

Untersuchung diverser Getreidearten auf das Vorkommen von Enniatin A1, A, B1, B sowie Beauvericin

Projektverantwortlicher: Dr. Alexander Maximilian Voigt

Technische Durchführung: Tobias Petzold, Sebastian Freff, Daniela Wallendszus und Sabine Kobus

Chemisches und Veterinäruntersuchungsamt Rheinland AöR, Winterstraße 19, 50354 Hürth

Zusammenfassung

Im Rahmen dieses Projektes wurde die Methode zur Bestimmung der Mykotoxine Enniatin A, A1, B, B1 und Beauvericin optimiert und erweitert. Ausgehend von der bestehenden Multi-Mykotoxinmethode wurde ein gemeinsamer Arbeitsprozess etabliert, der die Messung von insgesamt 21 verschiedenen Mykotoxinen mit drei Messungen eines Probenextraktes erlaubt. Dabei wurde das Untersuchungsspektrum zusätzlich zu den Enniatinen und Beauvericin auch um Nivalenol, 15-Acetyl- und 3-Acetyl-Deoxynivalenol, Deoxynivalenol-3-Glykosid und Fumonisin B3 erweitert. Die Eignung der Aufarbeitung und des Untersuchungsverfahrens zur Bestimmung von Enniatinen und Beauvericin konnte anhand der erfolgreichen Teilnahme an verschiedenen Laborvergleichsuntersuchungen sowie weiteren Richtigkeitskontrollen belegt werden.

Die Messung von insgesamt 104 Getreideproben zeigte, dass insbesondere Roggen in erhöhter Häufigkeit und mit zum Teil erhöhten Gehalten belastet war. Weizen und Gerste scheinen diesbezüglich weniger häufig belastet zu sein. Des Weiteren zeigte sich, dass Enniatin B und Enniatin B1 am häufigsten nachgewiesen wurden und in einem Verhältnis von in etwa 2,5:1 vorliegen.

Ein Zusammenhang zwischen einem positiven Nachweis von Ergotalkaloiden und Enniatinen beziehungsweise Beauvericin konnte nicht festgestellt werden. Jedoch konnte gezeigt werden, dass die Wahrscheinlichkeit erhöht ist, bei positivem Deoxynivalenol-Befund ebenfalls Enniatine (Nachweishäufigkeit: Enniatin B > B1 > A1 >> A und Beauvericin) nachzuweisen – dies ist jedoch durch weitere Untersuchungen in größeren Probensätzen zu bestätigen.

1. Einleitung

Eine bedeutende Gruppe der Mykotoxine stellen die von Schimmelpilzen der Gattung *Fusarium* gebildeten Fusarientoxine (u.a. Deoxynivalenol, Zearalenon sowie Fumonisine) dar. Betroffen sind unter anderem Getreide, wie Weizen, Roggen, Mais, Gerste, Hafer und verarbeitete Lebensmittel, die aus diesen hergestellt wurden.^[1] Gesetzlich festgelegt sind gemäß der Verordnung (EG) Nr. 1881/2006 Höchstmengen für die Fusarientoxine Deoxynivalenol, Zearalenon, Fumonisin B1 und B2, T-2- und HT-2-Toxin in diversen Lebensmitteln.^[2] Zurzeit nicht durch Höchstmengen reglementierte Mykotoxine, die aus Verbraucherschutzsicht dennoch von hohem Interesse sind, werden unter dem Begriff „*Emerging mycotoxins*“ zusammengefasst.^[3]

Untersuchung diverser Getreidearten auf das Vorkommen von Enniatin A1, A, B1, B sowie Beauvericin

Zu diesen zählen unter anderem, die von *Fusarium spp.*, *Alteranaria*, *Halosarpheia* sowie *Verticillium* gebildeten Enniatine und Beauvericin.^[3] Diese Substanzen leiten sich alle von ihrer cyclischen Hexadepsipeptid-Struktur ab – demnach weisen diese als Charakteristikum, neben Peptidbindungen, Esterbindungen auf (siehe Abbildung 1).

