



Bundesanstalt für
Landwirtschaft und Ernährung



Projektträger Bundesanstalt
für Landwirtschaft und Ernährung



FRIEDRICH-LOEFFLER-INSTITUT



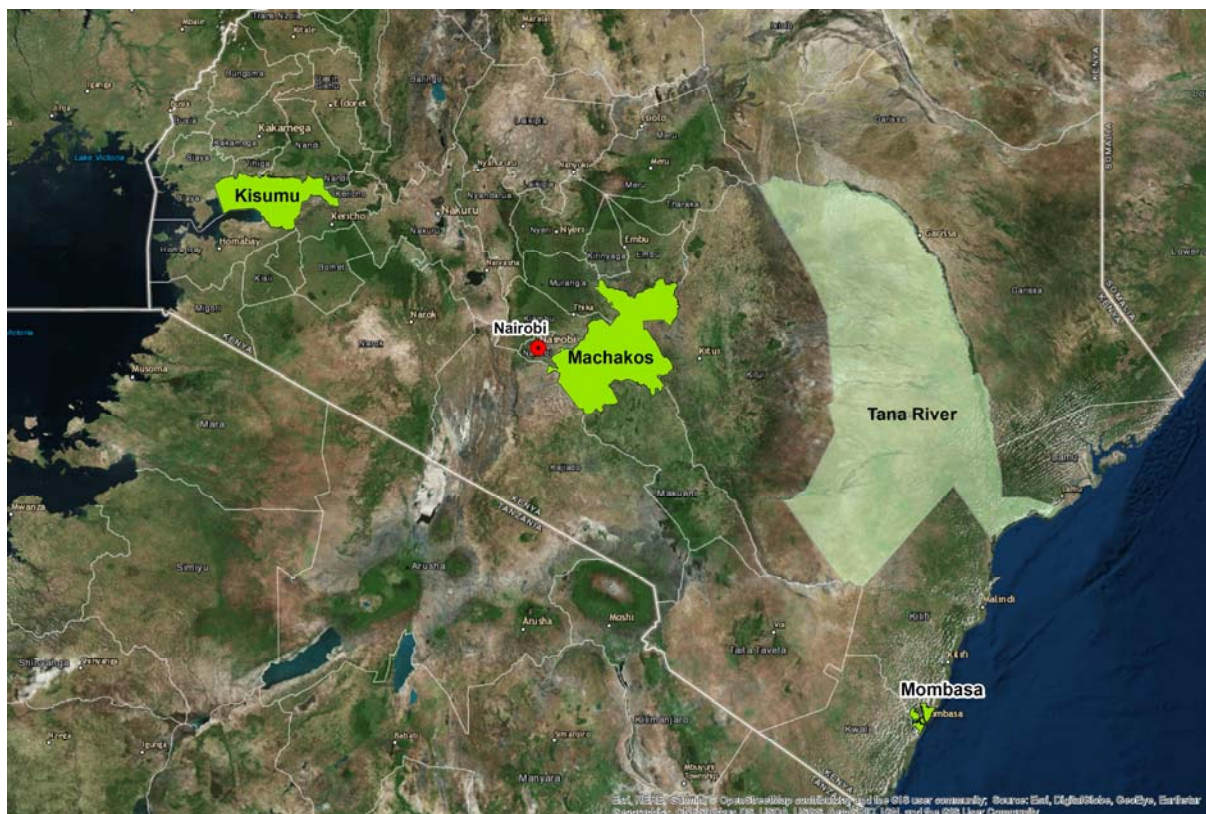
Projektupdate



Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit
Federal Research Institute for Animal Health

Projekttitel:	Entwicklung und Implementierung nachhaltiger Strategien zur Verbesserung von Lebensmittelsicherheit bei Erhalt der Nährstoffe durch Reduktion von Pilzbefall und Aflatoxin-Kontamination in der Lebensmittelkette in Kenia als Modellregion für Sub-Sahara Afrika (AflaZ)
Land/Region/Stadt:	Kenia
Bekanntmachung:	Geschäftszeichen: 323-06.01-03-2816PROC11 Förderkennzeichen: 2816PROC11
Kooperierende Partner:	Max Rubner-Institut; Julius Kühn-Institut; Friedrich-Loeffler-Institut; Universität Koblenz-Landau; Kenya Agricultural & Livestock Research Organisation; East African Farmers Federation
Laufzeit:	1.10.2018 bis 31.12.2022
Budget:	1.324.664,27 €

