

Zuwendungsempfänger bzw. ausführende Stelle

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

Institut für Tierernährung
Friedrich-Loeffler-Institut (FLI)
Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit
Bundesallee 50
38116 Braunschweig

Forschungsprojekt Nr. 07HS007

Thema: Untersuchungen zur Belastung von Getreidestroh mit Fusarium-Toxinen und Ochratoxin A sowie zur Bioverfügbarkeit von Deoxynivalenol und Zearalenon aus Weizenstroh

Laufzeit
01.08.2007 – 31.12.2009

Berichtszeitraum
01.08.2007 – 31.12.2009

Gemeinsame Zusammenfassung

Stroh wird in der Tierhaltung überwiegend als Einstreumaterial verwendet. Dabei ist davon auszugehen, dass es durch die Tiere aufgenommen wird, was sowohl Wiederkäuer als auch Monogastriden betrifft. Daneben kommt es als strukturwirksame Rationskomponente insbesondere in der Wiederkäuerfütterung zum Einsatz.

In den letzten Jahren wurde ein Spektrum an Typ-A und -B Trichothecenen sowie Zearalenon (ZON) in Getreidekörnern nachgewiesen; es existieren jedoch kaum Angaben zum Vorkommen dieser Mykotoxine im Stroh. Experimentelle Befunde deuten aber darauf hin, dass eine massive Kontamination von Weizenkörnern mit Deoxynivalenol (DON) sowie ZON auch mit einer erhöhten Konzentrationen in der Restfraktionen der Weizenpflanze (Spelzen, Spindeln, und Stroh) einhergeht. Dabei ist zu berücksichtigen, dass DON und ZON nur als Indikator-Toxine aufzufassen sind, da bei einer *Fusarium*-Infektion mit einer Kontamination durch weitere Toxine zu rechnen ist. Außerdem kann bei Lagerung des Strohs unter ungünstigen Bedingungen Ochratoxin A (OA) gebildet werden.

Ziel des Projektes war es, eine Abschätzung des möglichen Beitrags von Stroh zur Mykotoxinexposition von landwirtschaftlichen Nutztieren vorzunehmen, weshalb die folgenden vier Ansätze verfolgt wurden: ein deutschlandweiter Screeningversuch von Getreidestroh der Erntejahre 2007 und 2008, Versuche zur Strohlagerung, Versuche zu maskierten Toxinen sowie Tierversuche zur Bioverfügbarkeit von DON.

In einem zweijährigen bundesweiten Screeningversuch wurde das Vorkommen von Typ-A- und -B Trichothecenen, sowie ZON und OA in Getreidestroh untersucht. Die Strohproben wurden von amtlichen Probenehmern entsprechend der Futtermittelprobenahme- und Analysenverordnung entnommen und die beigelegten Fragebögen in Zusammenarbeit mit den Landwirten ausgefüllt. Durch Korrelation der Toxingehalte mit den Angaben aus dem Fragebogen wurden Hinweise auf den Einfluss acker- und pflanzenbaulicher Maßnahmen, durch Korrelation mit Wetterdaten Hinweise auf den Einfluss der Witterung auf den Toxingehalt von Stroh gesucht.

Die makroskopischen Befunde der Strohproben ergaben einen meist positiven Futterwert, hingegen zeigten sich leichte bis deutliche hygienische Mängel. Eine Multitoxinbelastung der Strohproben mit einem Spektrum an *Fusarium*-Toxinen wurde nachgewiesen. DON war im Hinblick auf Häufigkeit des Vorkommens und Gehalt das dominierende Toxin. Die DON-Gehalte lagen zwischen 16 und 23269 µg/kg, der mittlere Gehalt lag bei 1234 µg/kg und der

Median bei 439 µg/kg. OA wurde lediglich in einer von 201 Strohproben im Spurenbereich von 1,5 µg/kg detektiert, weshalb von einer sehr geringen Belastung durch dieses Lagertoxin auszugehen ist. Es konnte ein unterschiedliches Trichothecenvorkommen in den beiden Versuchsjahren beobachtet werden. Insgesamt zeichnete sich sowohl in der sensorischen Beurteilung als auch in der Analyse der *Fusarium*-Toxine eine schlechtere Qualität bzw. höhere Belastung des Strohs im Erntejahr 2007 im Vergleich zum Jahr 2008 ab. Zwischen Weizen- und Gerstenstroh ergab sich eine Belastung mit unterschiedlichem Trichothecenspektrum. Weiterhin wurden Unterschiede in Trichothecengehalten von Stroh je nach geographischer Herkunft beobachtet; ebenso ergaben sich Hinweise auf Unterschiede in Proben, die verschiedenen ackerbaulichen Maßnahmen unterlagen. Die Trockensubstanzgehalte (TS-Gehalt) der Screeningproben lagen im Mittel bei 89,1% im Jahr 2007 und 88,6% im Jahr 2008.

Es fanden sich keine höheren Toxingehalte in Proben, die nach längerer Lagerungsdauer entnommen worden waren im Vergleich zu solchen mit kürzerer Lagerdauer. Dies deckt sich mit dem Ergebnis aus den beiden durchgeführten Lagerversuchen, die ergaben, dass bei der Lagerung von Stroh nicht mit einem weiteren Anstieg der Gehalte an Trichothecenen zu rechnen ist, wenn der TS-Gehalt eine Lagerfähigkeit sicherstellt (~86 %). In den beiden Versuchen kam es eher zu einer Reduzierung in den Konzentrationen der Trichothecene bei ansteigenden Feuchtegehalten des gelagerten Strohs (> 14%), wohingegen gleichzeitig eine Zunahme von ZON festzustellen war. Daher sollte bei der Lagerung von Stroh auf einen Schutz vor der Witterung geachtet und ein maximaler Feuchtegehalt von 14% nicht überschritten werden.

Um Informationen über eine zusätzliche Belastung der Nutztiere mit sogenannten maskierten Toxinen, die durch chemische Bindung der Toxinanalyse nicht zugänglich sind, zu erhalten, wurden ausgewählte Strohproben mit Hilfe chemischer und enzymatischer Hydrolyse untersucht. Außerdem wurde zur Untersuchung ein *in vitro*-Modell, das den Magen-Darm Trakt des Tieres simuliert, eingesetzt. Mit den angewandten Methoden konnte keine Freisetzung möglicherweise maskierter Toxine aus den Strohproben nachgewiesen werden.

Die Abschätzung der Bioverfügbarkeit von DON mittels Kinetikversuchen (Vergleich der Flächen unter den Kurven der zeitabhängigen DON-Konzentrationen im Blut) ergab für Kaff (Mischung aus Spelzen und Spindeln) im Vergleich zu Körnern eine höhere und beim Stroh eine verminderte Bioverfügbarkeit, allerdings konnten diese Werte auf Grund der hohen Schwankungen nicht statistisch abgesichert werden.

Um den Einfluss der Infektion des Weizen mit *Fusarium* und des hohen NDF-Anteils im Stroh auf die Aufnahme, die Metabolisierung und die Ausscheidung von DON und seinem Metaboliten de-epoxy-DON über Kot und Harn sowie die Verdaulichkeit der Rohnährstoffe aus Stroh, Körnern und Kaff zu untersuchen, erfolgte ein Bilanzversuch mit sechs Schweinen zur Untersuchung des DON-Metabolismus unter steady-state-Bedingungen. In diesem Versuch konnte ein leichter Rückgang der prozentualen DON-Ausscheidung über den Kot durch den höheren NDF-Gehalt im Stroh und Kaff beobachtet werden. Die renale Ausscheidung von DON und de-epoxy-DON kann ebenfalls als Indikator der systemischen Bioverfügbarkeit angesehen werden, da nur in die systemische Zirkulation absorbiertes Toxin über die Nieren ausgeschieden wird. Die prozentuale Ausscheidung von DON über den Harn sowie von de-epoxy-DON über Kot und Harn blieb sowohl vom NDF-Gehalt als auch vom DON-Gehalt der Ration unbeeinflusst. Die Verdaulichkeit der Gesamtration nahm in den Varianten mit hohem NDF-Anteil (Stroh, Kaff) erwartungsgemäß ab und spiegelte sich in der Rohproteinverdaulichkeit und der Verdaulichkeit der NDF-Fraktion wider. Die Inokulation des Weizens ergab keine Unterschiede in den Verdaulichkeiten dieser Nährstofffraktionen. Beide Parameter veränderten die Verdaulichkeiten des Rohfettes, der Rohfaser sowie der ADF-Fraktion nicht.

Die ermittelten Daten zur Kontamination von Stroh und die vergleichbare Bioverfügbarkeit (Kinetikversuch und Bilanzversuch) von DON aus Stroh, Kaff und Körnern, führen zu der Schlussfolgerung, dass Stroh in Abhängigkeit von der Höhe der täglichen Strohaufnahme zur Mykotoxin-Exposition landwirtschaftlicher Nutztiere beitragen kann. Insbesondere die gelegentlich auftretenden hohen Gehalte an DON können signifikant zur oralen oder inhalativen Exposition von Schweinen beitragen.

Für den Menschen ist bei dem Umgang mit stark belastetem Stroh eine Inhalation (z.B. Dreschen, Stallarbeit) von Mykotoxinen nicht auszuschließen. Deshalb sollte bei der Verwendung von Stroh als Futterkomponente oder Einstreu auf einen hygienisch einwandfreien Zustand des Strohs und auf gute Lagerbedingungen geachtet werden.

Zuwendungsempfänger bzw. ausführende Stelle

Universität Hohenheim
Verwaltung
Schloss Mittelbau
70599 Stuttgart

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

Forschungsprojekt Nr. 07HS007

Thema: Untersuchungen zur Belastung von Getreidestroh mit *Fusarium*-Toxinen und Ochratoxin A sowie zur Bioverfügbarkeit von Deoxynivalenol und Zearalenon aus Weizenstroh

Laufzeit
01.08.2007 – 31.12.2009

Berichtszeitraum
01.08.2007 – 31.12.2009

In Zusammenarbeit mit:

Friedrich-Loeffler-Institut (FLI)
Institut für Tierernährung
Bundesallee 50
38116 Braunschweig

1. Ziele und Aufgabenstellung des Vorhabens

Ziel des Projektes war es durch einen deutschlandweiten Screeningversuch die Belastung von Getreidestroh mit *Fusarium*-Toxinen und Ochratoxin A zu ermitteln. Da neben der Kornfraktion der Getreidepflanze auch die Restfraktion (Stroh) mit *Fusarium*-Toxinen belastet sein kann und diese in der Tierhaltung als Einstreumaterial und Futterkomponente verwendet wird, sollen die erzielten Ergebnisse dazu dienen, eine Abschätzung des tatsächlichen Beitrags von Stroh zur Mykotoxinexposition von Nutztieren zu ermöglichen.

Versuche zu maskierten *Fusarium*-Toxinen in Stroh sollen Erkenntnisse über die Bioverfügbarkeit dieser Toxine geben.

1.1 Planung und Ablauf des Vorhabens

a. Bundesweiter Screeningversuch in Stroh der Ernte 2007 und 2008 wurde ausgeführt

Zur Feststellung der bundesweiten Belastung von Stroh mit *Fusarium*-Toxinen und Ochratoxin A (OA) wurde ein Screening mit amtlich entnommenen Proben aus 2 Erntejahren und aus allen Bundesländern entsprechend ihrem Strohaufkommen durchgeführt.

Zur Entnahme amtlicher Proben konnten die Verantwortlichen der Futtermittelüberwachung der Länder gewonnen werden.

Ein Fragebogen mit Angaben zu Getreideart, -sorte, Vorfrucht, Bodenbearbeitung etc. wurde an die zuständigen Stellen der Futtermittelüberwachung übermittelt (s. Anlage 1) und bei Probeneingang ausgewertet. Nach Vorliegen aller Proben wurden die Angaben aus den Fragebögen statistisch mit den Toxingehalten der jeweiligen Proben korreliert. Die Wetterdaten, wie Temperatur und Niederschlag wurden für jedes Bundesland und die beiden Versuchsjahre vom Deutschen Wetterdienst erfragt.

b. Trichothecenbestimmung in Proben aus Versuchen zur Strohlagerung

Die aus den Versuchen zur Strohlagerung aus dem FLI erhaltenen Proben wurden auf ein Spektrum an 13 Trichothecentoxinen analysiert und die Ergebnisse übermittelt.

c. Versuche zu maskierten Toxinen wurden durchgeführt

Um Untersuchungen zu maskierten Toxinen durchzuführen, wurden ausgewählte Strohproben einer chemischen bzw. enzymatischen Hydrolyse unterzogen. Das verwendete Enzymgemisch bestand aus α -Amylase, Cellulase, Invertase, Peptidase, Phosphatase und Sulfatase. Weiterhin wurden die Proben in einem *in vitro*-System, das durch den Einsatz spezifischer Enzyme und

entsprechender pH-Werte die Verhältnisse im Verdauungstrakt simuliert, auf die Freisetzung an maskierten Toxinen geprüft.

1.2. Wissenschaftlicher und technischer Stand

Getreidestroh beträgt im bundesdeutschen Mittel ca. 8 % des Getreideaufkommens und gilt somit als wichtigstes Nebenprodukt des Getreideanbaus. In der Wiederkäuerfütterung kann Getreidestroh durch seine rohfaserreiche, energie- und proteinarme Zusammensetzung vorwiegend bei Wiederkäuern mit geringem Leistungsniveau bzw. als Strukturkomponente eingesetzt werden, wobei die tägliche Strohaufnahme mehrere Kilogramm betragen kann. In diese Tiergruppe fallen trockenstehende Kühe, weibliche Jungrinder, Milchkühe im letzten Laktationsdrittel oder auch niedertragende Mutterschafe. Stroh wird auch oft eingesetzt um den Mindestrohfasergehalt von Futtermischungen von 16% zu decken (Flachowsky, 1987).

In der Schweinehaltung wird Stroh zwar nicht als Rationskomponente eingesetzt, jedoch kann nach van Barneveld (2005) die Strohaufnahme von Schweinen die auf Stroh gehalten werden bis zu 14 % der Ration (Gesamttagesration) ausmachen. Der pilzliche Verderb des Strohs vermindert nicht nur den Ertrag, sondern stellt auch durch die Produktion von Toxinen ein Risiko für die Gesundheit und Leistungsfähigkeit landwirtschaftlicher Nutztiere dar. Je nach Auftreten verschiedener *Fusarium*-Arten und deren Toxinproduktion kann es durch die orale Aufnahme großer Toxinmengen zu einer verminderten Futteraufnahme, geringeren Zunahmen, Erbrechen, Durchfall, Fertilitätsstörungen und einer höheren Anfälligkeit für andere Krankheiten kommen.

Auf Getreide ist ein breites Spektrum an A- und B-Trichothecenen, sowie Zearalenon und Ochratoxin A nachgewiesen (Bottalico, 1998).

Untersuchungen von White et al. (2007) und Berner et al. (2005) deuten darauf hin, dass bei einer erhöhten Kontamination der Getreidekörner auch die Restfraktion der Getreidepflanze hohe Toxinkonzentrationen enthalten kann. Diese Untersuchungen stützen sich jedoch fast ausschließlich auf die Toxine Deoxynivalenol (DON) als Vertreter der B-Trichothecene und Zearalenon (ZON), die als Leittoxine aufgefasst werden. Mit einer Produktion von weiteren Toxinen ist zu rechnen. Hier besteht noch großer Forschungsbedarf, da gerade die hochtoxischen A-Trichothecene (z.B. T-2 Toxin) ein erhebliches Gesundheitsrisiko bergen. Daher sind gesicherte Erkenntnisse zum Vorkommen eines breiten Spektrums an Toxinen im Getreidestroh von großem Interesse.

2003 führten Köhl und Waalwijk (2007) Untersuchungen zur *Fusarium*-Besiedlung von abgereiften Weizenpflanzen durch und beobachteten in den Stängeln und Blättern im

Vergleich zu den analysierten Körnern (fast ausschließlich *F. culmorum*) eine erheblich höhere Konzentration an *Fusarium*. Zudem wurden neben *F. culmorum* auch *F. graminearum* und *F. avenaceum* nachgewiesen. Diese Untersuchung konnte auch zeigen, dass in den Strohteilen zum Zeitpunkt der Ernte der größte Anteil dieser Erreger nachzuweisen war.

F. graminearum ist die dominierende *Fusarium*-Art auf Weizenkörnern, aber auch *F. culmorum* kann diese Getreideart befallen (Waalwijk et al., 2003, Mastél und Michels, 2000). Eine weitere Untersuchung in Süddeutschland wurde von Müller et al. (2001) an Weizenpflanzen durchgeführt. DON (86%) war das dominierende Toxin, gefolgt von Nivalenol (NIV) (38%), 3-Acetyldeoxynivalenol (3-ADON) (24%), ZON (20%), HT-2 Toxin (HT-2) (6%) und T-2 Toxin (T-2) (6%). White et al. (2007) fanden in 40 Strohproben, gesammelt in Mittel- und Südengland mittlere DON-Gehalte in Weizenstroh von 460 µg/kg und Maximumwerte über 1900 µg/kg. ZON zeigte bei dieser Untersuchung einen Mittelwert von 23 µg/kg und einen Maximumwert von 498 µg/kg.

Das Erregerspektrum von Gerste unterscheidet sich von dem von Weizen. Vor allem die Arten *F. poae*, *F. tricinctum*, *F. sporotrichioides* und *F. avenaceum* treten in der Gerste verstärkt auf. Diese Arten sind in der Literatur als Bildner der Trichothecene vom A-Typ beschrieben. Lediglich *F. culmorum* konnte als DON-Bildner häufiger nachgewiesen werden (Heß et al., 2009). Auch Mastél und Michels (2000) beobachteten *F. sporotrichioides* als dominierende Art in Gerste. In Gerstenkörnern fand Edwards (2009) DON, HT-2 und T-2 in 57, 36 bzw. 12% der Proben.

Der Einfluss acker- und pflanzenbaulicher Maßnahmen auf den Toxingehalt von Getreidekörnern wurde in zahlreichen Versuchen nachgewiesen. Für die Strohfraktion wurden diese Einflussfaktoren nur wenig untersucht. Berner et al. (2005) ermittelten mit ihren Untersuchungen zum Einfluss der Bodenbearbeitung auf den DON-Gehalt von Weizenkörnern und Weizenstroh erste Ergebnisse. Die wendende Bodenbearbeitung mit dem Pflug führte sowohl bei den Körnern als auch beim Stroh zu einer Reduzierung des DON-Gehaltes.

Pflanzen sind in der Lage sich durch Abwehrmechanismen gegen das Eindringen von Fremdstoffen oder deren toxische Wirkung zu schützen. Um die Toxizität der Mykotoxine zu reduzieren werden diese chemisch modifiziert. Dieser chemische Prozess der Detoxifizierung kann durch Konjugation der Mykotoxine an polare Substanzen wie Zucker, Aminosäuren oder Sulfate geschehen, die anschließend in Vakuolen gelagert werden können (Berthiller et al., 2005). Nach Versuchen von Gareis (1994) konnte bewiesen werden, dass Schweine in der Lage sind nach oraler Gabe von Zearalenon-Glucosid dieses in freies ZEA vollständig

aufzuspalten. Die Mikroflora im Verdauungstrakt sorgt für die Freisetzung des Toxins aus der Verbindung und erhöht somit die Bioverfügbarkeit.

2. Material und Methoden

a.) Bundesweiter Screeningversuch in Stroh der Ernte 2007 und 2008

201 Strohproben aus den verschiedenen Bundesländern, entsprechend dem jeweiligen Strohaufkommen, wurden von den amtlichen Stellen der Länder aus der Ernte 2007 und 2008 zur Verfügung gestellt. Es handelt sich um 80 Weizen-, 79 Gersten-, 12 Roggen-, 12 Triticale-, 11 Hafer- und 1 Dinkelstrohprobe, für 6 der eingesandten Strohproben existieren keine Angaben zur Getreideart. Tabelle 1 zeigt die Zahl der jeweils erhaltenen Proben pro Versuchsjahr.

**Tabelle 1: Probenzahlen aus der Ernte 2007 und 2008 nach Bundesländern
gegliedert**

Bundesland	Probenzahl 2007 (106)	Probenzahl 2008 (95)
Schleswig-Holstein	8	9
Hamburg	0	0
Niedersachsen	18	14
Nordrhein-Westfalen	9	9
Hessen	4	4
Rheinland-Pfalz	7	4
Baden-Württemberg	8	7
Bayern	29	29
Mecklenburg-Vorpommern	4	2
Brandenburg	5	4
Sachsen-Anhalt	3	3
Sachsen	4	3
Thüringen	4	4
Saarland	3	3

Die eingesandten Proben wurden:

- makroskopisch und sensorisch beurteilt
- homogenisiert und geteilt, eine Teilprobe an das Friedrich-Loeffler-Institut in Braunschweig zur Analyse auf ZON und OA geschickt
- analysiert auf ein Spektrum an Trichothecenen

Die Ergebnisse wurden statistisch ausgewertet und mit den Angaben aus dem Fragebogen korreliert.

Makroskopische Beurteilung der Strohproben:

Die makroskopische Beurteilung erfolgte nach Kamphues et al. (2004). Die Untersuchung mittels sensorischer Prüfung wurde bezüglich des Futterwertes und des Hygienestatus vorgenommen.

Tabelle 2: Sensorische Prüfung von Stroh (Kamphues et al., 2004)

Parameter	Futterwert (Energiegehalt und Akzeptanz)	Pkt	Hygienestatus (bzw. gesundheitliche Risiken)	Pkt
Griff	arttypisch (höherer Blattmasseanteil)	12	trocken-spröde	0
	sperrig (wenig Blattmasse)	5	leicht klamm (nesterweise)	-2
	holzige-reisigartig	0	klamm-feucht, elastisch	-5
Geruch	typischer Strohgeruch	3	frei von Fremdgeruch	0
	flach	0	leichtdumpf- muffige Nuance schimmelig-modrig	-5 -10
Farbe	intensiv-leicht goldig hell	3	leicht gedunkelt schmutzig grau-braun-	0
	ausgeblichen	1	schwärzlich nesterweise grau-weiße/ schwarz-rote Verfärbungen	-5 -10
	Verunreinigungen	frei von Verunreinigungen	2	Besatz mit Schimmel, Käfern, Milben, Unkraut
	leichte Sandbeimengungen	1	frei	0
	stärkere Sand-Erd- Beimengungen	0	mittlerer Besitz starker Besitz	-5 -10

Nach der Beurteilung wurden die Punkte und Minuspunkte addiert und entsprechend Tab. 3 untergliedert.

Tabelle 3: Einteilung der Proben bezüglich des Futterwertes und des Hygienestatus nach Punkten

Futterwert	Punkte	Hygienestatus	Punkte
günstig	15 - 20	einwandfrei	0
durchschnittlich	8 - 14	leichte Mängel	-1 bis -5
deutlich gemindert	4 - 7	deutliche Mängel	-6 bis -10
sehr gering	4	massive Mängel	-11 bis -30

Bestimmung des Wassergehaltes

Der Trockenmassegehalt der Proben wurde gravimetrisch nach einer Trocknung bei 103°C für vier Stunden nach Naumann und Basler (1979) bestimmt. Es wurden Gehalte zwischen 80% und 95% festgestellt.

Alle angegebenen Toxingehalte wurden auf einen Trockenmassegehalt von 88% bezogen.

Analytik

Trichothecene

Für die Analytik der Strohproben wurde die nach Schollenberger et al. (1998, 2005) beschriebene Methode verwendet.

5 g des auf 1 mm gemahlten Strohs wurden in eine 250 ml Schraubflasche eingewogen, mit 100 ml Acetonitril (ACN)/Wasser (H₂O_{bidest}) 75/25 (v/v) versetzt und anschließend am Horizontalschüttler für 1 h geschüttelt. Der Extrakt wurde über einen Faltenfilter abfiltriert. 63 ml des Filtrats wurden in einen 250 ml Scheidetrichter überführt und mit 50 ml Hexan 10 sec. geschüttelt. Nach der Phasentrennung wurde die untere wässrige Phase in einen 250 ml Rundkolben abgelassen, mit 60 ml Ethanol versetzt und bei einer Badtemperatur von 40°C zur Trockene abrotiert.

Der Rückstand wurde in 2,5 ml Methanol (MeOH) aufgenommen, ca. eine halbe Minute im Ultraschallbad gelöst und quantitativ in ein 5 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Danach wurde für 10 min bei 3360 × g und 20°C zentrifugiert. 2 ml des Überstandes wurden in ein Zentrifugenglas mit Schraubverschluss überführt, mit 18 ml Essigester (EE) versetzt und unter den genannten Bedingungen erneut zentrifugiert. 0,5 g Natriumsulfat (getrocknet, bei 130°C für 4h) wurden auf eine Florisilkartusche (MEGA-BE-FL, 5 GM, 20 ML, Bond Elut

Solid Phase Extraktion; Varian inc.) gegeben und diese mit 20 ml Hexan konditioniert. 12 ml des abzentrifugierten Probenextraktes wurden auf die Kartusche gegeben und das Eluat in einen 100 ml Spitzkolben aufgefangen. Mit 35 ml EE/MeOH 90/10 (v/v) wurde nachgespült, die vereinigten Eluate im Spitzkolben aufgefangen und bei 240 mbar bis zur Trockene einrotiert (Wasserbad 40°C).

Anschließend erfolgte eine Aufarbeitung über eine Kationenaustauscherkartusche (MEGA CBA, 1 GM, 6 ML, Bond Elut Solid Phase Extraktion, Varian inc.). Diese wurde zuvor mit 10 ml 1 M Essigsäure, 20 ml 0,05 M Essigsäure und 10 ml MeOH/0.05 M Essigsäure (HAc) (40/60, V/V) konditioniert.