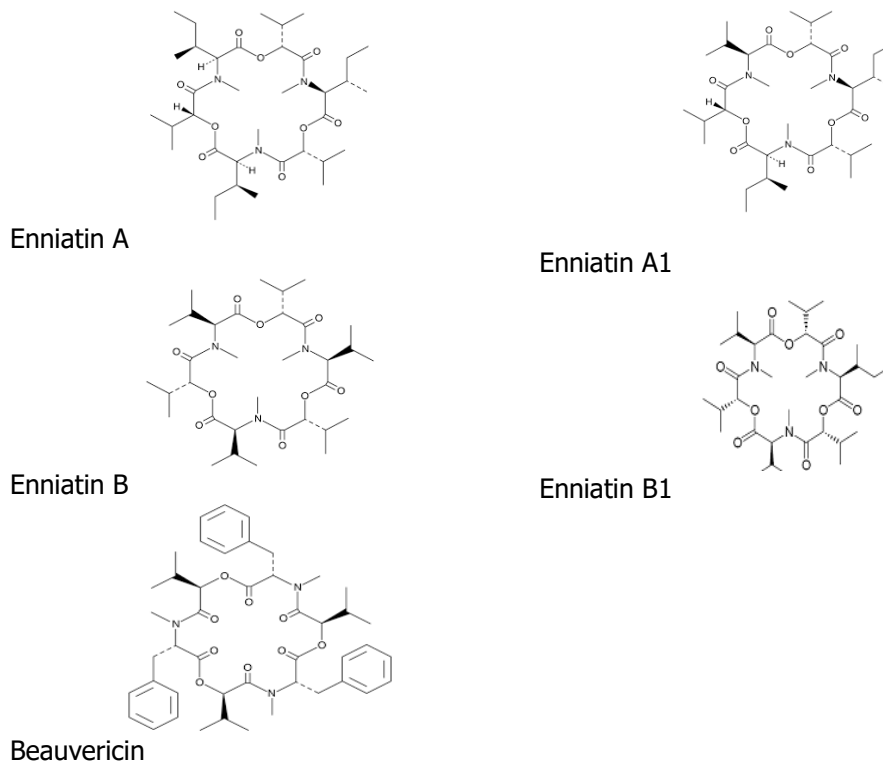


Abbildung 1 Chemische Strukturen der Zielanalyten Beauvericin sowie Enniatin A, A1, B und B1

Daten aus Skandinavien zeigten für die Jahre 2001-2005 diesbezüglich positive Befunde bis in den zweistelligen mg/kg Bereich. Sowohl in Norwegen (überwiegend Gerste, Weizen und Hafer) als auch in Finnland (insbesondere Gerste und Frühjahrsweizen) konnten vor allem Enniatin B und B1 nachgewiesen werden. Insgesamt schwankten jedoch die Mediane und Maxima der nachgewiesenen Konzentrationen zwischen den Analyten (Enniatin A, A1, B1, B und Beauvericin), den untersuchten Getreidearten, den Anbauländern und Erntejahren deutlich.^[4] In diesem Kontext hat die *European Food Safety Authority* eine gesundheitliche Relevanz bezüglich des Gehaltes an Enniatin A, A1, B, B1 sowie Beauvericin in bestimmten Lebensmitteln aufgezeigt und auf eine unzureichende Datenlage und das Fehlen entsprechender Referenzanalysenverfahren hingewiesen.^[5]

Im Rahmen der Sitzung des Sachverständigenausschusses „Agrarkontaminanten“ am 07.06.2019 in Brüssel berichtete Schweden über das Vorkommen von Enniatinen in Bio-Lebensmitteln, wobei aufgezeigt wurde, dass insbesondere Getreideprodukte höhere Enniatin-Gehalte aufweisen können, als die *European Food Safety Authority* im Jahr 2014 angenommen hatte. Zur Klärung, ob es sich hierbei um ein skandinavisches Problem handelt, beziehungsweise um der EFSA-Anfrage nach weiteren Datenerhebungen zur Expositionsabschätzung Folge zu leisten, erfolgte am 19.06.2019 seitens des Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft ein Erlass (AZ: 313-21612/0021), Gehaltsdaten zu Enniatinen und Beauvericin in Getreide und Getreideprodukten (Brot und Kleingebäck, Feine Backwaren, Teigwaren) abzufragen und gegebenenfalls durch das BVL auszuwerten. Zu diesem Zeitpunkt lagen in NRW keine entsprechenden Untersuchungsdaten vor.

Untersuchung diverser Getreidearten auf das Vorkommen von Enniatin A1, A, B1, B sowie Beauvericin

Als eines von wenigen amtlichen Laboratorien in Deutschland ist das Chemische und Veterinäruntersuchungsamt Rheinland in der Lage, mittels einer 2021/2022 entwickelten LC-MS/MS-Methode (nach QuEChERS-Aufarbeitung), diese „Emerging mycotoxins“ in bestimmten Getreiden und Getreideerzeugnissen nachzuweisen und zu quantifizieren. Es zeigte sich jedoch im Rahmen der Methodenentwicklung und erster Messungen von Realproben, dass noch weiterer Optimierungsbedarf in der Analytik besteht.

Daher sollte das Untersuchungsverfahren im ersten Schritt für weitere Matrices angepasst und getestet werden (z.B. Getreideerzeugnisse, insbesondere aus Roggen). Darüber hinaus sollte die Methodik durch neues zertifiziertes Referenzmaterial weitergehend abgesichert werden, da kaum kommerzielle Ringversuche zur Untersuchung von Enniatinen und Beauvericin zur Verfügung stehen. Die Teilnahme an zwei internationalen Ringversuchen in 2021 führte zwar zu guten Übereinstimmungen mit dem Konsensus, allerdings war die Anzahl der Teilnehmer sowie die Schwankung innerhalb der Teilnehmerergebnisse zum Teil unbefriedigend.

Um eine breitere Datenbasis bezüglich der Gehalte an Enniatinen und Beauvericin zu schaffen sollten vermehrt Biogetreide, aber auch konventionelle Getreide, auf eben diese Mykotoxine untersucht werden. Diese Daten können dabei helfen, etwaige Expositionen der Bevölkerung durch den Verzehr von Getreide und Getreideerzeugnissen abzuschätzen. Hierdurch sollte dem Aufruf der EFSA nach weiteren Datenerhebungen folgegeleistet werden, da der Forschungsbedarf bezüglich der Bedeutung von Enniatinen und Beauvericin für die Gesundheit von Mensch und Tier weiterhin sehr groß ist.^[3;5]

