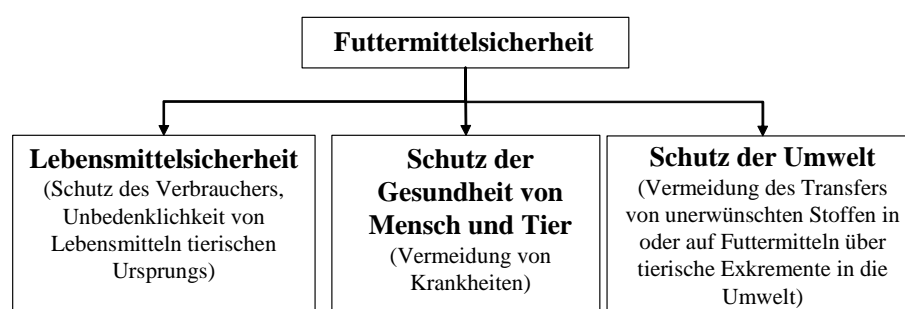


## Methodische Ansätze zur Abschätzung der Einflüsse der Mykotoxine Deoxynivalenol und Zearalenon auf die Futtermittelsicherheit

Sven Dänicke  
Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft, Braunschweig

### Einleitung

Die rechtliche Umsetzung des im Weißbuch zur Lebensmittelsicherheit<sup>1</sup> festgeschriebenen Grundsatzes "vom Erzeuger zum Verbraucher" erfolgte u.a. mit der Zusammenführung des Lebensmittel- und Bedarfsgegenständegesetzes mit dem Futtermittelgesetz zum gemeinsamen Lebensmittel-, Bedarfsgegenstände- und Futtermittelgesetzbuch (LFGB)<sup>2</sup>. Nach § 17 LFGB ist es verboten, Futtermittel derart herzustellen oder zu behandeln, in den Verkehr zu bringen oder zu verfüttern, die geeignet sind, die Gesundheit von Tieren zu schädigen, die Qualität der von Nutztieren gewonnenen Lebensmittel oder sonstigen Produkte zu beeinträchtigen oder die durch in tierischen Ausscheidungen vorhandene unerwünschte Stoffe, die ihrerseits bereits in Futtermitteln enthalten gewesen sind, den Naturhaushalt zu gefährden.



*Wichtung der Bedeutung der Elemente der Futtermittelsicherheit für die Festlegung von Höchstgehalten bzw. Orientierungswerten für einige unerwünschte Stoffe in Futtermitteln:*

Aflatoxine	++	++	-
Deoxynivalenol	-	++	-
Zearalenon	-	++	-
Dioxine	++	+	+
Organochlorpestizide	++	+	+
Blei	+	+	+

++ große Bedeutung, + bedeutungsvoll, - geringe Bedeutung oder Bedeutung nicht genau bekannt

*Abbildung 1: Von unerwünschten Stoffen kann eine Gefahr für die Futtermittelsicherheit ausgehen, die stoffspezifisch eine unterschiedliche Wichtung hinsichtlich der Bedeutung des unerwünschten Stoffes innerhalb der Elemente der Futtermittelsicherheit erfahren kann. Diese Wichtung ist bei der Anwendung analytischer und experimenteller Methoden zu berücksichtigen, wenn wissenschaftliche Grundlagen der Risikoidentifizierung und der Risikoabschätzung erarbeitet werden.*

Aus diesen Verboten lässt sich im Umkehrschluss ableiten, dass ein Futtermittel im Hinblick auf seinen Verwendungszweck als sicher einzuschätzen ist, wenn von ihm keine Gefährdung für Lebensmittel tierischen Ursprungs, der Tiergesundheit sowie der Umwelt ausgeht (Sicherheit für Mensch, Tier und Umwelt, Abb. 1). Mit diesen Aspekten der Futtermittelsicherheit ist auch der Rahmen abgesteckt, in dem beispielsweise eine Risikoabschätzung von unerwünschten Stoffen in Futtermitteln erfolgen muss. Entsprechend der Bedeutung der

<sup>1</sup> Weißbuch zur Lebensmittelsicherheit: Kommission der Europäischen Gemeinschaften, Brüssel, 12. Januar 2000, KOM (1999) 719 endg.

<sup>2</sup> Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuch in der Fassung der Bekanntmachung vom 26. April 2006 (BGBl. I S. 945)

genannten Teilaspekte der Futtermittelsicherheit für einen betrachteten unerwünschten Stoff (Abb. 1) sind auch die Methoden, die für die Erarbeitung wissenschaftlicher Grundlagen für eine fundierte Risikoabschätzung erforderlich sind, auszuwählen, zu etablieren bzw. anzupassen.

Im Folgenden sollen beispielhaft für die Mykotoxine Deoxynivalenol (DON) und Zearalenon (ZON) Methodenansätze in der Tierernährungsforschung im Zusammenhang mit der Futtermittelsicherheit problemorientiert diskutiert werden.

### **Welche Aspekte der Futtermittelsicherheit sind bei DON und ZON besonders zu berücksichtigen?**

Die Tatsache, dass sowohl DON als auch ZON im Boden nicht akkumulieren bzw. rasch abgebaut werden (z.B. Völkl et al., 2004; Mortensen et al., 2006), lässt es gerechtfertigt erscheinen, dass in Bezug auf die Futtermittelsicherheit den Einflüssen dieser Toxine auf die Tiergesundheit und deren möglichen Übergang in Lebensmittel tierischen Ursprungs (Carry over) eine größere Bedeutung zukommt als dem Umweltaspekt (Abb. 1). Diese Einschätzung wird noch dadurch gestützt, dass die Kommission der Europäischen Union Richtwerte (Orientierungswerte) von Mykotoxinen in zur Verfütterung an Tiere bestimmten Erzeugnissen empfohlen hat<sup>3</sup>. Die Einhaltung dieser Richtwerte soll sicherstellen, dass es unter praxistüblichen Bedingungen nicht zu Beeinträchtigungen von Leistung und Tiergesundheit kommt. Die EU-Kommission hat weiterhin empfohlen, ein Monitoring zum gleichzeitigen Vorkommen von DON und ZON sowie weiteren Mykotoxinen sowie zu Richtwertüberschreitungen durchzuführen, um zukünftig das diesbezügliche Risikomanagement weiter zu qualifizieren.

Daher werden in den folgenden Ausführungen nur die Aspekte von DON und ZON auf Tiergesundheit und Carry over im Hinblick auf die Futtermittelsicherheit methodisch angesprochen.