Die Probe wurde in 2,5 ml MeOH gelöst, anschließend 5,8 ml 0,05 M HAc hinzu gegeben und danach quantitativ auf die Kartusche aufgegeben. Mit 35 ml MeOH/HAc Elutionsmittel wurde nachgespült, die Eluate gemeinsam gesammelt, zur Trockene einrotiert und bis zur Analyse bei – 20°C gelagert.

Für die anschließende Derivatisierung wurde die Probe in ACN gelöst, die entsprechende Menge in ein 5 ml Reactivial überführt, Verrucarol zur Kontrolle der Derivatisierung zugegeben und unter Stickstoff bei 40°C zur Trockene eingengt.

Derivatisierung

20 – 30 mg Natriumhydrogencarbonat wurde in alle Reactivals gegeben. Anschließend wurden 400 µl Trifluoressigsäureanhydrid (TFAA) hinzupipettiert. Die Proben wurden bei 80°C für 30 min im Thermoblock derivatisiert, auf Raumtemperatur abgekühlt und zur Entfernung des überschüssigen TFAA's 20 min unter Stickstoff abgeblasen. 100 µl Toluol wurden hinzupipettiert, gemischt und 5 min stehen gelassen, 1000 µl H₂O_{bidest} versetzt und bis zur Phasentrennung stehen gelassen.

Im nachfolgenden Trocknungsschritt wurden in ein Probengefäß mit Einsatz 5 – 10 mg Natriumsulfat (getrocknet) vorgelegt, die Toluolphase auf das Natriumsulfat gegeben und am Whirlmixer gemischt. Die Toluolphase wurde anschließend zur Analyse eingesetzt und mittels GC/MS auf ein Spektrum an Trichothecentoxinen untersucht. Es erfolgte eine externe Eichung unter Matrixzusatz.

Es wurden folgende Toxine analysiert: Aus der Gruppe der B-Trichothecene DON, 15-Acetyldeoxynivalenol (15-ADON), 3-ADON, NIV, Fusarenon-X (FUS-X), aus der Gruppe der A- Trichothecene Scirpentriol (SCIRP), 15-Monoacetoxyscirpenol (MAS), 4,15-Diacetoxyscirpenol (DAS), HT-2, T-2, T-2 Tetraol (T-2 TETRA), T-2 Triol (T-2 TRIOL) und Neosolaniol (NEO).

Die Methode wurde validiert. Die Nachweisgrenzen der Trichothecene wurden in Strohmatrix bei einem Signal/Rauschverhältnis von 3:1 festgelegt und lagen zwischen 4 und 28 µg/kg. Die Wiederfindungsraten wurden bei einem Zusatz von 400 µg/kg an Toxin ermittelt und lagen zwischen 69 und 87% mit der Ausnahme von NIV mit einer Wiederfindungsrate von 51%. Bei der Bestimmung der Reproduzierbarkeit lagen die relativen Standardabweichungen bei einer Wiederholungsrate von n = 5 zwischen 1,4 und 10,9%.

b. Trichothecenbestimmung in Proben aus Versuchen zur Strohlagerung

Proben aus den am Friedrich-Loeffler-Institut Braunschweig, durchgeführten Lagerversuchen (Witterungsversuch und Weckglasversuch) wurden auf ein Spektrum an 13 Trichothecentoxinen analysiert und die Ergebnisse übermittelt.

c. Maskierte Toxine

Es wurden ausgewählte Proben aus dem Screeningversuch des Erntejahres 2007 sowie Proben (Korn, Kaff, Stroh) aus den Fütterungsversuchen am FLI in Braunschweig untersucht. Die Analyse der Strohproben auf maskierte Toxine erfolgte mittels chemischer bzw. enzymatischer Hydrolyse und mit Hilfe eines *in vitro*-Systems.

- Chemische Hydrolyse

a) saure Hydrolyse mit Trifluoressigsäure (TFA)

nach Liu et al. (2005) und Zhou et al. (2007) modifiziert:

Je Probe wurden 2 g Probenmaterial in ein Aufschlussgefäß eingewogen und mit 20 ml ACN/H₂O (84/16, v/v), 10 ml H₂O und 5 ml 1 molarer TFA versetzt. Für die Kontrollansätze erfolgte die gleiche Aufarbeitung jedoch ohne Zugabe von TFA. Die Proben wurden bei 140°C für 40 min im Trockenschrank inkubiert. Anschließend wurden 5 ml Kaliumhydroxidlösung (KOH) (1 M) mit ACN auf ein Probenvolumen von 50 ml ergänzt. Der Ansatz wurde abfiltriert und 35 ml des Filtrates in einen 250 ml Spitzkolben überführt und bei 270 mbar am Rotationsverdampfer abrotiert (Wasserbad 40°C).

Die Probe wurde anschließend in 10 ml ACN gelöst, in ein Zentrifugenröhrchen überführt und bei 3360 × g und 20°C 10 min zentrifugiert. 5 ml des Überstandes werden abpipettiert, mit 1 ml H₂O versetzt und über die MultiSep 225 Trichothecen Kartusche (Romer Labs) gegeben. 4 ml des Eluates wurden in einen 5 ml Spitzkolben überführt und abrotiert. Die Probe wurde mit ACN in ein Reaktionsgefäß überführt und unter N₂ zur Trockene eingedampft. Für diese Analyse wurden insgesamt 34 Ansätze aufgearbeitet.

- Enzymatische Hydrolyse - Behandlung mit Clara-Diastase

Bei der Clara-Diastase handelt es sich um ein Enzymgemisch bestehend aus α -Amylase, Cellulase, Invertase, Peptidase, Phosphatase und Sulfatase. Je Probe wurden drei Ansätze mit Clara-Diastase (A) und drei ohne das Enzymgemisch (B) aufgearbeitet, woraus sich ein Analysenvolumen für diesen Versuchsansatz von 66 Ansätzen ergab. Die Bestimmung wurde nach einer modifizierten Methode des Analytical Methods Committee (2000) durchgeführt.

A) 5 g gemahlene Stroh oder 10 g gemahlene Korn und 0,5 g Clara-Diastase wurden in eine Schraubflasche mit 50 ml Acetatpuffer (0,1 M, pH 4,5) versetzt und im Schüttel-Wasserbad 16 – 17 h bei 37°C inkubiert.

B) 5 g gemahlene Stroh oder 10 g gemahlene Korn wurden in eine Schraubflasche mit 50 ml Acetatpuffer (0,1 M, pH 4,5) versetzt und in einem Schüttel-Wasserbad bei 37°C 16 – 17 h inkubiert.

Nach der Inkubation wurden die Proben über einen Faltenfilter filtriert und 10 ml auf eine ChemElut-Kartusche (Probenvolumen max. 20 ml, Varian) pipettiert. Nach 15 minütiger Einwirkzeit wurde der Rückstand mit 70 ml EE / MeOH 92/8 (v/v) eluiert und in einem 100 ml Spitzkolben aufgefangen und abrotiert. Nach Zugabe von MeOH wurde das Gemisch in ein Reaktionsgefäß überführt und zur Trockene eingedampft.

- *In vitro* Modell des Verdauungstraktes

Der *in vitro*-Versuch stellte eine Simulation des Verdauungstraktes des Schweins dar, es wurden sowohl die Verhältnisse im Magen als auch im Darm geprüft (Schollenberger et al., 2008a). Das Verhältnis von Stroh (Futter) zu Inkubationsmedium wurde in Anlehnung an Döll et al. (2004) berechnet.

550 mg Stroh/Korn wurden je Probe eingewogen. Je Probe wurden 3 Ansätze mit künstlichem Magensaft mit Enzym, 3 Ansätze mit künstlichem Magensaft ohne Enzym, 3 Ansätze mit Darmsaft mit Enzym und 3 Ansätze mit Darmsaft ohne Enzym aufgearbeitet. Der Magen- und Darmsaft wurde nach Joel et al. (1995) wie folgt hergestellt:

Magensaft (mit Enzym):

Es wurden 2 g Natriumchlorid (NaCl) + 3,2 g Pepsin (77161; Pepsin from porcine gastric mucosa; Fluka Chemie GmbH, keine Angaben über weitere enthaltene Enzyme vom Hersteller verfügbar, aus der Literatur das Vorkommen von alkalischer Phosphatase, Aspartataminotransferase, β -Glucuronidase, Leucinaminopeptidase, Ornithinetranscarbamylase und Glutamatpyruvattransaminase beschrieben (Piper et al., 1965)) mit 800 ml H_2O_{bidest} versetzt und gelöst; mit 0,1 M Salzsäure (HCL) auf pH 3 eingestellt und auf 1 l aufgefüllt.

Magensaft (ohne Enzym):

Es wurden 2 g NaCl mit 800 ml H_2O_{bides} versetzt und gelöst; mit 0,1 M HCL auf pH 3 eingestellt und auf 1 l aufgefüllt.

Darmsaft (mit Enzym):

Es wurden 3,4 g Kaliumhydrogenphosphat (KH_2PO_4) + 5 g Pancreatin (P8096; Pancreatin from hog pancreas; weitere enthaltene Enzyme: Amylase, Trypsin, Lipase, Ribonuklease und Protease; SIGMA-Aldrich Chemie GmbH) + 95 ml 0,2 M Natronlauge (NaOH) mit 350 ml H_2O_{bidest} versetzt, mit NaOH auf pH 7,5 eingestellt und auf 500 ml aufgefüllt.

Darmsaft (ohne Enzym):

Es wurden 3,4 g KH_2PO_4 + 95 ml 0,2 M NaOH mit 350 ml H_2O_{bides} versetzen. Mit NaOH auf pH 7,5 eingestellt und auf 500 ml aufgefüllt.

Je Probe wurden drei Ansätze analysiert, woraus sich ein Volumen von 168 Ansätzen ergab.

550 mg Stroh/Korn wurden in 50 ml Zentrifugenröhrchen eingewogen und mit 15 ml Magensaft (mit und ohne Enzym)/Darmsaft (mit und ohne Enzym) versetzt. Die Inkubation mit Magen- und Darmsaft erfolgte separat.

3* Probe + Magensaft mit Enzym → + 4 h

3* Probe + Magensaft ohne Enzym → + 4 h

3* Probe + Darmsaft mit Enzym → + 4 h

3* Probe + Darmsaft ohne Enzym → + 4 h

Die Proben wurden im Wasserbad unter Schütteln bei 37°C für 4 h inkubiert und anschließend bei $2630 \times g$ bei 4°C für 10 min zentrifugiert. Die abdekantierte Flüssigkeit wurde in 15 ml Plastikzentrifugenröhrchen überführt und bis zur weiteren Aufarbeitung tiefgefroren. Die Proben wurden aufgetaut und 10 ml auf die ChemElut-Kartusche

(Probenvolumen max. 20 ml, Varian) gegeben. Nach einer 15 minütigen Einwirkzeit wurde mit 70 ml EE/MeOH (92/8, v/v) eluiert, eingengt, mit ACN in ein Reaktionsgefäß überführt und unter N₂ zur Trockene eingedampft.

Die Bestimmung von A- und B-Trichothecenen erfolgte am GC/MS. In Proben die DON enthielten aber keine A-Trichothecene wurde die Bestimmung des Toxins mittels HPLC/FLD mit Nachsäulenderivatisierung mittels NaOH (0,15 M) und Methylacetoacetat (0,03 M) + Ammoniumacetat (2 M) (Schollenberger et al., 2008b) durchgeführt. Die Untersuchung auf ZON erfolgte im Institut für Tierernährung des FLI Braunschweigs. Die Aufarbeitung erfolgte mittels Immunoaffinitätschromatographie und anschließender Messung an der HPLC/FLD. Es konnten insgesamt 50 Ansätze auf ZON analysiert werden. Diese wurden aus dem Versuch zur Hydrolyse mit TFA und der Behandlung mit Clara-Diastase ausgewählt, da sich die Proben aus dem *in vitro*-Versuch aufgrund der geringen Einwaage und des daraus resultierenden geringen Analysevolumens nicht zur Analyse auf ZON eigneten.

Statistische Auswertung

Alle erfassten Parameter wurden mit Hilfe des Statistikpaketes SAS 9.1 ausgewertet. Erst ab einem Anteil an mind. 20% positiven Proben (Ausnahmen angegeben) wurde eine statistische Auswertung vorgenommen. Waren Toxine nicht nachweisbar, so wurde der Wert der halben Nachweisgrenze eingesetzt. Die Daten waren nicht normalverteilt, weshalb alle Variablen nach Absprache mit Herrn Prof. Piepho (Institut für Bioinformatik, Universität Hohenheim) mit Hilfe von verteilungsfreien Tests ausgewertet wurden. Bei der Überprüfung der Signifikanz einzelner Toxine in verschiedenen Parametern (z.B. NIV in verschiedenen Stroharten) wurde der Kruskal-Wallis Test (Prozedur NPAR1WAY) für unabhängige Gruppen verwendet. Bestanden Zweifel an der identischen Verteilung wurden die Daten (mit ¹ gekennzeichneten) mit Hilfe des Mediantest ausgewertet, wobei sich der angegebene p-Wert auf die Rangmittel bezieht. Die Überprüfung einzelner Korrelationen (z.B. korreliert der DON-Gehalt mit den Ergebnissen aus der sensorischen Überprüfung) wurde mit der SAS Prozedur Proc Corr errechnet.

Die statistische Auswertung der Versuche zu maskierten Toxinen wurde mittels der Prozedur UNIVARIATE (PROC UNIVARIATE) auf Normalverteilung untersucht und die Signifikanzen mit der Prozedur PROC MIXED festgestellt. Das Signifikanzniveau wurde für einen p-Wert < 0,05 und eine Tendenz für 0,05 < p < 0,15 festgelegt.

3. Ergebnisse

3.1 Ausführliche Darstellung der wichtigsten Ergebnisse

a.) Screeningversuch

- Wetterdaten

Die Witterungsparameter wie die mittleren Niederschlagswerte (mm) und die Monatsmittel der Lufttemperatur (°C) wurden vom Deutschen Wetterdienst für die Monate März bis September der Versuchsjahre 2007 und 2008 für die einzelnen Bundesländer erfasst und zur Verfügung gestellt. Eine Übersicht über die Witterungsbedingungen gibt die Abbildung 1.

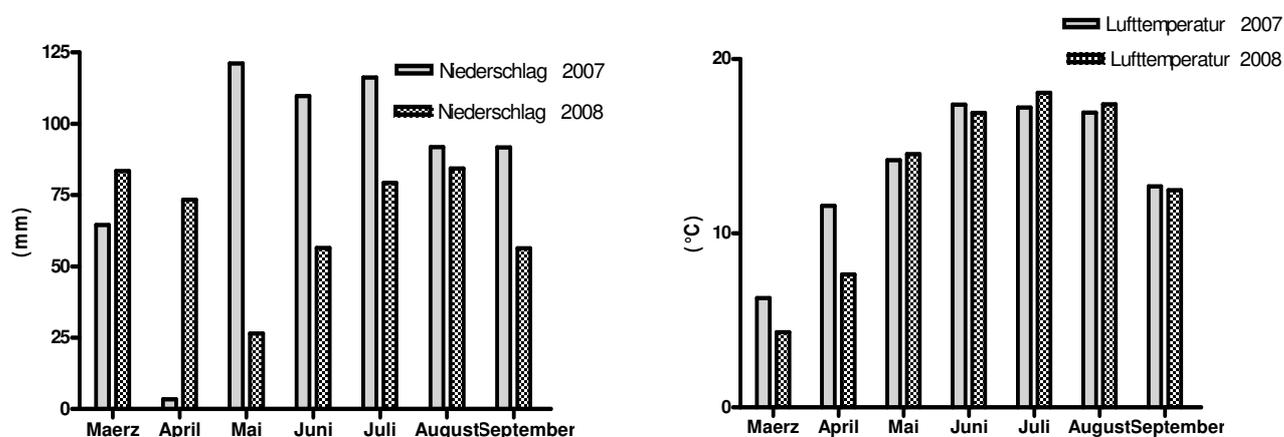


Abbildung 1: Monatsmittel des Niederschlags und der Temperatur in den Vegetationsperioden der Erntejahre 2007 und 2008

In den Erntejahren 2007 und 2008 lagen die Niederschlagsmengen von März bis Juli zwischen 38 und 98 mm, waren jedoch 2007 in den Monaten Mai, Juni und Juli um 95 mm, 53 mm bzw. 37 mm höher als in den entsprechenden Monaten des Erntejahres 2008. Die mittleren Lufttemperaturen waren in beiden Jahren vergleichbar und lagen zwischen Mai und August in beiden Jahren zwischen 14°C und 18°C.

Alle 201 Strohproben aus den beiden Erntejahren wurden nach der Methode nach Kamphues et al. sensorisch untersucht. Im Jahr 2007 zeigten 41% der Proben bezüglich des Hygienestatus deutliche (-6 bis -10 Punkte) bis massive (-11 bis -30 Punkte) Mängel. 59% der Strohproben waren einwandfrei (0 Punkte) oder zeigten lediglich leichte (-1 bis -5 Punkte) Mängel. 2008 wiesen 7% der Proben weniger deutliche bis massive Mängel auf. Über alle Proben ergab sich ein Mittelwert für den Hygienestatus des Strohs des Erntejahres 2007 von - 5,2 und 2008 ein Mittelwert von - 4,8. Bei der Beurteilung des Futterwertes im Erntejahr 2007 wurde nur 1 Probe von 106 mit einem deutlich geminderten Futterwert (4 bis 7) bewertet. Alle anderen Strohproben

wiesen einen durchschnittlichen (8 bis 14 Punkte) bis günstigen (15 bis 20 Punkte) Futterwert auf, was zu einem Durchschnittswert von 16,5 führte. 2008 hingegen zeigte die Sensorik bezüglich des Futterwertes eine durchweg durchschnittliche bis günstige Qualität bei einem Mittelwert von 16,7. Die Abbildungen 2 und 3 zeigen Stroh mit gutem bzw. schlechtem Hygienestatus.



Abbildung 2: Stroh mit gutem Hygienestatus



Abbildung 3: Stroh mit schlechtem Hygienestatus

Insgesamt wurden 201 Strohproben auf ein Spektrum an 13 Trichothecentoxinen, sowie ZON und OA untersucht. Lediglich das Toxin NEO wurde in keiner der analysierten Proben detektiert, OA wurde in einer Probe mit einem Gehalt von 1,5 µg/kg nachgewiesen. Über beide Erntejahre hinweg wurde DON als das dominierende Trichothecen hinsichtlich der Häufigkeit des Vorkommens und der Gehalte festgestellt (s. Tabelle 5). Das Toxin war in 83% der Proben mit Gehalten zwischen 16 und 23269 µg/kg nachweisbar, der mittlere Gehalt der positiven Proben lag bei 1234 µg/kg, der mediane Gehalt bei 439 µg/kg und die Variationsbreite bei 23253 µg/kg. Im Erntejahr 2007 war sowohl die Anzahl an positiven Proben, als auch der Mittel- und Maximumwert höher im Vergleich zum Erntejahr 2008. Die Trichothecene HT-2, T-2, T-2 TETRA, SCIRP, NIV, 15-ADON und 3-ADON waren in 55, 37, 9, 9, 32, 21 und 9% der 201 analysierten Proben nachweisbar. FUS-X, MAS, DAS und T-2 TRIOL wurden in weniger als 5 % der Proben detektiert.

Es wurden 2007 bis zu zehn Toxine in einer Probe nachgewiesen, durchschnittlich waren die Proben mit 4 der untersuchten Toxine belastet. Im Untersuchungsjahr 2008 konnten die Trichothecentoxine FUS-X, MAS, DAS, T2-TETRA und T2-TRI in keiner der 95 Strohproben detektiert werden, die Zahl der in einer Probe nachgewiesenen Toxine lag bei durchschnittlich 3. In diesem Erntejahr wurden bis zu 7 Toxine gleichzeitig in einer Probe gemessen.

ZON war in 46% der 201 Strohproben nachweisbar, die Gehalte lagen zwischen 7 und 767 µg/kg, der mittlere und mediane Gehalt bei 89 und 31 µg/kg. Auch dieses Toxin konnte im Jahr 2007 mit 55% positiven Proben häufiger nachgewiesen werden als im zweiten Versuchsjahr (2008: 37% pos. Proben).

**Tabelle 4: *Fusarium*-Toxingehalte in den Strohproben der Ernten 2007 und 2008
berechnet auf einen Trockenmassegehalt von 88 % (Mittelwert der pos. Proben)**

Toxine	Jahre	% positive Proben	Bereich (µg/kg)	MW ± s* (µg/kg)
NIV	insges.	32	21-2486	338 ± 486
	2007	40	21-2486	191 ± 376
	2008	23	21-2473	618 ± 555
FUS-X	insges.	0,5	33	33
	2007	1	33	33
	2008	0	-	-
DON	insges.	83	16-23269	1234 ± 2471
	2007	89	16-23269	1311 ± 3059
	2008	77	40-9035	1135 ± 1406
15-ADON	insges.	21	12-2437	264 ± 507
	2007	27	12-2437	277 ± 524
	2008	14	12-1834	233 ± 488
3-ADON	insges.	9	30-337	124 ± 88
	2007	16	30-337	132 ± 89
	2008	2	30-76	53 ± 33
SCIRP	insges.	9	24-640	156 ± 161
	2007	14	24-413	102 ± 101
	2008	4	218-640	359 ± 195
MAS	insges.	3	18-29	22 ± 5
	2007	6	18-29	22 ± 5
	2008	0	-	-
DAS	insges.	0,5	21	21
	2007	1	21	21
	2008	0	-	-
T2-TETRA	insges.	9	42-478	153 ± 126
	2007	18	42-478	153 ± 126
	2008	0	-	-
T2-TRIOL	insges.	0,5	61	61
	2007	1	61	61
	2008	0	-	-
HT-2	insges.	55	9-674	66 ± 95
	2007	52	9-413	52 ± 72
	2008	59	9-674	81 ± 111
T-2	insges.	37	2-214	41 ± 39
	2007	34	6-110	29 ± 28
	2008	41	2-214	52 ± 44
ZON	insges.	46	7-767	89 ± 126
	2007	55	9-524	99 ± 117
	2008	37	7-767	72 ± 139

* Mittelwert (MW) ± Standardabweichung (s)

Abbildung 4 zeigt die Verteilung der DON-Gehalte beider Versuchsjahre. Dabei lagen 74% der Proben bei Gehalten von 0,9 mg/kg oder darunter, 26% der Proben überschritten diesen Wert.

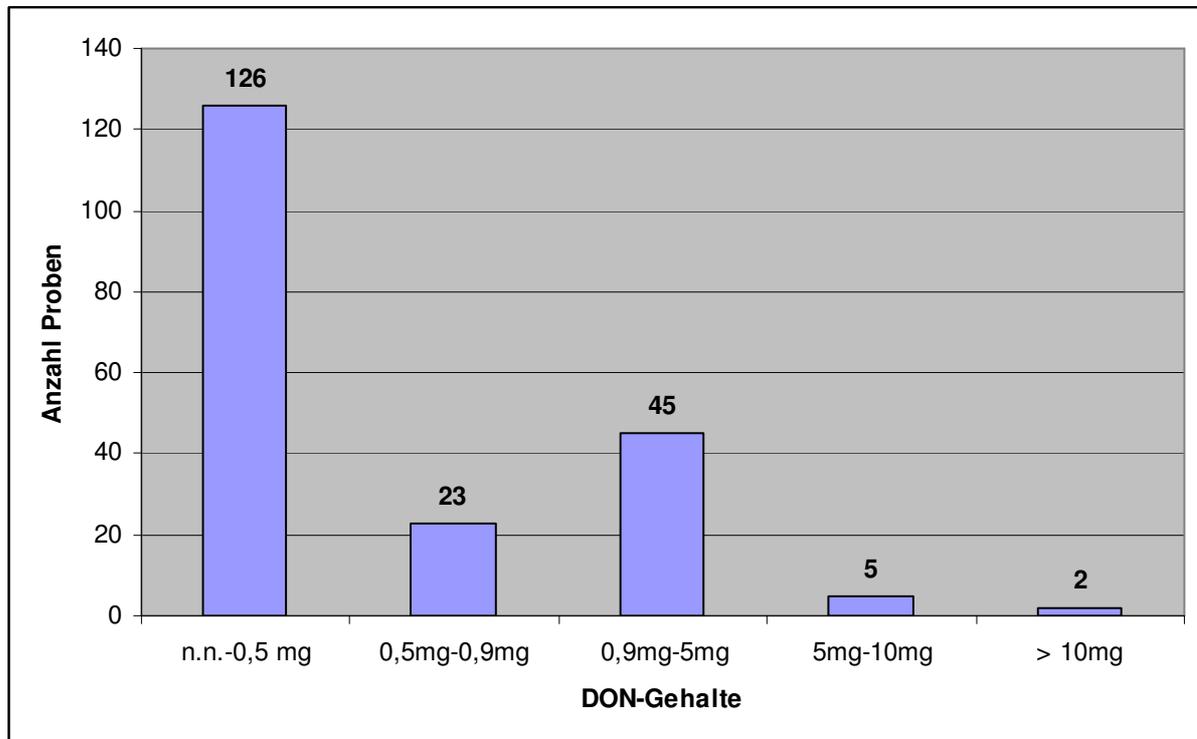


Abbildung 4: Verteilung der DON-Gehalte beider Versuchsjahre

In den folgenden Tabellen wurde für die statistische Auswertung der Daten der Mittelwert nicht aus den positiven Proben, sondern aus der Gesamtheit der Proben ermittelt. Lagen die Toxingehalte unterhalb der Nachweisgrenze, so wurde jeweils die halbe Nachweisgrenze eingesetzt. Lag jedoch ein Toxingehalt zwischen der Nachweis- und Bestimmungsgrenze, so wurde der Mittelwert aus Nachweis- und Bestimmungsgrenze als Analysenwert eingesetzt. Eine statistische Auswertung für ein Toxin über beide Erntejahre erfolgte nur dann, wenn Daten der Jahre 2007 und 2008 vorlagen. Die Anzahl der Informationen zu den acker- und pflanzenbaulichen Maßnahmen zur Auswertung eines Datensatzes für einen statistischen Vergleich entspricht der Zahl der in den Fragebögen übermittelten Informationen ($N=X=\text{Gesamt}/N=Y=2007/N=Z=2008$) und liegt aufgrund unvollständiger Angaben meist unterhalb der Anzahl an untersuchten Proben.