Ferner sollten die zu untersuchenden Proben auf weitere, am CVUA Rheinland untersuchte, Mykotoxine (z.B. Ergotalkaloide, Aflatoxine, Fusarientoxine, Alternariatoxine) hin analysiert werden. Abschließend sollte geprüft werden, ob zwischen diesen Mykotoxin-Gruppen mögliche Zusammenhänge vorliegen, um zukünftig die Analytik von Enniatinen und Beauvericin risikoorientierter durchführen zu können. Erste Untersuchungen des CVUA Rheinland deuteten an, dass Roggen vermehrt neben erhöhten Gehalten an Ergotalkaloiden auch erhöhte Konzentrationen an Enniatin B und B1 aufweisen kann, was anhand der Daten von Uhlig et al. (2007) nicht zu erwarten war. In dieser Studie konnten zwischen 2001 und 2005 in Roggen (Finnland) selten Enniatine und Beauvericin nachgewiesen werden, wobei die Gehalte zudem deutlich niedriger als in anderen Getreidearten (Weizen, Gerste) waren.^[4]

2. Methodik

Neben den neu am CVUA Rheinland etablierten Mykotoxinen Beauvericin und Enniatin A, A1, B und B1 konnten zudem Nivalenol sowie Deoxynivalenol-3-Glykosid, 3-Acetyl-Deoxynivalenol und 15-Acetyl-Deoxynivalenol (allesamt Metaboliten des Deoxynivalenols) in das Untersuchungsprogramm „Mykotoxine“ ergänzt werden. Des Weiteren konnten Fumonisin B1 und Fumonisin B2 mit in die Multimethode implementiert und Fumonisin B3 zusätzlich neu ins Analytenspektrum aufgenommen werden.

Bei den 2022 abgeschlossenen Methoden Anpassungen und Neuentwicklungen wurde ein besonderes Augenmerk daraufgelegt, eine möglichst einheitliche Aufarbeitung und / oder LC-MS/MS-Messung zu ermöglichen. Als Ausgangspunkt diente die QuEChERS-basierte LC-MS/MS-Multimethode, die seit 2019 am CVUA Rheinland eingesetzt wird. Der allgemeine *Workflow*, der auch in dem vorliegenden Projekt eingesetzt wurde, ist in Abbildung 2 schematisch dargestellt.

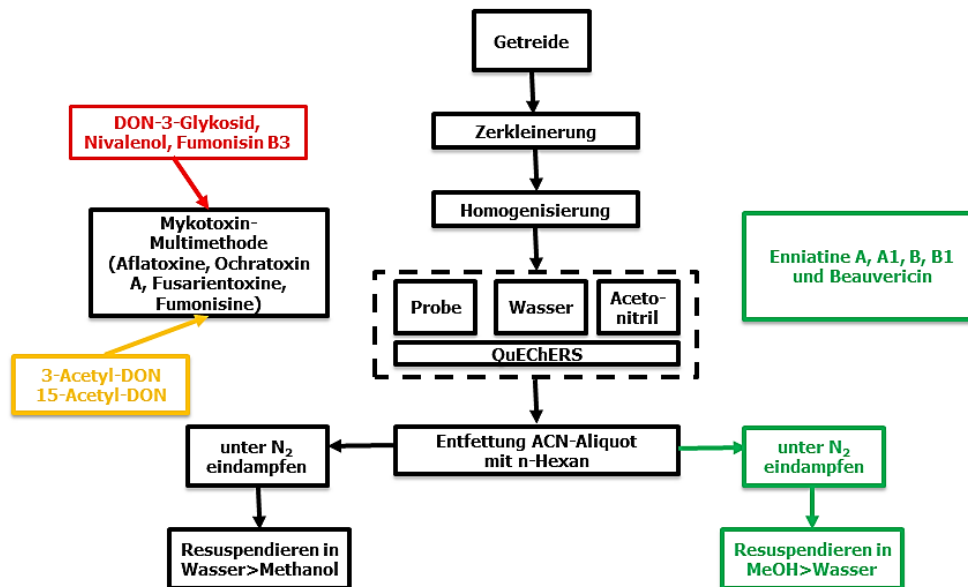


Abbildung 2: Aufarbeitungsfließschema Mykotoxinanalytik am CVUA Rheinland

Mit Deoxynivalenol-3-Glykosid, Fumonisin B1, B2 und B3 sowie Nivalenol konnten vier Mykotoxine beziehungsweise Metabolite ohne weitere Anpassungen direkt in die routinemäßig angewendete LC-MS/MS-Multimethode aufgenommen werden.

Im Falle der Stellungsisomere 3-Acetyl-Deoxynivalenol und 15-Acetyl-Deoxynivalenol konnte zwar die QuEChERS-Aufarbeitung, unter Zuhilfenahme von ¹³C-markierten Internen Standards, beibehalten werden, sodass der Messextrakt auch für diese beiden Mykotoxine zur Untersuchung verwendet werden kann, jedoch wird zur chromatographischen Trennung eine spezielle Trennsäule (B: Cortecs Shield RP 18 3x100mm 2,7µm; Waters) benötigt.