### **Was ist bei der Untersuchung metabolischer Effekte von DON und ZON methodisch zu beachten?**

Bei der Untersuchung des Einflusses beider Toxine auf die Tiergesundheit bzw. auf die zugrunde liegenden metabolischen Effekte sind die spezifischen Eigenschaften von DON und ZON in Beziehung zu deren Vorkommen in Futtermitteln methodisch zu berücksichtigen (Abb. 2). Zunächst ist festzustellen, dass beide Toxine in natürlich kontaminierten Futtermitteln unter den Produktionsbedingungen in Deutschland häufig vergesellschaftet vorkommen. Hinzu kommt, dass die Wirkmechanismen beider Toxine verschieden sind. So ist DON als Proteinsynthesehemmer bekannt, während ZON eine östrogene Wirkung entfalten kann und den endokrinen Disruptoren zugeordnet wird. Entsprechend dieser Wirkmechanismen lassen sich bestimmte Effekte zwar entweder DON oder ZON zuordnen, doch kann die Ausprägung aller beobachteten Veränderungen sowohl von der Dosis als auch vom Verhältnis beider Toxine zueinander abhängen. Für eine experimentelle Klärung der Frage nach den Wechselwirkungen zwischen beiden Toxinen bieten sich zunächst Kombinationsversuche an, welche die Verwendung in unterschiedlichen Verhältnissen zugesetzter reiner Toxine zu Toxin-freien Futtermischungen implizieren (z.B. Lusky et al., 2001; Müller et al., 1999). Berücksichtigt man die in Abbildung 2 angedeutete Komplexität der Toxinwirkungen im Organismus, so wird schnell verständlich, dass die Identifikation von Effekten und Wechselwirkungen neben den verwendeten Dosen und Toxinverhältnissen auch in starkem Maße von den untersuchten Parametern abhängt. Zudem wird für Versuche, bei denen mit zugesetzten Toxinen gearbeitet wurde, häufig eine Wirkungsstärke beobachtet, die von der abweicht, die bei Verwendung gleicher Toxinkonzentrationen aus natürlich kontaminierten Futtermitteln berichtet wird. Einerseits stellt sich die Frage nach der Wirkung von analytisch nicht erfassten weiteren *Fusarium*-Toxinen in natürlich kontaminierten Futtermitteln und andererseits nach der Bioverfügbarkeit von DON und ZON aus solchen Matrices. Für zugesetzte reine Toxine ist eine Freisetzung aus der Futtermatrix unter den Bedingungen des Verdauungstraktes (pH, Temperatur, Feuchte) nicht erforderlich, so dass ein höherer Anteil für die Absorption und die systemische Zirkulation, welche eine wichtige Voraussetzung für die Entfaltung metabolischer Effekte darstellt, zur Verfügung steht. Demgegenüber müssen Toxine aus natürlich kontaminierten Futtermitteln unter den Bedingungen des Verdauungstraktes zunächst aus der Futtermatrix freigesetzt werden, bevor eine Absorption erfolgen kann.

---

<sup>3</sup> Empfehlung der Kommission vom 17. August 2006 betreffend das Vorhandensein von Deoxynivalenol, Zearalenon, Ochratoxin A, T-2- und HT-2-Toxin sowie von Fumonisinen in zur Verfütterung an Tiere bestimmten Erzeugnissen (Text von Bedeutung für den EWR) (2006/576/EG) Amtsblatt der Europäischen Union L 229/7 (23.8.2006)

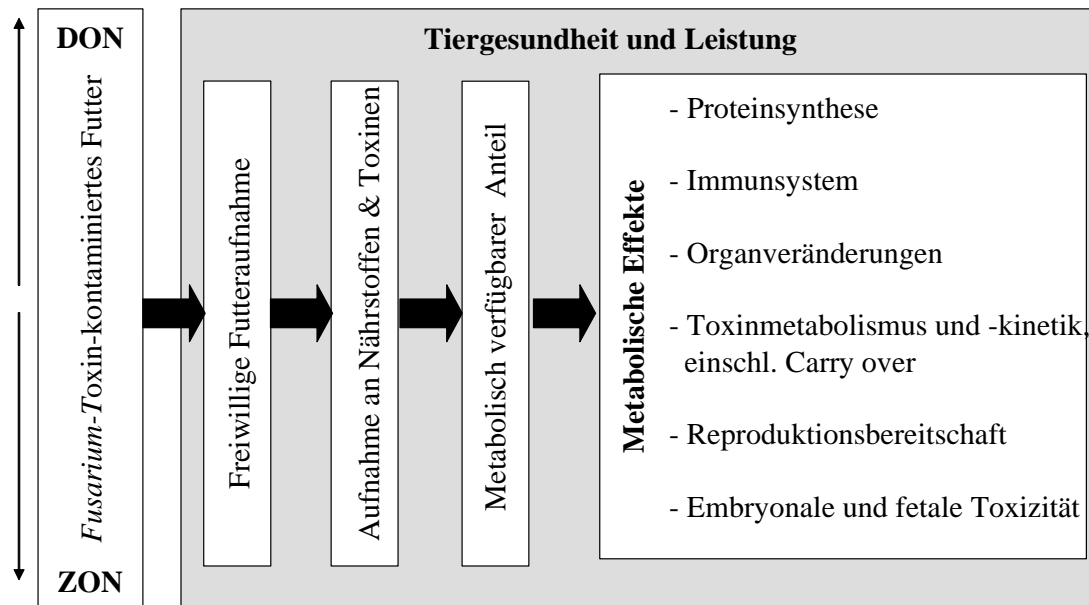


Abbildung 2: Unter den Produktionsbedingungen in Deutschland sind Fusarium-Toxin kontaminierte Futtermittel häufig gleichzeitig mit Deoxynivalenol (DON) und Zearalenon (ZON) kontaminiert. Ausgehend von den Wirkmechanismen wird der metabolische Effekt von DON häufig mit der Hemmung der Proteinsynthese assoziiert, während ZON für eine Beeinträchtigung der Reproduktionsbereitschaft verantwortlich gemacht wird. Zu beachten ist hierbei, dass mögliche Wechselwirkungen zwischen beiden Toxinen auftreten können. Die Höhe der freiwilligen Futtermittelaufnahme bestimmt die Höhe der Toxinmenge, die im Organismus potentiell wirksam werden kann und stellt damit das Bindeglied zwischen Toxinkonzentration im Futter und den Toxinwirkungen im Organismus dar.