In der Tabelle 5 sind die Ergebnisse des Vergleiches der beiden Versuchsjahre bezüglich der Toxingehalte dargestellt. Die Toxine FUS-X, NEO, MAS, DAS und T2-Triol, 3-ADON und SCIRP wurden aufgrund der geringen Anzahl an positiven Proben statistisch nicht mit erfasst. Mit Ausnahme des DON zeigten sich bei allen anderen Toxinen tendenzielle oder signifikante

Unterschiede zwischen den beiden Versuchsjahren. Die Typ-A Trichothecene HT-2 und T-2 waren signifikant ($p = 0,0366$) und tendenziell ($p = 0,0854$) in Proben aus dem Versuchsjahr 2008 stärker vertreten. Hingegen waren die Gehalte der Typ B-Trichothecene NIV (0,0126) und 15-ADON (0,0195) und auch das ZON (0,0023) signifikant in beiden Jahren verschieden mit höheren Werten im Erntejahr 2007.

Tabelle 5: Toxingehalte in Strohproben der Erntejahre 2007 und 2008

Toxin	Versuchsjahr		P
	2007 (N=106) MW (MD) ² ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	2008 (N=95) MW (MD) ² ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	
NIV	80 (7) (0,55) ¹	149 (7) (0,43) ¹	0,0126* ¹
DON	1163 (301) (0,45) ¹	873 (409) (0,55) ¹	0,1819 ¹
15-ADON	79 (4)	35 (4)	0,0195*
HT-2	28 (9)	49 (20)	0,0366*
T-2	11 (2)	22 (2)	0,0854
ZON	56 (9)	29 (3)	0,0023**

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$;

¹ Rangmittel (in Klammern dargestellt) und P-Wert des Mediantests

² Mittelwert (MW) und Median (MD)

Toxingehalte in Abhängigkeit von der Strohart

Insgesamt wurden über die beiden Versuchsjahre 80 Weizen-, 79 Gersten-, 11 Hafer-, 12 Roggen-, 12 Triticale-, 1 Dinkel- und 6 Proben mit unbekannter Strohart untersucht.

Durch die geringe Anzahl an positiven Proben wurden die Toxine FUS-X, NEO, MAS, DAS und T2-TRIOL im Versuchsjahr 2007, sowie zusätzlich in 2008 die Toxine 3-ADON und SCIRP nicht statistisch bewertet. Die Strohproben der Getreidearten Hafer, Roggen, Triticale und Dinkel wurden, aufgrund der geringen Anzahl an Proben, im Hinblick auf die Toxingehalte in Abhängigkeit von der Strohart nicht statistisch ausgewertet. Bei der Auswertung des gesamten Datensatzes über beide Versuchsjahre hinweg zeigte sich für die Typ-B Trichothecene DON und 15-ADON ein höchst signifikant verschiedener Toxingehalt mit höheren Werten im Weizenstroh im Vergleich zum Gerstenstroh mit p-Werten von jeweils $< 0,0001$. Die Typ-A Trichothecene HT-2 ($p < 0,0001$) und T-2 ($p < 0,0001$) zeigten signifikant verschiedene Gehalte in den beiden Stroharten mit höheren Toxingehalten in Gerste im Vergleich zu Weizen.

ZON ist im Weizenstroh signifikant stärker vertreten als im Gerstenstroh. NIV zeigte bei dem Vergleich der Getreidestrohartarten keinen signifikanten Unterschied.

Die Auswertung der Daten des Jahres 2007 deckt sich mit den Ergebnissen aus dem Versuchsjahr 2008 wobei in dem ersten Versuchsjahr aufgrund der hohen Anzahl an positiven Proben zusätzlich noch eine statistische Auswertung bezüglich der Toxine 3-ADON, SCIRP und T2-TETRA vorgenommen werden konnte. Die DON Derivate 3-ADON ($p = 0,0106$) und 15-ADON ($p = 0,0002$) zeigten signifikant verschiedene Gehalte mit höheren Toxinwerten in Weizen. SCIRP ($p = 0,0038$) und T-2 TETRA ($p = 0,0012$) waren hingegen in Gerste signifikant stärker vertreten.

Somit lässt sich ein unterschiedliches Toxinspektrum auf dem Stroh der beiden Getreidearten erkennen, mit den Typ-B Trichothecenen dominierend in Weizenstroh und den Typ-A Trichothecenen in Gerstenstroh.

Tabelle 6: Toxingehalte in Proben der Stroharten Weizen und Gerste über beide Versuchsjahre

Toxin	Jahrgang	Weizen (N ¹ =X/Y/Z)	Gerste (N ² =X/Y/Z)	P
		MW ² (µg/kg)	MW ² (µg/kg)	
NIV	insges.	86 (7) (0,51)¹	114 (7) (0,48)¹	0,5177¹
	2007	57 (7)	106 (7)	0,9336
	2008	128 (7)	122 (7)	0,2650
DON	insges.	1446 (133)	789 (623)	< 0,0001***
	2007	1615 (84)	922 (590)	0,0006***
	2008	1204 (210)	646 (657)	0,0048**
15-ADON	insges.	122 (4)	18 (4)	< 0,0001***
	2007	151 (4)	27 (8)	0,0002***
	2008	81 (4)	7 (4)	0,0101*
3-ADON	insges.	-	-	-
	2007	49 (10)	15 (10)	0,0106*
	2008	-	-	-
SCIRP	insges.	-	-	-
	2007	10 (8)	33 (8)	0,0038**
	2008	-	-	-
T2-TETRA	insges.	-	-	-
	2007	17 (14)	64 (14)	0,0012**
	2008	-	-	-
HT-2	insges.	23 (29)	61 (3)	< 0,0001***
	2007	13 (18)	49 (3)	0,0117*
	2008	37 (38)	73 (3)	0,0001***
T-2	insges.	11 (12)	26 (2)	< 0,0001***
	2007	10 (2)	14 (2)	0,1047
	2008	12 (26)	39 (2)	<0,0001***
ZON	insges.	52 (3)	19 (9)	0,0017**
	2007	73 (3)	25 (14)	0,0539
	2008	18 (3)	17 (7)	0,0161*

* p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001 (N¹ = 80/47/33), (N² = 79/41/38)

¹ Rangmittel (in Klammern dargestellt) und P-Wert des Mediantests

² Mittelwert (MW)

Toxingehalte bei Strohproben nach unterschiedlichen pflanzen- und ackerbaulicher Maßnahmen

- Getrennt nach Weizen- und Gerstenstroh

Da zwischen den Stroharten Gerste und Weizen signifikante Unterschiede im Toxinspektrum beobachtet werden konnten, wurden die folgenden Auswertungen getrennt nach den beiden Getreidearten vorgenommen.

Die Angaben über pflanzen- und ackerbaulicher Maßnahmen sind den für den Screeningversuch angefertigten Fragebogen entnommen worden. Bei der Beurteilung von Unterschieden im Toxingehalt von Strohproben nach unterschiedlichen produktionstechnischen Maßnahmen muss berücksichtigt werden, dass sie nicht in einem speziell durchgeführten Feldversuch ermittelt wurden. Daher sollen die nachfolgenden Ergebnisse erste Informationen zum Einfluss dieser Maßnahmen geben und als Anhaltspunkte angesehen werden.

In Gerste konnten die Toxine NIV, DON, HT-2, T-2 und ZON für die Auswertung der verschiedenen Bodenbearbeitungsvarianten statistisch erfasst werden, beim Weizenstroh zusätzlich noch das 15-ADON. In Tabelle 7 sind die nach der statistischen Auswertung ermittelten Ergebnisse der beiden Stroharten bei unterschiedlicher Bodenbearbeitung dargestellt. Die in der Literatur beschriebenen höheren Toxingehalte im Korn nach nicht wendender Bodenbearbeitung (Berner et al., 2005) decken sich teilweise mit den im Screeningversuch ermittelten Ergebnissen für Stroh. Für DON zeigte sich sowohl in Gersten- als auch in Weizenstroh eine signifikant oder tendenziell unterschiedliche Belastung des Strohs mit höheren Gehalten bei Proben nach wendender Bodenbearbeitung im Vergleich zur wendenden. Tendenzuell war der ZON-Gehalt in Gerstenstroh nach nicht wendender Bodenbearbeitung höher.

Tabelle 7: Toxingehalte in Gersten- bzw. Weizenstroh bei unterschiedlicher Bodenbearbeitung

Toxin	Bodenbearbeitung					
	Gerste			Weizen		
	n. w. (N=17) MW (MD) ² (µg/kg)	w. (N=50) MW (MD) ² (µg/kg)	P	n. w. (N=21) MW (MD) ² (µg/kg)	w. (N=53) MW (MD) ² (µg/kg)	P
NIV	65 (7)	143 (7)	0,7257	54 (7)	101 (7)	0,6038
DON	606 (362)	438 (103)	0,0413*	1648 (1088) (0,67) ¹	1726 (459) (0,43) ¹	0,0730¹
15-ADON	-	-	-	167 (4)	97 (4)	0,5710
HT-2	96 (45)	46 (27)	0,2017	50 (9)	14 (3)	0,3635
T-2	28 (15)	23 (7)	0,1853	21 (2)	7 (2)	0,1848
ZON	28 (3)	13 (3)	0,1047	33 (9)	60 (9)	0,6647

* p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001, n.w. = nicht wendend, w. = wendend

¹ Rangmittel (in Klammern dargestellt) und P-Wert des Mediantests

² Mittelwert (MW) und Median (MD)

Bei der Untersuchung der Toxingehalte von Getreidestroh bei unterschiedlicher Vorfrucht wurden die Proben mit der Vorfrucht Mais mit den Proben mit anderen Vorfrüchten verglichen. Die in Tabelle 8 dargestellten Ergebnisse der statistischen Auswertung zeigen, dass lediglich in Gerstenstroh eine hoch signifikant verschiedene Belastung mit dem Toxin NIV (p = 0,0038) beobachtet werden konnte mit höheren Gehalten bei der Vorfrucht Mais. Es konnten keine weiteren signifikanten Unterschiede bei den verschiedenen Vorfrüchten und den beiden Stroharten nachgewiesen werden.

Tabelle 8: Toxingehalte in Gersten- bzw. Weizenstroh bei unterschiedlicher Vorfrucht

Toxin	Vorfrucht					
	Gerste			Weizen		
	Mais (N=11) MW (MD) ² (µg/kg)	nicht Mais (N=46) MW (MD) ² (µg/kg)	P	Mais (N=14) MW (MD) ² (µg/kg)	nicht Mais (N=43) MW (MD) ² (µg/kg)	P
NIV	75 (22) (0,74) ¹	104 (7) (0,43) ¹	0,0038**¹	97 (7)	64 (7)	1,0000
DON	572 (409) (0,64) ¹	598 (133) (0,46) ¹	0,2881¹	2143 (765)	1903 (698)	0,4415
15-ADON	-	-	-	217 (4)	120 (4)	0,9267
HT-2	75 (37)	68 (33)	0,8627	21 (3) (0,47) ¹	30 (3) (0,50) ¹	0,8132¹
T-2	26 (8)	28 (14)	1,0000	12 (2)	13 (2)	0,9899
ZON	34 (3)	19 (3)	0,3931	54 (9)	51 (9)	0,9385

* p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001

¹ Rangmittel (in Klammern dargestellt) und P-Wert des Mediantests

² Mittelwert (MW) und Median (MD)

Um signifikante Unterschiede im Toxingehalt von Stroh, das unterschiedlich lange eingelagert wurde, erfassen zu können, wurde mit Hilfe des Kruskal Wallis Tests der Toxingehalt in Proben mit der Lagerdauer von null bis fünf Monaten von der Ernte bis zur Probenahme mit dem Toxingehalt von Proben mit der Lagerdauer von sechs Monate und länger nach der Ernte verglichen. Getrennt nach Weizen- und Gerstenstroh wurden die Toxingehalte bei unterschiedlich lang gelagerten Proben statistisch ausgewertet. Die Ergebnisse sind der Tabelle 9 zu entnehmen. Die Auswertung der Weizenstroh- und Gerstenstrohproben ergab keinen signifikanten Unterschied im Toxingehalt in kurz- bzw. lang gelagerten Proben. Hingegen wurde in länger gelagertem Gerstenstroh tendenziell niedrigere DON (p = 0,0768) und ZON-Gehalte (p = 0,1328) beobachtet.

Tabelle 9: Toxingehalte in Weizen- bzw. Gerstenstroh mit unterschiedlicher Lagerdauer

Toxin	Lagerdauer					
	Gerste			Weizen		
	kurz (N=28) MW (MD) ² (µg/kg)	lang (N=26) MW (MD) ² (µg/kg)	P	kurz (N=28) MW (MD) ² (µg/kg)	lang (N=18) MW (MD) ² (µg/kg)	P
NIV	51 (7) (0,53) ¹	242 (7) (0,47) ¹	0,4616¹	105 (7)	46 (7)	0,4177
DON	890 (303)	341 (52)	0,0768	2745 (1021)	1507 (687)	0,9461
15-ADON	-	-	-	293 (8)	50 (4)	0,2433
HT-2	84 (48)	57 (27)	0,2419	11 (3)	19 (6)	0,3496
T-2	31 (22)	27 (4)	0,2741	10 (2)	5 (2)	0,3829
ZON	30 (3)	8 (3)	0,1328	60 (9)	54 (12)	0,6606

* p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001

¹ Rangmittel (in Klammern dargestellt) und P-Wert des Mediantests

² Mittelwert (MW) und Median (MD)

Nach der Ernte wurde das Stroh von den landwirtschaftlichen Betrieben unter verschiedenen Bedingungen bis zur Probenahme durch die amtlichen Probenehmer gelagert. Tabelle 10 zeigt die Ergebnisse des statistischen Vergleichs der Toxinwerte von Strohproben die bei unterschiedlichen Bedingungen gelagert wurden. In Gerstenstroh zeigten die nach der statistischen Auswertung ermittelten Ergebnisse keine signifikanten Unterschiede im Toxingehalt in Proben die im Freien (i. F.) oder unter dem Dach (u. D.) gelagert wurden. Die Typ-B Trichothecene DON (p = 0,0237) und 15-ADON (p = 0,0889) und auch das ZON (p = 0,1300) zeigten in Weizenstroh signifikante bzw. tendenzielle Unterschiede, mit höheren Gehalten in Proben die im Freien gelagert wurden.

Tabelle 10: Toxingehalte in Gersten- bzw. Weizenstroh bei unterschiedlichen Lagerorten

Toxin	Lagerort					
	Gerste			Weizen		
	u. D. (N=69) MW (MD) ² (µg/kg)	i. F. (N=8) MW (MD) ² (µg/kg)	P	u. D. (N=67) MW (MD) ² (µg/kg)	i. F. (N=11) MW (MD) ² (µg/kg)	P
NIV	87 (7)	339 (7)	0,3984	75 (7)	144 (7)	0,1849
DON	544 (140)	173 (46)	0,3054	1336 (589)	4288 (2228)	0,0237*
15-ADON	-	-	-	130 (4)	141 (37)	0,0889
HT-2	66 (33)	34 (20)	0,6864	10 (3)	14 (9)	0,3405
T-2	28 (13)	15 (7)	0,4683	24 (2) (0,49) ¹	19 (2) (0,57) ¹	0,6127¹
ZON	20 (3)	11 (3)	0,6699	50 (9)	82 (24)	0,1300

p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001, u.D. = unter dem Dach, i.F. = im Freien

¹ Rangmittel (in Klammern dargestellt) und P-Wert des Mediantests

² Mittelwert (MW) und Median (MD)

Toxingehalte von Stroh bei unterschiedlicher geographischer Lage innerhalb Deutschlands

Um die Toxingehalte von Strohproben aus unterschiedlichen Bereichen Deutschlands zu untersuchen, wurde eine virtuelle Linie zwischen Nord- und Süddeutschland bzw. zwischen Ost- und Westdeutschland (siehe Abbildung 5) gezogen. Die Tabelle 11 weist auf den Anteil der Stroharten je Region hin.

Tabelle 11: Anteil (N) der Stroharten an der Gesamtzahl der Proben nach geographischer Herkunft in den Erntejahren 2007 und 2008

Strohart	Jahr	N / % Anteil an gesamt N			
		Nord	Süd	Ost	West
Weizen	insges.	42/44	39/37	35/37	46/43
	2007	26/51	22/40	19/39	29/51
	2008	16/36	17/33	16/36	17/34
Gerste	insges.	30/32	48/45	40/43	38/36
	2007	16/31	24/44	22/45	18/32
	2008	14/32	24/47	18/40	20/40

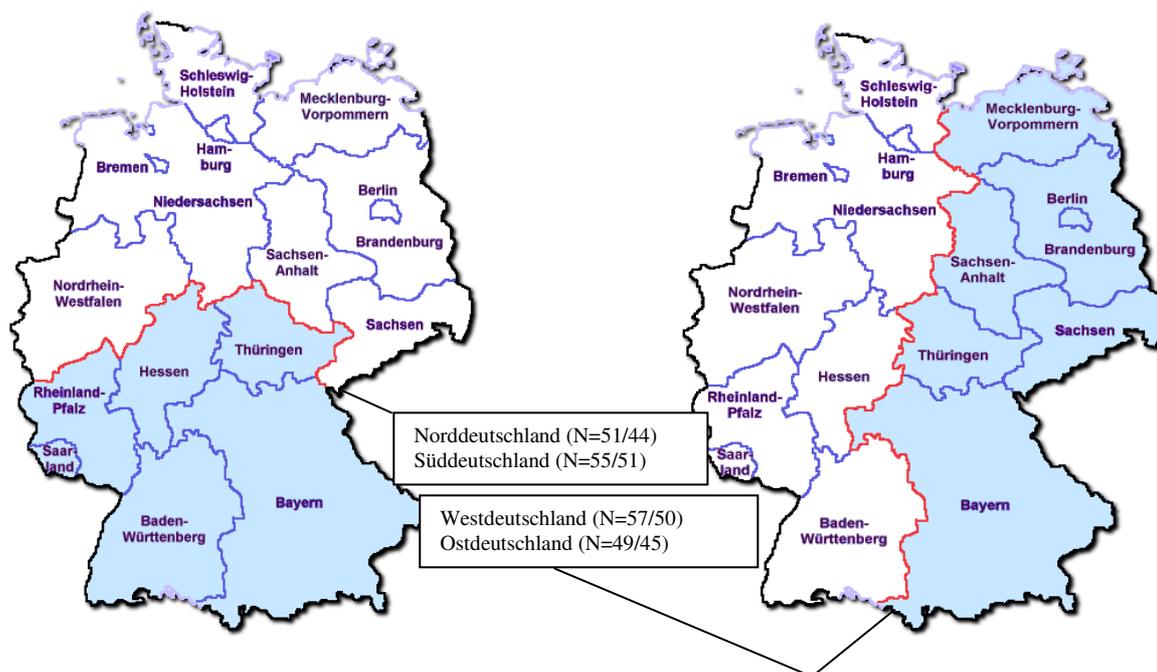


Abbildung 5: Aufteilung Deutschlands in die Regionen Nord und Süd bzw. Ost und West unter Angabe der Probenzahl je Region und Erntejahr (2007/2008)

In Tabelle 12 ist die Verteilung der Toxine in den Strohproben im nördlichen und südlichen Areal Deutschlands aufgezeigt. In den Gerstenstrohproben wiesen die Typ-A Trichothecene HT-2 und T-2 signifikant verschiedene Gehalte auf, mit höheren Werten im Süden Deutschlands und p-Werten von 0,0005 und 0,0036, zeigten jedoch in Weizenstroh keine signifikanten Unterschiede. Bei den Typ-B Trichothecenen waren sowohl in Gerste als auch in Weizen keine unterschiedlichen Verteilungen innerhalb Deutschlands zu beobachten. Die mittleren DON-Gehalte lagen in Weizenstroh im Süden bei 2291 µg/kg und im Norden bei 1160 µg/kg, wobei jedoch keine Signifikanz nachgewiesen werden konnte.

Tabelle 12: Toxingehalte in Weizen- bzw. Gerstenstroh in Nord- bzw. Süddeutschland

Toxin	Geographische Verteilung					
	Gerste			Weizen		
	Nord (N=30) MW (MD) ² (µg/kg)	Süd (N=48) MW (MD) ² (µg/kg)	P	Nord (N=43) MW (MD) ² (µg/kg)	Süd (N=39) MW (MD) ² (µg/kg)	P
NIV	208 (7) (0,48) ¹	52 (7) (0,51) ¹	0,7139¹	108 (7)	66 (7)	0,1936
DON	432 (133)	544 (149)	0,3631	1160 (489)	2291 (743)	0,2032
15-ADON	-	-	-	103 (4)	151 (4)	0,6869
HT-2	36 (6)	77 (39)	0,0005***	31 (3)	13 (3)	0,6600
T-2	17 (2)	32 (18)	0,0036**	14 (2)	7 (2)	0,8065
ZON	11 (3)	24 (9)	0,1702	59 (17)	46 (3)	0,0500

* p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001

¹ Rangmittel (in Klammern dargestellt) und P-Wert des Mediantests

² Mittelwert (MW) und Median (MD)

Nach der virtuellen Aufteilung Deutschlands entsprechend Abbildung 5 wurden die Weizen- und Gerstenstrohproben getrennt ausgewertet. Sowohl in Gerstenstroh (p = 0,1032) als auch in Weizenstroh (p = 0,0171) wies das DON je nach Region tendenziell bzw. signifikant verschiedene Gehalte auf, mit mittleren Gehalten im Westen von 599 µg/kg bzw. 2097 µg/kg und im Osten von 408 µg/kg bzw. 1214 µg/kg. Auch NIV zeigte in Weizenstroh im Westen signifikant höhere (p = 0,0221) Gehalte. Die Typ-A Trichothecene und ZON zeigten keine Dominanz in einem Gebiet.

Tabelle 13: Toxingehalte in Weizen- bzw. Gerstenstroh in Ost- bzw. Westdeutschland

Toxin	Geographische Verteilung					
	Gerste			Weizen		
	Ost (N=40) MW (MD) ² (µg/kg)	West (N=38) MW (MD) ² (µg/kg)	P	Ost (N=35) MW (MD) ² (µg/kg)	West (N=46) MW (MD) ² (µg/kg)	P
NIV	96 (7) (0,51) ¹	129 (7) (0,49) ¹	0,7015¹	36 (7)	129 (7)	0,0221*
DON	408 (81)	599 (210)	0,1032	1214 (392)	2097 (947)	0,0171*
15-ADON	-	-	-	111 (4)	139 (4)	0,1542
HT-2	63 (33)	60 (22)	0,4055	36 (3)	13 (3)	0,4134
T-2	25 (14) (0,52) ¹	27 (9) (0,48) ¹	0,7601¹	15 (2)	7 (2)	0,8776
ZON	20 (3) (0,49) ¹	18 (3) (0,50) ¹	0,8736¹	47 (7)	57 (10)	0,4187

* p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001

¹ Rangmittel (in Klammern dargestellt) und P-Wert des Mediantests

² Mittelwert (MW) und Median (MD)

Korrelationen zwischen den analysierten *Fusarien*-Toxinen innerhalb einer Strohart

Aufgrund des geringen Anteils an positiven Proben wurde für die Toxine 15-ADON, 3-ADON, DAS, T2-TRIOL, NEO und FUS-X in Gerstestroh und 3-ADON, SCIRP, MAS, DAS, T2-TETRA, T2-TRI, FUS-X und NEO in Weizenstroh keine statistische Auswertung zur Prüfung der Korrelationen der Toxine vorgenommen. Nach der Analyse aller 79 Gerstenstrohproben wurden diese mit Hilfe der Proc Corr Prozedur auf Korrelationen einzelner Toxine untersucht und in Tabelle 14 dargestellt. Innerhalb der Gerstenproben konnte eine höchst signifikante Korrelation der Typ-A Trichothecene HT-2 und T-2 untereinander beobachtet werden. Aus Untersuchungen von Heß et al. (2009) ist bekannt, dass *F. sporotrichioides*, der sowohl HT-2 als auch T-2 bildet, auf Gerste sehr häufig gefunden wird. Jedoch konnte auch zwischen DON, HT-2 und T-2 eine Beziehung nachgewiesen werden, hier lagen die Korrelationskoeffizienten bei 0,34 und 0,37.