Bei der Entwicklung der Untersuchungsmethode für die Enniatine und das Beauvericin zeigten sich zwei Besonderheiten. Zum einen konnte nicht auf strukturanaloge isotope markierte Verbindungen als Interne Standards zurückgegriffen werden, um etwaige Aufarbeitungsverluste sowie Matrixeffekte zu kompensieren, zum anderen mussten bei dieser Substanzklasse chromatographische Probleme (u.a. Co-Elutionen) aufgrund sehr ähnlicher Strukturen gelöst werden. Im Verlauf der Methodenentwicklung zeigte sich, dass trotz des Fehlens von Internen Standards die standardmäßig durchgeführte QuEChERS-Aufarbeitung valide Ergebnisse erzielt, wobei die Kalibrierung zur Verbesserung der Wiederfindungsraten in einer Blankmatrix anzusetzen ist. Eine Kalibrierung in aufgearbeitetem Blankweizenmehl hat sich aufgrund der guten Wiederfindungsraten für die Quantifizierung in unterschiedlichsten Getreidearten in der Praxis bewährt (Tabelle 1).

Tabelle 1 Wiederfindungsraten (WDF, [%]) dotierter unterschiedlicher Getreideblanks (n = 7) gegen eine Weizenblank-Kalibrierung inklusive Variationskoeffizient (VK, [%]).

Getreideart	WDF [%] +/- VK [%]				
	Enniatin A	Enniatin A1	Enniatin B	Enniatin B1	Beauvericin
Dinkel	97,5 ± 3,23	98,9 ± 2,92	102,0 ± 2,08	103,1 ± 2,07	99,5 ± 2,79
Hafer	94,9 ± 4,65	93,3 ± 4,78	103,9 ± 5,17	97,0 ± 4,83	87,8 ± 4,36
Roggen	83,9 ± 6,42	83,2 ± 6,77	86,2 ± 6,25	83,9 ± 6,15	80,2 ± 6,52
Weizen	102,6 ± 3,60	103,1 ± 4,22	103,3 ± 2,77	107,1 ± 4,11	105,3 ± 3,77

Untersuchung diverser Getreidearten auf das Vorkommen von Enniatin A1, A, B1, B sowie Beauvericin

Des Weiteren muss bei der Resuspension des eingedampften QuEChERS-Extraktes ein erhöhter Methanol-Anteil im Vergleich zur Multimethode verwendet werden.

Demnach kann nach der QuEChERS-Aufarbeitung der zu untersuchenden Getreideprobe ein Aliquot (1 mL) zur Untersuchung auf Enniatine und Beauvericin (höherer Methanol-Anteil, Trennsäule A: Nucleodur Sphinx 3µm 150*3 mm, Macherey und Nagel) und ein weiterer Aliquot (1 mL, höherer Wasser-Anteil, Trennsäule B: Cortecs Shield RP 18 3x100mm 2,7µm; Waters und C: Zorbax Bonus-RP 2,1x150mm 3,5µm, Agilent) zur Untersuchung auf alle weiteren in Tabelle 2 aufgeführten Mykotoxine verwendet werden.

Die Eignung dieser Multi-Methode konnte durch die erfolgreiche Teilnahme an verschiedenen Laborvergleichsuntersuchungen (u.a. mit dem BfR) sowie die Untersuchung von zertifiziertem Weizenmehl-Referenzmaterial (nach Auftragsanfertigung durch die Firma AOKIN) belegt werden.

Auch bei den 2022 durchgeführten Laborvergleichsuntersuchungen ist auf eine geringe Teilnehmerzahl hinzuweisen, wodurch z.T. nur eine begrenzte Aussagekraft vorliegt. Weiterhin wurde zur Methodenabsicherung die Erstellung von zertifiziertem Referenzmaterial in Auftrag gegeben, wobei bei der Methodenentwicklung festgestellt wurde, dass bei verschiedenen Anbietern starke Abweichungen im Vergleich zur Sollkonzentration vorliegen können.

Mit der weiterentwickelten Multi-Mykotoxinmethode ist es nun bei Getreideproben möglich, mit einer Aufarbeitung und drei separaten HPLC-Messungen des gewonnenen Extraktes insgesamt 21 verschiedene Mykotoxine zu untersuchen (vergleiche Tabelle 2). Durch die Neubeschaffung eines Lösemittelschaltventils sowie eines Säulenschaltventils für das entsprechende HPLC-System kann zudem eine automatisierte Messung über die drei verschiedenen Säulen erfolgen, da der Wechsel von Eluentenflaschen und Trennsäulen nicht mehr manuell nötig ist.

Tabelle 2 Analytspektrum der am Chemischen und Veterinäruntersuchungsamt Rheinland in einem *Workflow* untersuchten Mykotoxine

Für die Matrices Getreide und Getreideerzeugnisse validierte Mykotoxine			
Aflatoxin B1	Aflatoxin B2	Aflatoxin G1	Aflatoxin G2
Ochratoxin A	HT-2-Toxin	T-2-Toxin	Zearalenon
Deoxynivalenol (DON)	15-A-DON	3-A-DON	DON-3-Glykosid
Nivalenol	Fumonisin B1	Fumonisin B2	Fumonisin B3
Enniatin A	Enniatin A1	Enniatin B	Enniatin B1
Beauvericin			

Zusätzlich wurden die Getreideproben in diesem Projekt auf die zwölf gemäß der Verordnung (EG) Nr. 1881/2006 rechtlich zu überwachenden Ergotalkaloide untersucht, wobei auch eine Differenzierung der Stereoisomere α -Ergokryptin und β -Ergokryptin sowie α -Ergokryptinin und β -Ergokryptinin erfolgte. Aufgrund der analytischspezifischen Besonderheiten der Ergotalkaloide, muss diese Substanzklasse weiterhin gesondert aufgearbeitet und gemessen werden.