Es gibt Hinweise, dass sowohl DON als auch ZON in natürlich kontaminierten Futtermitteln in variablen Anteilen an pflanzliche Bestandteile gebunden vorliegen, woraus sich theoretisch eine verminderte Bioverfügbarkeit ergeben kann. Glycosylierte und glucuronidierte DON- und ZON-Konjugate, die sich der Routineanalytik entziehen und die Bioverfügbarkeit beeinflussen können, wurden in verschiedenen Untersuchungen nachgewiesen (Miller and Arnison, 1986; Gareis et al., 1990; Savard 1991; Sewald et al., 1992; Schneewis et al., 2002). Das Ausmaß einer solchen Beeinträchtigung der Bioverfügbarkeit ist jedoch im Tierversuch zu quantifizieren. Folgt man dem in Abbildung 2 dargestellten Toxinfluss retrograd, so wird klar, dass die Interpretation beobachteter metabolischer Toxineffekte erleichtert werden kann, wenn die systemisch verfügbare Toxinkonzentration bekannt ist, die aus einer bestimmten Toxinkonzentration im Futter resultiert. Dies setzt einerseits Kenntnisse über den Anteil an Toxin voraus, der aus der Futtermatrix freigesetzt, absorbiert und letztlich systemisch verfügbar ist, aber andererseits stellt die freiwillige Futtermittelaufnahme das wichtigste Bindeglied zwischen der Toxinkonzentration im Futter und der Toxinmenge dar, die letztlich metabolisch wirksam werden kann.

Von DON ist bekannt, dass es hauptsächlich eine Beeinträchtigung der Futtermittelaufnahme bewirkt. Dies trifft insbesondere für das Schwein zu, das als besonders sensible Nutztierart eingestuft wird. Damit wird nicht nur die aufgenommene Toxinmenge verringert, sondern auch die für den Stoffwechsel notwendige Energie- und Nährstoffaufnahme. Soll nun der Toxineffekt *per se* untersucht werden, müssen derartig interferierende Einflüsse ausgeschaltet werden, da die Effekte einer DON-assoziierten Reduktion der Energie- und Nährstoffzufuhr stärker ausgeprägt sein können als der eigentliche Toxineffekt. Um diese Zusammenhänge näher zu analysieren und Schlussfolgerungen für weitere Experimente bezüglich der Untersuchung der eigentlichen Toxinwirkung im Organismus abzuleiten, erfolgte die Fütterung einer DON-kontaminierten Futtermischung im Vergleich zu einer nicht-kontaminierten Futtermischung an Mastschweine, wobei das Futter entweder zur *ad libitum* Aufnahme angeboten oder aber restriktiv vorgelegt wurde. Bei letzterer Fütterungstechnik wurde die Futtermenge vorgelegt, die auch tatsächlich von beiden Versuchsgruppen vollständig aufgenommen wurde. Mit diesem 2-faktoriellen Versuchsansatz konnte gezeigt werden, dass die verminderte Lebendmassezunahme und der erhöhte Futteraufwand nach Verfütterung einer DON-kontaminierten Futtermischung ausschließlich auf die Reduktion im Futterverzehr zurückzuführen ist (Abb. 3). In begleitenden Bilanzversuchen konnte zudem gezeigt werden, dass die Nährstoffverdaulichkeit der DON-kontaminierten Futtermischung sogar noch signifikant verbessert war, was zumindest für die restriktiv gefütterten Schweine des Fütterungsversuches in einer höheren Lebendmassezunahme hätte resultieren müssen. Die Beobachtung des

Futteraufnahmeverhalten ergab, dass die restriktiv mit DON gefütterten Tiere durchschnittlich eine längere Zeit benötigten, um die vorgelegte Futtermenge aufzunehmen (Abb. 3), was mit einer erhöhten körperlichen Aktivität einherging. Damit könnte die verbesserte Nährstoffverdaulichkeit durch einen erhöhten Erhaltungsbedarf kompensiert worden sein. Insgesamt zeigt der Versuch, dass es wichtig ist, die durch DON hervorgerufene Beeinflussung der Futteraufnahme zu berücksichtigen, wenn metabolische Effekte von DON untersucht werden sollen.

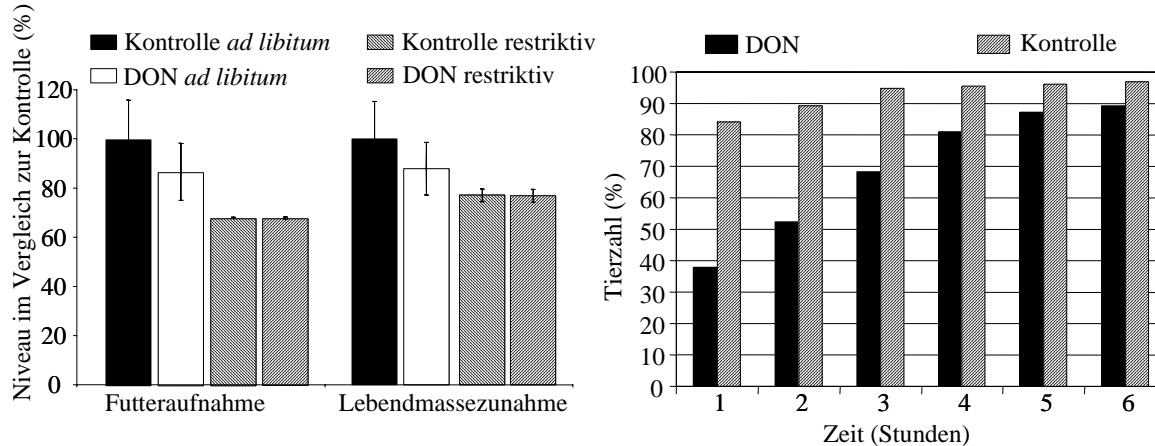


Abbildung 3: Einfluss der Fütterungstechnik auf die Leistung von Mastschweinen bei Verfütterung von Deoxynivalenol (DON)-kontaminiertem Futter (**links**) sowie Einfluss von DON auf die Dauer der Futteraufnahme von restriktiv gefütterten Mastschweinen (**rechts**) (n=12) (Goyarts et al., 2005)

Wie bereits erwähnt, kommt - neben der Futteraufnahme als bestimmende Größe für die Höhe der Toxinaufnahme - dem DON-Anteil, der aus der Futtermatrix freigesetzt, absorbiert und in der systemischen Blutzirkulation erscheint, für die Beurteilung der an potenziellen Wirkorten vorhandenen Toxinkonzentration eine große Bedeutung zu. Unter Verwendung pharmakokinetischer Methoden und Modelle wurde die Bioverfügbarkeit von DON aus natürlich kontaminiertem Weizen bestimmt. Dazu war es erforderlich, DON einerseits intravenös und andererseits oral zu verabreichen. Da intravenös applizierte Pharmaka oder Toxine *per definitionem* zu 100 % systemisch verfügbar sind, lässt sich aus dem Verhältnis der korrespondierenden Flächen unter den Kurven der Konzentrations-Zeit-Verläufe nach oraler und intravenöser Applikation die Bioverfügbarkeit abschätzen (Abb. 4). Es zeigte sich, dass DON aus natürlich kontaminiertem Weizen zu annähernd 100 % bioverfügbar war (Goyarts und Dänicke, 2006). Aus diesen Versuchen lässt sich weiterhin schlussfolgern, dass auch etwaig an pflanzliche Strukturen gebundenes DON unter den Bedingungen des Verdauungstraktes des Schweins freigesetzt und vollständig absorbiert wurde.

