



Bundesanstalt für
Landwirtschaft und Ernährung

Afla

ptble

Projektträger Bundesanstalt
für Landwirtschaft und Ernährung

MRI
Max Rubner-Institut

JKI
Julius Kühn-Institut
Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen



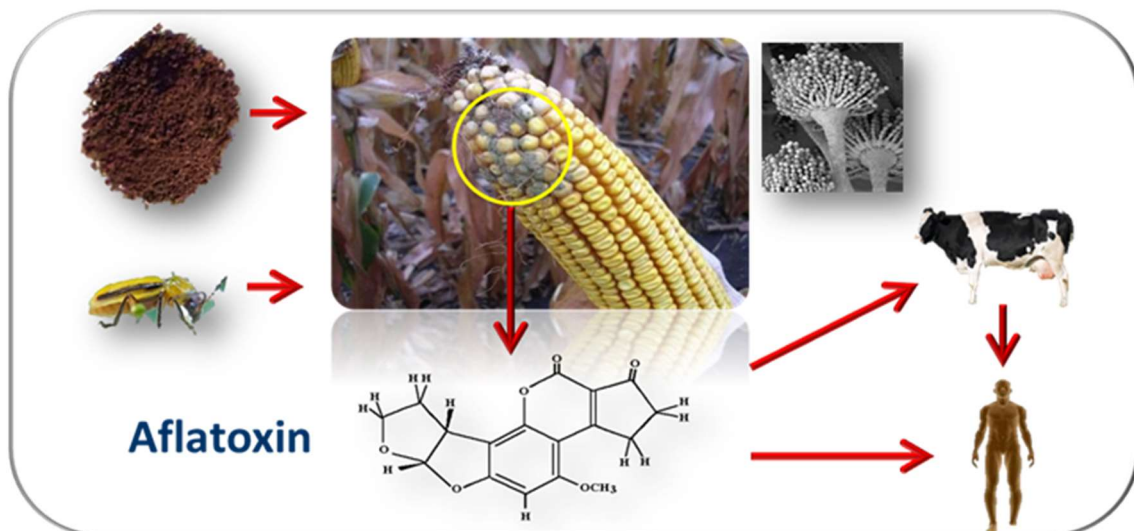
UNIVERSITÄT
KOBLENZ · LANDAU

FRIEDRICH-LOEFFLER-INSTITUT
FLI
Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit
Federal Research Institute for Animal Health

Projektupdate

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:	1.505.039,13 €

Schema der Kernthemen die bei AflaZ im Fokus stehen:





Ziele des Vorhabens:

Die Bevölkerung Kenias und anderer afrikanischer Länder sind durch den Konsum von stark mit Aflatoxinen kontaminierten Lebensmitteln (insbesondere der Grundnahrungsmittel Mais und Milch) 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 wurde als Modellregion gewählt, da es ein Hochrisikogebiet für Aflatoxin Kontaminationen durch Schimmelpilzbefall im Lebensmittelbereich ist. Im Rahmen des AflaZ-Projektes werden effektive und nachhaltige Methoden entwickelt, Pilzbefall und Aflatoxinkontamination sowohl auf dem Feld als auch im Lager zu analysieren und zu monitoren, um diese nachhaltig zu reduzieren. Darüber hinaus beinhaltet das AflaZ-Forschungsprogramm umfangreiche Strategien zur Kompetenzerweiterung (Capacity Building). Diese schließen Kooperationen mit lokalen Institutionen, Farmern, Studierenden und weiteren Beteiligten mit ein und ermöglichen so einen nachhaltigen Wissenstransfer (Dissemination), der eine kulturelle Akzeptanz der Empfehlungen und die nachhaltige Integration der neuen Methoden durch die lokale Bevölkerung sicherstellt.