3. Ergebnisse der Datenerhebung

Im Rahmen des Projektes (Projektzeitraum 22.06.2022 bis 31.12.2022) wurden 104 Getreideproben (52 Roggen, 32 Weizen, 20 Gerste) untersucht. Ausgehend von typischerweise zu erwartenden Verhältnissen wurden 3-Acetyl-Deoxynivalenol sowie 15-Acetyl-Deoxynivalenol erst ab einem Gehalt von Deoxynivalenol über 500 µg/kg sowie Fumonisin B3 ab einer Summe von 500 µg Fumonisin B1 und B2 pro kg Probe gemessen.

3.1. Enniatine und Beauvericin

In 37 der untersuchten 104 Proben (35,6 %) waren Enniatine und Beauvericin nicht nachweisbar (Nachweisgrenze: 7 µg/kg). Demzufolge wiesen 67 Proben (64,4 %) mindestens einen positiven Befund auf. Am häufigsten konnte Enniatin B oberhalb der Bestimmungsgrenze (20 µg/kg) nachgewiesen werden, am zweithäufigsten Enniatin B 1, wobei das Verhältnis von Enniatin B zu Enniatin B1 bei $2,66 \pm 0,86$ lag. Enniatin A sowie Beauvericin konnten hingegen in keiner der untersuchten Proben gefunden werden. Enniatin A1 war nur in sieben Proben oberhalb der Bestimmungsgrenze (> 20 µg/kg) enthalten und scheint in den untersuchten Matrices von einer untergeordneten Bedeutung zu sein. Tabelle 3 liefert einen genauen Überblick über die Untersuchungsergebnisse.

Tabelle 3 Übersicht der Ergebnisse für Enniatin A, A1, B, B1 sowie Beauvericin der im Projektzeitraum untersuchten Proben (Gerste, Roggen und Weizen).

Gerste (n = 20)	Enniatin A	Enniatin A1	Enniatin B	Enniatin B1	Beauvericin
Anzahl pos. Proben (>20 µg/kg)	0 (0%)	1 (0,5%)	4 (20%)	4 (20%)	0 (0%)
Mindestens [µg/kg]	< 7	56,6	32,7	23,8	< 7
Median [µg/kg]	< 7	56,6	67,1	26,4	< 7
Maximal [µg/kg]	< 7	56,6	288,0	173,0	< 7

Roggen (n = 52)	Enniatin A	Enniatin A1	Enniatin B	Enniatin B1	Beauvericin
Anzahl pos. Proben (>20 µg/kg)	0 (0%)	6 (11,5%)	30 (57,7%)	18 (34,6%)	0 (0%)
Mindestens [µg/kg]	< 7	32,4	20,8	23,1	< 7
Median [µg/kg]	< 7	41,5	66,4	46,5	< 7
Maximal [µg/kg]	< 7	63,7	730	227	< 7

Weizen (n = 32)	Enniatin A	Enniatin A1	Enniatin B	Enniatin B1	Beauvericin
Anzahl pos. Proben (>20 µg/kg)	0 (0%)	0 (0%)	13 (40,6%)	6 (18,8%)	0 (0%)
Mindestens [µg/kg]	< 7	< 7	20,3	23,6	< 7
Median [µg/kg]	< 7	< 7	55,1	29,4	< 7
Maximal [µg/kg]	< 7	< 7	114,0	54,4	< 7

3.2. Ergotalkaloide

In 25 der 104 untersuchten Getreideproben (24,0%) konnte mindestens ein Ergotalkaloid mit einem Gehalt von $> 1 \mu\text{g}/\text{kg}$ (= NG) nachgewiesen werden. Erwartungsgemäß waren in Roggen am häufigsten Ergotalkaloide quantifizierbar (16 von 52 Proben; 30,8%, BG = $2 \mu\text{g}/\text{kg}$). Die charakteristischsten Ergotalkaloide waren hierbei Ergotamin (12/52), Ergosin (11/52) sowie Ergocristin (11/52).

Unter Berücksichtigung der in der Verordnung (EG) Nr. 1881/2006 festgelegten Höchstgehalte für die Summe ausgewählter Ergotalkaloide, die ab dem 01.01.2022 - mit entsprechenden Übergangsfristen – gelten, waren eine Roggenprobe (Summe Ergotalkaloide: $665 \mu\text{g}/\text{kg}$; Höchstgehalt: $500 \mu\text{g}/\text{kg}$) sowie eine Gerstenprobe (Summe Ergotalkaloide: $280 \mu\text{g}/\text{kg}$; Höchstgehalt: $150 \mu\text{g}/\text{kg}$) unter Berücksichtigung der erweiterten Messunsicherheit auffällig. Unter Zugrundelegung des ab dem 01.07.2024 geltenden Höchstgehaltes für Roggen von $250 \mu\text{g}/\text{kg}$, wäre eine weitere Roggenprobe auffällig ($445 \mu\text{g}/\text{kg}$).

Ein Überblick über die Untersuchungsergebnisse ist in Tabelle 4 dargestellt.