Tabelle 14: Korrelationen zwischen den *Fusarium*-Toxinen in der Strohart Gerste aus beiden Versuchsjahr (2007/2008) (Korrelationskoeffizient/Signifikanz)

Gerste	NIV	DON	HT-2	T-2	ZON
NIV		0,21/n.s.	0,07/n.s.	0,21/n.s.	0,05/n.s.
DON			0,34/**	0,37/**	0,19/n.s.
HT-2				0,65/****	-0,08/n.s.
T-2					-0,09/n.s.
ZON					

* p < 0,05; ** p < 0,01; **** p < 0,001 , n.s. = nicht signifikant

Die in Tabelle 15 dargestellten Korrelationen aller 80 Weizenstrohproben zeigen zwischen allen statistisch ausgewerteten Typ-B Trichothecenen Beziehungen und auch das DON und das 15-ADON korrelieren mit dem ZON. Nach Schlüter et al. (2006) treten die Arten *F. graminearum* und *F. culmorum* häufig auf Weizenpflanzen auf. Diese *Fusarium*-Spezies produzieren nach Bottalico (1998) vorwiegend die Toxine DON, ZON und NIV, woraus sich die Korrelation dieser Toxine untereinander erklären lässt. Höchst signifikante Korrelation der Typ-A Trichothecene HT-2 und T-2 untereinander konnte beobachtet werden.

Tabelle 15: Korrelationen zwischen den *Fusarium*-Toxinen in der Strohart Weizen aus beiden Versuchsjahr (2007/2008) (Korrelationskoeffizient/Signifikanz)

Weizen	NIV	DON	15-ADON	HT-2	T-2	ZON
NIV		0,25/*	0,22/*	-0,06/n.s.	-0,03/n.s.	0,09/n.s.
DON			0,66/****	-0,08/n.s.	-0,06/n.s.	0,40/****
15-ADON				-0,07/n.s.	-0,04/n.s.	0,46/****
HT-2					0,85/****	-0,10/n.s.
T-2						-0,05/n.s.
ZON						

* p < 0,05; ** p < 0,01; **** p < 0,001 , n.s. = nicht signifikant

Korrelation der analysierten Toxine mit dem Hygienestatus

Mit Hilfe der Prozedur PROC CORR des Statistikpaketes SAS wurden die Korrelationen der einzelnen Toxine mit den Werten der sensorischen Prüfung ermittelt. Toxine die einen Wert unterhalb von 20% an positiven Proben aufwiesen wurden für diese Berechnung nicht mit einbezogen.

2007 konnten Korrelationen zwischen den Werten des Hygienestatus und den Gehalten der Toxine NIV, T2-TETRA und HT-2 beobachtet werden. Auch 2008 konnten bei annähernd gleichem p-Wert ($p = 0,0368$) wie schon im Jahr zuvor signifikante Korrelationen des NIV-Gehaltes mit den Werten des Hygienestatus beobachtet werden. Die Auswertung aller 201 Strohproben aus den 2 Versuchsjahren zeigt, dass der Wert der Korrelation bei den Toxinen NIV, T-2 TETRA und HT-2 signifikant war, dies jedoch nur auf sehr geringem Niveau. Somit ist eine Einschätzung des Toxingehaltes über die sensorische Beurteilung nur sehr schwer möglich.

Tabelle 16: Korrelation der analysierten Toxine mit den Werten des Hygienestatus aus den Erntejahren 2007 und 2008 (Korrelationskoeffizient/Signifikanz)

Jahr	NIV	DON	15-ADON	T-2 Tetra	HT-2	T-2	ZON
insges.	-0,20	-0,07	-0,00	-0,18	-0,15	-0,10	-0,09
	**	n.s.	n.s.	*	*	n.s.	n.s.
2007	-0,2	-0,08	0,02	-0,27	-0,19	-0,04	-0,14
	*	n.s.	n.s.	**	*	n.s.	n.s.
2008	-0,21	-0,06	-0,01		-0,13	-0,15	-0,04
	*	n.s.	n.s.	-	n.s.	n.s.	n.s.

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$, n.s. = nicht signifikant

b. Lagerversuch Braunschweig

Die Proben aus dem Lager- und Witterungsversuch wurden auf ein Spektrum an 13 Trichothecentoxinen analysiert und die Ergebnisse den Kollegen in Braunschweig übermittelt.

c. Versuchsergebnisse zu den maskierten Toxinen

Mykotoxine können in modifizierter, also chemisch veränderter Form vorliegen. Man bezeichnet sie daher auch als maskiert. Es wurden Proben aus den vom Screeningversuch stammenden Strohproben für die Analyse auf maskierte Toxine eingesetzt. Weiterhin wurden Futterkomponenten aus den von den Kollegen in Braunschweig im Rahmen dieses Projektes durchgeführten Kinetik- und Bilanzversuche für die Versuche verwendet um Ergebnisse über einen möglichen Gehalt maskierter Toxine mit den Resultaten aus den Versuchen zur Bioverfügbarkeit von Toxinen beim Schwein vergleichen zu können. Zur Erfassung der maskierten Toxine wurde die chemische bzw. enzymatische Hydrolyse, sowie ein *in vitro*-Modell zur Simulation des Magen-Darm Traktes eingesetzt. Die zur Verfügung stehenden Proben aus dem Screeningversuch und den Versuchen zur Bioverfügbarkeit enthielten v.a. DON

in größeren Mengen (Bereich mg/kg), die anderen Toxine waren in deutlich geringeren Konzentrationen vertreten. In dem durchgeführten *in vitro*-Versuch war die Probenmenge, die zum Test eingesetzt werden konnte, durch das notwendige Volumenverhältnis von Probe zu Inkubationsmedium sehr begrenzt. Bei der enzymatischen Hydrolyse war eine Aufkonzentrierung des Probenextraktes bei der anzuwendenden Probenaufarbeitung nicht in demselben Ausmaß wie in der im Screeningversuch eingesetzten Probenaufarbeitung möglich. Daraus resultierte, dass in den Untersuchungen zu den maskierten Toxinen v.a. das in großen Mengen in den Proben vorkommende DON auswertbar war, sowie die sehr empfindlich zu detektierenden Toxine HT-2 und T-2. Andere Toxine, die eine vergleichsweise höhere Nachweisgrenze aufweisen, konnten aufgrund ihrer geringen Gehalte in den Ansätzen nicht quantifiziert werden.

- Chemische Hydrolyse - Hydrolyse mit TFA

Um gebundene Trichothecene aus ihren Bindungen zu lösen wurden die Proben mit Acetonitril/Wassergemisch extrahiert, mit einem Teil des Extraktes eine saure Hydrolyse von Strohproben mit TFA mittels modifizierter Methode nach Liu et al. (2005) und Zhou et al. (2007) durchgeführt und anschließend über Festphasenextraktion aufgereinigt. Mit einem Aliquot des Extraktes erfolgte eine Festphasenextraktion ohne vorherige Säurebehandlung.

Für eine Zugabe von 1200 µg/kg DON ergab sich für die Analyse ohne Säurebehandlung eine Wiederfindungsrate von $89\% \pm 5,4\%$, für eine Analyse mit Säurebehandlung eine Wiederfindungsrate von $68\% \pm 50,6$. Dies zeigt eine unreproduzierbare Zersetzung des Toxins infolge der Säurebehandlung an, was sich auch bei der Analyse ausgesuchter Strohproben widerspiegelte. Hier betrug der DON-Gehalt nach Säurebehandlung zwischen 125 und 0% des Wertes ohne Säurebehandlung.

Aufgrund seiner Struktur ist das ZON nicht in dem Maße säurelabil wie die Trichothecene. Eine statistische Auswertung konnte für die ZON-Gehalte nicht erfolgen, da keine Wiederholungen je Probe durchgeführt wurden. Die Werte für dieses Toxin sind in Tabelle 17 dargestellt. Probe Nr. 1, 4, 5 und 6 wiesen höhere Werte in der Variante mit TFA-Aufschluss auf.

Tabelle 17: Vergleich der Behandlungsmodelle für ZON mit bzw. ohne Trifluoressigsäure (TFA)

Behandlungsmodell					
ZON (% von Beh. ohne TFA)			ZON (Beh. ohne TFA=100%)		
Behandlung <u>mit</u> TFA	Probe Nr.		Behandlung <u>ohne</u> TFA	Probe Nr.	
	1	157%		1	100%
	2	86%		2	100%
	3	94%		3	100%
	4	150%		4	100%
	5	167%		5	100%
	6	115%		6	100%

- Enzymatische Hydrolyse - Behandlung mit Clara-Diastase

Es ergab sich kein signifikanter Einfluss der Behandlung, also der Zugabe des Gemisches an Verdauungsenzymen, auf den DON-Gehalt der Probe. Der P-Wert für die Behandlung lag bei 0,2567 und somit über dem Signifikanzniveau. Auch der ZON-, HT-2 und T-2 Gehalt wurde durch die enzymatische Hydrolyse nicht signifikant erhöht. Das Enzymgemisch bestehend aus α -Amylase, Cellulase, Invertase, Peptidase, Phosphatase und Sulfatase sorgte demnach nicht für eine erhöhte Freisetzung potentiell vorhandener maskierter Toxine aus den untersuchten Strohproben.

Tabelle 18: Vergleich der Behandlungsmodelle mit bzw. ohne Clara-Diastase

Behandlungsmodell				
	DON (% von Beh. ohne Enzym)		DON (Beh. ohne Enzym = 100%)	P
Beh. <u>mit</u> Clara-Diastase	101%	Beh. <u>ohne</u> Clara-Diastase	100%	0,2567
Behandlungsmodell				
	ZON (% von Beh. ohne Enzym)		ZON (Beh. ohne Enzym = 100%)	P
Beh. <u>mit</u> Clara-Diastase	96%	Beh. <u>ohne</u> Clara-Diastase	100%	0,6899
Behandlungsmodell				
	HT-2 (% von Beh. ohne Enzym)		HT-2 (Beh. ohne Enzym = 100%)	P
Beh. <u>mit</u> Clara-Diastase	105%	Beh. <u>ohne</u> Clara-Diastase	100%	0,8609
Behandlungsmodell				
	T-2 (% von Beh. ohne Enzym)		T-2 (Beh. ohne Enzym = 100%)	P
Beh. <u>mit</u> Clara-Diastase	98%	Beh. <u>ohne</u> Clara-Diastase	100%	0,9214

-In vitro-Modell des Verdauungstraktes

Das *in vitro*-Modell wurde zur Simulierung der *in vivo*-Bedingungen (pH-Wert, Einfluss von Verdauungsenzymen, Temperatur, Durchlaufzeit) des Gastrointestinaltraktes des Schweins verwendet. Eine mögliche Freisetzung maskierter Toxine im tierischen Verdauungstrakt sollte damit überprüft werden. In dem durchgeführten *in vitro*-Versuch war die Probenmenge, die zum Test eingesetzt werden konnte durch das notwendige Volumenverhältnis von Probe zu Inkubationsmedium begrenzt. Durch die geringe Einwaage fielen Inhomogenitäten der auf 1 mm gemahlene Proben stärker ins Gewicht. Auf eine weitergehende Zerkleinerung der Proben wurde jedoch verzichtet, da durch eine solche Maßnahme die Probenoberfläche so stark vergrößert worden wäre, dass die Abweichungen zu *in vivo*-Bedingungen sehr stark gewesen wären. Der Vergleich der Behandlung aller Proben mit Enzym mit der Behandlung aller Proben ohne Enzym ergab keine Unterschiede. Einzig der in Tabelle 19 gezeigte Vergleich der Magensaftproben mit Enzym mit den Magensaftproben ohne Enzym zeigte einen signifikanten Einfluss der Enzymwirkung auf den DON-Gehalt der Proben mit einem P-Wert von 0,0364. Aus der Literatur ist jedoch nicht bekannt, dass die bei dem Versuch verwendeten Reagenzien zu

einem Abbau des DON führen. Auch bei HT-2 und T-2 konnte nach der Behandlung kein signifikant höherer Toxingehalt festgestellt werden. Die Freisetzung von möglicherweise vorhandenen maskierten Toxinen (DON, HT-2 und T-2) aus den untersuchten Strohproben konnte durch das verwendete Modell und damit auch durch die verwendeten Enzyme nicht nachgewiesen werden. Da dieses Magen-Darm Modell zur Simulierung der *in vivo*-Bedingungen des tierischen Verdauungstraktes dient, wurden keine Anhaltspunkte nach den in Tabelle 18 vorliegenden Ergebnissen für eine zusätzliche Toxinbelastung durch maskierte Toxine im Vergleich zu der durch die Routineanalytik ermittelten Werte gefunden.

Tabelle 19: Vergleich der Behandlungsmodelle des Magen-Darm Modells

Behandlungsmodell				
	DON (% von Beh. ohne Enzym)		DON (Beh. ohne Enzym = 100%)	P
Behandlung <u>mit</u> Enzym	99%	Behandlung <u>ohne</u> Enzym	100%	0,9072
<u>Magensaft mit</u> Enzym	94%	<u>Magensaft ohne</u> Enzym	100%	0,0364*
<u>Darmsaft mit</u> Enzym	105%	<u>Darmsaft ohne</u> Enzym	100%	0,8312
Behandlungsmodell				
	HT-2 (% von Beh. ohne Enzym)		HT-2 (Beh. ohne Enzym = 100%)	P
Behandlung <u>mit</u> Enzym	107%	Behandlung <u>ohne</u> Enzym	100%	0,5532
<u>Magensaft mit</u> Enzym	101%	<u>Magensaft ohne</u> Enzym	100%	0,8735
<u>Darmsaft mit</u> Enzym	112%	<u>Darmsaft ohne</u> Enzym	100%	0,4532
Behandlungsmodell				
	T-2 (% von Beh. ohne Enzym)		T-2 (Beh. ohne Enzym = 100%)	P
<u>Darmsaft mit</u> Enzym	146%	<u>Darmsaft ohne</u> Enzym	100%	0,4532

* p < 0,05

3.2 Voraussichtlicher Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse

Die vorliegenden Untersuchungen haben zum Erkenntnisfortschritt zum Vorkommen von Trichothecentoxinen, sowie ZON und OA in Getreidestroh geführt. Für den Einsatz des Strohs als Futterkomponente oder Einstreumaterial und damit auch der zumeist unkontrollierten Aufnahme von Stroh ist dies besonders wichtig.

Es konnte eine Multitoxinbelastung des Getreidestrohs mit durchschnittlich 3 Mykotoxinen je Probe und mit bis zu 10 der analysierten Toxine gleichzeitig in einer Probe nachgewiesen werden. Die aufgezeigten Jahresunterschiede machen die möglicherweise durch das Wetter verursachten Schwankungen und die damit verbundenen Unsicherheiten bei der Abschätzung des toxischen Potentials von Stroh deutlich.

Zwischen Weizen- und Gerstenstroh zeichnete sich eine Belastung mit unterschiedlichen Toxinspektren ab. Die Auswertung der Fragebögen und die anschließende Korrelation der Daten mit den Toxingehalten lieferten erste Hinweise zum Einfluss acker- und pflanzenbaulichen Maßnahmen und deren mögliche Auswirkungen auf den Toxingehalt von Stroh.

Eine unterschiedliche Verteilung der Toxine innerhalb Deutschlands konnte nach der Auswertung des Screeningversuches nachgewiesen werden.

DON war hinsichtlich des Vorkommens und auch der Gehalten das dominierende Toxin. Der mittlere DON-Gehalt lag bei 1234 µg/kg. Da weitere Toxine im Stroh nachgewiesen wurden, ist in Abhängigkeit von der täglich aufgenommenen Strohmenge durch orale oder inhalative Aufnahme von einem Beitrag von Stroh zur Gesamtexposition von Nutztieren mit Mykotoxinen auszugehen. Weiterhin ist zu berücksichtigen, dass die vereinzelt auftretenden hohen Toxingehalte von bis zu 23 mg/kg (DON) bei der Verwendung des Strohs als Einstreumaterial oder Futterkomponente trotz begrenzter Strohaufnahme im Einzelfall stärker zur Exposition landwirtschaftlicher Nutztiere mit *Fusarium*-Toxinen beitragen können. Für den Menschen ist bei dem Umgang mit stark belastetem Stroh eine Inhalation (z.B. Dreschen, Stallarbeit) von Mykotoxinen nicht auszuschließen, zumal Stroh im Vergleich zu anderen Futtermitteln verstärkt zur Staubbildung neigt. Studien von Amuzie et al. (2008) belegen, dass bei intranasaler Exposition von Mäusen mit DON, die Plasmakonzentration dieses Toxins bis zu 3 mal höher sein kann im Vergleich zur oralen Aufnahme. Die Auswertung der *in vitro*-Versuche ergab keine Freisetzung von potentiell vorhandenen maskierten Toxinen aus den untersuchten Strohproben, so dass davon ausgegangen werden kann, dass die Toxine in ungebundener Form vorlagen oder durch die gewählten *in vitro*-Bedingungen nicht freigesetzt werden konnten.

4. Zusammenfassung

In einem zweijährigen bundesweiten Screeningversuch wurde das Vorkommen von Trichothecentoxinen, sowie von Zearalenon (ZON) und Ochratoxin A (OA) in Getreidestroh untersucht um eine bessere Abschätzung des Expositionsrisikos landwirtschaftlicher Nutztiere durch die Strohaufnahme zu ermöglichen. Die Strohproben wurden von amtlichen Probenehmern entsprechend der Futtermittelprobenahme- und Analysenverordnung entnommen und die beigelegten Fragebögen in Zusammenarbeit mit den Landwirten ausgefüllt. Durch Korrelation der Toxingehalte mit den Angaben aus dem Fragebogen wurden Hinweise auf den Einfluss acker- und pflanzenbaulicher Maßnahmen, durch Korrelation mit Wetterdaten Hinweise auf den Einfluss der Witterung auf den Toxingehalt von Stroh gesucht. Zusätzlich sollten Informationen zum Vorkommen von maskierten Toxinen im Getreidestroh gewonnen werden.

Die beantragten Arbeitsschritte wurden gemäß Zeitplan durchgeführt. Im Berichtszeitraum ist das Screening von Strohproben verschiedener Getreidearten der Ernte 2007 und 2008 auf ein Spektrum an *Fusarium*-Toxinen sowie auf OA abgeschlossen worden, ein makroskopischer Befund wurde für die Proben erhoben. Eine statistische Auswertung der Daten wurde vorgenommen. Weiterhin wurden aus einem Lagerversuch von Stroh des Friedrich-Loeffler-Institutes Proben auf ein Spektrum an Trichothecenen untersucht.

Die makroskopischen Befunde ergaben für die Screeningproben einen meist positiven Futterwert, hingegen lag der Wert für den durchschnittlichen Hygienestatus 2007 bei -5,2 und 2008 bei -4,8 und zeigte damit leichte bis deutliche hygienische Mängel. Die ermittelten Toxingehalte wurden mit den Werten für den Hygienestatus aus der sensorischen Beurteilung korreliert. Die Nivalenol (NIV)-, T-2 Tetraol (T-2 TETRA)- und HT-2 Toxin (HT-2)-Gehalte korrelierten signifikant mit dem Hygienestatus, jedoch auf einem sehr geringen Niveau.

Die Belastung der Strohproben mit einem Spektrum an *Fusarium*-Toxinen wurde nachgewiesen. Da die durchschnittlich ermittelte Zahl an gemeinsam vorliegenden Toxinen in den Proben bei 3 lag, muss von der Möglichkeit einer Multi-Trichothecenbelastung von Stroh ausgegangen werden. Deoxynivalenol (DON) war im Hinblick auf Häufigkeit des Vorkommens und Gehalt das dominierende Toxin. Es war in 83% der Proben nachweisbar mit mittlerem Gehalt von 1234 µg/kg, medianem Gehalt von 439 µg/kg und einer Variationsbreite von 23253 µg/kg. Die Trichothecene HT-2, T-2 Toxin (T-2), T-2 TETRA, Scirpentriol, NIV, 15-Acetyldeoxynivalenol (15-ADON) und 3-Acetyldeoxynivalenol waren in 55, 37, 9, 9, 32, 21 und 9% der 201 analysierten Proben nachweisbar. Fusarenon-X, 15-Monoacetoxyscirpenol, 4,15-

Diacetoxyscirpenol, T-2 triol und OA wurden in weniger als 5% der Proben detektiert, Neosolaniol in keiner Probe. ZON war in 46% der 201 Strohproben nachweisbar, die Gehalte lagen zwischen 7 und 767 µg/kg. OA wurde lediglich in einer von 201 Strohproben im Spurenbereich detektiert, somit ist von keiner Belastung durch dieses Lagertoxin auszugehen.

Es konnte ein unterschiedliches Trichothecenaufkommen in den 2 Versuchsjahren beobachtet werden. Im ersten Versuchsjahr lagen die NIV-, 15-ADON- und ZON-Gehalte über denen im zweiten Jahr. HT-2 und T-2 waren signifikant bzw. tendenziell im Erntejahr 2008 stärker vertreten. Insgesamt zeichnete sich sowohl in der sensorischen Beurteilung als auch in der Analyse der *Fusarium*-Toxine eine schlechtere bzw. höhere Belastung des Strohs im Erntejahr 2007 ab. Dieses Ergebnis könnte mit den höheren Niederschlägen in den Monaten Mai bis Juli im ersten Versuchsjahr im Zusammenhang stehen.

Über die beiden Versuchsjahre wurden 80 Weizenstroh-, 79 Gerstenstroh-, 11 Haferstroh-, 12 Roggenstroh-, 12 Triticalestroh-, 1 Dinkelstroh- sowie 6 Strohproben mit unbekannter Strohart untersucht.

Zwischen Weizen- und Gerstenstroh ergab sich eine Belastung mit unterschiedlichen Trichothecenspektren, wobei die Ergebnisse aus beiden Erntejahren gut übereinstimmten. Insgesamt zeigten sich signifikant verschiedene Gehalte der Toxine DON, 15-ADON und ZON mit höheren Gehalten in der Strohart Weizen und der Typ-A Trichothecene HT-2 und T-2 in Gerste. Diese Unterschiede im Toxinspektrum könnten durch eine Besiedlung mit unterschiedlichen *Fusarium*-Arten entstanden sein.

Aufgrund der hohen Anteile an Weizen- und Gerstenstrohproben konnte für diese beiden Stroharten eine separate Auswertung bezüglich der Einflüsse acker- und pflanzenbaulicher Maßnahmen erfolgen und auch die geographische Verteilung der Toxine innerhalb Deutschlands ermittelt werden. Die aus den Fragebögen gewonnenen Informationen wurden mit den Toxingehalten der jeweiligen Strohproben korreliert und statistisch mit Hilfe des Kruskal-Wallis ausgewertet. Nach nicht wendender Bodenbearbeitung zeigten Proben sowohl aus Gersten- als auch aus Weizenstroh eine signifikant oder tendenziell stärkere Belastung mit DON im Vergleich zu Proben nach wendender Bodenbearbeitung. Die Weizen- und die Gerstenpflanzen wurden nach unterschiedlichen Vorfrüchten angebaut. Der NIV-Gehalt war in Gerstenstroh hoch signifikant höher in Proben mit der Vorfrucht Mais. In Weizenstroh wurden keine signifikanten Unterschiede festgestellt.

Nach der Ernte wurde das Stroh unterschiedlich lang und auch an unterschiedlichen Orten gelagert. Weizenstrohproben die im Freien gelagert wurden, enthielten im Vergleich zu unter

Dach gelagerten Proben einen signifikant höheren DON-Gehalt, tendenziell ergab sich diese Beobachtung auch für die Toxine 15-ADON und ZON.

Die Proben wurden von der Ernte bis zur Probenahme unterschiedlich lang gelagert. Die Proben die nach der Ernte bis zum Dezember des Erntejahres entnommen wurden, also 0-5 Monate lagerten, wurden mit denen verglichen die 6-12 Monate nach der Ernte entnommen wurden. Es ergaben sich keine höheren Toxingehalte in länger gelagerten Proben.

In den Gerstenstrohproben zeigten die Typ-A Trichothecene HT-2 und T-2 signifikant höhere Gehalte im Süden Deutschlands mit p-Werten von 0,0005 und 0,0036, wiesen jedoch in Weizenstroh keine signifikanten Unterschiede auf. Sowohl in Gerstenstroh ($p = 0,1032$) als auch in Weizenstroh ($p = 0,0171$) wies das DON tendenziell bzw. signifikant höhere Gehalte im westlichen Gebiet Deutschlands auf. Auch NIV zeigte in Weizenstroh in diesem Areal signifikant höhere ($p = 0,0221$) Gehalte.

Die Analyse der Strohproben auf maskierte Toxine erfolgte mit Hilfe chemischer und enzymatischer Hydrolysen und eines *in vitro*-Modells das die Verhältnisse des Magen-Darm Traktes des Schweins simuliert. Die statistische Auswertung der einzelnen Versuche ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Varianten mit Behandlung im Vergleich zu den Varianten ohne Behandlung. Es konnte somit keine Freisetzung von möglicherweise vorhandenen maskierten Toxinen aus den Strohproben mit den angewandten Methoden nachgewiesen werden.

5. Gegenüberstellung der ursprünglich geplanten zu den tatsächlich erreichten Zielen

Alle geplanten Versuche zur Untersuchung der Belastung von Getreidestroh mit *Fusarium*-Toxinen und Ochratoxin A, sowie Untersuchungen zum Vorkommen von maskierten Toxinen wurden erfüllt.