Im Rahmen von AflaZ werden folgende Kernthemen bearbeitet:

- Isolierung und phylogenetische Identifizierung Aflatoxin-bildender Pilze auf Mais und assoziierten Bodenproben aus Kenia, sowie deren mikrobiologische und molekularbiologische Charakterisierung mit dem Ziel der Entwicklung von Monitoringsystemen, sowie wirksamer und nachhaltiger Nachweis- und Vermeidungsstrategien.
- Untersuchung der Übertragung von Aflatoxin aus dem Futter in die Kuhmilch, sogenanntes Carry Over, sowie Analyse einer möglichen Reduktion/Abbau von Aflatoxinen bei der anschließenden Verarbeitung der Milch zu Käse und Joghurt. Identifikation eines Aflatoxin-spezifischen Biomarkers im Blut von Milchkühen und Entwicklung einer passenden Analyseverfahren.
- Analyse von Aflatoxin-Derivaten, die durch den Pilz oder die Pflanze durch Metabolisierung gebildet werden und wesentlich zu einer „maskierten“ Aflatoxinbelastung beitragen können; Vergleich und Entwicklung einer standardisierten Methodik für die Anwendung von Fast-Screen-Tests auf Aflatoxin, sowie Etablierung einer APP für mobile Aflatoxin-Analysen auf dem Feld.
- Bestimmung von Aflatoxin Gehalten im Boden und physico-chemischen Bodenparametern als Vitalitätsfaktor für Bodenorganismen und für Maispflanzen, sowie von Feldinsekten als Schädlinge auf der Maispflanze und Vektoren der Verbreitung von Pilzsporen Aflatoxin-bildender Pilze.
- Schulung und Anleitung (Capacity Building) von kenianischen Doktoranden innerhalb des AflaZ-Projektes als Multiplikatoren zur Verbreitung (Dissemination) der AflaZ-Forschungsergebnisse an die Landwirt/innen, sowie deren Aufklärung und Schulung in den neuen Methoden. Stärken der Kommunikation und der Kooperation zwischen kenianischen Partnerinstitutionen und anderen lokalen Forschungsinstitutionen. Verbreitung der Projektergebnisse über die eGRANARY-Plattform und den PAEPARD-Blog-Spot, sowie als Empfehlung an Regierungs- und Nichtregierungsorganisationen in Kenia. Breitere Bevölkerungsschichten werden mit der Ausstrahlung einer TV-Dokumentation über das AflaZ-Projekt und themenspezifische Radioprogramme erreicht.

Ergebnisse des dritten Projektjahres (2021):

Die Corona Pandemie sorgt seit Frühjahr 2020 in vielen Lebenslagen und Arbeitssituationen für Einschränkungen, so auch bei den in Rahmen des AflaZ-Projektes im Jahr 2021 stattfindenden Arbeiten. Hinzu kamen ungewöhnlich starke Regenfälle über einen längeren Zeitraum in Kenia, welche die Arbeiten teilweise weiter erschwerten. Die Projektziele haben sich im Laufe der Projektdurchführung durch Umorganisation und kompensatorische Maßnahmen dennoch nicht geändert. Die Arbeiten mussten jedoch an die Covid19-bedingten Einschränkungen angepasst werden.

Am **Max Rubner-Institut** (MRI), Standort Karlsruhe, wurden im Rahmen des **WP1** ein umfassendes Monitoring der Aflatoxinbiosynthese von *Aspergillus flavus* durchgeführt und die gebildeten Aflatoxine sowie Vorstufen von Aflatoxinen untersucht. Es zeigte sich, dass der Pilz zusätzlich zu B-Aflatoxinen auch Aflatoxin M₁ und M₂ bildet, welche primär als Kontamination in Milch und Milchprodukten als Abbauprodukte von B-Aflatoxinen durch den Metabolismus in Kühen bekannt sind. Die Bildung durch den Pilz ist jedoch kaum beschrieben. Die Ergebnisse zeigen, dass auch in Cerealien wie beispielsweise Mais M-Aflatoxine gebildet werden können und damit anzudenken ist, dass Aflatoxin Monitoring von derartigen Lebensmitteln um M-Aflatoxine zu erweitern. Zusätzlich wurde eine relativ hohe Menge an bestimmten Vorstufen von Aflatoxinen gemessen, von denen vor allem Aspertoxin, eine fast gar nicht beschriebene Verbindung, die allerdings bereits toxische Effekte gezeigt hatte und O-Methylsterigmatocystin anzuführen sind. Beide Verbindungen weisen die für die kanzerogene Wirkung von Aflatoxin B₁ erforderliche Doppelbindungen auf und könnten damit ebenfalls eine kanzerogene Aktivität haben.