Karte der Zielregion:



(bitte hier die Logos der kooperierenden Partner einfügen)

Stand Januar 2020

Seite 2 von 5

Ziele des Vorhabens:

Durch den Konsum von stark mit Aflatoxinen kontaminierten Lebensmitteln (insbesondere der Grundnahrungsmittel Mais und Milch) ist die Bevölkerung Kenias regelmäßig Toxingehalten ausgesetzt, die weit über den empfohlenen Grenzwerten liegen. Dennoch nimmt der Konsum dieser Produkte beständig zu. Gerade Kinder und Kranke Menschen, sind durch die gesundheitlichen Auswirkungen, die mit der Aufnahme von Mykotoxinen assoziiert sind, besonders gefährdet.

Das BLE-finanzierte Projekt **AflaZ** fokussiert auf eine Verbesserung der Lebensmittelsicherheit und des Qualitätsstandards von Milch, Mais und daraus hergestellten Produkten. Kenia ist eine Modellregion, da es ein Hochrisikogebiet für Aflatoxin Kontaminationen und Schimmelpilzbefall im Lebensmittelbereich ist. Im Rahmen des AflaZ-Projektes sollen effektive und nachhaltige Methoden entwickelt werden, um Pilzbefall und Aflatoxinkontamination sowohl auf dem Feld als auch im Lager zu detektieren, zu analysieren und effektiv zu reduzieren. Darüber hinaus implementiert AflaZ umfangreiche Strategien zur Kompetenzerweiterung (Capacity Building), die Kooperationen mit lokalen Institutionen, Farmern, Studierenden und weiteren Beteiligten mit einschließen, und ermöglicht so einen nachhaltigen Wissenstransfer, kulturelle Akzeptanz der Empfehlungen und die effektive Integration der neuen Methoden durch die lokale Bevölkerung.

Im Rahmen von AflaZ werden folgende Kernthemen bearbeitet:

- Isolierung und Identifizierung Aflatoxin-bildender Pilze von Mais aus Kenia, sowie deren mikrobiologische und molekularbiologische Charakterisierung zur Entwicklung wirksamer und nachhaltiger Detektions- und Vermeidungsstrategien.
- Analyse der Übertragung von Aflatoxin aus dem Futter in die Kuhmilch, sogenanntes Carry Over, sowie Analyse einer möglichen Reduktion des Aflatoxingehalts bei der anschließenden Verarbeitung der Milch zu Käse und Joghurt. Identifikation eines Aflatoxinbiomarkers im Blut von Milchkühen und Entwicklung einer passenden Analysemethode.
- Analyse von Aflatoxinderivaten, die wesentlich zu „maskierten“ Kontaminationen beitragen können; Entwicklung und Implementierung von Fast-Screen-Tests, sowie einer APP für mobile Analysen auf dem Feld.
- Bestimmung von Bodenparametern als Vitalitätsparameter für Bodenorganismen und für Maispflanzen, sowie von Feldinsekten als Vektoren der Verbreitung von Pilzsporen.
- Capacity Building zusammen mit afrikanischen Doktoranden, vierteljährliche Verbreitung der Projektergebnisse über den PAEPARD-Blog.