6. Literatur

Amuzie, C.J., Harkema, J.R., Pestka, J.J. (2008). Tissue distribution and proinflammatory cytokine induction by the trichothecene deoxynivalenol in the mouse: Comparison of nasal vs. oral exposure. *Toxicology*, 248, 39-44

Analytical Methods Committee (2000). Determination of thiamine and riboflavin in pet foods and animal feedingstuffs. *The Analyst*, 125, 353-360

Berner, A., Frei, R., Dierauer, H.-U., Vogelsang, S., Forrer, H.-R., Mäder, P. (2005). Effects of reduced tillage, fertilisation and biodynamic preparations on crop yield, weed infestation and the occurrence of toxigenic *Fusaria*. <http://orgprints.org>

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

Bottalico, A. (1998). *Fusarium* diseases of cereals: species complex and related mycotoxin profiles, in Europe. *Journal of Plant Pathology*, 80 (2), 85-103

Döll, S., Dänicke, S., Valenta, H., Flachowsky, G. (2004). In vitro studies on the evaluation of mycotoxin detoxifying agents for their efficacy on deoxynivalenol and zearalenon. *Archives of Animal Nutrition*, 58 (4), 311-324

Edwards, S.G. (2009). *Fusarium* mycotoxin content of UK organic and conventional barley. *Food Additives and Contaminants*, 26 (8), 1185-1190

Flachowsky, Gerhard (1987). *Stroh als Futtermittel*. VEB Deutscher Landwirtschaftsverlag Berlin

Gareis, M. (1994). Maskierte Toxine. *Übersichten Tierernährung*, 22, 104-113

Heß, M., Hillebrecht, W., Winkler, J. (2009). Verschiedene *Fusarium*arten auf der Gerste - Auftreten und Einfluss der Bekämpfungsmaßnahmen. Getreidemagazin 2/2009, 80-82

Joel, S.P., Clark, P.I., Slevin, M.L. (1995). Stability of the i.v. and oral formulation of etoposide in solution. Cancer chemotherapy and pharmacology, 137, 117-124

Kamphues, J., Coenen, M., Kienzle, E., Pallauf, J., Simon, O., Zentek, J. (2004). Supplemente zu Vorlesungen und Übungen in der Tierernährung. M. & H. Schaper Verlag. Hannover, 141

Köhl, J., Waalwijk, C. (2007). Ährenfusariose: Viele Erreger verursachen Probleme. Getreidemagazin 2/2007, 100-104

Liu, Y., Walker, F., Hoeglinger, B., Buchenauer, H. (2005). Solvolysis procedures for the determination of bound residues of the mycotoxin deoxynivalenol in *Fusarium* species infected grain of two winter wheat cultivars preinfected with barley yellow dwarf virus. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53, 6864-6869

Mastel, K., Michels, K. (2000). Dauerbrenner *Fusarium*. Landinfo 9/2000, 9-13

Müller, H.-M., Reimann, J., Schuhmacher, U., Schwadorf, K. (2001). Further survey of the occurrence of *Fusarium* toxins in wheat grown in southwest Germany. Archives of Animal Nutrition, 54 (2), 173-182

Naumann, K., Basler, R. (1979). VDLUFA-Methodenbuch, Band III. Die Chemische Untersuchung von Futtermitteln. VDLUFA-Verlag: Darmstadt.

Piper, D.W., Fenton, B.H., Griffith, E.M., Broderick, F.L., Beeston, D (1965). Enzyme systems in gastric mucosa. Digestive Diseases and Sciences, 10 (7), 596-601

Schlüter, K., Kropf, U. (2006). *Fusarium*-Befall aus dem Boden? Landwirtschaft ohne Pflug, 2, 28-33

Schollenberger, M., Lauber, U., Terry, H., Suchy, S., Drocher, W., Müller, H.-M. (1998). Determination of eight trichothecenes by gas chromatography-mass spectrometry after sample clean-up using two-stage solid phase extraction. *Journal of Chromatography A*, 815, 123 -132

Schollenberger, M., Müller, H.-M. , Rüfle, M., Suchy, S., Planck, S., Drochner, W. (2005). Survey of *Fusarium* toxins in foodstuffs of plant origin marketed in Germany. *International Journal of Food Microbiology*, 97, 317-326

Schollenberger, M., Müller, H.-M. , Terry-Jara, H., Drochner, W. (2008a). *In-Vitro* studies on the capacity of some macromolecules to adsorb deoxynivalenol and zearalenone. Conference Abstract of the 30th Mycotoxin Workshop, Utrecht, The Netherlands, 134

Schollenberger, M., Müller, H.-M. , Rüfle, M., Suchy, S., Dejanovic, C, Frauz, B., Oechsner, H., Drochner, W. (2008b). Simultaneous determination of a spectrum of trichothecene toxins out of residuals of biogas production. *Journal of Chromatography A*, 1193, 92 - 96

van Barneveld, R. (2005). Accurate assessment of diet intake and composition in various pig housing systems. Pig Research Report (APL Projekt 1754)

Waalwijk, C., Kastelein, P., de Vries, I., Kerényi, Z., van der Lee, T., Hesselink, T., Köhl, J., Kema, G. (2003). Major changes in *Fusarium spp.* in wheat in the Netherlands. *European Journal of Plant Pathology*, 109, 743-754

White, C.I., Edwards, S.G., Stewart, A.H. (2007). An investigation into the level of *Fusarium* mycotoxins in samples of UK wheat straw used for bedding livestock. *Proceedings of the British Society of Animal Science Annual Conference 2007*, 106

Zhou, B., Li, Y., Gillespie, J., He, G.-Q., Horsley, R., Schwarz, P. (2007). Doehler Matrix Design for Optimization of the Determination of Bound Deoxynivalenol in Barley Grain with Trifluoroacetic Acid (TFA). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 10141-10149

Zuwendungsempfänger bzw. ausführende Stelle

Institut für Tierernährung
Friedrich-Loeffler-Institut (FLI)
Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit
Bundesallee 50
38116 Braunschweig

Forschungsprojekt Nr. 07HS007

Thema: Untersuchungen zur Belastung von Getreidestroh mit *Fusarium*-Toxinen und Ochratoxin A sowie zur Bioverfügbarkeit von Deoxynivalenol (DON) und Zearalenon (ZON) aus Weizenstroh

Laufzeit

01.08.2007 – 15.11.2009

Berichtszeitraum

01.08.2007 – 15.11.2009

In Zusammenarbeit mit:

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

1. Ziele und Aufgabenstellung des Projekts

1.1 Planung und Ablauf des Projekts

Ziel dieses Projektes war es, eine Abschätzung des möglichen Beitrags von Stroh zur Mykotoxinexposition von Nutztieren vorzunehmen. Zu diesem Zweck wurden am Standort Braunschweig zwei Lagerversuche (Witterungsversuch, Weckglasversuch) und zwei Tierversuche (Bioverfügbarkeitsversuch, Bilanzversuch) durchgeführt.

In den Lagerversuchen wurden zwei Varianten von Stroh, einmal mit *Fusarium culmorum* inokulierter Weizen und eine anbaugleiche Kontrollvariante, unter unterschiedlichen Bedingungen gelagert. Um an den praktischen Hintergrund anzuknüpfen, wurden beim Witterungsversuch zwei praxisrelevante Lagerbedingungen unterschieden, die Lagerung in einer Scheune (witterungsgeschützt) und die Lagerung im Freien (Witterungseinfluss). Beim Weckglasversuch sollte unter kontrollierbaren Bedingungen der Einfluss der Feuchtigkeit auf die Mykotoxinkonzentrationen in Abhängigkeit von der Lagerdauer untersucht werden. Für beide Lagerversuche war eine Lagerdauer von 16 Wochen vorgesehen.

Zur Verbesserung der statistischen Auswertung, erfolgten im Witterungsversuch abweichend vom Projektplan (einfache Beprobung, 16 Wochen Lagerdauer) eine dreifache Beprobung und eine zusätzliche Beprobung nach 32 Wochen. Auf Grund des feuchteren Ausgangsmaterials wurden die drei Abstufungen in der Trockensubstanz im Weckglasversuch um 2% reduziert.

Im Bioverfügbarkeitsversuch wurde den Schweinen eine einmalig orale Dosis von DON über die Einmischung von drei Weizenfraktionen (Körner, Stroh und Kaff) des mit *Fusarium culmorum* inokulierten Weizens verabreicht. Hierbei dienten Schweine als Positivkontrolle, die die gleiche Dosis DON intravenös appliziert bekamen (i.v. = 100% Bioverfügbarkeit). Um die Bioverfügbarkeit von DON aus Stroh und Kaff im Vergleich zu Körnern bestimmen zu können, wurden die DON-Serum-Konzentrationen hierbei über einen Zeitraum von 24 Stunden ausgewertet. Durch die Möglichkeit auf Daten aus einem vorangegangenen Versuch zurückzugreifen, konnte auf die intravenöse Injektion des DON bei den vier geplanten Schweinen verzichtet werden. Diese Schweine konnten für andere Gruppen verwendet werden, was der statistischen Auswertung dienlich war.

Der Bilanzversuch wurde mit sechs Mastschweinen über eine Periode von acht Wochen durchgeführt. Ziel dieses Versuches war es, über eine quantitative Sammlung von Kot und

Harn weitere Aussagen zur Bioverfügbarkeit, sowie zu Ausscheidungswegen und zur Metabolisierung von DON zu De-epoxy-DON (DOM-1) treffen zu können. Weitere Kenntnisse zu Unterschieden in den Verdaulichkeiten der Roh Nährstoffe zwischen den Kontrollgruppen und den *Fusarium*-Gruppen sollten durch eine zusätzliche Weender-Analyse der Futter-, Kot- und Harnproben erlangt werden.

1.2 Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde

Das Aufkommen an Getreidestroh beträgt im bundesdeutschen Mittel ca. 7,3 % des Getreideaufkommens (BMELV 2008). Dieser nicht unerhebliche Teil der Getreideernte wird in der Tierhaltung überwiegend als Einstreumaterial verwendet. Daneben wird Stroh als strukturwirksame Rationskomponente insbesondere in der Wiederkäuerfütterung eingesetzt. Allerdings ist davon auszugehen, dass auch Stroh aus der Einstreu durch die Tiere aufgenommen wird, was sowohl Wiederkäuer als auch Monogastriden betrifft. Verlässliche Angaben zur Strohaufnahme aus der Einstreu liegen nicht vor. Daher ist die Abschätzung des Expositionsrisikos gegenüber unerwünschten Stoffen aus Stroh, wie z.B. *Fusarium*-Toxine, nur bedingt möglich. Hierzu kommt, dass es kaum Angaben zum Vorkommen dieser Mykotoxine im Stroh gibt. Experimentelle Befunde deuten darauf hin, dass eine massive Kontamination von Weizenkörnern mit DON sowie ZON auch mit einer erhöhten Konzentrationen in der Restfraktionen der Weizenpflanze (Spelzen, Spindeln, und Stroh) einhergeht. Dabei ist zu berücksichtigen, dass DON und ZON nur als Indikator-Toxine aufzufassen sind, da eine *Fusarium*-Infektion häufig auch mit einer Kontamination weiterer Toxine, für deren Analytik momentan noch keine Verbandsmethode des VDLUFA existiert, zu rechnen ist. Die EU hat in diesem Zusammenhang dazu aufgefordert, in den nächsten Jahren korrespondierende Analysedaten zum Vorkommen von *Fusarium*-Toxinen (insbesondere T-2 Toxin und HT-2 Toxin neben DON und ZON) zu erheben, um das toxische Potential kontaminierter Futtermittel besser abschätzen zu können.

Außer den *Fusarium*-Toxinen, die bereits mit der Ernte ins Stroh gelangen, kann auch eine längere Lagerung von Stroh unter ungünstigen Lagerbedingungen (insbesondere Feuchte) zur Bildung von Ochratoxin A, einem typischen Lagertoxin, führen.

Um repräsentative Angaben zum Vorkommen dieser Mykotoxine in Getreidestroh in der Bundesrepublik machen zu können, war ein Screening von Strohproben entsprechend den Aufkommen nach Bundesländern erforderlich.

Neben diesen Angaben zum Vorkommen ist auch die Frage nach der Bioverfügbarkeit von *Fusarium*-Toxinen aus Stroh zu stellen, da diese in den mehr oder weniger lignifizierten Strohbestandteilen (einschl. Spelzen und Spindeln) in einer anderen Bindungsform vorliegen könnten als in den Körnern. Als indirekter Hinweis für die Änderung in den Bindungsformen von *Fusarium*-Toxinen während der Entwicklung von Getreide bei gleichzeitiger *Fusarium*-Infektion kann der zu beobachtende Rückgang der DON- und ZON- Konzentration in den einzelnen Fraktionen der Getreidepflanzen nach Erreichen eines Maximums gewertet werden. Daher war zu klären, ob und in welcher Höhe eine der herkömmlichen Analytik unzugängliche Toxinfraktion (so genannte maskierte Mykotoxine) im Stroh vorliegen und inwieweit die in der Strohfraktion gebundenen oder physikalisch eingeschlossenen Toxine für das Tier zugänglich, d.h. bioverfügbar, sind.

Aus den durch das Screening und die Tierversuche zur Bioverfügbarkeit gewonnenen Daten sollte das Gefährdungspotential von Getreidestroh abgeschätzt werden.

2. Material und Methoden

Im Institut für Tierernährung am Standort Braunschweig des Friedrich-Loeffler-Instituts wurden zwei Versuche zur Auswirkung der Lagerung auf die Mykotoxinkonzentrationen (Witterungsversuch, Weckglasversuch) im Stroh unter definierten Bedingungen sowie zwei Tierversuche (Bioverfügbarkeitsversuch, Bilanzversuch) zur Bioverfügbarkeit von DON als Leittoxin einer *Fusarium*-Infektion durchgeführt.

Um für die Versuche eine ausreichende Menge an mit Mykotoxinen kontaminiertem Ausgangsmaterial zur Verfügung zu stellen, wurde am Standort Mariensee des Friedrich-Loeffler-Instituts ein Teil des angebauten Winterweizens mit Sporen von *Fusarium culmorum* künstlich inokuliert, wie bei Matthäus (2004) beschrieben. Bei der Ernte wurden drei verschiedene Fraktionen des Weizens unterschieden: Stroh, Körner und eine Mischung aus Spindel und Spelzen, das Kaff. Durch die kontrollierte Inokulation standen des Weiteren für die Fraktionen Stroh und Körner die anbaugleichen Kontrollen zur Verfügung.

Alle fünf Weizenfraktionen wurden an der LUFA Münster einer mikrobiologischen Untersuchung unterzogen, um einen Überblick über den Hygienestatus zu erhalten.

Toxinanalytik

Die DON-Konzentration im Futtermittel und in den fünf Weizenfraktionen, wurde mittels HPLC mit UV-Detektion nach Reinigung der Extrakte mit Immunoaffinitätssäulen nach der Methode von Oldenburg et al. (2007) bestimmt. Die Nachweisgrenze lag bei 0,03 mg/kg. Die durchschnittliche Wiederfindung betrug 92%.

Die aus dem Bioverfügbarkeitsversuch stammenden Blutserumproben wurden mittels HPLC mit UV-Detektion nach 16-stündiger Inkubation mit Glucuronidase und Reinigung des Extraktes mit Immunoaffinitätssäulen auf DON und DOM-1 analysiert (Valenta et al. 2003). Die Nachweisgrenze betrug 2 ng/ml und die Wiederfindung lag bei 95%.

Die Strohproben aus den Lagerversuchen wurden vom Projektpartner in Hohenheim auf ein Spektrum von 13 Trichothecenen untersucht (Nivalenol, Fusarenon-X, DON, 3- und 15 Acetyl-DON, T2-Toxin, HT2-Toxin, T2-Triol, T2-Tetraol, Neosolaniol, 4,15-Diacetoxyscirpenol, 15-Monoacetoxyscirpenol und Scirpenol). Die Nachweisgrenzen lagen für Nivalenol bei 35 µg/kg, für Fusarenon-X bei 55 µg/kg, für DON bei 15 µg/kg, für 3- und 15 Acetyl-DON bei 50 µg/kg und 20 µg/kg, für T2-Toxin bei 10 µg/kg, für HT2-Toxin bei 15 µg/kg, für T2-Triol bei 35 µg/kg, für T2-Tetraol bei 70 µg/kg, für Neosolaniol bei 25 µg/kg, für 4,15-Diacetoxyscirpenol bei 35 µg/kg, für 15-Monoacetoxyscirpenol bei 30 µg/kg und für Scirpenol bei 40 µg/kg. Zusätzlich wurden die Proben auf die Mykotoxine ZON und Ochratoxin A (OTA) mittel HPLC mit Fluoreszenz-Detektion nach Aufreinigung mit Immunoaffinitätssäulen analysiert (VDLUFA 1976). Die Nachweisgrenzen lagen bei 0,4 ng/g für OTA und bei 6 ng/g für ZON, die Wiederfindung bei 85 % und 67 %.

Witterungsversuch

Für den Witterungsversuch unter praktischen Bedingungen wurde sowohl das inokulierte als auch das Kontrollstroh nach der Ernte in Quaderballen (l*h*b: 2,50m * 0,70m * 1,20m) gepresst und auf der Versuchsstation in Braunschweig gelagert. Die Lagerung erfolgte zum einen in einer offenen Scheune Abbildung 1 und zum anderen unter freiem Himmel abgedeckt mit einer Folie (Abbildung 2). Für jede der vier Varianten standen drei Großballen zur Verfügung.



Abbildung 1: Lagerbedingungen des in der Scheune gelagerten Strohs im Witterungsversuch



Abbildung 2: Lagerbedingungen des im Freien gelagerten Strohs im Witterungsversuch

Die Stichproben wurden in Form eines Zylinders mittels Silagebohrgerät gewonnen, der alle Schichten des Ballens bis in eine Tiefe von ca. 35 cm umfasste. Die Beprobung wurde am ersten Tag der Lagerung durchgeführt und nach 2, 4, 8, 16, und 32 Wochen wiederholt (Tabelle 1)

Tabelle 2: Versuchsdesign des Witterungsversuches

Strohvariante	Lagervariante	Probennahme (Wochen nach Beginn)					
		0	2	4	8	16	32
Kontrolle	Im Freien	3 x	3 x	3 x	3 x	3 x	3 x
	In der Scheune	3 x	3 x	3 x	3 x	3 x	3 x
Inokuliert	Im Freien	3 x	3 x	3 x	3 x	3 x	3 x
	In der Scheune	3 x	3 x	3 x	3 x	3 x	3 x

Die Proben wurden bei 60°C vorgetrocknet und auf 1mm vermahlen. Ein Teil der Probe wurde zur Trichothecen-Analyse nach Hohenheim versandt. In Braunschweig erfolgten in dem Rest der Probe die Bestimmung der absoluten Trockensubstanz sowie des Gehaltes an OTA und ZON.

Während der gesamten Lagerzeit wurden täglich die Wetterdaten Temperatur, Luftfeuchte und Niederschlag von der Wetterstation Braunschweig (Entfernung zum Lagerungsort der Strohballe < 500m) des Deutschen Wetterdienstes aufgezeichnet (siehe Abbildung 3) und für den Versuch zur Verfügung gestellt.

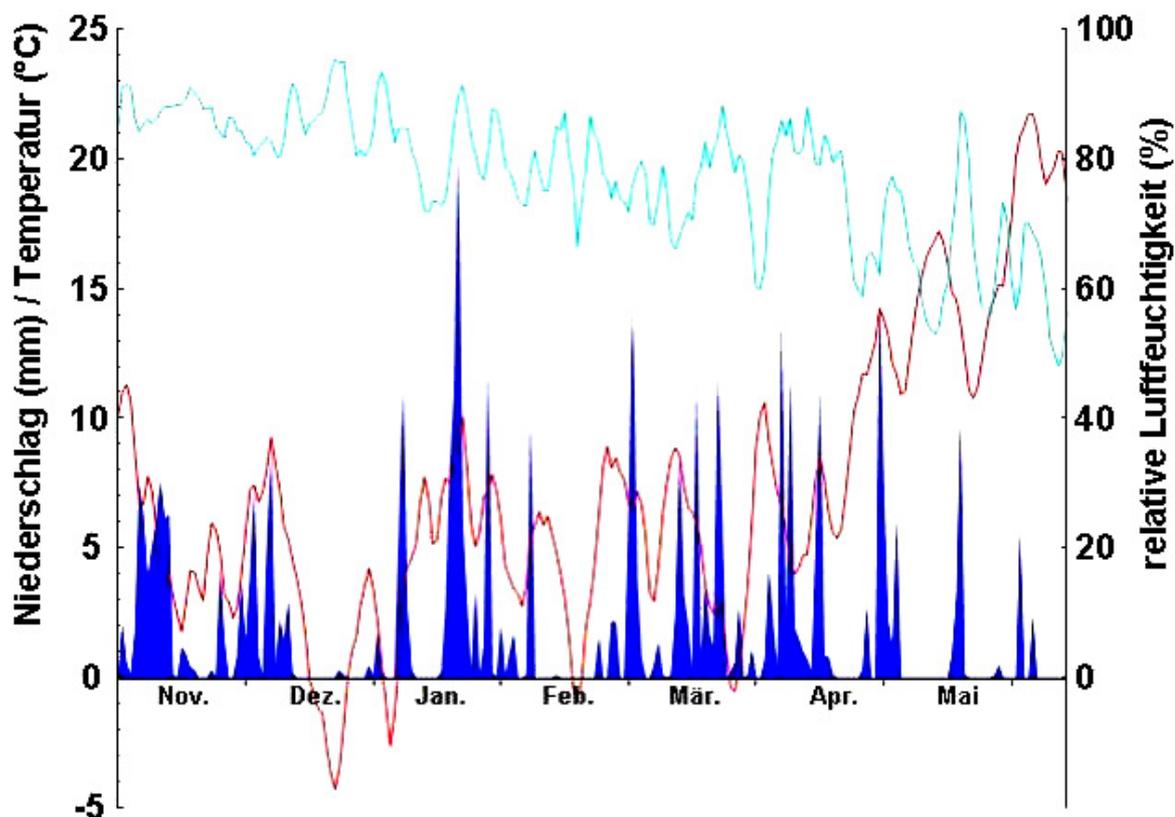


Abbildung 3: Tagesmittelwerte der Temperatur (—), des Niederschlages (■) und der relativen Luftfeuchtigkeit (—)

Die statistische Auswertung der Daten aus den Toxinanalysen erfolgte mit dem Statistikpaket SAS 9.1. Die Berechnung der Effekte der Strohvariante und der Zeit innerhalb der Stroh- und Lagervarianten auf die einzelnen Mykotoxin-Konzentrationen wurde mit einem Mixed Model nach der „restricted maximum likelihood“ Methode unter Anwendung der Berechnung der Freiheitsgrade nach Kennward-Roger durchgeführt. Den inhomogenen Varianzen der vier Varianten wurde im angewendeten Model berücksichtigt.

```
PROCEDURE MIXED METHOD = REML ;
CLASS Strohvariante Lagervariante ;
MODEL Mykotoxin = Strohvariante Zeit(Strohvariante * Lagervariante) / DDFM =
KENWARDROGER ;
REPEATED / GROUP = Strohvariante * Lagervariante ;
RUN ;
```

Weckglasversuch

Um den Einfluss der Trockensubstanz auf die Mykotoxinkonzentration im Stroh des mit *Fusarium culmorum* inokulierte Weizenstrohs und des Kontrollweizenstrohs zu untersuchen, sollten die Trockensubstanz-Gehalte auf 88 %, 84 % und 80 % eingestellt werden. Da die Ausgangstrockensubstanz beim Stroh nur bei 86 % lag, wurden die drei angestrebten Trockensubstanzen um 2 %, auf 86 %, 82 % und 78 %, reduziert.

Zur Einstellung der gewünschten Trockensubstanzen wurde das Stroh auf 0,5 cm gehäckselt und gleichmäßig mit der benötigten Menge Wasser benetzt. Anschließend wurde das Stroh der sechs Varianten in Weckgläser abgefüllt und so gestopft, dass ein Verdichtungsgrad erreicht wurde, der demjenigen bei Lagerung in Strohbällen entspricht. Um einen Gasaustausch zu ermöglichen, wurden die Weckgläser nur mit einem Glasdeckel (ohne Gummidichtung) verschlossen, liegend gelagert (Tabelle 2).

Tabelle 3: Versuchsdesign des Weckglasversuches

Strohvariante	Trockensubstanz	Probennahme (Wochen nach Beginn)				
		0	2	4	8	16
Kontrolle	86 %	X	X	X	X	X
	82 %	X	X	X	X	X
	78 %	X	X	X	X	X
Inokuliert	86 %	X	X	X	X	X
	82 %	X	X	X	X	X
	78 %	X	X	X	X	X

Die Lagerung der Weckgläser erfolgte am Institut für Pflanzenbau und Bodenkunde des Julius Kühn-Instituts in Braunschweig in einer Klimakammer bei 20°C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von ca. 45 %. Für die Beprobung der sechs Varianten zu Beginn der Lagerperiode und nach 2, 4, 8, und 16 Wochen Lagerung standen jeweils 2 Gläser à 250 g Stroh zur Verfügung. Die Probenbehandlung nach der Entnahme aus den Weckgläsern erfolgte analog dem Witterungsversuch.

Die statistische Auswertung der Daten aus den Toxinanalysen erfolgte mit dem Statistikpaket SAS 9.1. Die Berechnung der Effekte der Strohvariante und der Zeit innerhalb der Stroh- und Trockensubstanzvarianten auf die einzelnen Mykotoxin-Konzentrationen wurde mit einem Mixed Model nach der „restricted maximum likelihood“

Methode unter Anwendung der Berechnung der Freiheitsgrade nach Kennward-Roger durchgeführt. Den inhomogenen Varianzen der vier Varianten wurde im angewendeten Model berücksichtigt.