Bei Arbeiten unter **WP2** wurden die Genome unterschiedlicher Aspergillen miteinander verglichen, um Rückschlüsse auf die Unterschiede in der Aflatoxinbiosynthese und damit deren Impact auf die Lebensmittelsicherheit der betroffenen Produkte ziehen zu können. In den Aflatoxingencluster von *A. minisclerotigenes* Stämmen wurde eine Deletion entdeckt, welche die für die Biosynthese von Aflatoxin G notwendigen Gene umfasst. Damit lässt sich erklären, weshalb die aus kenianischen Proben isolierten *A. minisclerotigenes* Stämme kein Aflatoxin G bilden, was für die Mehrheit dieser Spezies beschrieben ist. Des Weiteren wurde ein Stopcodon im Aflatoxingencluster eines *A. parasiticus* Stamm entdeckt, welches die Ursache für die Unfähigkeit der Bildung von Aflatoxin B₁ und G₁ aber der gleichzeitigen Bildung von Aflatoxin B₂ und G₂ dieses Stammes erklärt. Diese neuen Forschungsergebnisse haben eine hohe Relevanz für die Bewertung der Sicherheit der durch die genannten Pilze kontaminierten Lebensmittel.

Kompetitionsversuche mit einem MRI-Isolat eines mycoparasitisch lebenden Pilzes, *Trichoderma afroharzianum*, sowie *Aspergillus flavus* im Rahmen von **WP3** wurden ausgeweitet. Es konnte die Effektivität des MRI-Isolates *T. afroharzianum* als Biocontrol Spezies bestimmt werden. Es wurden weitere Analysen durchgeführt, um die Rolle der Mykotoxine im Mechanismus der Konkurrenz zu untersuchen. Zusätzlich wurden erste Konkurrenzversuche auch mit *Fusarium verticilloides* durchgeführt, einem weiteren filamentösen, human- und pflanzenpathogenen Pilz, der häufig als „Wegbereiter“ für andere nicht stark pflanzenpathogene Spezies wie *A. flavus* dient. *F. verticilloides* bildet die sehr toxische Fumonisine und infiziert sehr häufig Mais, Getreide und andere Nutzpflanzen. Bei Untersuchungen am MRI wurden sowohl in Mais- als auch in Bodenproben von kenianischen Versuchsfeldern entsprechende Fusarien gefunden.

Das **Julius Kühn-Institut** (JKI) hat in **WP3.2** weitere potentielle Begleitpflanzen chemisch extrahiert und analysiert. Im etablierten und im März 2021 fertig gestellt und angemeldeten BSL2-Labor des JKI in Berlin konnte nun auch mit *Aspergillus flavus* gearbeitet werden. Ergebnisse zur antifungalen Wirkung der Begleitpflanzen *Lippia adoensis* und *Ocimum gratissimum* konnten nun auch für *A. flavus* bestätigt werden. Dabei zeigte sich der Einfluss der Herkunfts- und Anbaubedingungen auf die Inhaltsstoffe und die antifungale Wirkung.

Seite 4 von 6

Am **MRI Detmold** wurden die Methoden zur Bestimmung von Aflatoxinen und deren pflanzlichen Metabolisierungsprodukte, die evtl. einen Einfluss auf den Schnelltest haben könnten, weiter etabliert. Die kenianische Doktorandin Beatrice Tenge hat mit zwei Schnelltestsystemen (**WP4**) vergleichende Messungen an Maisproben durchgeführt. Auf Grund der geltenden Reisebeschränkungen war jedoch nur ein eingeschränkter Kontakt zu den Landwirt/innen möglich, so dass nur eingeschränkt Proben vor Ort in Kenia analysiert werden konnten.