Tabelle 4 Überblick über den Gehalt an Ergotalkaloiden (Summe der rechtlich vorgeschriebenen 12 Einzelverbindungen*) der untersuchten Getreideproben

	Gerste (n = 20)	Weizen (n = 32)	Roggen (n = 52)
Anzahl pos. Proben ($>2 \mu\text{g}/\text{kg}$)	3 (15%)	4 (12,5%)	16 (30,8%)
Mindestens [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	41,0	19,0	2,10
Median [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	58,0	40,50	44,50
Maximal [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	280,0	81,00	665,0

*Summe aus: Ergotamin, Ergotaminin, Ergocristin, Ergocristinin, Ergocornin, Ergocorninin, Ergokryptin, Ergokryptinin, Ergometrin, Ergometrinin, Ergosin, Ergosinin

3.3. „klassische“ Mykotoxine

In keiner der untersuchten Proben waren Aflatoxin B1, B2, G1 und G2 (NG = $0,5 \mu\text{g}/\text{kg}$) sowie Fumonisin B1, B2 und B3 (NG = $50 \mu\text{g}/\text{kg}$) nachweisbar. Das neu im Untersuchungsspektrum aufgenommene Nivalenol konnte ebenfalls nicht nachgewiesen werden (NG = $10 \mu\text{g}/\text{kg}$).

HT-2-Toxin ($52,5 \mu\text{g}/\text{kg}$) und T-2-Toxin ($15,4 \mu\text{g}/\text{kg}$) konnten in einer Gerstenprobe nachgewiesen werden. Darüber hinaus war HT-2-Toxin in zwei Weizenproben nachweisbar ($12,7 \mu\text{g}/\text{kg}$ beziehungsweise $<10 \mu\text{g}/\text{kg}$).

In drei von 52 Roggenproben konnte Ochratoxin A oberhalb der Nachweisgrenze (NG = $0,2 \mu\text{g}/\text{kg}$) gefunden werden (2,2; 2,3 und $4,3 \mu\text{g}/\text{kg}$). Des Weiteren konnten in drei Roggenproben niedrige Gehalte an Zearalenon (2x $<10 \mu\text{g}/\text{kg}$ sowie $19,3 \mu\text{g}/\text{kg}$) nachgewiesen werden (NG = $3 \mu\text{g}/\text{kg}$).

Wie erwartet wurde Deoxynivalenol (DON) am häufigsten nachgewiesen (60 von 104 Proben $> \text{BG}$ ($10 \mu\text{g}/\text{kg}$)). DON wurde in allen Weizen (32/32; 100 %) quantifiziert, gefolgt von Roggen (23/52, 44,2%) und Gerste (5/20; 25 %). Die Gehalte lagen hierbei zwischen $10,8$ und $103,6 \mu\text{g}/\text{kg}$ (Gerste), $10,6$ und $216,9 \mu\text{g}/\text{kg}$ (Roggen) sowie $10,7$ und $308,8 \mu\text{g}/\text{kg}$ (Weizen). Unabhängig von der Getreideart betrug der Gehalt des DON-Hauptmetabolits Deoxynivalenol-3-Glykosid circa 10-30 % des DON-Gehaltes.

4. Zusammenhang und Fazit

Die Ergebnisse dieses Projektes bestätigten die ersten Untersuchungsergebnisse der 2021 am CVUA Rheinland untersuchten Proben, dass Enniatine und Beauvericin vermehrt und in erhöhten Konzentrationen in Roggen nachgewiesen werden können. Gerste und Weizen scheinen unter Berücksichtigung der vergleichsweise geringen Stichprobenzahl weniger häufig und in geringeren Konzentrationen mit Enniatinen und Beauvericin belastet zu sein.

Die hohen und häufigen Nachweise, insbesondere an Enniatin B und B1, in Roggen sowie die seltenen Befunde an Enniatinen und Beauvericin in Weizen stehen zum Teil im Kontrast zu den von Logrieco et al. (2002) sowie den von Silvio Uhlig (2007) zusammengetragenen Untersuchungsergebnissen aus Finnland beziehungsweise Norwegen, die insbesondere in Weizen, aber auch in Gerste, Gehalte an Enniatinen bis in den mg/kg-Bereich nachweisen konnten. Wie stark die Belastung von Getreidearten zwischen verschiedenen Erntejahren ausfallen kann, zeigen die Untersuchungsergebnisse von Jestoi et al. (2004) beziehungsweise Kokkonnen et al. (unveröffentlicht). In diesen Arbeiten konnten für das Erntejahr 2005 auch in Roggen Gehalte an Enniatin B und B1 bis in den 3-stelligen µg/kg-Bereich gefunden werden, während im Erntejahr 2001 maximal Spuren in Roggen festgestellt wurden.^[4,6]

In Bezug auf die hier vorgestellte Arbeit kann retrospektiv nicht bewertet werden, inwieweit die klimatischen Bedingungen Ende 2021 und 2022 zu den abweichenden Befunden des CVUA von den bereits erwähnten Studienergebnissen in Roggen beziehungsweise Weizen führten.^[4,6] Einflussgrößen wie zum Beispiel klimatische Bedingungen, das Erntejahr oder auch das Anbaugebiet sind, wie bereits von Fredlund et al. (2013) beschrieben, mögliche Einflussfaktoren für eine Belastung des Getreides mit Enniatinen.^[7] Somit können diese als erste Erklärungsansätze für die im Vergleich zur vorliegenden Literatur häufigeren Nachweise an Enniatinen in Roggen, mit zum Teil deutlich höheren Gehalte, genannt werden.^[4,6,7] So wurden laut Svingen et al. (2017) auch in dänischem Roggen Enniatine mit ebenfalls hohen Nachweishäufigkeiten (100%) gefunden.^[8]