PROCEDURE MIXED METHOD = REML ;

CLASS Strohvariante Trockensubstanzgehalt ;

MODEL Mykotoxin = Strohvariante Zeit(Strohvariante * Trockensubstanzgehalt) / DDFM
= KENWARDROGER ;

REPEATED / GROUP = Strohvariante * Trockensubstanzgehalt ;

RUN ;

Des Weiteren erfolgte eine Untersuchung der Strohproben auf Hefen und Schimmelpilze zu Beginn der Lagerung und nach 16 Wochen.

Bioverfügbarkeitsversuch

Zur Durchführung des Bioverfügbarkeitsversuchs wurden 16 Mastschweine ab ca. 25 kg Lebendmasse (LM) in Einzelhaltung an das im Versuch verwendete Mastfutter gewöhnt. Das Mastfutter setzte sich aus 35 % Gerste, 79,9 % Weizen, 22 % Sojaschrot und 1,5 % Sojaöl, sowie 3 % Mineralstoffvormischung für Mastschweine und 0,5 % Aminosäurevormischung für Mastschweine zusammen. Die Futtermischung war auf den Bedarf für Mastschweine zwischen 25 und 75 kg mit 900 g täglichen Lebendmassezunahmen angepasst. Die Futtermenge lag zwischen 1000 g und 1200 g pro Tag und Tier in Abhängigkeit vom Gewicht der Tiere.

Eine Woche vor Beginn des Versuches erfolgte die Aufstallung der Schweine in Stoffwechselkäfige. Zwei Tage vor dem Versuch wurden die Venenverweilkatheter unter Vollnarkose, wie bei Goyarts (2006) beschrieben, gelegt, um Stress bei den Tieren durch die frequente Blutentnahme zu vermeiden.

Am Versuchstag wurde eine halbe Stunde vor der Morgenfütterung eine Blutprobe entnommen („Null-Probe“). Bei der Fütterung wurden den Schweinen einmalig 10 bis 15 % des Anfangsmastfutters durch eine Fraktion des künstlich inokulierten Weizens ersetzt (Tabelle 3). Die Menge der Substitution richtete sich nach der verabreichten Fraktion und nach der Akzeptanz der einzelnen Tiere. Als Referenzgruppe sollten vier Schweine intravenös mit kristallinen DON, gelöst in NaCl-Lösung, exponiert werden (= 100%

Bioverfügbarkeit). Um den Schweinen die intravenöse Verabreichung von DON zu ersparen, konnte auf Daten aus einem vorausgegangenem Versuch (Goyarts & Dänicke 2006) zurückgegriffen werden, der analog zu diesem durchgeführt wurde. Die vier Schweine, die für die Referenzgruppe vorgesehen waren, konnten somit zur besseren statistischen Auswertung der Stroh bzw. der Körner Gruppe zugeschlagen werden. Somit erhöhten sich die Tierzahlen in der Stroh und der Körner-Gruppen von 4 auf 6 Schweine und bei der Kaff-Gruppe wurde die Tierzahl um ein Schwein zusätzlich auf fünf gesteigert.

Tabelle 4: Gruppenaufteilung des Bioverfügbarkeitsversuches

Gruppe	i.v.	Stroh	Körner	Kaff
Tierzahl	5	6	6	5
Lebendmasse (kg)	39 - 41	37 - 41	36 - 46	43 - 49
Substitutionsmenge (%)	0	10 - 15	15	12 - 15

Die verabreichte Dosis sollte so eingestellt werden, dass sie derjenigen Dosis entsprach, die auch für die i.v. Exposition angewendet wurde (Referenzgruppe, 53 µg DON/kg Körpergewicht). Nach der Fütterung wurden über 24 Stunden Blutproben entnommen und für die Toxinanalytik aufbereitet.

Die Verläufe der Serum-DON-Konzentrationen wurden an die Bateman-Funktion nach Dost (1968) angepasst.

$$f(t) = \frac{D * k_i}{V * (k_i - k_e)} * \left[\exp^{(-k_e * t)} - \exp^{(-k_i * t)} \right]$$

(t = Zeit, D = Dosis, V = scheinbares Verteilungsvolumen, k_i = Invasionskonstante, k_e = Eliminationskonstante)

Die Bioverfügbarkeit (F) lässt sich aus dem Verhältnis zwischen der um die Dosis (D) korrigierten Fläche unter der Kurve (AUC) nach oralen Applikation zu der nach i.v. Applikation berechnen (intravenöse Applikation entspricht einer Bioverfügbarkeit von 100%):

$$F = \frac{\frac{AUC_{oral}}{D_{oral}}}{\frac{AUC_{iv}}{D_{iv}}} = \frac{AUC_{oral} * D_{iv}}{AUC_{iv} * D_{oral}}$$

Bilanzversuch

Der Bilanzversuch wurde mit sechs Schweinen in der Mastperiode zwischen 40 kg und 85 kg LM nach der Standard-Methode nach Schiemann (1981) durchgeführt. Als Grundfutter diente das im Bioverfügbarkeitsversuch eingesetzte Futter. Die Schweine erhielten täglich 80 g Futter pro Kilogramm metabolische Körpermasse ($LM^{0,75}$) aufgeteilt auf zwei Mahlzeiten. Während des Versuchszeitraums wurden 6 % des Futters durch eine der drei zur Verfügung stehenden Fraktionen des inokulierten Weizens oder der zwei zur Verfügung stehenden Fraktionen des Kontrollweizens ersetzt. Das nicht supplementierte Futter diente als Kontrolle. Der Versuchszeitraum von acht Wochen wurde in vier Durchgänge aufgeteilt. Nach jedem Durchgang wurden die verschiedenen Substitutionen gewechselt, um den tierindividuellen Effekt auszuschließen (Tabelle 4).

Tabelle 5: Gruppenaufteilung in den vier Durchgängen des Bilanzversuches

Tiernummer	1	2	3	4	5	6
Durchgang 1	KON-ST	AV	FUS-KÖ	KON-KÖ	FUS-KA	FUS-ST
Durchgang 2	FUS-ST	KON-ST	AV	FUS-KÖ	KON-KÖ	FUS-KA
Durchgang 3	FUS-KA	FUS-ST	KON-ST	AV	FUS-KÖ	KON-KÖ
Durchgang 4	KON-KÖ	FUS-KA	FUS-ST	KON-ST	AV	FUS-KÖ

AV = Mastfutter außer Versuch, KON-ST = Kontrollstroh, FUS-Stroh = inokuliertes Stroh, FUS-KA = inokuliertes Kaff, KON-KÖ = Kontrollkörner, FUS-KÖ = inokulierte Körner

Jeder der vier Durchgänge unterteilte sich in zwei Phasen, die Adaptionphase (9 Tage) an das Futter mit der neuen Substitution und die eigentliche Bilanzphase (5 Tage) (Abbildung 4).

1. Woche	2. Woche	3. Woche	4. Woche	5. Woche	6. Woche	7. Woche	8. Woche
Durchgang 1		Durchgang 2		Durchgang 3		Durchgang 4	
9 Tage	5 Tage						
Adaption	Bilanzphase	Adaption	Bilanzphase	Adaption	Bilanzphase	Adaption	Bilanzphase

Abbildung 4: Zeitlicher Ablauf der vier Durchgänge des Bilanzversuches

Der Harn wurde in Behältern aufgefangen, in denen 30 ml Schwefelsäure vorgelegt waren, anschließend wurde die Menge bestimmt sowie ein Aliquot von 10 % für die Analyse eingefroren. Der Kot wurde zweimal täglich gesammelt und vollständig eingefroren. Nach jedem Durchgang wurde der Gesamtkot homogenisiert, gefriergetrocknet und für die Analyse auf 1 mm gemahlen.

Futtermittel, Kot und Harn wurden zusätzlich zur DON-Analyse noch einer Weender-Analyse (VDLUFA 1976) und der Detergentien-Analyse nach Van Soest (VDLUFA 1976) unterzogen, um Aussagen zu den Verdaulichkeiten der Roh Nährstoffe treffen zu können.

Die Daten wurden einer zweifaktoriellen Varianzanalyse unterzogen und an das Model

$$y_{ijk} = \mu + a_i + b_j + e_{ijk}$$

angepasst, bei dem y_{ijk} die Ausprägung des Schweins (k) in der jeweiligen Gruppe des Fasergehaltes (i) und des DON-Gehaltes (j) ist. μ beschreibt den Mittelwert der Ausprägung, a_i den Effekt des Fasergehaltes im Futter, b_j den Effekt des DON-Gehaltes und e_{ijk} den tierindividuellen Effekt. Im Anschluss folgte ein post-hoc Test nach Tukey.

3. Ergebnisse

3.1 Ausführliche Darstellung der wichtigsten Ergebnisse

Witterungsversuch

Bei der Analyse der Proben aus dem Witterungsversuch wurden lediglich die Mykotoxine DON, 15-AcDON und ZON in allen Proben detektiert. 3-AcDON wurde nur in den Proben der inokulierten Variante nachgewiesen und Nivalenol konnte nur in 5 einzelnen Proben detektiert werden. Alle anderen Mykotoxine lagen unterhalb der Nachweisgrenze. Dieses Toxin-Muster begründet sich durch die Inokulation des Weizens mit *Fusarium culmorum*, der hauptsächlich die Toxine DON und ZON produziert (Toth et al. 2004).

Die Trockensubstanz des Strohs lag zu Beginn der Lagerung bei 80,8 % (Tabelle 6). Während die Trockensubstanz bei der Lagerung in der Scheune nahezu konstant blieb, sank die Trockensubstanz des im Freien gelagerten Strohs auf 36,0 % nach 32 Wochen ab (Abbildung 5).

Tabelle 6: LSMeans und Anstiege über die Zeit des Witterungsversuches

	Lagerung in der Scheune		Lagerung im Freien	
	Kontrollstroh	Inokuliertes Stroh	Kontrollstroh	Inokuliertes Stroh
LSMeans ($\mu\text{g}/\text{kg}$ bei 88% TS)				
TS (%)	81,8	81,2	81,8	81,2
DON	526 ^a	28.713 ^b	526 ^a	28.713 ^b
3-Acetyl-DON	37 ^a	3.371 ^b	37 ^a	3.371 ^b
15-Acetyl-DON	41 ^a	96 ^b	41 ^a	96 ^b
ZON	87 ^a	585 ^b	87 ^a	585 ^b
Veränderung der Gehalte (Anstiege der Regressionsgleichung) über die Zeit ($\mu\text{g}/\text{kg}/\text{d}$)				
TS (%)	0,02 ^{a*}	<0,01 ^a	-0,28 ^{b*}	-0,19 ^{b*}
DON	-0,4 ^a	-17,8 ^a	<0,1 ^a	-69,2 ^{b*}
3-Acetyl-DON	-0,1 ^a	0,6 ^a	<0,1 ^a	-16,3 ^{b*}
15-Acetyl-DON	-0,1	-0,3	-0,2	-0,4
ZON	0,4 ^{a*}	0,1 ^a	2,9 ^{b*}	6,2 ^{c*}

(abc = Unterschiedliche Indizes kennzeichnen signifikante Unterschiede innerhalb der Zeilen)

($p < 0,05$), * = Steigungen sind signifikant von Null verschieden ($p < 0,05$)

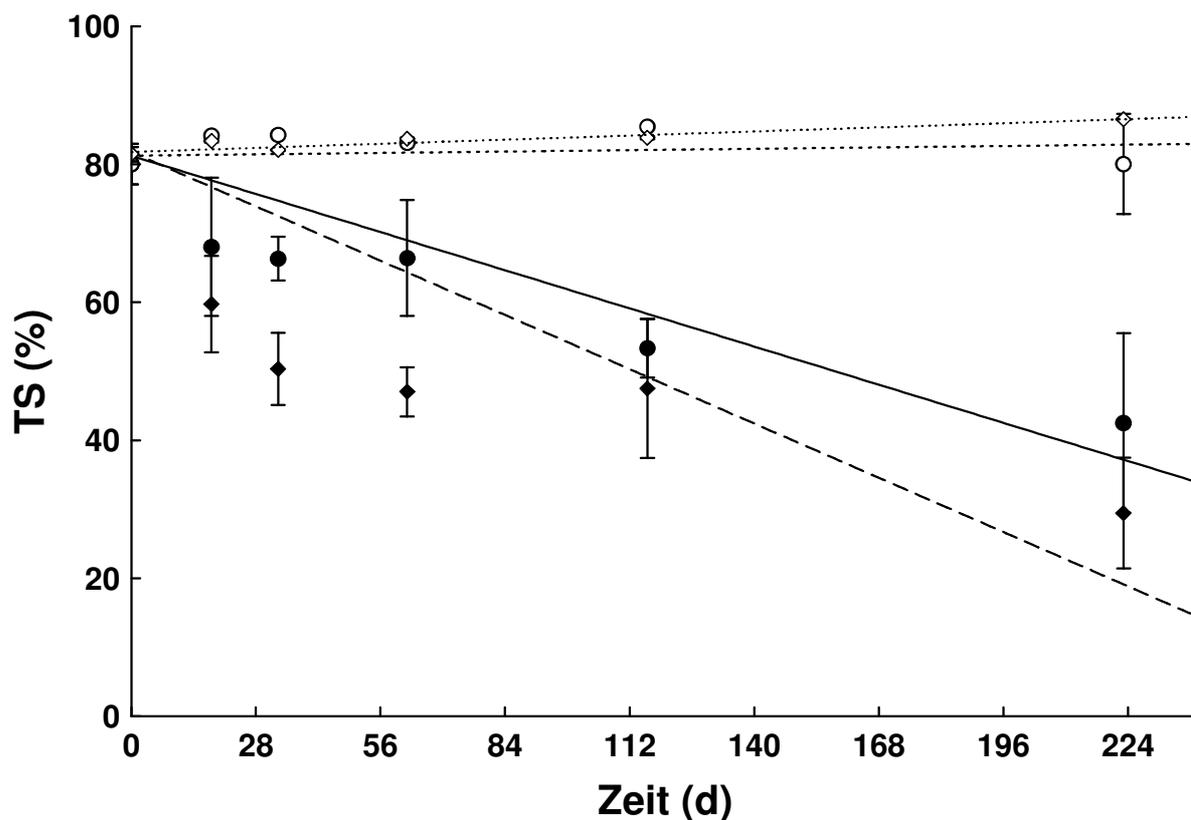


Abbildung 5: Verlauf der Trockensubstanzgehalte im inokulierten Stroh bei Lagerung im Freien (—●—) und in der Scheune (-○-) sowie im Kontrollstroh bei Lagerung im Freien (-◆-) und in der Scheune (---◇---) (MW±Stabw., n=3)

Das Stroh des mit *Fusarium culmorum* inokulierten Weizens enthielt 28,7 mg DON/kg, während die Kontrollvariante nur 0,5 mg DON/kg aufwies (Tabelle 6). Im Verlauf der Lagerung kam es in den Varianten des Kontrollstrohs zu keiner signifikanten Veränderung der DON-Konzentration. Bei der Variante des im Freien gelagerten, inokulierten Strohs kam es zu einer signifikanten Reduzierung der DON-Konzentration um 70 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{d}$ auf 13,1 mg DON/ kg nach 32 Wochen (Abbildung 4). Eine Reduktion der DON-Konzentration in der inokulierten Strohvariante, welche in der Scheune lagerte, erreichte keine statistische Signifikanz.

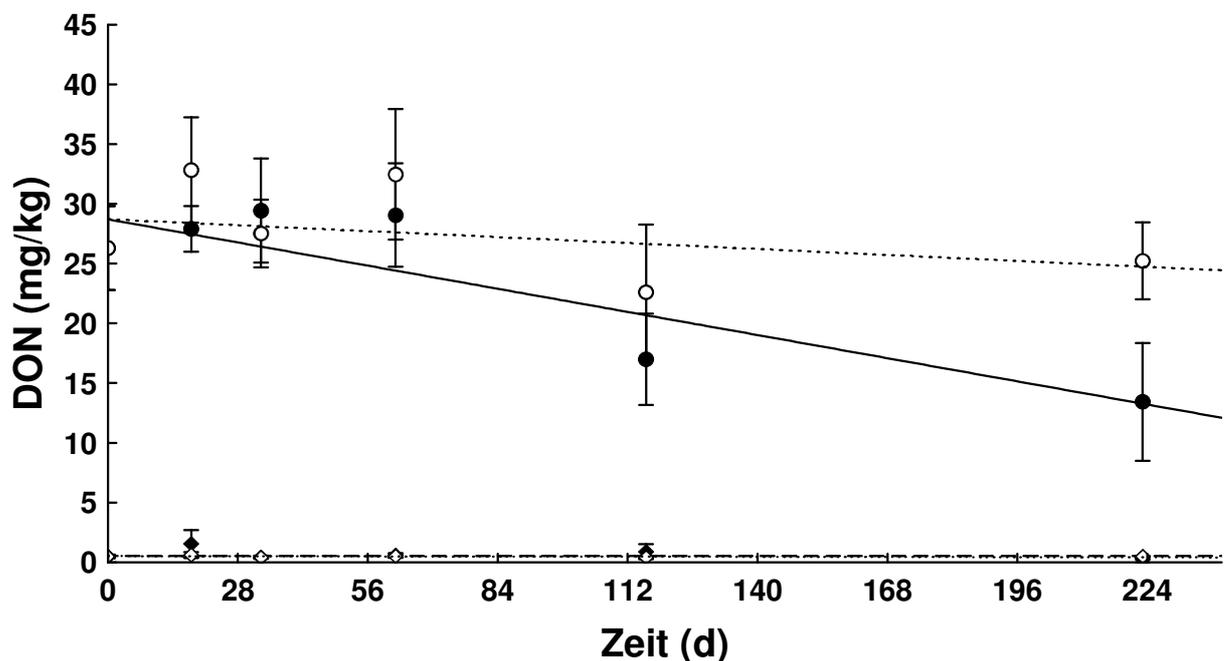


Abbildung 6: Verlauf der Deoxynivalenol-Konzentrationen im inokulierten Stroh bei Lagerung im Freien (—●—) und in der Scheune (-○-) sowie im Kontrollstroh bei Lagerung im Freien (-◆-) und in der Scheune (---◇---) (MW±Stabw., n=3)

Dieses Ergebnis spiegelt sich auch beim 3-Acetyl-DON wieder. Die inokulierten Varianten lagen mit einer Anfangskonzentration von 3,3 mg/kg höher als die des Kontrollstrohs mit 0,1 mg/kg (Tabelle 5). Beim Konzentrationsverlauf des 3-Acetyl-DON über die Zeit konnte ebenfalls nur eine signifikante Reduzierung bei der Variante des inokulierten, im Freien gelagerten Strohs bestätigt werden (Abbildung 5).

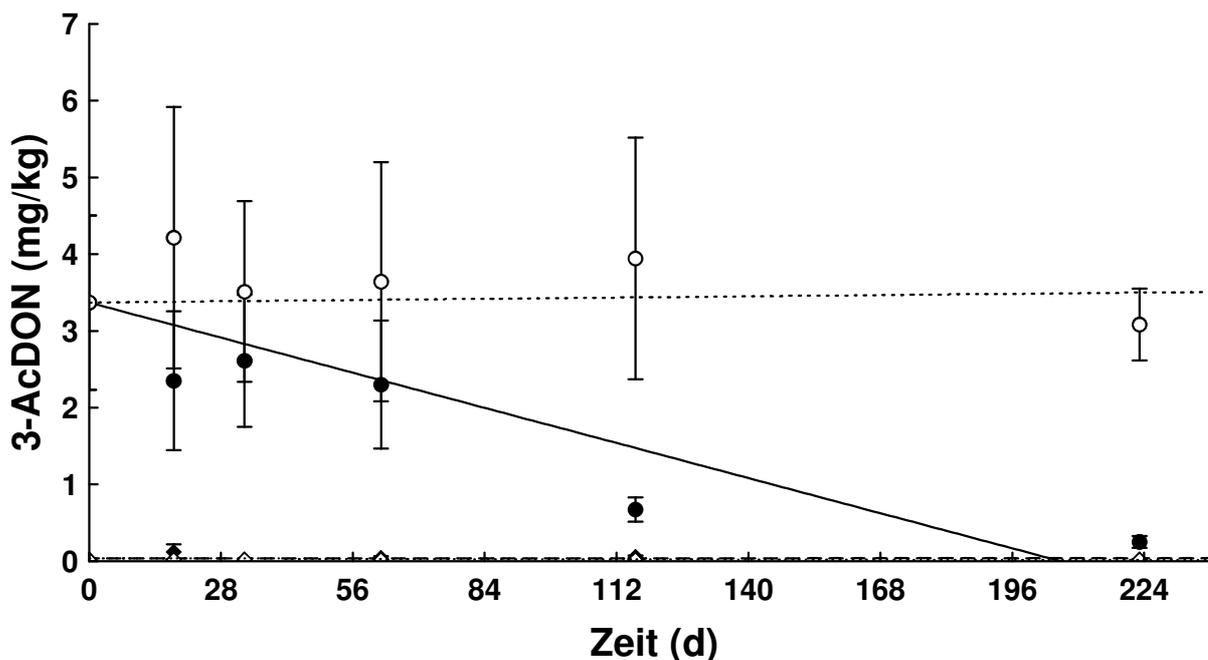


Abbildung 7: Verlauf der 3-Acetyl-Deoxynivalenol-Konzentrationen im inokulierten Stroh bei Lagerung im Freien (—●—) und in der Scheune (-○-) sowie im Kontrollstroh bei Lagerung im Freien (-◆-) und in der Scheune (.....◇.....) (MW±Stabw., n=3)

Die Ausgangswerte des ZON lagen wie beim DON und 3-Acetyl-DON in den inokulierten Varianten über denen im Kontrollstroh (Tabelle 6). Über die Dauer der Lagerung kam es bei den im Freien gelagerten Varianten zu einem Anstieg von 2,9 µg/kg und Tag beim Kontrollstroh und um 6,2 beim inokulierten Stroh. Die Anstiege waren signifikant voneinander und von Null verschieden. Bei der Lagerung des Kontrollstrohs in der Scheune stieg die Konzentration an ZON mit 0,4 µg/kg und Tag signifikant an, unterschied sich aber nicht signifikant vom inokulierten in der Scheune gelagerten Stroh, welches keinen signifikanten Anstieg aufwies (Abbildung 6).

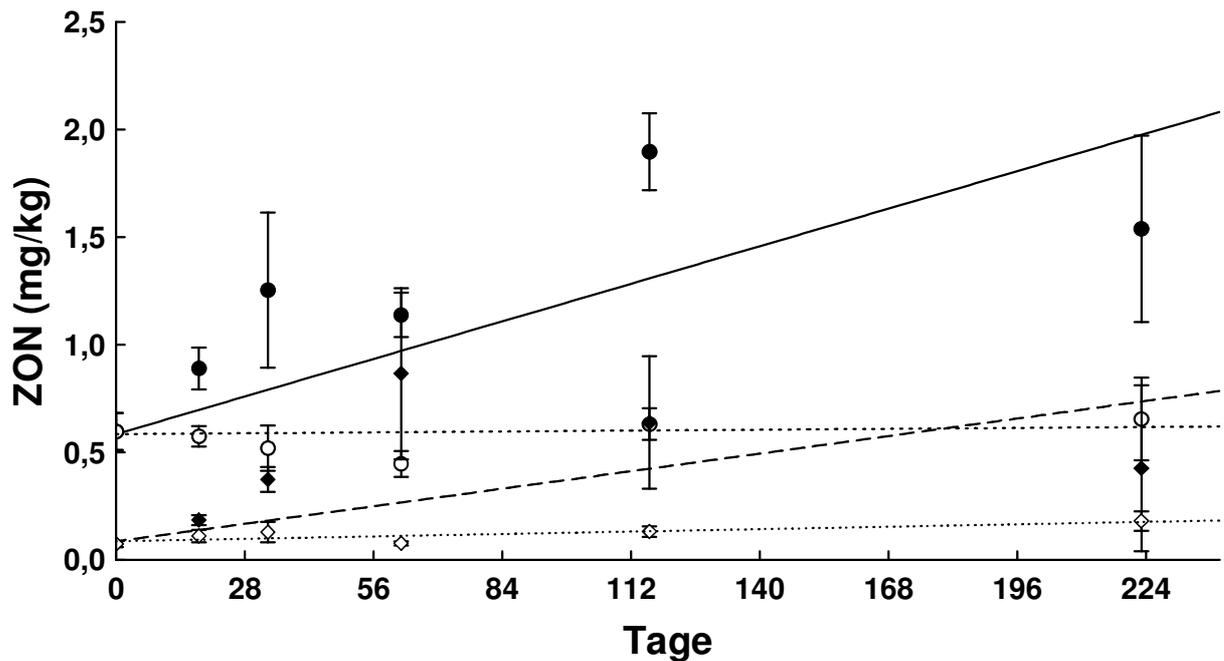


Abbildung 8: Verlauf der Zearalenon-Konzentrationen im inokulierten Stroh bei Lagerung im Freien (—●—) und in der Scheune (-○-) sowie im Kontrollstroh bei Lagerung im Freien (-◆-) und in der Scheune (.....◇.....) (MW±Stabw., n=3)

Für keines der detektierten Toxine konnte ein Zusammenhang zwischen der Temperatur, der Luftfeuchte oder dem Niederschlag nachgewiesen werden.