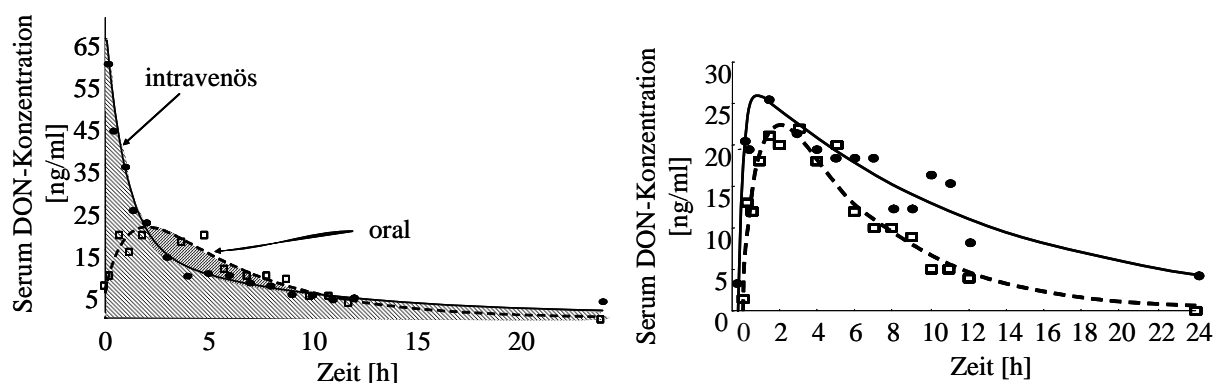


Abbildung 4: Deoxynivalenol (DON)-Konzentration im Serum von Schweinen (~40 kg b.w.) nach intravenöser und oraler DON-Gabe (**links**) sowie Variation der Serumkonzentration von DON nach oraler Exposition von 2 Schweinen bei annähernd gleicher Dosis und gleicher Lebendmasse (**rechts**) (Goyarts and Dänicke, 2006)

Vergleichbare Untersuchungen zur Bioverfügbarkeit von ZON liegen für das Schwein gegenwärtig nicht vor, doch deuten methodische Vorarbeiten an, dass auch ZON aus natürlich kontaminierten Futtermitteln in erheblichem Ausmaß absorbiert wird (Döll et al., 2003; Dänicke et al., 2005b).

Es lässt sich feststellen, dass die methodischen Vorarbeiten zur Kinetik und zum Metabolismus eine Voraussetzung darstellen, um metabolische Toxineffekte bestimmten Toxin- oder Metabolitenkonzentrationen in physiologischen Matrices gegenüberzustellen zu können.

Somit stellt sich die Frage:

### **Sind DON- und ZON-Konzentrationen in physiologischen Proben des Schweins geeignet, um eine Intoxikation anzuzeigen?**

Aus praktischer und forensischer Sicht stellt sich häufig die Frage, inwieweit dem Nachweis von Mykotoxinen in physiologischen Proben vom Schwein eine Bedeutung für das Auftreten mehr oder weniger ausgeprägter toxischer Effekte zukommt bzw. ob es nutzbare Korrelationen zwischen den Toxinkonzentrationen und den toxischen Effekten gibt. Aus methodischer Sicht sind hierbei Dosis-Wirkungsstudien notwendig, welche die Toxinkonzentrationen im Futter den Toxinkonzentrationen in den physiologischen Proben gegenüberstellen. Dabei ist zu berücksichtigen, dass sich DON und ZON hinsichtlich ihres kinetischen Verhaltens im Organismus deutlich voneinander unterscheiden. So ist ZON durch eine ausgeprägte enterohepatische Rezirkulation mit konsekutiver Anreicherung des Toxins und seiner Metaboliten in der Galle gekennzeichnet (z.B. Biehl et al., 1993; Döll et al., 2003; Dänicke et al., 2005c), während für DON dieser Weg offensichtlich eine geringere Rolle spielt und es stattdessen prominent systemisch zirkuliert, bevor es renal eliminiert wird (z.B. Goyarts and Dänicke, 2006; Dänicke et al., 2005b).

Daher haben wir in den entsprechenden Dosis-Wirkungsstudien den Toxinrückständen im Blut, im Falle von DON, bzw. in der Galle, im Falle von ZON, besondere Aufmerksamkeit geschenkt und konnten in beiden Fällen lineare Beziehungen zwischen der Toxinaufnahme und den Toxinkonzentrationen in den jeweiligen Matrices feststellen (Abb. 5-7).

Aus praktischer Sicht ist jedoch bedeutsam, inwieweit sich Beziehungen zwischen der Toxinkonzentration im Futter und der Toxinkonzentration in Blut bzw. Galle herstellen lassen. Auch hier ließ sich eine signifikante Linearität zeigen (Abb. 5-7). Die Anwendbarkeit dieser Beziehungen für praktische Belange wird jedoch stark eingeschränkt durch die hohe Variabilität der entsprechenden Konzentrationen sowohl von DON im Serum als auch von ZON und seinen Metaboliten in der Galle, die zu den jeweiligen Toxinkonzentrationen im Futter gehören, die von praktischem Interesse sind. Die europäischen Richtwerte für die kritischen Toxinkonzentrationen in der Gesamtration von Schweinen betragen 0,9 mg DON/kg für alle Kategorien, und 0,1 bzw. 0,25 mg ZON/kg für Ferkel und Jungsauen bzw. für Sauen und Mastschweine. In diesem Konzentrationsbereich ist eine sichere Differenzierung zwischen "Toxin-frei" gefütterten Tieren und solchen die eine Ration erhalten haben, deren Toxinkonzentration sich um die genannten Richtwerte bewegt, nicht möglich. Dies resultiert auch aus der Tatsache, dass praktische Futtermischungen nie ganz frei sind von DON und ZON. Mehrjährige Untersuchungen im Rahmen des bundesweiten Futtermittelüberwachungsprogramms haben gezeigt, dass sich auch bei guter fachlicher Praxis ein gewisses "Grundrauschen" in Futtermischungen nicht vermeiden lässt (Meng et al., 2006). So bewegten sich die medianen Konzentrationen von Mischfuttermitteln für Schweine in den Jahren 2001-2003 von DON zwischen 70 und 200 µg/kg und für ZON zwischen 6 und 26 µg/kg. Daher lassen sich auch bei quasi "Toxin-frei" gefütterten Kontrolltieren regelmäßig positive DON- und ZON-Befunde in Serum und Galle erbringen (Abb. 5-7). Außerdem sind bei der Beurteilung der DON-Befunde im Blut die Kinetik sowie die tierindividuelle Variation zu berücksichtigen. Aus dem kinetischen Profil lässt sich ableiten, dass die DON-Konzentration im Blut nach der Fütterung bis zu einem Maximum rasch ansteigt und dann allmählich abfällt. Das bedeutet, dass der Zeitpunkt der Blutentnahme nach der Fütterung zur Variation der Befunde beiträgt. Dieses Problem ist insbesondere bei *ad libitum* gefütterten Tieren von Bedeutung, bei denen eine Standardisierung des Blutentnahmezeitpunktes praktisch nicht möglich ist. Hinzu kommt die erwähnte tierindividuelle Variation, die bei vergleichbarer Lebendmasse und Toxindosis zu gleichen Zeitpunkten der Blutentnahme zu deutlichen Unterschieden in der DON-Konzentration im Blut führen kann. Aus dem Vergleich der Beziehungen zwischen der DON-Aufnahme und der DON-Konzentration im Blut kontrolliert gefütterter Ferkel mit *ad libitum* gefütterten Mastschweinen wird deutlich, dass eine Einschränkung der tierindividuellen Variation möglich ist, wenn der Zugang zum Futter über einen definierten Zeitraum unterbunden wird. Diese Verringerung der Variation schlägt sich aber nicht in einer verringerten Variabilität der Beziehungen zwischen der DON-Konzentration im Futter und der DON-Konzentration im Blut nieder (Abb. 5 und 6).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Beurteilung einer Intoxikation von Schweinen mit DON und ZON anhand der Toxinkonzentration im Blut bzw. in der Galle für praxisrelevante Toxinkonzentrationen im Futter eher als kritisch einzuschätzen ist. Ein Rückschluss von der gemessenen Toxinkonzentration in den physiologischen Matrices auf die Überschreitung von kritischen Konzentrationen der Toxine im Futter ist daher nur bedingt möglich. Die Analytik des Futters auf beide Toxine liefert daher häufig eine bessere Grundlage zur Beurteilung der Toxinbelastung der Schweine, wenn eine sichere Zuordnung des Futters gewährleistet ist. Der Futteranalytik kommt somit auch eine große prophylaktische Bedeutung bei der Überwachung des Futtermittelhygienestatus zur Vermeidung von Intoxikationserscheinungen durch DON und ZON zu.