Ergebnisse des ersten Projektjahres (2019):

Am **Max Rubner-Institut (MRI)**, Standort Karlsruhe, wurde damit begonnen, *Aspergillus*-Stämme von Maisproben aus Kenia zu isolieren. Die verschiedenen Stämme wurden auf ihre Fähigkeit zur Aflatoxinbildung hin untersucht und miteinander verglichen. Um die Genexpression von Aflatoxin- und Cyclopiazonsäure-spezifischen Genen sowie die Produktion von Aflatoxin und Cyclopiazonsäure unter Standardbedingungen (bei 25 ° C) vor dem Testen verschiedener Temperaturen und Wasseraktivitäten besser zu verstehen, wurden in **WP1** *A. flavus* und zwei weitere ausgewählte Stämme auf Labormedium und auf Maiskörnern bei verschiedenen Temperaturen und Wasseraktivitäten kultiviert und die Aflatoxinbildung, sowie die Genexpression unter Verwendung eines neu entwickelten ddPCR-Systems analysiert. Dieses ddPCR System wird in der späteren Phase des Projektes angewandt werden, um die Interaktion zwischen nicht Aflatoxin-bildenden und Aflatoxin-bildenden *A. flavus* Stämmen zu untersuchen. Der Hintergrund für diesen Ansatz ist das AflaSafe-Verfahren in Kenia, bei dem nicht-bildende Stämme von *A. flavus* eingesetzt werden, um bildende

Seite 3 von 5

Stämme auf Mais kompetitiv zu unterdrücken. Für die Entwicklung des ddPCR Systems wurden aus einem DNA Bereich der Polyketidsynthese, einem Schlüsselgen für die Aflatoxin-Biosynthese, spezifische Sonden mit zwei verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen, einer für den nicht-bildenden Stamm (*A. flavus* ATCC96045/AF36 aus WP2) und einer für den bildenden Stamm (*A. flavus* M19/MRI19 aus WP2), abgeleitet. Auf der Suche nach neuen Präventionsmethoden für die Aflatoxin-Biosynthese von *A. flavus* wurden Versuche mit Arginin durchgeführt, da frühere Untersuchungen der Arbeitsgruppe zeigten, dass die Aminosäure Arginin die Mykotoxin-Biosynthese von *Penicillium*-Arten hemmen kann. Tatsächlich nahm das Wachstum von *A. flavus* auf PDA ab, das mindestens 80 mM Arginin enthielt, und war auf Mais-medium, das 60 mM Arginin enthielt, vollständig gehemmt. Die Aflatoxin-Biosynthese war reduziert, während die Cyclopiazonsäure-Biosynthese erhöht war.

Im Rahmen des **WP2** und **WP3** wurden verschiedene Aflatoxin-bildende Aspergillen aus Kenianischen Maiskörnern isoliert und identifiziert. Außerdem wurde ein nicht Aflatoxin bildender *A. flavus* von der Stammsammlung ATCC erworben (AflaSafe). Diese Pilze wurden WP1 und WP7 für deren Arbeiten zur Verfügung gestellt und in WP2 auf physiologischer Ebene näher charakterisiert. Von diesen Pilzen wurden mittels paired-end Sequenzieretechnologie die Genome sequenziert und charakterisiert. Außerdem wurden die Bedingungen untersucht, bei denen Aflatoxin-bildende Aspergillen Aflatoxin bilden und unter welchen Bedingungen die Aflatoxinbildung bzw. das Wachstum dieser Pilze reduziert ist. Auf Grundlage der gewonnenen Erkenntnisse kann zum Beispiel der Einsatz von chemischen Fungiziden in der Landwirtschaft reduziert werden. Diese sind zum einen kostspielig und zum anderen können sie zu unerwünschten Rückständen führen. Bei den wichtigsten Aflatoxin bildenden Pilzspezies *Aspergillus flavus* und *A. parasiticus*, konnte gezeigt werden, dass unter Reduktion der Wasserverfügbarkeit im Nährmedium (aw) und Einfluss von Licht einer bestimmten Wellenlänge, sowohl Wachstum, Mykotoxinbiosynthese, als auch die Sporenbildung drastisch reduziert werden können. Analysen eines Homologes des HOG1 Proteins (High Osmolarity Glycerol) in *Aspergillus*, genannt SAKA, dass im Pilz unter anderem die Reaktion auf osmotischen Stress reguliert, zeigen zudem eine negativ-proportionale Korrelation zwischen Aflatoxin- bzw. Cyclopiazonsäure-bildung und SAKA Aktivität (Phosphorylierung) in *Aspergillus flavus* und *A. parasiticus*. Dies verdeutlicht, dass eine regulatorische Verbindung zwischen Stressregulations-Signalweg und Aflatoxin- bzw. Cyclopiazonsäurebildung existiert. Aspergillen können junge Maispflanzen über verletzte Wurzeln infizieren und so in die Leitbündel der Pflanze vordringen. Über diese und weitere Untersuchungen der Infektionswege von Aspergillen und Maispflanzen konnten in **WP2** *in vivo* mittels Scanning Electron Microscopy (SEM) gezeigt werden, dass der Pilz gerichtet in die Stomata-Öffnungen der Pflanze einwächst, also über entsprechende Sensorsysteme verfügen muss, um diese zu finden. In einem Laborversuch wurde außerdem gezeigt, dass das Mykotoxin Aflatoxin über die Wurzeln in die Pflanze aufgenommen werden kann (leaching) und bereits nach wenigen Tagen auch im Spross der Maispflanzen nachweisbar war. Weitere Untersuchungen folgen.