Weckglasversuch

Die beiden Strohvarianten wurden mit maximalen Abweichungen von 0,5% auf die angestrebten TS-Gehalte von 86, 82 und 78 % eingestellt. Im Verlauf der Lagerung stieg die TS des Kontroll- sowie des inokulierten Strohs durch die niedrige Luftfeuchtigkeit in der Klimakammer in den Varianten mit 86% TS und 82% TS um ca. 3% an. In der Variante des Kontrollstrohs mit 78 % TS kam es zu einem Anstieg der TS von 6 %, die TS der vergleichbaren, inokulierten Variante verblieb als einzige konstant bei 78% (Abbildung 9).

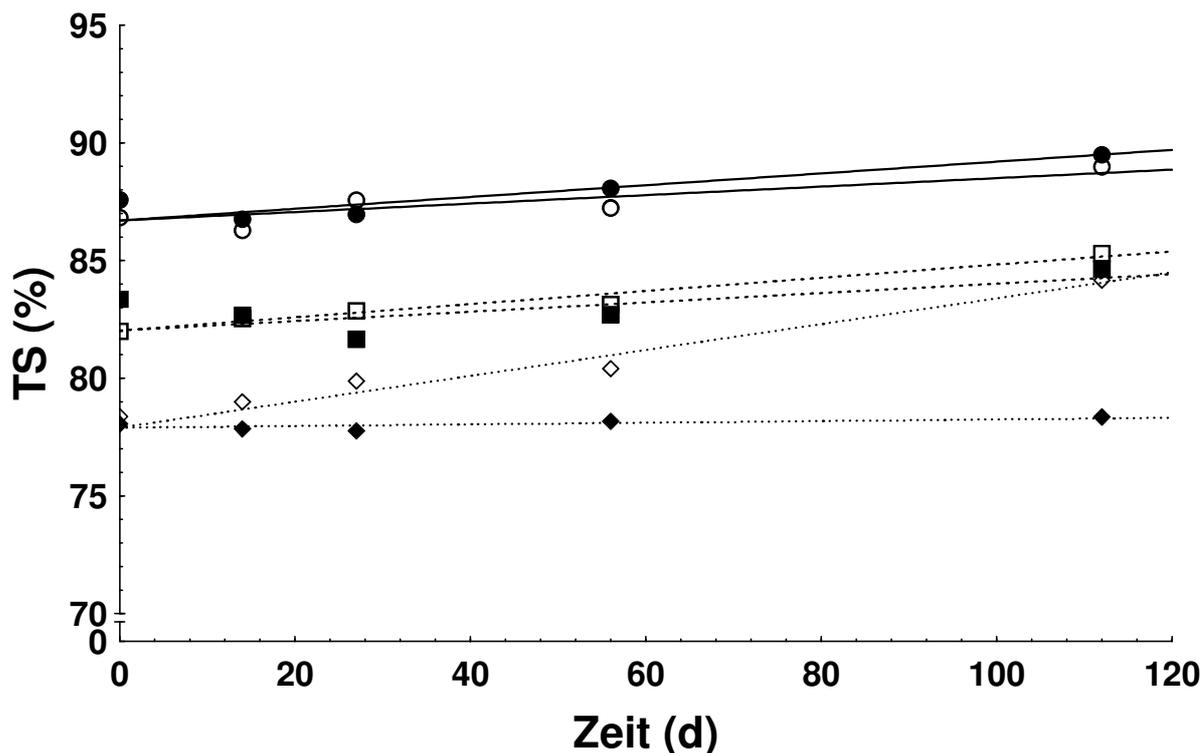


Abbildung 9: Verlauf der Trockensubstanzen-Gehalte des Kontrollstrohs mit einer Anfangstrockensubstanz von 86 (—○—), 82 (—□—) und 78 (—◇—) %, sowie des inokulierten Strohs bei einer Anfangstrockensubstanz von 86 (—●—), 82 (—■—) und 78 (—◆—) % über die Lagerdauer von 116 Tagen im Weckglasversuch (n=1)

Bei der Toxinanalyse ergab sich bei den Ausgangsgehalten der Mykotoxine das gleiche Bild wie im Witterungsversuch, da die beiden Versuche mit dem gleichen Ausgangsmaterial durchgeführt wurden. In den Proben wurden die Toxine DON, 3-Acetyl-DON, 15-Acetyl-DON und ZON oberhalb der Nachweisgrenzen gemessen, wobei die Konzentrationen erwartungsgemäß in den inokulierten Varianten höher lagen als in den Kontrollvarianten. Im Verlauf der Lagerung kam es bei DON, 15-Acetyl-DON und ZON in einzelnen Varianten zu einer numerischen Reduktion der Konzentrationen, welche auf Grund der starken Schwankungen statistisch aber nicht abzusichern waren (Abbildung 8).

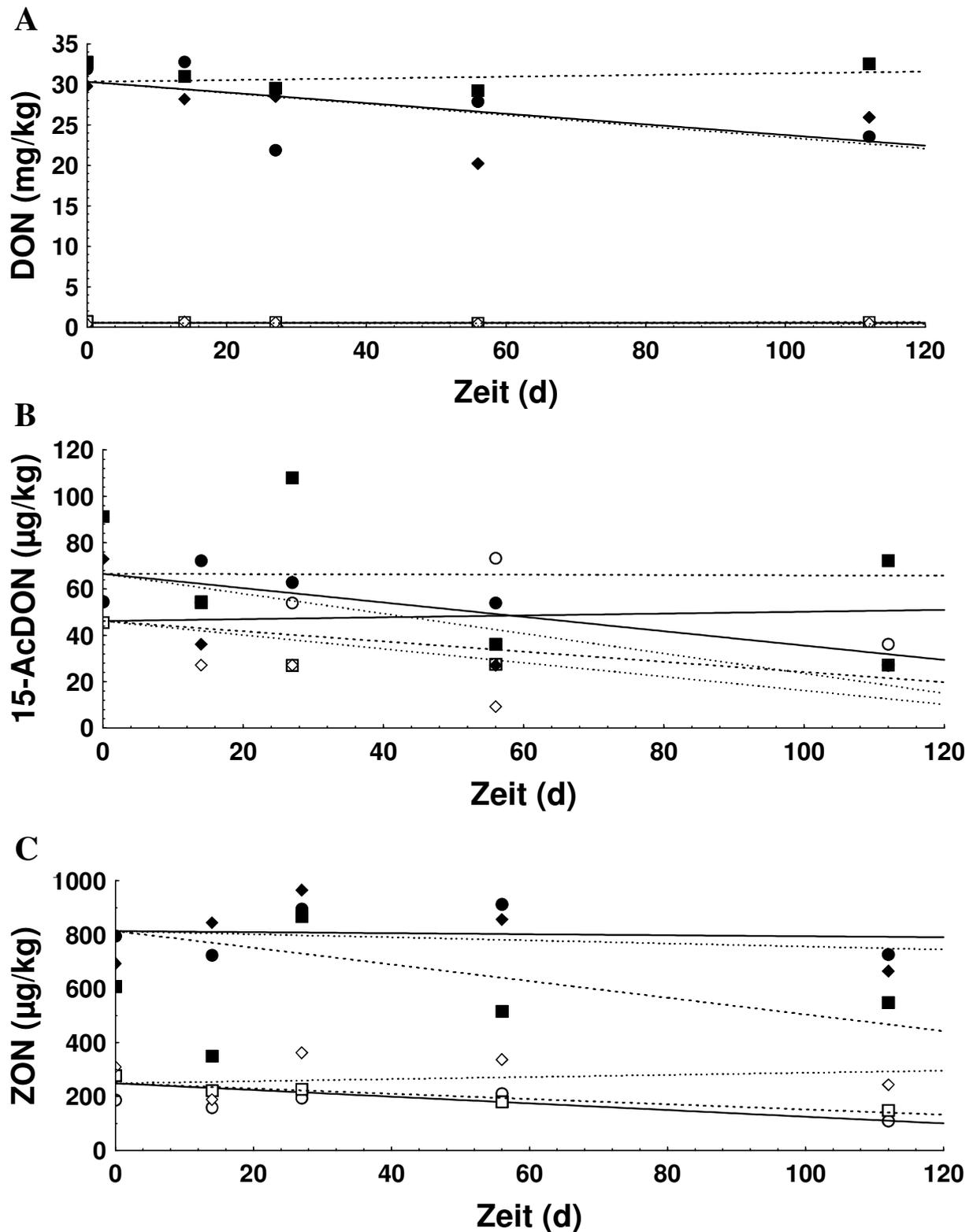


Abbildung 10: Verlauf der Deoxynivalenol- (A), 15-Acetyl-Deoxynivalenol- (B) und der Zearalenol- (C) Konzentrationen im Kontrollstroh bei 86 (—○—), 82 (—□—) und 78 (—◇—) % Trockensubstanz, sowie im inokulierten Stroh bei 86 (—●—), 82 (—■—) und 78 (—◆—) % Trockensubstanz über die Lagerdauer von 116 Tagen im Weckglasversuch (n=1)

Die verschiedenen Trockensubstanzen hatten im getesteten Bereich keinen signifikanten Einfluss auf die Entwicklungen der Konzentrationen dieser Mykotoxine in den einzelnen Strohvarianten während der Lagerung über 16 Wochen (Tabelle 6).

Tabelle 7: Veränderungen in der Mykotoxin-Konzentration pro Tag (Anstiege der Regressionsgleichung in $\mu\text{g}/\text{kg}$)

Trockensubstanzgehalt	Kontrollstroh			Inokuliertes Stroh		
	86 %	82 %	78 %	86 %	82 %	78 %
Deoxynivalenol	<-0,1 ^{a*}	0,6 ^a	-0,9 ^a	-65,7 ^a	10,5 ^a	-68,6 ^a
3-Acetyl-Deoxynivalenol	0,4 ^a	0,6 ^a	0,4 ^a	-8,0 ^b	-14,6 ^b	-27,8 ^{b*}
15-Acetyl-Deoxynivalenol	<0,1 ^a	-0,2 ^a	-0,3 ^a	-0,3 ^a	<-0,1 ^a	-0,4 ^a
Zearalenon	-1,2 ^a	-1,0 ^a	0,4 ^a	-0,2 ^a	-3,1 ^a	-0,6 ^a

(abc = Unterschiedliche Indizes kennzeichnen signifikante Unterschiede ($p < 0,05$), * = Steigungen sind signifikant von Null verschieden ($p < 0,05$))

Beim 3-Acetyl-DON konnte im inokulierten Stroh bei allen drei Trockensubstanzgehalten eine Reduktion der Konzentration beobachtet werden. Der Rückgang in der Konzentration war in allen inokulierten Strohvarianten signifikant von Verläufen der Konzentrationen in den Kontrollvarianten verschieden, unterschied sich aber nur in der inokulierten Variante mit einem Trockensubstanzgehalt von 78 % signifikant von Null (Abbildung 11).

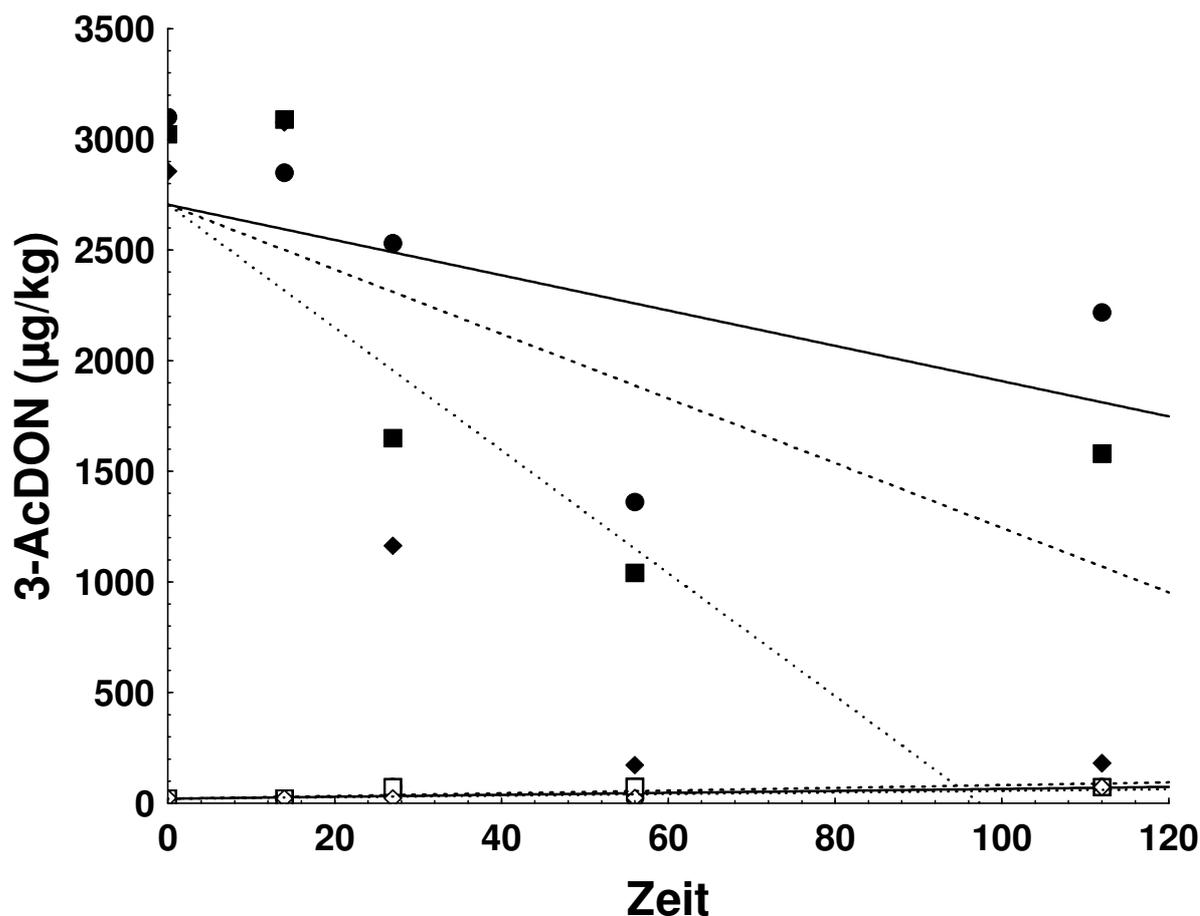


Abbildung 11: Verlauf der 3-Acetyl-Deoxynivalenol-Konzentration im Kontrollstroh bei 86 (—○—), 82 (-□-) und 78 (---◇---) % Trockensubstanz, sowie im inokulierten Stroh bei 86 (-●-), 82 (-■-) und 78 (-◆-) % Trockensubstanz über die Lagerdauer von 116 Tagen (n=1)

Das inokulierte Stroh wies zu Beginn der Lagerung im Weckglas erwartungsgemäß einen mit 160×10^3 Kolonien-Bildenden-Einheiten (KBE) leicht erhöhten Schimmelpilzbefall auf, während der Schimmelpilzbefall im Kontrollstroh einen produkttypischen Befall zeigte. Nach der 116 tägigen Lagerung mit 86 und 82 % Trockensubstanz kam es in beiden Strohvvarianten zu einem Rückgang des Befalls mit Schimmelpilzen. Nur in der Lagervariante mit einem Trockensubstanzgehalt von 78 % kam es im Kontrollstroh zu einem Anstieg auf 670×10^3 KBE, was einen überhöhten Befall gleich kommt. Bei der gleichen Lagervariante kam es im inokulierten Stroh sogar zu einem stark überhöhten Befall mit 4.600×10^3 KBE (Tabelle 8).

Tabelle 8: Schimmelpilzbefall des Strohs zu Beginn und am Ende des Weckglasversuches

Trockensubstanzgehalt	Kontrollstroh			Inokuliertes Stroh		
	86 %	82 %	78 %	86 %	82 %	78 %
Befall mit Schimmelpilzen ($\times 10^3$ KBE/g)						
zu Versuchsbeginn	4,7	4,7	4,7	160,0	160,0	160,0
nach 116 Tagen Lagerung	0	0	670	13	0	4600
Bioverfügbarkeitsversuch						

In Tabelle 9 sind die Ergebnisse der Weender-Analyse sowie der Toxinanalyse des Futters und der fünf Weizenfraktionen dargestellt, die in den beiden Tierversuchen eingesetzt wurden.

Tabelle 9: Übersicht der Analyseergebnisse des Futters und der einzelnen Weizenfraktionen

	Mast- futter	KontrollS troh	Inokul. Stroh	Kontroll Körner	Inokul. Körner	Inokul. Kaff
Analysierte Inhaltsstoffe (%)						
Trockensubstanz	89,6	91,5	90,0	89,4	88,5	91,2
Org. Masse	94,6	96,2	96,3	98,3	98,2	94,4
Rohprotein	20,2	3,8	6,2	13,3	14,1	9,5
Rohfett	4,5	1,0	1,1	2,5	2,1	1,5
Rohfaser	3,8	42,3	40,1	2,2	2,9	30,1
ADF	5,0	49,5	47,8	2,8	4,2	37,8
NDF	14,1	82,8	79,8	16,9	32,5	69,8
ges. NSP	13,3	46,4	44,6	10,1	11,7	40,1
lösl. NSP	10,3	46,8	43,1	8,8	9,9	38,3
Toxin-Analyse (mg/kg)						
DON	0,14	0,64	24,76	0,18	22,05	27,27
ZON	0,002	0,229	0,712	0,007	0,894	4,145
Mikrobiologische Untersuchung ($\times 10^3$ KBE/g)						
Schimmelpilze						
gesamt	-	104	74	4	1070	1500
Fusarien	-	4	50	1	1050	1400
Hefen	-	52	20	1	<1	140

Hinsichtlich der analysierten Inhaltsstoffe ergeben sich Unterschiede zwischen den einzelnen Weizenfraktionen Stroh, Körner und Kaff. Durch die Inokulation des Weizens mit *Fusarium culmorum* kam es innerhalb der jeweiligen Fraktionen zu keinen Veränderungen der Inhaltsstoffe. Im Gegensatz dazu führte die Inokulation des Weizens zu deutlich erhöhten Toxin-Konzentrationen in den einzelnen Fraktionen. So lagen die DON-

Konzentrationen in den inokulierten Varianten mit 22 bis 27 mg/kg deutlich über den Konzentrationen der Kontrollvarianten mit weniger als 1 mg/kg DON. Bei der mikrobiologischen Untersuchung zeigte sich, dass der Schimmelpilzbefall in den inokulierten Varianten der Körner und des Kaffs erhöht war, was auf den erwartungsgemäß deutlich erhöhten Befall mit *Fusarium* zurückzuführen ist. Bei der inokulierten Strohfraktion konnte hingegen nur eine leichte Erhöhung des Schimmelpilzbefalls festgestellt werden, was wiederum auf dem Befall mit *Fusarium* basiert. In den beiden Kontrollvarianten des Strohs und der Körner liegt der Befall mit *Fusarium* innerhalb der Orientierungswerte. Das Kontrollstroh wies zusätzlich einen leicht erhöhten Befall mit Schimmelpilzen auf, die nicht der Gattung *Fusarium* zugeschrieben werden konnten, aber produkttypisch und nicht verderbsanzeigend sind. Bei dem Befall mit Hefen ist nur der Wert des Kaffs erhöht, die anderen Varianten entsprechen den Normalgehalten.

Durch die Einmischung der einzelnen Fraktionen des inokulierten Weizens mit 10 bis 15 %, je nach Akzeptanz der Ration, und den leicht unterschiedlichen Gewichten der Schweine beim Versuch, ergeben sich für die einzelnen Gruppen und für die einzelnen Schweine unterschiedliche Dosen an DON (Tabelle 10).

Durch die pharmakologische Auswertung der Serum-DON-Gehalte kann festgestellt werden, dass das DON aus allen drei Weizenfraktionen mit der gleichen Geschwindigkeit absorbiert wird, da bei den Halbwertszeiten der Invasion ($t_{1/2\alpha}$) zwischen den Fraktionen keine signifikanten Unterschiede bestehen. Auch in der Elimination des DON aus dem Blut konnten Unterschiede zwischen den drei Weizenfraktionen nachgewiesen werden, da die Halbwertszeiten für die Elimination ($t_{1/2\beta}$) keine statistisch signifikanten Differenzen aufwiesen. Diese Ergebnisse spiegeln sich auch in der maximalen Serum-DON-Konzentration (C_{\max}) und dem Zeitpunkt (t_{\max}) des Erreichen dieses Maximums wieder (Tabelle 10), die nahezu identisch waren.

Tabelle 10: Mittelwerte der pharmakologischen Auswertung des Bioverfügbarkeitsversuches

Gruppe	i.v. (n=5)		Stroh (n=6)		Körner (n=6)		Kaff (n=4)	
	MW	Stabw	MW	Stabw	MW	Stabw	MW	Stabw
Dosis ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	53	(0)	49,0	(9,3)	44,2	(3,6)	40,2	(2,5)
$t_{1/2\alpha}$ (h)	0,72	(0,48)	0,77	(0,23)	0,76	(0,33)	0,52	(0,16)
$t_{1/2\beta}$ (h)	15,24	(12,93)	3,9	(1,05)	3,6	(1,09)	4,7	(0,74)
C_{\max} (ng/ml)	-	-	16,7	(2,9)	16,5	(5,5)	16,3	(2,2)
t_{\max} (min)	-	-	129,6	(18,6)	125,1	(28,9)	110,4	(23,4)
F (%)	100	(-)	81,8	(18,7)	87,3	(20,5)	109,9	(25,1)

($t_{1/2\alpha}$ = Halbwertszeit der Invasion, $t_{1/2\beta}$ = Halbwertszeit der Elimination, C_{\max} = maximale Serum-DON-Konzentration, t_{\max} = Zeitpunkt der maximalen DON-Konzentration, F = Bioverfügbarkeit)

Betrachtet man die Bioverfügbarkeit, so ergeben sich zwischen den einzelnen Fraktionen numerische Unterschiede, die aber nicht signifikant sind. Die numerisch erhöhte Bioverfügbarkeit in den Körnern und dem Kaff zeigt sich auch in den um die Dosis korrigierten DON-Verläufen im Serum (Abbildung 12). Diese Unterschiede sollten aber nicht überbewertet werden, da Kaff als auch Stroh sehr inhomogenes Probenmaterial darstellt und es somit bei den Analysen auch unter sorgfältigster Probennahme und -aufbereitung zu starken Schwankungen kommen kann. Es ist aber nicht klar, ob nicht auch die tierindividuelle Streuung zur Gesamtstreuung beiträgt.

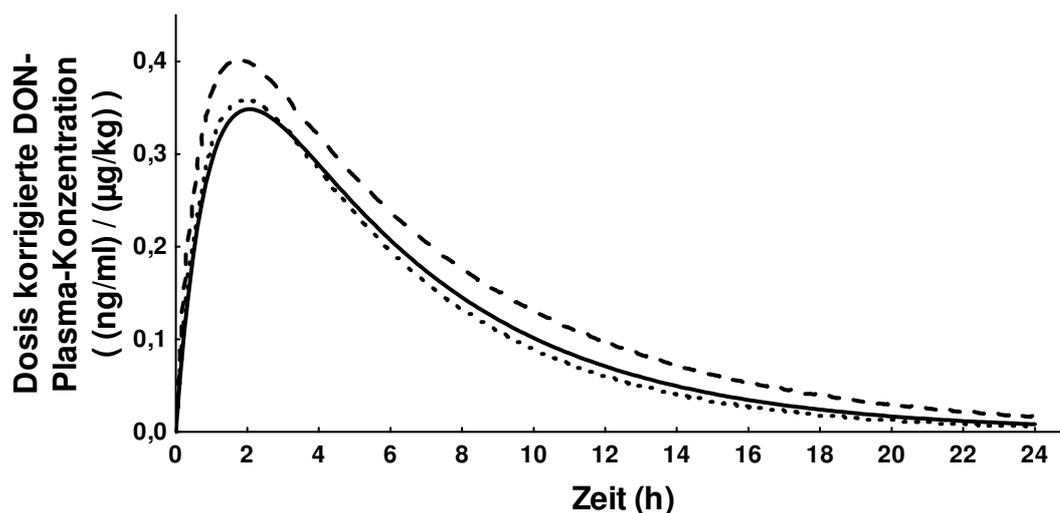


Abbildung 12: Mittlere Verläufe der um die Dosis korrigierten DON-Plasma-Konzentrationen nach oraler Exposition mit inokulierten Weizenstroh (—, n = 6), körnern (....., n = 6) und -kaff (- - -, n = 4) über 24 Stunden

Bilanzversuch

Die Einmischung der einzelnen Weizenfraktionen des Kontrollweizens ergaben DON-Gehalte in der Gesamtration von 0,15 mg/kg für die Körner und 0,18 mg/kg für das Stroh im Vergleich zu der Gruppe ohne Substitution mit einem Gehalt von 0,14 mg/kg. Die DON-Gehalte in den Gesamtrationen, welche als Substitution die Weizenfraktionen aus dem inokulierten Stroh enthielten, betragen 1,53 mg/kg bei den Körnern, 1,73 mg/kg beim Stroh und 1,91 mg/kg beim Kaff.

In Tabelle 10 ist die prozentuale Ausscheidung von DON und DOM-1 nach den Ausscheidungswegen aufgeteilt dargestellt. Bei der prozentualen DON-Ausscheidung über den Harn sowie über den Kot ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen. Durch die zweifaktorielle Analyse der Daten wurde ersichtlich, dass die prozentuale Ausscheidung von DON über den Harn weder durch den Fasergehalt der Ration noch durch den DON-Gehalt beeinflusst wird. Trotz der nicht vorhandenen Unterschiede zwischen den sechs Gruppen in der prozentualen DON-Ausscheidung über den Kot, konnte durch die zweifaktorielle Analyse ein leichter Rückgang durch die Aufnahme des DON über das faserreiche Futter festgestellt werden. Die prozentuale Ausscheidung vom DOM-1 über Kot und Harn blieb sowohl vom Fasergehalt wie auch von dem DON-Gehalt unbeeinflusst.