An der **Universität Koblenz-Landau** wurde 2021 im Rahmen von **WP5** das Vorkommen von Aflatoxinen und Fusarien-toxinen in Maisanbauböden in Deutschland untersucht. Außerdem wurden die Persistenz von Aflatoxinen im Boden in drei Szenarien: Photolytischer Abbau, mikrobieller Abbau und Abbau unter sterilen Bedingungen und Abwesenheit von Licht (Kontrolle) untersucht. Darüber hinaus wurden Bodenproben aus Kenia mittels HPLC-Fluoreszenz (HPLC-FL) und LC-Massenspektroskopie (LC-HRMS) analysiert. Die untersuchten Mykotoxine waren: Aflatoxine, Ochratoxin A, Deoxynivalenol, Nivalenol, T-2-Toxin und Zearalenone. Insgesamt wurden 319 Proben analysiert, die den vier landwirtschaftlichen Behandlungen, zwei Tiefen und zwei Positionen entsprechen. Die unter den kenianischen Landwirt/innen durchgeführte Umfrage (n=116) wird derzeit ausgewertet. Basierend auf den statistisch ausgewerteten Daten der Umfrage, soll dazu im laufenden Jahr ein Modell entwickelt werden, das das Wissen über Mykotoxine mit dem Auftreten von Getreideinfektionen in Beziehung setzt.

Durch den kenianischen Doktoranden Ginson Riungu (**WP6**) wurden in Kenia nun über 100 Insektenarten beprobt und bis jetzt die 3 Arten *Sitophilus zeamisi*, *Carpophilus sp.* und *Camponotus nearcticus sp.* als Sporenträger nachgewiesen. Ein Großteil der Sporen (60 %) wird von den Anhängseln der Insekten (Beine und Fühler) getragen. Die beprobten Sporen sind in Kulturen lebensfähig und 30 % davon sind aflatoxigen.

Am **MRI in Kiel** konnte im Rahmen von **WP7** der im November 2020 begonnene Fütterungsversuch mit Schimmelpilzkontaminiertem Mais im Januar 2021 abgeschlossen werden. Mit der Herstellung von Joghurt aus der im Versuch gewonnenen Milch wurde begonnen und die Vorbereitungen für die anschließend erforderlichen analytischen Arbeiten konnten weitgehend abgeschlossen werden. Aus den gewonnenen Milchproben wurden Joghurts hergestellt und analysiert, wobei die Stabilität des Toxins AFM₁ während der Joghurtherstellung gezeigt werden konnte. Darüber hinaus wurde aus der Milch Käse nach Edamer Art hergestellt, um den Verbleib des *Aspergillus*-Toxins Cyclopiazonsäure in diesem wichtigen lebensmitteltechnologischen Prozess abzubilden.

Am **Friedrich-Loeffler-Institut (FLI)** wurde im Rahmen des **WP7** während des Tierversuches 208 Proben Serum gewonnen (4 Gruppen à 4 Tiere, 13 Zeitpunkte), die per LC-MS/MS auf den Biomarker Aflatoxin-Lysin untersucht wurden. In keiner dieser Proben konnte Aflatoxin-Lysin detektiert werden, wobei die Nachweisgrenze bei 0,05 ng/mL lag. Des Weiteren wurden bei diesen Proben klinisch-chemische Parameter und ausgewählte Elektrolyte bestimmt. Die Auswertung dieser Daten steht noch aus.

Die Entwicklung der HPLC-Methode für die Bestimmung von Aflatoxin M₁ (AFM₁) in Urin wurde abgeschlossen und die Methode validiert. Die Methode hat einen Arbeitsbereich von 0,05 bis 20 ng/mL mit einer Nachweisgrenze von 0,2 ng AFM₁/mL Urin. Die Wiederfindungsrate beträgt 93 %. In den Versuchsproben (n=48) konnte AFM₁ nur in der Toxinbildenden *Aspergillus flavus* Gruppe nach 14-tägiger Exposition (n=4) nachgewiesen werden, wobei die Konzentration zwischen 0,33 und 0,95 ng/mL lag.

Des Weiteren wurden diese Urinproben per ELISA auf AFM₁ untersucht. Auch mit dieser Methode konnte AFM₁ nur in den obengenannten Proben nachgewiesen werden, wobei die Konzentration zwischen 0,8 und 2,0 ng/mL lag.

Die entnommenen Leberbiopate des Tierversuches wurden hinsichtlich ihres Fettgehaltes und histologisch untersucht. Die Bestimmung des Lebertranskriptoms wird aktuell vorbereitet. Die abschließende Sequenzierung und Auswertung der Daten stehen momentan noch aus.