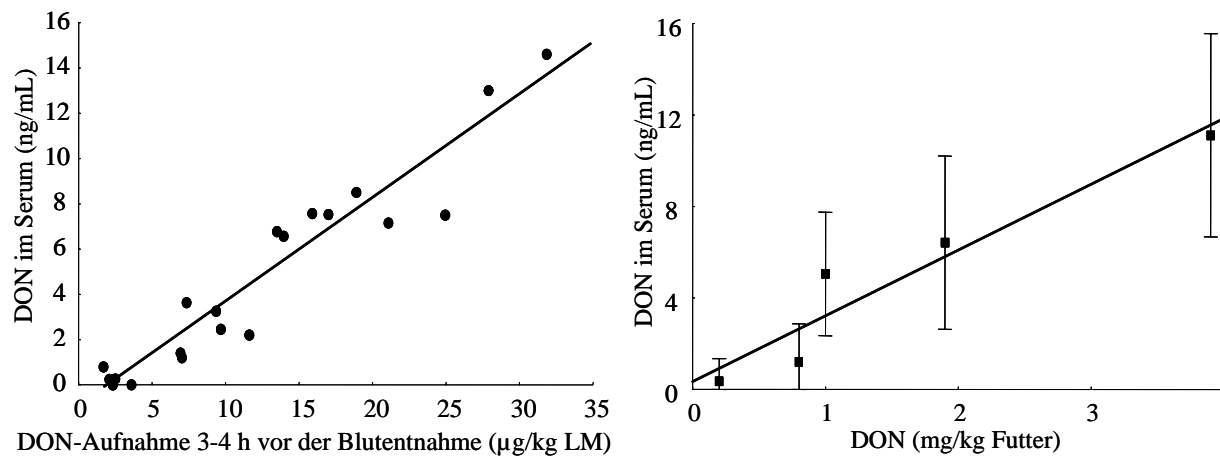


Abbildung 5: Deoxynivalenol (DON)-Konzentration im Serum von kontrolliert gefütterten Ferkeln: In Abhängigkeit von der DON-Aufnahme je kg Lebendmasse (LM) (**links**) sowie von der DON-Konzentration des Futters (**rechts**) (Döll et al., 2003)

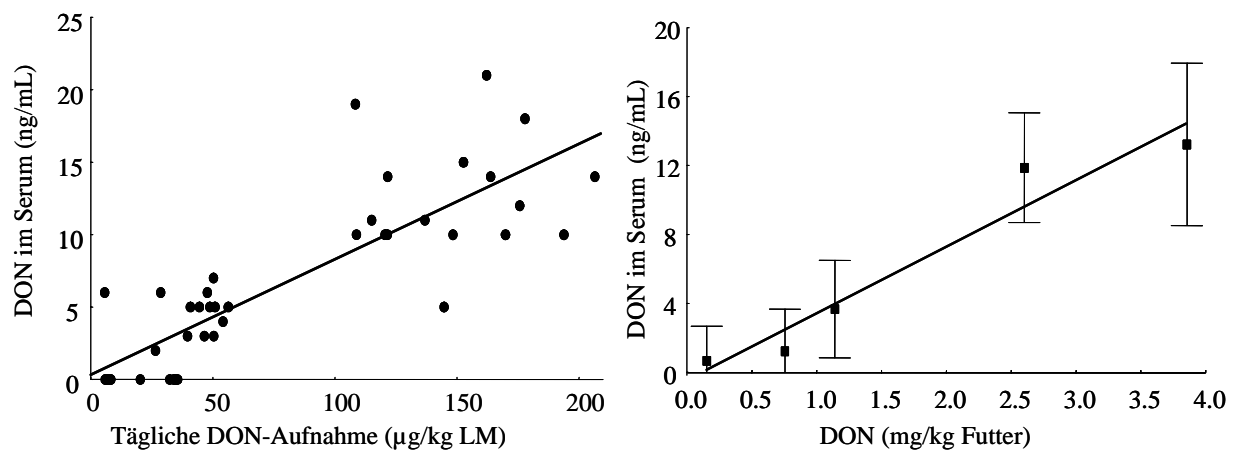


Abbildung 6: Deoxynivalenol (DON)-Konzentration im Serum von ad libitum gefütterten Mastschweinen: In Abhängigkeit von der DON-Aufnahme je kg Lebendmasse (LM) (**links**) sowie von der DON-Konzentration des Futters (**rechts**) (Dänicke et al., 2004)