Außerdem wurde in Tabelle 10 noch der prozentuale Anteil der Ausscheidung von DOM-1 an der Gesamtausscheidung dargestellt. Auch hier treten keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen sowie den Einflussfaktoren Fasergehalt und DON-Gehalt auf, was darauf hinweist, dass die Metabolisierung zu DOM-1 ebenso von diesen Faktoren unbeeinflusst bleibt. Diese Ergebnisse spiegeln sich auch auf der Ebene der gesamten Ausscheidungen von DON und DOM-1 wieder, wo ebenfalls keine signifikanten Unterschiede festgestellt wurden.

Tabelle 11: Ausscheidung von DON und DOM-1 in den sechs Gruppen (n=4) aufgeteilt nach den Ausscheidungswegen im Bilanzversuch

Gruppe	Mast- futter		Kontroll -Stroh		Inokul. Stroh		Kontroll -Körner		Inokul. Körner		Inokul. Kaff	
	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD
DON-Aufnahme (mg/d)	0,23	0,03	0,27	0,04	2,62	0,38	0,23	0,03	2,32	0,33	2,90	0,42
Ausscheidung über Harn (in % der Aufnahme)												
DON	45,6	17,81	58,5	13,77	46,4	5,15	44,8	18,19	56,1	7,68	54,2	7,19
	1		5		8		6		1		8	
DOM-1	6,94	8,02	2,45	2,85	1,27	0,91	6,76	7,92	1,98	7,63	1,27	0,73
Ausscheidung über Kot (in % der Aufnahme)												
DON	2,78	2,08	3,97	2,33	2,62	2,31	2,58	0,79	1,05	0,76	2,30	1,52
DOM-1	0,88	1,04	2,61	2,48	1,26	0,67	1,42	1,65	1,07	0,54	1,63	0,86
DOM-1 Ausscheidung (in % der DON + DOM-1 Ausscheidung)												
Harn	13,3	15,73	3,22	3,73	2,64	1,78	11,2	14,68	3,40	2,79	2,39	1,57
	4		3		1		8		3		2	
Kot	31,9	36,87	39,5	35,80	43,7	35,33	27,8	33,40	17,8	31,14	45,2	26,76
	2		3		1		6		0		0	
Summe Ausscheidung (DON + DOM-1 durch Harn und Kot in % der Aufnahme)	56,2	14,95	67,5	18,86	51,6	5,34	55,6	23,02	60,2	7,85	59,4	7,59
	2		8		3		3		2		7	

Die Verdaulichkeiten der Rohnährstoffe Rohfett, Rohfaser sowie der ADF-Fraktion zeigten ebenfalls keine Unterschiede zwischen den sechs Gruppen. Bei der Gesamtverdaulichkeit der TS sowie bei der Verdaulichkeit des Rohproteins und der NDF-Fraktion ist ein signifikanter Einfluss des höheren Faseranteils in der Ration zu erkennen (Abbildung 13). So liegt die Verdaulichkeit der TS und des Rohproteins in den faserreichen Gruppen um etwa 5% niedriger als bei den faserärmeren Gruppen. Bei der NDF-Fraktion war eine 10 bis 15% niedrigere Verdaulichkeit zu beobachten.

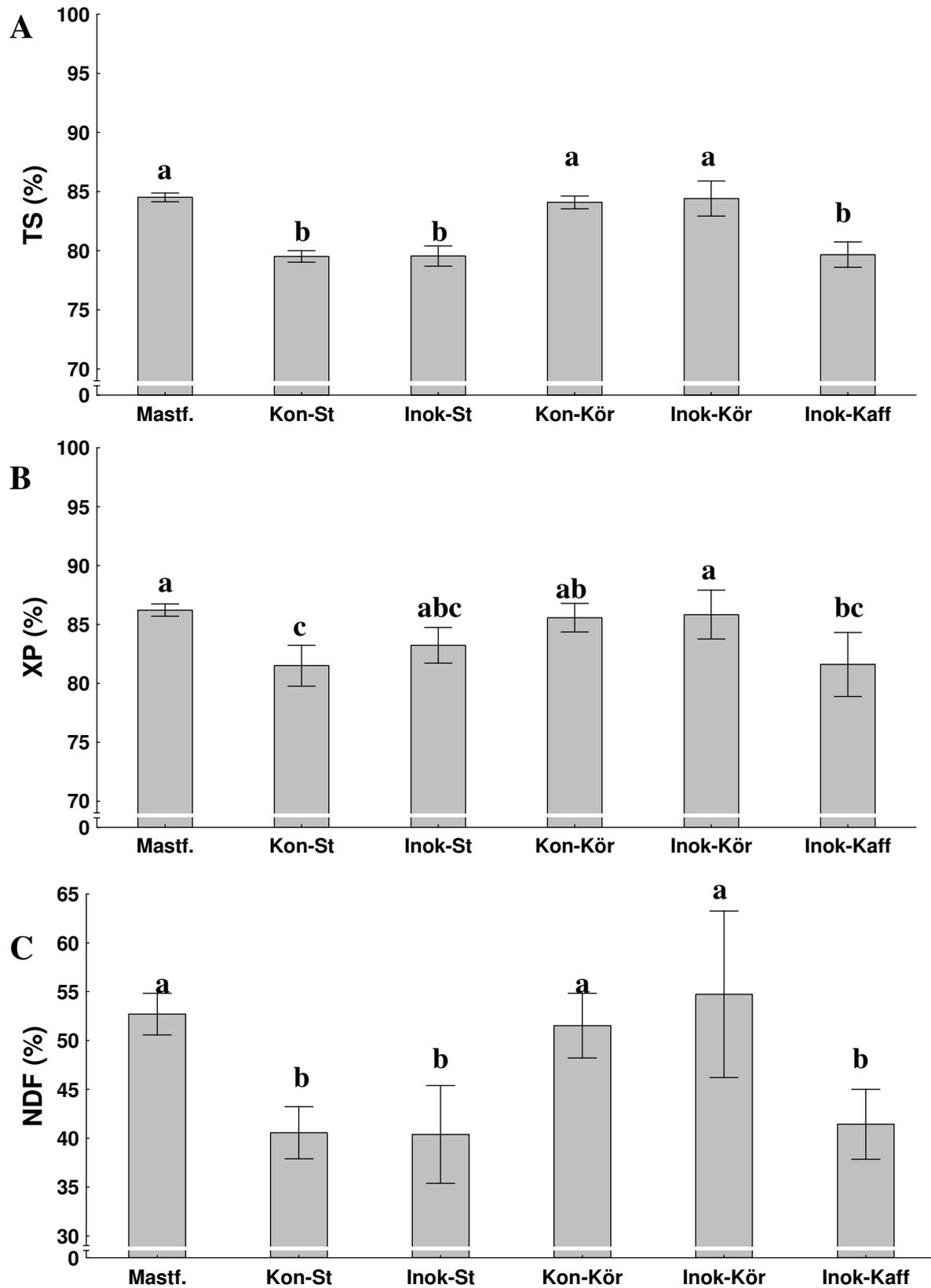


Abbildung 13: Nährstoffverdaulichkeiten (A:TS, B:XP, C:NDF) der Gesamtration in den sechs Gruppen des Bilanzversuches (Mastf = Mastfutter, Kon = Fraktion des Kontrollweizens, Inok = Fraktion von inokuliertem Weizen, St = Stroh, Kör = Körner, abc = Unterschiedliche Indizes kennzeichnen signifikante Unterschiede ($p < 0,05$))

3.2 Voraussichtlicher Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse

Auf Grund der durchgeführten Lagerversuche (Witterungsversuch, Weckglasversuch) kann davon ausgegangen werden, dass bei der Lagerung von Stroh nicht mit einem weiteren Anstieg der Gehalte an Trichothecenen zu rechnen ist. In den beiden Versuchen kam es eher zu einer Reduzierung in den Konzentrationen der Trichothecene, welches bei unsachgemäßer Lagerung (TM < 88%) gefördert schien. Diese Lagerverhältnisse unterstützen hingegen die Zunahme von ZON. Bei einer Aufwiegung dieser beiden Sachverhalte steht die sichere Zunahme von ZON einer unsicheren Reduktion der Trichothecene gegenüber, somit ist die witterungsgeschützte Lagerung von Stroh vorzuziehen.

Stroh kann je nach Menge des täglichen Verzehrs, auch aus der Einstreu, den gleichen Anteil zur Mykotoxin-Exposition beitragen wie normales Futter. Bei der Verwendung von Stroh als Futtermittel aber auch als Einstreu sollte somit auf den Befall mit Schimmelpilzen wie *Fusarium* geachtet werden, da sich in den beiden Tierversuchen (Bioverfügbarkeitsversuch, Bilanzversuch) keine Unterschiede in der Bioverfügbarkeit von DON aus Stroh und Körnern herausstellten. Eine schlechtere Bioverfügbarkeit der Mykotoxine durch den hohen NDF-Anteil konnte nicht bestätigt werden. Gerade bei rationierter Fütterung sollte auf einwandfreies Stroh als Einstreu geachtet werden, da in diesem Fall die Aufnahme von Stroh zur Sättigung gesteigert ist.

Mit Hinblick auf die Inhomogenität von Stroh muss gesagt werden, dass das Problem der adäquaten Probennahme noch nicht gelöst ist. Bei der Beprobung von Stroh sollte auf die Aussagekräftigkeit der Probe geachtet werden und das Probenmaterial an möglichst vielen Stellen entnommen werden.

4. Zusammenfassung

Ziel des Projektes war es durch die Analyse von Strohproben aus zwei Lagerversuchen (Witterungsversuch, Weckglasversuch) den Einfluss von verschiedenen Lagerbedingungen und verschiedenen Vorbelastungen mit *Fusarium* auf die Mykotoxin-Konzentrationen zu untersuchen. Des Weiteren sollte durch die Durchführung von Tierversuchen (Bioverfügbarkeitsversuch, Bilanzversuch) Erkenntnisse über die Bioverfügbarkeit, die Metabolisierung und Ausscheidungswege von DON aus Stroh erlangt werden.

Zur Durchführung der verschiedenen Versuche wurde von der Versuchstation Mariensee des Friedrich-Loeffler-Instituts mit *Fusarium culmorum* inokulierter Weizen sowie anbaugleicher Kontrollweizen bereitgestellt. Aus dem Weizen wurden die Fraktionen Körner, Stroh und Kaff gewonnen.

Der erste Lagerversuch wurde unter praktischen Bedingungen durch Lagerung der beiden Strohvarianten zum einen in einer Scheune und zum anderen im Freien durchgeführt. Die Beprobung der Strohballen erfolgte zu Beginn der Lagerung sowie nach 2, 4, 8, 16 und 32 Wochen, so dass der zeitliche Verlauf nachvollzogen werden konnte. In diesem Versuch kam es zu einer Reduzierung der DON-Konzentration im Verlauf der Lagerung des inokulierten Weizenstrohs im Freien. Bei der Lagerung dieser Strohvariante in der Scheune wurde ebenfalls eine Verringerung der DON-Konzentration festgestellt, welche aber statistisch nicht abzusichern war. Dieses Ergebnis zeigte sich auch beim 3-Acetyl-DON, dessen Konzentration über die Zeit der Lagerung im Freien beim inokulierten Stroh zurückging. Die ZON-Konzentration hingegen stieg in beiden Strohvarianten bei Lagerung im Freien an, wobei der Anstieg der Inokulierten Variante stärker ausgeprägt war als bei der Kontrollvariante.

Um den Einfluss der TS-Gehalte zu untersuchen wurde ein zweiter Lagerversuch unter definierten Bedingungen durchgeführt. Zu Beginn der Lagerung wurden die beide Strohvarianten auf die TS-Gehalte 86, 82 und 78 % eingestellt und in einer Klimakammer bei konstanter Temperatur und Luftfeuchtigkeit eingelagert. Die Beprobung verlief analog zu dem ersten Versuch, endete aber bereits nach 16 Wochen. Bei diesem Versuch konnte ein ähnlicher numerischer Rückgang der Konzentrationen von DON und 3-Acetyl-DON beobachtet werden wie im ersten Lagerversuch. In der inokulierten Strohvariante steigerte sich die Reduzierung der 3-Acetyl-DON-Konzentration mit steigender Strohfeuchtigkeit und erreichte in der feuchtesten Variante Signifikanz. Die ZON-Konzentrationen blieben bei den getesteten TS-Gehalten unbeeinflusst.

Zur Abschätzung der Bioverfügbarkeit von DON wurde ein Versuch mit 16 Mastschweinen durchgeführt. Durch die einmalige Beimischung von inokulierten Weizenfraktionen zum Futter und der anschließenden Analyse der über 24 Stunden gesammelten Blutproben, wurde die Bioverfügbarkeit des DON aus den Weizenfraktionen Stroh und Kaff im Vergleich zu den Körnern ermittelt. Als Referenzgruppe dienten fünf Tiere, welche eine vergleichbare DON-Dosis intravenös appliziert bekamen (i.v. = 100 % Bioverfügbarkeit). Beim Kaff im Vergleich zu Körnern konnte eine höhere und beim Stroh

eine verminderte Bioverfügbarkeit ermittelt werden; allerdings konnten diese Werte auf Grund der hohen Schwankungen nicht statistisch abgesichert werden.

Die renale DON/DOM-1-Ausscheidung kann ebenfalls als Indikator der systemischen Bioverfügbarkeit angesehen werden, da nur in die systemische Zirkulation absorbiertes Toxin über die Nieren ausgeschieden werden. Um den Einfluss der Infektion des Weizens mit *Fusarium* und des hohen NDF-Anteils im Stroh auf die Aufnahme, die Metabolisierung und die Ausscheidung von DON sowie die Verdaulichkeit der Rohnährstoffe zu untersuchen, erfolgte ein Bilanzversuch mit sechs Schweinen. In diesem Versuch wurden den Schweinen ein Teil des Futters durch die einzelnen Fraktionen des inokulierten und des Kontrollweizens ausgetauscht und quantitativ Kot und Harn gesammelt. Bei der Auswertung der Toxinanalysen dieses Versuches konnte ein leichter Rückgang der prozentualen DON-Ausscheidung über den Kot durch den höheren NDF-Gehalt im Stroh und Kaff beobachtet werden. Die prozentuale Ausscheidung vom DON über den Harn sowie vom DOM-1 über Kot und Harn blieb sowohl vom NDF-Gehalt als auch vom DON-Gehalt der Ration unbeeinflusst. Die Verdaulichkeit der Gesamtration nahm in den Varianten mit hohem NDF-Anteil erwartungsgemäß ab und spiegelte sich in der Rohproteinverdaulichkeit und der Verdaulichkeit der NDF-Fraktion wider. Die Inokulation des Weizens ergab keine Unterschiede in den Verdaulichkeiten dieser Nährstofffraktionen. Beide Parameter veränderten die Verdaulichkeiten des Rohfettes, der Rohfaser sowie der ADF-Fraktion nicht.

5. Gegenüberstellung der ursprünglich geplanten zu den tatsächlich erreichten Zielen

Die beiden Lagerversuche wurden wie geplant durchgeführt und zusätzlich konnte die Beprobung im Witterungsversuch aus eigenen Mitteln zu einer dreifach Beprobung ausgeweitet, sowie ein zusätzlicher Probenahmetag nach 32 Wochen hinzugefügt werden. Bei der Durchführung des Bioverfügbarkeitsversuches konnte auf Daten aus einem vorhergegangenen Versuch für die intravenöse Gruppe zurückgegriffen werden und die vier eingeplanten Schweine zur besseren statistischen Auswertung den anderen Gruppen zugeschlagen werden. Die Analyse der Proben aus dem Bilanzversuch wurde ebenfalls aus eigenen Mitteln um die Rohnährstoffanalysen erweitert. Die Abarbeitung der beantragten Maßnahmen ist voll und ganz erfüllt worden.

6. Literaturverzeichnis

References

- BMELV 2008. Statistisches Jahrbuch Über Ernährung, Landwirtschaft Und Forsten Der Bundesrepublik Deutschland 2008.
- Dost,F.H. 1968. Grundlagen Der Pharmakokinetik. Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
- Goyarts,T. & Dänicke,S. 2006. Bioavailability of the Fusarium toxin deoxynivalenol (DON) from naturally contaminated wheat for the pig. Toxicology Letters, 163, 171-182.
- Matthaus,K., Dänicke,S., Vahjen,W., Simon,O., Wang,J., Valenta,H., Meyer,K., Strumpf,A., Ziesenib,H. & Flachowsky,G. 2004. Progression of mycotoxin and nutrient concentrations in wheat after inoculation with *Fusarium culmorum*. Archives of Animal Nutrition-Archiv fur Tierernahrung, 58, 19-35.
- Oldenburg,E., Bramm,A. & Valenta,H. 2007. Influence of nitrogen fertilization on deoxynivalenol contamination of winter wheat - experimental field trials and evaluation of analytical methods. Mycotoxin Research, 23, 7-12.
- Schiemann,R. 1981. Methodical Directions for Digestion Experiments for the Feed Evaluation. Archiv fur Tierernahrung-Archives of Animal Nutrition, 31, 1-19.
- Toth,B., Mesterhazy,A., Nicholson,P., Teren,J. & Varga,J. 2004. Mycotoxin production and molecular variability of European and American isolates of *Fusarium culmorum*. European Journal of Plant Pathology, 110, 587-599.
- Valenta,H., Dänicke,S. & Döll,S. 2003. Analysis of Deoxynivalenol and De-epoxy-deoxynivalenol in Animal Tissues by Liquid Chromatography after Clean-up with an Immunoaffinity Column. Mycotoxin Research, 19, 51-55.
- VDLUFA 1976. Die Chemische Untersuchung Von Futtermitteln. Darmstadt.

Anhang

Tabelle 12: Einzelwerte der DON-Analysen im Blut des Bioverfügbarkeitsversuchs

Gruppe	Versuch	Tier	Zeitpunkt	DON	DOM-1
Stroh	SV 706	Tier 1	-30 min	0,0	0,0
			0 min	2,2	0,0
			10 min	3,5	0,0
			30 min	15,9	0,0
			45 min	18,9	7,3
			60 min	12,6	0,0
			90 min	18,3	0,0
			3 h	15,6	0,0
			4 h	14,4	0,0
			6 h	17,1	0,0
			9 h	4,1	0,0
			12 h	3,6	0,0
			24 h	0,0	0,0
			Stroh	SV 706	Tier 2
0 min	0,0	0,0			
10 min	3,7	0,0			
30 min	8,8	0,0			
45 min	9,1	0,0			
60 min	11,9	0,0			
90 min	10,9	0,0			
3 h	12,6	0,0			
4 h	10,4	0,0			
6 h	6,9	0,0			
9 h	4,1	0,0			
12 h	3,2	0,0			
24 h	0,0	0,0			
Stroh	SV 706	Tier 5			
			0 min	4,4	0,0
			10 min	10,0	0,0
			30 min	13,6	0,0
			45 min	14,2	0,0
			60 min	19,2	0,0
			90 min	17,6	0,0
			3 h	21,0	0,0
			4 h	17,8	0,0
			6 h	11,2	0,0
			9 h	8,2	0,0
			12 h	3,0	0,0
			24 h	0,0	0,0

Fortsetzung Tabelle 2

Gruppe	Versuch	Tier	Zeitpunkt	DON	DOM-1
Stroh	SV 706	Tier 6	-30 min	0,0	0,0
			0 min	1,6	0,0
			10 min	10,4	0,0
			30 min	10,8	0,0
			45 min	13,2	0,0
			60 min	15,6	0,0
			90 min	16,6	0,0
			3 h	16,2	0,0
			4 h	14,2	0,0
			6 h	9,2	0,0
			9 h	5,0	0,0
			12 h	2,2	0,0
			24 h	0,0	0,0
Stroh	SV 713	Tier 1	-30 min	0,0	0,0
			0 min	5,7	0,0
			10 min	7,0	0,0
			30 min	12,8	0,0
			45 min	14,0	0,0
			60 min	13,8	0,0
			90 min	15,2	0,0
			3 h	16,3	0,0
			4 h	14,7	0,0
			6 h	8,6	0,0
			9 h	5,8	0,0
			12 h	5,1	0,0
			24 h	0,0	0,0
Stroh	SV 713	Tier 2	-30 min	0,0	0,0
			0 min	5,9	0,0
			10 min	11,4	0,0
			30 min	12,4	0,0
			45 min	14,1	0,0
			60 min	13,1	0,0
			90 min	13,4	0,0
			3 h	13,7	0,0
			4 h	12,6	0,0
			6 h	9,8	0,0
			9 h	5,8	0,0
			12 h	3,7	0,0
			24 h	0,0	0,0

Fortsetzung Tabelle 2

Gruppe	Versuch	Tier	Zeitpunkt	DON	DOM-1
Körner	SV 713	Tier 4	-30 min	0,0	0,0
			0 min	4,4	0,0
			10 min	5,3	0,0
			30 min	9,1	0,0
			45 min	10,4	0,0
			60 min	8,4	0,0
			90 min	8,9	0,0
			3 h	9,5	0,0
			4 h	9,2	0,0
			6 h	0,0	0,0
			9 h	3,2	0,0
			12 h	0,0	0,0
			24 h	0,0	0,0
			Körner	SV 713	Tier 5
0 min	3,3	0,0			
10 min	6,0	0,0			
30 min	12,2	0,0			
45 min	8,6	0,0			
60 min	10,6	0,0			
90 min	13,3	0,0			
3 h	12,0	0,0			
4 h	12,7	0,0			
6 h	8,3	0,0			
9 h	5,9	0,0			
12 h	0,0	0,0			
24 h	0,0	0,0			
Körner	SV 713	Tier 6			
			0 min	0,0	0,0
			10 min	6,1	0,0
			30 min	8,4	0,0
			45 min	11,6	0,0
			60 min	14,5	0,0
			90 min	18,5	0,0
			3 h	12,5	0,0
			4 h	17,1	0,0
			6 h	9,0	0,0
			9 h	5,6	0,0
			12 h	2,9	0,0
			24 h	0,0	0,0

Fortsetzung Tabelle 2

Gruppe	Versuch	Tier	Zeitpunkt	DON	DOM-1
Körner	SV 715	Tier 7	-30 min	0,0	0,0
			0 min	3,1	0,0
			10 min	7,5	0,0
			30 min	8,8	0,0
			45 min	8,3	0,0
			60 min	11,3	0,0
			90 min	22,8	0,0
			3 h	17,2	0,0
			4 h	16,2	0,0
			6 h	7,2	0,0
			9 h	7,1	0,0
			12 h	3,9	0,0
			24 h	0,0	0,0
			Körner	SV 715	Tier 8
0 min	3,2	0,0			
10 min	8,3	0,0			
30 min	13,1	0,0			
45 min	13,5	0,0			
60 min	14,6	0,0			
90 min	16,2	0,0			
3 h	14,2	0,0			
4 h	12,9	0,0			
6 h	8,2	0,0			
9 h	6,4	0,0			
12 h	3,2	0,0			
24 h	0,0	0,0			
Körner	SV 715	Tier 9			
			0 min	3,1	0,0
			10 min	13,6	0,0
			30 min	17,8	0,0
			45 min	22,5	2,7
			60 min	21,2	0,0
			90 min	26,2	0,0
			3 h	27,4	0,0
			4 h	17,1	0,0
			6 h	10,1	0,0
			9 h	7,5	0,0
			12 h	3,2	0,0
			24 h	0,4	0,0

Fortsetzung Tabelle 2

Gruppe	Versuch	Tier	Zeitpunkt	DON	DOM-1
Kaff	SV 713	Tier 3	-30 min	0,0	0,0
			0 min	2,6	0,0
			10 min	8,0	0,0
			30 min	18,7	0,0
			45 min	13,4	0,0
			60 min	12,9	0,0
			90 min	12,4	0,0
			3 h	12,2	0,0
			4 h	13,3	0,0
			6 h	7,0	0,0
			9 h	4,7	0,0
			12 h	2,1	0,0
			24 h	0,0	0,0
			Kaff	SV 715	Tier 2
0 min	5,2	0,0			
10 min	14,1	0,0			
30 min	16,4	0,0			
45 min	16,5	0,0			
60 min	14,6	0,0			
90 min	17,7	0,0			
3 h	14,6	0,0			
4 h	11,4	0,0			
6 h	8,2	0,0			
9 h	6,6	0,0			
12 h	4,5	0,0			
24 h	0,0	0,0			
Kaff	SV 715	Tier 5			
			0 min	5,5	0,0
			10 min	8,2	0,0
			30 min	15,2	0,0
			45 min	15,1	0,0
			60 min	10,1	0,0
			90 min	12,6	0,0
			3 h	12,9	0,0
			4 h	11,9	0,0
			6 h	7,5	0,0
			9 h	5,8	0,0
			12 h	3,6	0,0
			24 h	0,0	0,0

Fortsetzung Tabelle 2

Gruppe	Versuch	Tier	Zeitpunkt	DON	DOM-1
Kaff	SV 715	Tier 6	-30 min	0,0	0,0
			0 min	0,0	0,0
			10 min	7,0	0,0
			30 min	14,2	0,0
			45 min	12,9	0,0
			60 min	17,4	0,0
			90 min	17,5	0,0
			3 h	14,0	0,0
			4 h	15,5	0,0
			6 h	11,0	0,0
			9 h	8,1	0,0
			12 h	5,5	0,0
			24 h	0,0	0,0