Die **Kenya Agricultural & Livestock Research Organisation (KALRO), WP8**, betreute in 2021 die AflaZ-Versuchsfelder in den drei Bezirken Kisumu, Makueni und Kilifi, die als Hotspots für die Aflatoxin-Kontamination von Mais gelten. Im Projektzeitraum 2021 wurden die Probenfelder in Kilifi und Makueni bis Februar abgeerntet und ab März neue Maisfelder angelegt, um die Unterschiede in den verschiedenen Anbaumethoden (konservativer Bodenbearbeitung, Push and Pull, Einsatz von *Trichoderma* und konventioneller Bodenbearbeitung) zu demonstrieren. Außerdem wurden 2021 die Ergebnisse aus den in den Vorjahren durchgeführten Versuchen weiter analysiert und ausgewertet: Die Wirkung der vier genannten Behandlungsmethoden auf die Kontamination des Bodens und der Maispflanzen durch *Aspergillus* Spezies und anderen filamentösen Pilzen, sowie auf den Gehalt an Aflatoxin im Mais wurde insgesamt über drei Anbauperioden untersucht. Darüber hinaus wurde die Bodenfruchtbarkeit bestimmt und in den Bodenchemielabors von KALRO Kabete eine Nährstoffanalyse durchgeführt und der pH-Wert der Böden, die während der Grundlagenenerhebung gesammelt wurden, bestimmt.

Die an dem Projekt beteiligten Landwirt/innen werden über die gesamte Projektlaufzeit durch die **East African Farmers Federation (EAFF), WP9**, betreut. Dabei wurde auch im Jahr 2021 der gesamte Anbau von Mais, von der Aussaat bis zur Ernte und Lagerung überwacht. Die Überwachung dient der Erfassung des Keimungsgrads der Pflanzen, des Pflanzenwachstums, der Suche nach Insekten und Schädlingen und deren frühzeitiger Bekämpfung, sowie der Überwachung der Unkrautbekämpfung und des Niederschlagsmusters, da all diese Faktoren die Ernte beeinflussen können. Die im Rahmen des Projekts entwickelten Technologien für die Lagerung und Ernte, die zu einer geringeren Aflatoxin-kontamination von Lebens- und Futtermitteln führen können, wurden den Landwirt/innen, wenn möglich, in vor-Ort-Schulungen demonstriert. Wenn dies nicht möglich war, wurden Informationen auf digitalem Wege geteilt. Die Ergebnisse aus dem AflaZ-Projekt fließen außerdem in eine momentan produzierte AflaZ-TV-Dokumentation ein. Die TV-Dokumentation erfasst die Aktivitäten aller Partner. Alle Projektpartner stellten die eigenen Informationen inkl. Filmaufnahmen zur Verfügung, um eine umfassende Berichterstattung über das gesamte Projekt zu gewährleisten. Da aufgrund von Covid-19 auch im Jahr 2021 physische Treffen nur eingeschränkt abgehalten werden konnten, wurde die e-GRANARY-Plattform genutzt, um Informationen zu verbreiten und die Landwirt/innen mit relevanten Themen bzgl. AflaZ und Kontamination der Maisernte zu erreichen. Die beteiligten Interessensgruppen sind sich dank der Aufklärungsarbeit immer mehr der Problematik der Aflatoxin-Kontamination in Lebensmitteln und Futtermitteln bewusst. Jene Landwirt/innen, die die neuen Technologien bereits nutzen, geben ihr neu erlangtes Wissen als Multiplikatoren an andere Landwirt/innen weiter und leisten damit einen nachhaltigen Beitrag zur breiteren Anwendung dieser Kenntnisse und Technologien.

Das **AflaZ-Jahrestreffen** in 2021 wurde unter reger Beteiligung aller Projektpartner online abgehalten.