Da einerseits zwischen der DON-Konzentration im Futter und dem Leistungsrückgang bei Schweinen lineare negative Beziehungen bestehen (Dänicke et al., 2001) und andererseits lineare positive Beziehungen zwischen der Futter-DON-Konzentration und der DON-Konzentration im Blut, ist von diagnostischem Interesse, ob auch zwischen der DON-Konzentration im Blut und dem Leistungsrückgang (oder anderen Parametern) diagnostisch verwertbare Beziehungen bestehen. Aus den in Abbildung 8 dargestellten Zusammenhängen wird deutlich, dass sich eindeutige Beziehungen zwischen dem Leistungsrückgang einzelner Individuen und den korrespondierenden Konzentrationen an DON im Blut nicht herstellen lassen. Selbst bei der überwiegenden Zahl der Ferkel der am höchsten exponierten Gruppe (3,9 mg DON/kg) ist eine eindeutige Zuordnung anhand der DON-Konzentrationen im Blut nicht möglich. Berücksichtigt man weiterhin den Östrogen-ähnlichen Effekt von ZON auf das Uterusgewicht von Ferkeln, dann lassen sich auch für die Beziehungen zwischen der Konzentration von ZON und seinen Metaboliten in der Galle und dem Uterusgewicht ähnliche Schlussfolgerungen ableiten. Auch hier ist eine tierindividuelle Zuordnung im Prinzip nicht möglich.

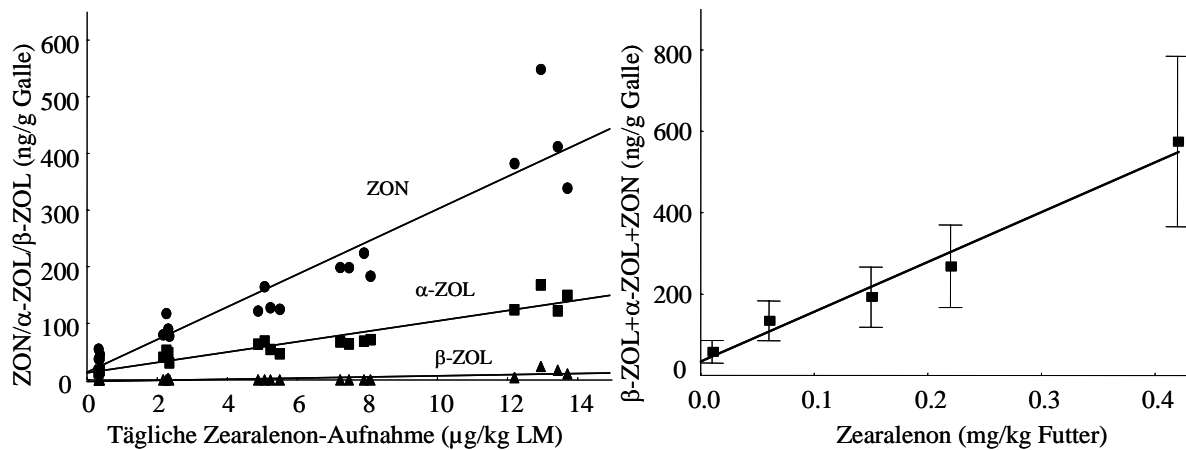


Abbildung 7: Konzentration von Zearalenon (ZON) sowie den Metaboliten  $\alpha$ -Zearalenol (ZOL) sowie  $\beta$ -ZOL in der Galle von Absatzzerkeln: In Abhängigkeit von der ZON-Aufnahme je kg Lebendmasse (LM) (links) sowie von der ZON-Konzentration des Futters (rechts) (Döll et al., 2003)

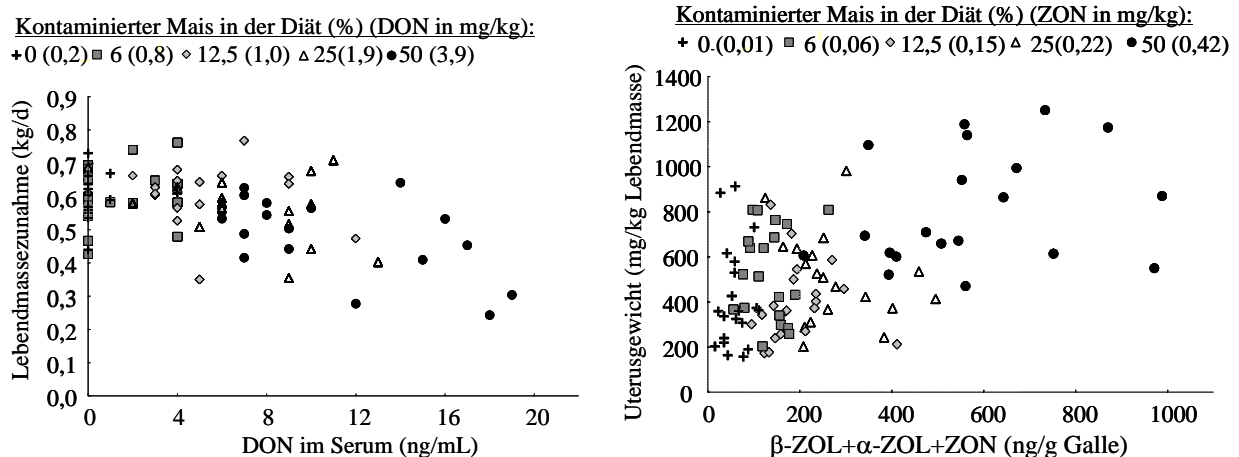


Abbildung 8: Lebensmassezunahme von Ferkeln in Abhängigkeit der Deoxynivalenol (DON)-Konzentration im Serum (links) sowie Uterusgewicht in Abhängigkeit der Konzentration von Zearalenon (ZON) sowie den Metaboliten  $\alpha$ -Zearalenol (ZOL) sowie  $\beta$ -ZOL in der Galle (rechts) (Döll et al., 2003)

Wie bereits eingangs erwähnt, sind Kenntnisse der Kinetik und des Metabolismus beider Toxine nicht nur für die Beurteilung von Zusammenhängen zwischen Toxinrückständen in physiologischen Matrices und toxischen Effekten von Bedeutung, sondern auch für das Verständnis des Carry over von Toxinrückständen in Lebensmittel tierischen Ursprungs. Am Beispiel der Milchkuh soll kurz dargestellt werden, wie durch eine Kombination verschiedener Methoden folgende, in verschiedenen Diskussionsforen aufgeworfene Frage wissenschaftlich bearbeitet wurde:

### Ist bei Hochleistungskühen ein Übergang von nicht-metabolisiertem DON in die Milch möglich?

Unveröffentlichte Berichte aus dem In- und Ausland über analytisch nachgewiesene Rückstände von DON in der Milch von Hochleistungskühen waren Anlass, diesem Problem aus wissenschaftlicher Sicht nachzugehen. Nach früheren Untersuchungen bestand Konsens darüber, dass DON durch die Mikroorganismen des Pansens weitgehend de-epoxidiert wird (z.B. King et al., 1984; Cote et al., 1986; Swanson et al., 1987), was als Detoxifizierungsreaktion angesehen wird. Andererseits ist bekannt, dass eine steigende Futtermittelzufuhr bei Milchkuhen mit einer kürzeren Verweildauer des Futters im Pansen einhergeht. Daher prüften wir die Hypothese, dass mit steigender Futtermittelzufuhr die für die Metabolisierung von DON durch die Pansenmikroorganismen zur Verfügung stehende Zeit verringert wird und somit der Anteil an DON, der in nicht-metabolisierter (nicht de-epoxidiert) Form den Pansen verlässt, ansteigen müsste. Zur Prüfung dieser Hypothese wurden am Pansen und proximalen Duodenum fistulierte Milchkuhe verwendet, bei denen unter Verwendung eines unverdaulichen Markers nach den von Rohr et al. (1979, 1984) beschriebenen Prinzipien eine

quantitative Bestimmung des Toxinflusses am proximalen Duodenum möglich war. Den Kühen wurde entweder unkontaminiertes Kontrollfutter oder mit DON kontaminiertes Futter (3,4 mg DON/kg Trockensubstanz) in steigenden Mengen (5,6 bis 20,5 kg Trockensubstanz je Kuh und Tag) gefüttert. Die Ergebnisse zeigten, dass DON im Pansen zu 94-99 % nahezu vollständig de-epoxidiert wurde, wobei ein Einfluss einer steigenden Futteraufnahme nicht nachweisbar war. Die Wiederfindung des mit dem Futter aufgenommenen DON variierte an dieser Lokalisation zwischen 0,2 und 4,7 % als DON, und zwischen 11 und 73 % als de-epoxy-DON (Seeling et al., 2006, Abb. 9). Zudem zeigten Untersuchungen an isolierter Pansenmukosa vom Schaf im Ussing-Kammer-Versuch, dass DON die intakte Mukosa praktisch nicht passiert (Dänicke et al., 2005a). Daher können die geringen, mit der Milch ausgeschiedenen DON-Mengen (Carry over-Rate zwischen 0,003 und 0,02 % der DON-Aufnahme) nur auf im Dünndarm absorbiertes DON zurückzuführen sein. Das Verhältnis zwischen de-epoxy-DON und DON in der Milch spiegelte im Wesentlichen das am Duodenum festgestellte Verhältnis wider. Korrespondierend zu diesen Befunden ließ sich im Blut der Kühe nur de-epoxy-DON nachweisen. Aus diesen Ergebnissen lässt sich schlussfolgern, dass die Höhe der Futteraufnahme keinen Einfluss auf das präsystemische Potential des Pansens zur De-epoxidierung von DON ausübt. Als weitere, noch abzuklärende Frage ist zu prüfen, inwieweit sich eine chronische Fütterung DON-kontaminierten Futters bei hohen Konzentratfuteranteilen nachteilig auf die Funktion der Pansenschleimhaut als Absorptionsbarriere für DON auswirken könnte.

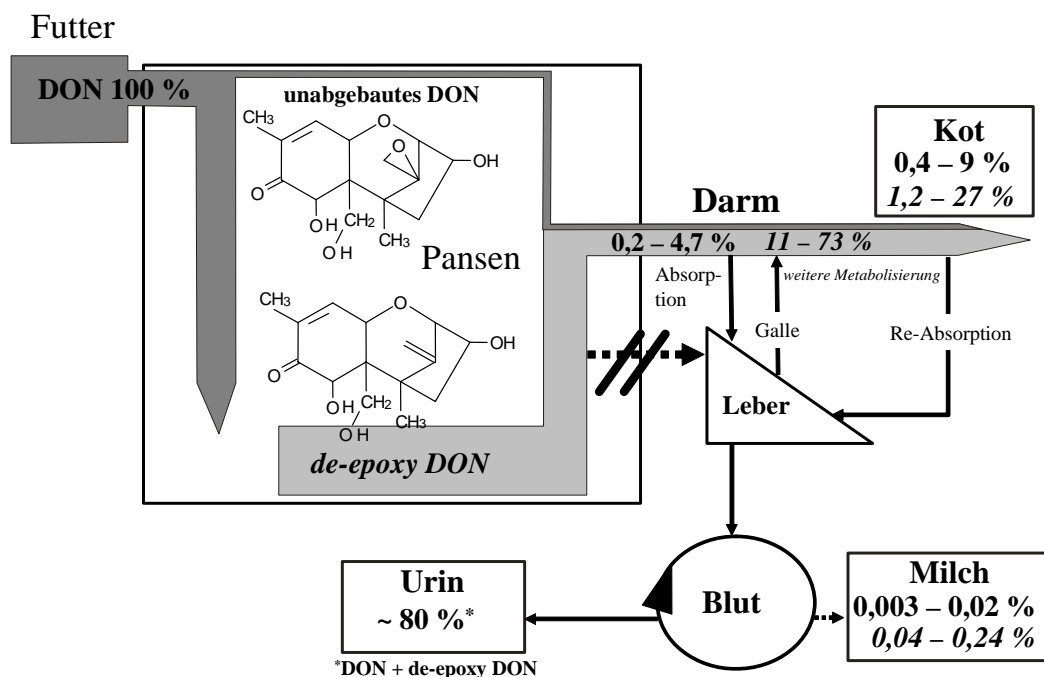


Abbildung 9: Metabolismus, Elimination und Carry over von Deoxynivalenol (DON) bei Milchkühen, die mit Pansen- und Duodenalkaniülen versehen sind. Die Prozentangaben an den verschiedenen Lokalisationen bzw. in den verschiedenen Matrices stellen die relative Wiederfindung von DON bzw. de-epoxy-DON (kursive Zahlenangaben) im Vergleich zur DON-Aufnahme dar. Der im Ussing-Kammer-Versuch festgestellte Transfer von DON durch die Pansenmukosa ist vernachlässigbar gering (angedeutet durch durchgestrichelten Pfeil) (Seeling et al., 2006; Dänicke et al., 2005a).

## Schlussfolgerungen

Methodenansätze der Tierernährungsforschung zur Futtermittelsicherheit hinsichtlich unerwünschter Stoffe (hier dargestellt am Beispiel der Mykotoxine Deoxynivalenol und Zearalenon) basieren auf einer Kombination etablierter Methoden oder müssen bei Identifikation neuer Risiken gegebenenfalls neu etabliert bzw. modifiziert werden. Dabei sind zunehmend interdisziplinäre Lösungsansätze erforderlich, was nicht zuletzt dem breiter gefassten Verständnis der Elemente, welche die Futtermittelsicherheit bestimmen, geschuldet ist (Abb. 1). Daher müssen sich die entsprechenden Methoden an der Bedeutung des unerwünschten Stoffes innerhalb der Elemente der Futtermittelsicherheit (Lebensmittelsicherheit, Gesundheit, Umwelt) orientieren sowie auf den Wirkmechanismus, die Eigenschaften des unerwünschten Stoffes im Organismus sowie seine Effekte auf den Organismus ausgerichtet sein. Letztlich sollen diese Methoden eine Grundlage für eine wissenschaftlich begründete Risikoabschätzung bilden.