Als weitere Interventionsmöglichkeit wird, im Rahmen des **WP3** Anteil des MRI.Karlsruhe, der mykoparasitische Pilz *Trichoderma afroharzianum* gegen Aflatoxin-bildende Pilze eingesetzt. Der Pilz *Trichoderma afroharzianum* hemmt und reduziert dabei nicht nur sehr stark Aflatoxin-bildende Pilze in ihrem Wachstum, sondern auch andere Mykotoxin-bildende und zum Teil pflanzenpathogene Pilze der Gattungen *Fusarium*, *Alternaria* und *Penicillium*. In Bezug auf den Einsatz von *Trichoderma* als unschädliches Biozid, haben erste Analysen des Genoms gezeigt, dass in dieser *Trichoderma*-Art keine toxischen Sekundärmetabolitencluster, wie sie bspw. mit Trichothecenen in anderen *Trichoderma*-Arten beschrieben wurden, vorhanden sind.

Am **Julius Kühn-Institut** (JKI) wurde 2019 zur Bearbeitung von **WP3** mit der Methodenentwicklung begonnen. Bioassays (Petrischalen-Assays und Mikrodilutions-Assays) wurden zum Testen der antimykotischen Aktivität von wässrigen und methanolischen Extrakten und ätherischen Ölen aus Blättern von Kenianischen Pflanzen angepasst. Dabei wurde das Wachstum und die Mykotoxinproduktion verschiedener Arten von Pilzen (*Fusarium culmorum*, *Fusarium*

Seite 4 von 5

graminearum, *Aspergillus sidowii*) in Kombination mit den Extrakten verschiedener Pflanzen (*Callistemon rigidus*, *Annona senegalensis*, *Lippia adoensis*, *Parthenium hysterophus*) getestet. Weiterhin wurden verschiedene Probenahmemethoden zur Messung des Pilzbefalls an Pflanzen untersucht.

Am **MRI** am Standort Detmold im Rahmen von **WP4** wurde ein Mais Probenahme-Plan für Kenia erstellt. Außerdem wurde nach einigen Vorarbeiten, die Optimierung von Laufmittel und Durchflussparameter für die Aflatoxin-Bestimmungsmethoden an zwei chromatografischen Systemen (LC-MS/MS -HRQToF) etabliert werden. Des Weiteren wurden die Schnelltestsysteme beschafft, getestet und für den Einsatz in Kenia vorbereitet. Die Systeme werden den Kenianischen Partnern dauerhaft, auch über den Projektzeitraum hinaus, zur Verfügung gestellt (Capacity Building).