Kernaussagen und Policy Advice:

- 1) Das Projekt AflaZ legt seinen Fokus auf die Problematik des Befalls von Mais durch Aflatoxin-bildende Pilze, wie *A. flavus* und *A. parasiticus*. Im Laufe der Untersuchungen, sowie in aktuellen Studien hat sich gezeigt, dass auch *A. minisclerotigenes* eine wesentliche Rolle bei der Aflatoxinkontamination von Mais in Kenia einnimmt. Bei Untersuchungen von sowohl Mais- als auch Bodenproben von kenianischen Versuchsfeldern wurden darüber hinaus auch verschiedene Fusarien gefunden. Daher wurde entschieden, ausgewählte *Fusarium*-Stämme mit in die Untersuchungen ein zu beziehen, da es auch gerade bei Fusarien häufig stark pflanzenpathogene Stämme gibt, die Mais, Getreide und andere Nutzpflanzen wie Obst und Gemüse infizieren, dort sehr toxische Mykotoxine bilden und häufig wegbereitend sind für weniger pathogene Arten wie Aspergillen.
- 2) 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 antagonistischer Pilze effektiv zu hemmen. Dabei ist der Einsatz von kommerziell eingesetzten Biokontroll-Stämmen (*A. flavus*) aus verschiedenen Gründen kritisch zu beurteilen. Der im Rahmen von AflaZ untersuchte alternative Einsatz eines kommerziellen Produkts mit *Trichoderma harzianum* zeigt gute, zum Teil jedoch ambivalente Ergebnisse bezüglich des Befalls mit *A. flavus* auf dem Feld. Der Einsatz eines MRI-Isolates von *T. afroharzianum* als Biokontroll-Stamm zeigt sich als vielversprechend.
- 3) Antifungale Pflanzeninhaltsstoffe aus lokalen kenianischen Begleitpflanzen, sowie die Aminosäure Arginin, die einfach auf die Pflanze aufgesprüht werden könnte, zeigten sich als weiterer vielversprechender Ansatz zur Hemmung Aflatoxin-bildender Pilze.
- 4) Befall und Effektivität der Präventionsmethoden (bspw. Durchsetzungsfähigkeit von Biocontrol-Spezies gegenüber Toxin bildenden Spezies) können mittels molekularer ddPCR Technologie im Labor überprüft und gemonitort werden.
- 5) Aflatoxin-Schnellnachweismethoden werden weiterhin in Feldversuchen in Kenia angewendet und weiterentwickelt. Eine Befragung der Landwirt/innen und Vorführung der Schnelltests zeigte, dass ein Test mit Smartphone App Auswertung bevorzugt wird. Jedoch zeigte sich auch, dass auf Grund der hohen Kosten der benötigten Teststreifen zu diesem Zeitpunkt eine App Entwicklung nicht ausreichend realisierbar und erfolgversprechend zu sein scheint. Gespräche mit einzelnen Firmenvertretern bzgl. einer Kooperation, um die Kosten zu senken, verliefen bis jetzt nicht erfolgversprechend, so dass weitere Überlegungen dazu projektergänzend durchgeführt werden sollten, z.B. eine Organisation und Realisierung von Mais-Tests auf Aflatoxine über die EAFF.
- 6) Es wurde eine Methode zur Bestimmung der Aflatoxin Konzentration in Boden/Pflanze entwickelt und diese erfolgreich validiert. Die Methode wurde darüber hinaus für die Analyse von pflanzlichen Matrices (Lebensmittel) optimiert, um bei der Untersuchung des Systems Boden/Pflanze eingesetzt zu werden. Die Übertragungsrate von Aflatoxin in Kuhmilch wird im Rahmen einer Fütterungsstudie untersucht, sowie eine mögliche Aflatoxinreduktion in den Milchfolgeprodukten Joghurt und Käse. Zudem ist außerdem ein spezifischer Biomarker zur Messung der Aflatoxinbelastung der Milchkuh in Entwicklung.
- 7) Maisfelder werden unter konventionellen Methoden, sowie mit den im AflaZ entwickelten Methoden angebaut, der Befall mit Aflatoxin wird verglichen und die Landwirt/innen in den neuen Methoden, sowie Fachwissen über die gesundheitliche Problematik einer Aflatoxin Intoxikation geschult. Auf diese Weise ist eine nachhaltige Aflatoxinreduktion möglich und realisierbar. Durch die Ausbildung kenianischer Doktoranden, teilweise auch zusätzlich von Erasmus Doktoranden aus Kenia, teilweise auch in Tandem mit deutschen Doktoranden, innerhalb des AflaZ Projektes, aber auch von Landwirt/innen, ist die Multiplikation der Erkenntnisse aus AflaZ vor Ort gewährleistet.