Die Verteilung der einzelnen Enniatine in positiven Getreideproben stimmt mit den Ergebnissen des CVUA Rheinland überein. Die Gehalte an Enniatin B waren in belasteten Proben stets am höchsten, gefolgt von Enniatin B1 und Enniatin A1.^[4,6,8] Darüber hinaus bestätigen die Befunde der von Uhlig (2007) veröffentlichten Studie, in der Enniatin A maximal in Spuren (Mediane für Weizen, Gerste und Hafer <5 µg/kg) nachgewiesen werden konnte, die hier gezeigten negativen Befunde an Enniatin A. Für Beauvericin zeichnet sich hingegen ein heterogeneres Bild ab. So konnten in Norwegen lediglich Spuren an Beauvericin in Weizen und Gerste beziehungsweise in geringen Konzentrationen in Hafer (bis max. 120 µg/kg) nachgewiesen werden, was zu den Ergebnissen des CVUA passt – wohingegen in mit *Fusarium spec.* befallenen finnischen Weizen Gehalte an Beauvericin bis in den einstelligen mg/kg-Bereich festgestellt werden konnten.^[4,6]

Zusammenfassend erscheint die zukünftige Untersuchung von Roggenprodukten auf Enniatine und Beauvericin - neben den typischerweise durchgeführten Ergotalkaloid-Bestimmungen - am CVUA Rheinland sinnvoll.

Zur Prüfung möglicher Zusammenhänge der Belastungen von Getreide mit Enniatinen (sowie Beauvericin) und Ergotalkaloiden beziehungsweise anderen Mykotoxinen, erfolgte die Berechnung sogenannter *Odds-Ratios*. Die berechneten *Odds-Ratios* der Untersuchungsergebnisse zeigten überraschend deutlich, dass die Wahrscheinlichkeit geringer ist Enniatine in Roggen nachzuweisen, der gleichzeitig auch mit Ergotalkaloiden belastet ist (*Odds-Ratio* = 0,3 ; siehe Tabelle 4).

Untersuchung diverser Getreidearten auf das Vorkommen von Enniatin A1, A, B1, B sowie Beauvericin

Eine mögliche Erklärung hierfür liegt in den unterschiedlichen Schimmelpilz-Gattungen, die für die Bildung von Ergotalkaloiden (z.B. *Claviceps purpurea*) beziehungsweise Enniatinen (z.B. *Fusarium avenaceum*) verantwortlich sind, sodass nur bei einer Kontamination des Roggens mit beiden Schimmelpilz-Gattungen beide Mykotoxin-Gruppen nachzuweisen wäre.^[4,6,8]

Für den Vergleich der Ergotalkaloid- und Enniatin-Befunde ist zu berücksichtigen, dass *Claviceps purpurea* Kolonien gerne in Form sogenannter Sklerotien („Mutterkorn“) vorliegen, die zum einen sehr hoch mit Ergotalkaloiden belastet sein können und zum anderen jedoch auch leicht durch geeignete Sortierverfahren vom Getreide abgetrennt werden können. Dieses technische Verfahren ist jedoch nicht gleichermaßen geeignet, um mit *Fusarium* Spezies befallene Getreidekörner auszusortieren. Somit könnte dieses Verfahren ein weiterer Grund für die erniedrigte Wahrscheinlichkeit, beide Mykotoxin-Gruppen parallel nachweisen zu können, sein, selbst wenn ein Befall des untersuchten Roggens mit *Fusarium* und *Claviceps* Arten vor der Ernte vorlag.

In Übereinstimmung mit dieser These konnte eine deutlich erhöhte Wahrscheinlichkeit (*Odds-Ratio* = 19,29), Enniatine und Beauvericin gleichzeitig mit Deoxynivalenol, welches ebenfalls von Schimmelpilzen der Gattung *Fusarium* u.a. gebildet wird, nachzuweisen, festgestellt werden. Der generelle Nachweis von Deoxynivalenol sowie Enniatinen und Beauvericin in mit *Fusarium* befallenem Getreide konnte auch in anderen Studien bereits belegt werden, wobei noch nicht eindeutig gezeigt werden konnte, dass Deoxynivalenol sowie Enniatine und Beauvericin von denselben *Fusarien* Arten gebildet werden. So zeigte Fredlund et al. (2013) eine starke Korrelation von Deoxynivalenol mit *Fusarium graminearum* ($r = 0,77, P < 0,001$) sowie eine Korrelation von Enniatinen mit *Fusarium tricinctum* ($r = 0,76, P < 0,001$) sowie mit *Fusarium avenaceum* ($r = 0,67, P < 0,001$). Beauvericin hingegen zeigte die stärkste Korrelation zu *Fusarium poae* ($r = 0,78, P < 0,001$).^[8]

Tabelle 5 Berechnung der *Odds-Ratios* für die Wahrscheinlichkeit in Roggen (n = 52) neben Enniatine und Beauvericin gleichzeitig Ergotalkaloide (links) beziehungsweise Deoxynivalenol (rechts) nachzuweisen. Als Grundlage der Berechnung dienen die Anzahl an Proben mit positiven (+) und negativen Befunden (-) für die jeweiligen Mykotoxine.