An der **Universität Koblenz-Landau**, im Rahmen von **WP5**, wurde eine zuverlässige, einfache und kostengünstige Extraktions- und Analyseverfahren für Aflatoxine aus dem Boden entwickelt. Dafür wurden verschiedene schnelle und einfache generische Extraktionsverfahren (Fest-Flüssig-Extraktion, Ultraschallextraktion, QuEChERS) in Kombination mit verschiedenen Aflatoxinen (AFB1, AFB2, AFG1, AFG2) verglichen. Als zu testender Boden wurde ein „Worst-Case“-Boden herangezogen, d.h. ein Boden mit hohem Anteil an Ton und organischen Material, der daher besonders ungünstige Verhältnisse zur Extraktion von Aflatoxinen bietet. Die Überlegung dahinter ist, dass wenn die Methode unter den schlechtestmöglichen Bedingungen funktioniert, dass sie dann auch für alle anderen Bodenarten geeignet ist. Die Extrakte wurden mittels LC-MS (Liquid-Chromatographie-Massenspektrometrie) über eine matrixangepasste Kalibrierung analysiert und die Nachweisgrenzen und Quantifizierung wurden ermittelt. In einem nächsten Schritt soll die optimierte Methode an vier landwirtschaftlichen Referenzböden und einem Kenianischen Versuchsboden validiert werden. Es ist davon auszugehen, dass viele Kenianische/Afrikanische Institute keinen Zugang zu MS-Systemen haben und daher eine quantitative Bestimmung von Aflatoxinen im Boden nur mit herkömmlichen Methoden (HPLC-Fluoreszenz) möglich ist. Daher wird ein HPLC-FLD-Verfahren entwickelt, welches Bestimmungsgrenzen erreicht, die das Verfahren für reale Umweltproben anwendbar macht. Darüber hinaus wird an einer Studie gearbeitet, die die toxische Wirkung des aeroben biotischen Abbaus von Aflatoxinen auf Bodenmikroorganismen untersucht.

Im Oktober 2019 reiste ein Wissenschaftler des **JKI** zur Vorbereitung der Arbeiten in **WP6** nach Kenia, um vor Ort seinen kenianischen Doktoranden zu treffen und mit ihm die entomologischen Untersuchungen im Freiland und die Anforderungen an die Versuchsflächen methodisch zu strukturieren und abzusprechen. Während seines Aufenthaltes besichtigte er mit der Unterstützung von KALRO die Versuchsflächen in den Regionen Kisumu, Machakos und Mombasa und konnte an Hand der neu gewonnenen Eindrücke den Versuchsaufbau anpassen. Darüber hinaus konnte er für alle Projektpartner wertvolle Informationen zu den realen Begebenheiten, Anbaumethoden und möglichen Problemen vor Ort sammeln und diese über die Koordination, den anderen Partnern zur Verfügung stellen.

Am **MRI** in Kiel wurde in **WP7** Futtermais für die späteren Fütterungsversuche beschafft und die Infrastruktur zur Inokulation vorbereitet (L2-Labor für Arbeiten mit *Aspergillus*-Stämmen im Großmaßstab). Die Sporensuspensionen zur Beimpfung wurde am MRI in Karlsruhe im Rahmen von WP2 für die Versuche hergestellt und nach Kiel gebracht. Der benötigte Tierversuchsantrag wird in Q2 2020 eingereicht. Die HPLC-FLD Methode wurde erweitert, um Futtermittel auf AFB1-Gehalt überprüfen zu können.

Als Ziel für 2019 wurde am **Friedrich-Loeffler-Institut** (FLI) im Rahmen des **WP7** die Ergänzung des Fütterungsversuchs des Instituts für Sicherheit und Qualität bei Milch und Fisch am MRI festgelegt. Ein ELISA-Testkit („QUANTITATIVE ASSAY FOR – AFLATOXIN M1 IN URINE“ der Firma Helica Biosystems) wurde evaluiert und einer Validierungsprüfung unterzogen. Die Validierung wurde anhand von Urinproben von 12 Milchkühen sowie eines Aflatoxin M1 Standards durchgeführt. Die Methode wurde auf die Validierungsparameter Richtigkeit, Präzision, Nachweis- und Bestimmungsgrenze sowie Verdünnungslinearität geprüft. In einem nächsten Schritt wurde an der Entwicklung einer verbesserten