## Literatur

- Biehl ML, Prelusky DB, Koritz GD, Hartin KE, Buck WB, Trenholm HL** (1993) Biliary excretion and enterohepatic cycling of zearalenone in immature pigs. *Toxicol Appl Pharm* 121: 152-159
- Cote LM, Dahlem AM, Yoshizawa T, Swanson SP, Buck WB** (1986) Excretion of deoxynivalenol and its metabolite in milk, urine, and feces of lactating dairy cows. *J Dairy Sci* 69: 2416-2423
- Dänicke S, Breves G, Ueberschär KH, Valenta H** (2005a) *In vitro* study on the transfer of the *Fusarium* toxins deoxynivalenol (DON), zearalenone (ZON), alpha-zearalenol (a-ZOL) and beta-zearalenol (b-ZOL) across ruminal epithelium of sheep. *Proc Soc Nutr Physiol* 14: 97
- Dänicke S, Brüssow K-P, Valenta H, Ueberschär K-H, Tiemann U, Schollenberger M** (2005b) On the effects of graded levels of *Fusarium* toxin contaminated wheat in diets for gilts on feed intake, growth performance and metabolism of deoxynivalenol and zearalenone. *Mol Nutr Food Res* 49: 932-943
- Dänicke S, Gareis M, Bauer J** (2001) Orientation values for critical concentrations of deoxynivalenol and zearalenone in diets for pigs, ruminants and gallinaceous poultry. *Proc Soc Nutr Physiol* 10: 171-174
- Dänicke S, Swiech E, Buraczewska L, Ueberschär K-H** (2005c) Kinetics and metabolism of zearalenone in young female pigs. *J Anim Physiol An N* 89: 268-276
- Dänicke S, Valenta H, Goyarts T, Razzazi E, Böhm J** (2004) On the effects of increasing deoxynivalenol (DON) concentrations in pig feed on growth performance and utilization of nutrients and on DON metabolism. *J Anim Feed Sci* 13: 539-556
- Döll S, Dänicke S, Ueberschär K-H, Valenta H, Schnurrbusch U, Ganter M, Klobasa F, Flachowsky G** (2003) Effects of graded levels of *Fusarium* toxin contaminated maize in diets for female weaned piglets. *Arch Anim Nutr* 57: 311-334
- Gareis M, Bauer J, Thiem J, Plank G, Grabley S, Gedek B** (1990) Cleavage of zearalenone-glycoside, a "masked" mycotoxin, during digestion in swine. *J Vet Med* 37: 236-240
- Goyarts T, Dänicke S** (2006) Bioavailability of the *Fusarium* toxin deoxynivalenol (DON) from naturally contaminated wheat for the pig. *Toxicol Lett* 163: 171-182
- Goyarts T, Dänicke S, Rothkötter H-J, Spilke J, Tiemann U, Schollenberger M** (2005) On the effects of a chronic deoxynivalenol intoxication on performance, haematological and serum parameters of pigs when diets are offered either for *ad libitum* consumption or fed restrictively. *J Vet Med A* 52: 305-314
- King RR, McQueen RE, Levesque D, Greenhalgh R** (1984) Transformation of deoxynivalenol (vomitoxin) by rumen microorganisms. *J Agric Food Chem* 32: 1181-1183
- Lusky K, Gobel R, Tesch D, Doberschütz KD, Lusky K, Haider W** (2001) The effects of mycotoxins OTA, ZEA and DON on the health and residue values of pigs. *Tierärztl Umschau* 56: 15-20
- Meng W, Lahrssen-Wiederholt M, Dänicke S** (2006) Undesirable substances in animal nutrition - minimising is possible. *Kraftfutter/Feed Magazine* 1-2/06: 26-33
- Miller JD, Arnison PG** (1986) Degradation of deoxynivalenol by suspension-cultures of the *Fusarium* head blight resistant wheat cultivar Frontana. *Can J Plant Pathol* 8: 147-150
- Mortensen GK, Strobel BW, Hansen HC** (2006) Degradation of zearalenone and ochratoxin A in three Danish agricultural soils. *Chemosphere* 62: 1673-1680
- Müller G, Kielstein P, Rosner H, Berndt A, Heller M, Köhler H** (1999) Studies on the influence of combined administration of ochratoxin A, fumonisin B1, deoxynivalenol and T2 toxin on immune and defence reactions in weaner pigs. *Mycoses* 42: 485-493
- Rohr K, Brandt M, Castrillo O, Lebzien P, Assmus G** (1979) Der Einfluss eines teilweisen Ersatzes von Futterprotein durch Harnstoff auf den Stickstoff- und Aminosäurenfluss am Duodenum. *Landbauforsch Völk* 29: 32-40
- Rohr K, Brandt M, Lebzien P, Schafft H** (1984) Measurement of duodenal flow in dairy-cows by either total collection or spot sampling, using a special cannula. *Can J Anim Sci* 64: 116-117
- Savard ME** (1991) Deoxynivalenol fatty-Acid and glucoside conjugates. *J Agric Food Chem* 39: 570-574
- Schneewis I, Meyer K, Engelhardt G, Bauer J** (2002) Occurrence of zearalenone-4-beta-D-glucopyranoside in wheat. *J Agric Food Chem* 50: 1736-1738
- Seeling K, Dänicke S, Valenta H, van Egmond HP, Schothorst RC, Jekel AA, Lebzien P, Schollenberger M, Razzazi-Fazeli E, Flachowsky G** (2006) Effects of *Fusarium* toxin-contaminated wheat and feed intake level on the biotransformation and carry-over of deoxynivalenol in dairy cows. *Food Addit Contam* 23: 1008-1020
- Sewald N, Vongleissenthall JL, Schuster M, Muller G, Aplin RT** (1992) Structure elucidation of a plant metabolite of 4-deoxynivalenol. *Tetrahedron-Asymmetry* 3: 953-960
- Swanson SP, Nicoletti J, Rood HD, Buck WB, Cote LM, Yoshizawa T** (1987) Metabolism of three trichothecene mycotoxins, T-2 toxin, diacetoxyscirpenol and deoxynivalenol, by bovine rumen microorganisms. *J Chromatogr* 414: 335-342
- Völkl A, Vogler B, Schollenberger M, Karlovsky P** (2004) Microbial detoxification of mycotoxin deoxynivalenol. *Journal of Basic Microbiology* 44: 147-156