		Enniatine und Beauvericin				Enniatine und Beauvericin	
		+	-			+	-
Ergotalkaloide	+	6	10	Deoxynivalenol	+	27	7
	-	24	12		-	3	15

Eine, wie im Projektantrag vorgesehene, statistische Auswertung möglicher Unterschiede zwischen biologisch-kontrolliert und konventionell angebautem Getreide kann aufgrund der nicht in allen Fällen gemäß der Vorgabe erfolgten Probenahme nicht durchgeführt werden, da die Gesamtzahl der eingelieferten Proben nicht der angeforderten Verteilung entspricht, wodurch sich die verschiedenen Datensätze zu stark in der Größe unterscheiden beziehungsweise die Stichprobenmenge pro Datengruppe zu niedrig ist; darüber hinaus war das Anbauverfahren nicht bei allen Proben dokumentiert (vergleiche Abbildung 3).

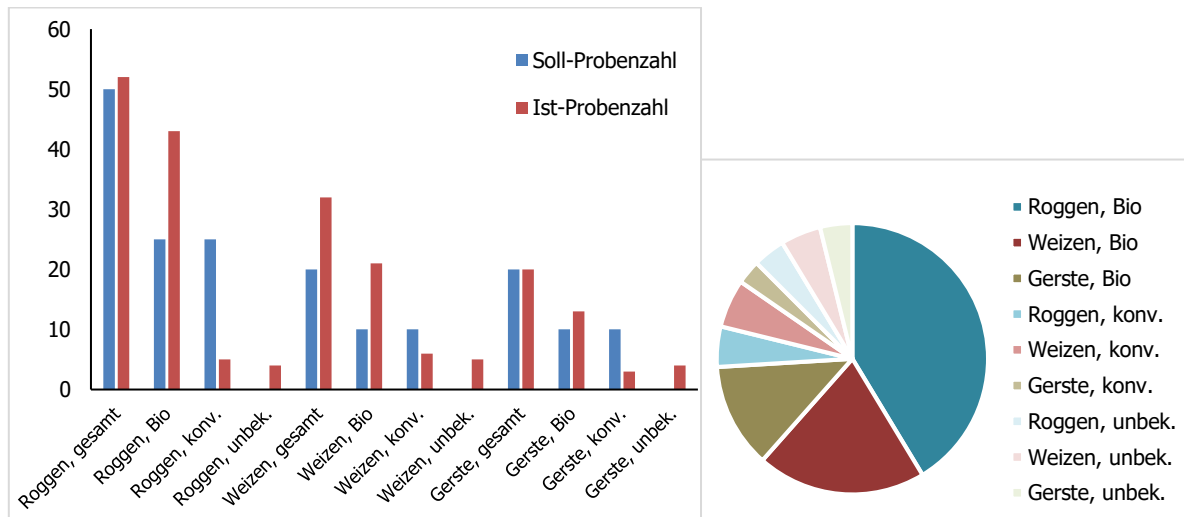


Abbildung 3 Verteilung der Probenzahlen (Soll und Ist) auf die einzelnen Getreidearten und Anbauverfahren.

Im kommenden Jahr sollen vermehrt Hirseproben, bei denen die Untersuchungsergebnisse des CVUA Rheinland aus 2022 deutlich vermehrte und erhöhte Befunde an Alternaria-Toxinen aufzeigen, ebenfalls auf Enniatine und Beauvericin untersucht werden. Neben weiteren Untersuchungen von Roggen und -erzeugnissen sollen die Getreide Reis und Mais, der ebenfalls häufig mit dem Schimmelpilz *Fusarium avenaceum* belastet sein soll,^[4] stichpunktartig auf Enniatine und Beauvericin untersucht werden.

5. Literatur

[1] Degen GH (2017). Mykotoxinen in Lebensmitteln – Vorkommen, Bedeutung und gesundheitliches Risiko. Bundesgesundheitsblatt. **60**: 745-756

[2] Verordnung (EG) Nr. 1881/2006 (letzte konsolidierte Fassung vom 14.10.2020)

[3] Bertero A, Fossati P, Tedesco DEA und Calon F (2020). Beauvericin and Enniatins: In Vitro Intestinal Effects. Toxins. **686**: 1-43.

[4] Uhlig S (2007). *Fusarium avenaceum* – The North European situation. International Journal of Food Microbiology. **119**: 17-24.

[5] European Food Safety Authority (2014). Scientific opinion on the risks to human and animal health related to the presence of beauvericin and enniatins in food and feed. EFSA Journal. **12(8)**:3802.

[6] Logrieco A, Rizzo A, Ferracane R, Ritieni A (2002). Occurrence of Beauvericin and Enniatins in Wheat Affected by *Fusarium avenaceum* Head Blight. Applied and Environmental Microbiology. **68(1)**: 82-85.

[7] Fredlund E, Gidlund A, Sulyok M, Börjesson T, Krska R, Olsen M, Lindblad M (2013). Deoxynivalenol and other selected *Fusarium* toxins in Swedish oats – Occurrence and correlation to specific *Fusarium* species. International Journal of Food Microbiology. **167(2)**: 276-283.

[8] Svingen T, Lund Hansen N, Taxvig C, Vinggaard AM, Jensen U, Rasmussen PH (2017). Enniatin B and beauvericin are common in Danish cereals and show high hepatotoxicity on a high-content imaging platform. Environmental Toxicology. **32(5)**: 1658-1664.