Seite 5 von 5

Methode über UHPLC mit FLD-Detektor gearbeitet. Erste Probenansätze wurden analog zur ELISA-Methode mittels Urinproben von 12 Milchkühen sowie eines Aflatoxin M1 Standards angesetzt und über die entwickelte Methode analysiert. Die Auswertung über die qualitative Beurteilung der Ergebnisse sowie der quantitativen Beurteilung der Wiederfindung zeigt, dass die Methode eine grundsätzliche Eignung besitzt. Es bestehen Kontakte zu Wissenschaftlern des ILRI (Lifestock Research) in Kenia, um die Methodik auf die dortigen Milchkuh-Varietäten anzupassen bzw. mit dortigen Ergebnissen zu vergleichen.

In 2019 wurde durch die **Kenya Agricultural & Livestock Research Organisation in WP8**, in Zusammenarbeit mit **EAFF, WP9**, in 112 Haushalten eine geschlechtsspezifische Umfrage mittels eines von EAFF ausgearbeiteten Fragebogens durchgeführt, um Anbau- und Verarbeitungspraktiken der Landwirte sowie deren Wissen über Aflatoxin zu erfassen. Basierend auf den Ergebnissen der durchgeführten Umfragen (u.a. Topographie des Farmlandes, Größe des Farmlandes, Bereitschaft des Landwirts an den Versuchen mit zu wirken), wurde in Zusammenarbeit mit EAFF die Endauswahl der drei Regionen getroffen, in denen die Versuchsfelder liegen. In jedem der 72 Betriebe, in denen Feldversuche durchgeführt werden, wurden Bodenproben und Maisproben der vorherigen Ernte aus den Getreidespeichern der beteiligten Betriebe entnommen und analysiert. Im Verlauf des Jahres wurde das Anlegen der Versuchsfelder, deren Bestellung und die Ernte durch die Landwirte von EAFF überwacht und unterstützt. EAFF nutzt die eigene Informations- und Kommunikationsplattform, e-Granary, um die Projektergebnisse weitreichend zu vermitteln. Im Zeitraum 2019 erreichte EAFF 13.000 Landwirte aus verschiedenen Landkreisen, um sie über die Auswirkungen der Aflatoxin-Kontamination in der Wertschöpfungskette von Mais und Sojabohnen zu schulen.

Im April 2019 fand am MRI in Karlsruhe unter der Teilnahme fast aller Projektbeteiligter das erste **AflaZ-Partnermeeting** statt.

Kernaussagen und Policy advice:

- 1) Es ist möglich Mykotoxin-bildende Pilze mit einer Kombination aus hemmenden Einflüssen im Lager und zum Teil bereits auch auf dem Feld durch den Einsatz natürlicher Kompetitor-Pilze effektiv zu hemmen.
- 2) Antifungale Pflanzeninhaltsstoffe, sowie die Aminosäure Arginin, die einfach aufgesprüht werden könnten, zeigen sich als weiterer vielversprechender Ansatz zur Hemmung Aflatoxin-bildender Pilze.
- 3) Befall und Effektivität der Präventionsmethoden, können mittels molekularer ddPCR Technologie im Labor überprüft und gemonitored werden.
- 4) Es werden Aflatoxin-Schnellnachweismethoden für das Feld entwickelt und die Übertragungsrate von Aflatoxin in Kuhmilch untersucht, sowie eine mögliche Aflatoxinreduktion in den Milchprodukten Joghurt und Käse. Zur Verwendung in einer effektiven Analysemethode ist außerdem ein Biomarker zur Messung der Aflatoxinbelastung der Milchkuh in Entwicklung.
- 5) Maisfelder werden unter konventionellen Methoden, sowie mit den im AflaZ entwickelten Methoden angebaut, der Befall mit Aflatoxin wird verglichen und die Farmer in den neuen Methoden, sowie Fachwissen über die Aflatoxinproblematik geschult. Auf diese Weise ist eine nachhaltige Aflatoxinreduktion möglich und realisierbar. Durch die Ausbildung afrikanischer Doktoranden im AflaZ Projekt ist die Multiplikation der Erkenntnisse aus AflaZ vor Ort gewährleistet.