

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Lehrstuhl für Tierhygiene

Nachweis und Vorkommen von *Aspergillus fumigatus*-Toxinen in Gras- und Maissilagen

Johannes Ostertag

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Agrarwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender:

Univ.-Prof. Dr. H.-R. Fries

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. Dr. h. c. J. Bauer
2. Univ.-Prof. Dr. H. H. D. Meyer

Die Dissertation wurde am 16.12.2009 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 19.02.2010 angenommen.



## Inhaltsverzeichnis

A	Einleitung.....	1
B	Literatur .....	3
1	Allgemeine Bedeutung des Gärfutters in der Tierernährung.....	3
1.1	Grassilage.....	3
1.2	Maissilage.....	3
1.3	Gärfutterbereitung.....	5
2	Schimmelpilze in Silagen .....	11
3	<i>Aspergillus fumigatus</i> .....	15
3.1	Eigenschaften und Verbreitung .....	15
3.2	Phylogenetische Einordnung.....	16
3.3	Sekundäre Stoffwechselmetaboliten .....	18
3.3.1	Gliotoxin .....	18
3.3.2	Fumagillin.....	21
3.3.3	Tremorgene.....	23
3.3.4	Fumiquinazoline/Fumichinazoline.....	35
3.3.5	Fumigaclavine .....	36
3.3.6	Trypacidin .....	40
3.3.7	Sphingofungine .....	40
3.3.8	Pseurotin A .....	41
3.3.9	Pyripyropen A.....	42
3.3.10	Helvolsäure .....	43
C	Material und Methoden .....	44
1	Material.....	44
1.1	Proben .....	44
1.2	Mykologische Untersuchungen .....	45
1.3	Mykotoxikologische Untersuchungen .....	45
2	Methoden.....	48
2.1	Überprüfung der Stabilität gelagerter Referenzsubstanzen .....	48
2.2	Herstellung kommerziell nicht angebotener Referenzsubstanzen .....	48
2.2.1	Toxinproduktion.....	48
2.2.2	Extraktion kommerziell nicht verfügbarer <i>A. fumigatus</i> - Stoffwechselprodukte .....	50
2.2.3	Aufreinigung kommerziell nicht verfügbarer <i>A. fumigatus</i> - Stoffwechselprodukte .....	50
2.2.4	Isolierung der Substanzen mittels semipräparativer HPLC.....	51
2.3	Bestimmung des Keimgehaltes und der Keimarten .....	53
2.4	Voruntersuchungen zur mykotoxikologischen Analyse der Silageproben .....	54

---

2.5	Analyse von Mykotoxinen in Silage mittels HPLC-MS/MS.....	56
2.6	Bestimmung der Wiederfindungsraten und Nachweisgrenzen.....	58
2.7	Statistische Auswertungen .....	58
D	Ergebnisse.....	59
1	Mykotoxikologische Voruntersuchungen .....	59
2	Referenzsubstanzen.....	62
2.1	Quantitativ nachweisbare Stoffwechselmetaboliten.....	63
2.2	Qualitativ nachweisbare Stoffwechselmetaboliten.....	69
3	Validierung der Analysemethode .....	79
4	Untersuchung der Feldproben .....	81
4.1	Mykologische Untersuchungen .....	81
4.2	Mykotoxikologische Untersuchung .....	90
E	Diskussion .....	96
F	Zusammenfassung .....	111
G	Summary .....	112

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Orientierungswerte für Energie- und Nährstoffgehalte, Silierung und Gärqualität von Gras- und Maissilagen (Spiekers, 2006) .....	4
Tabelle 2:	Wachstumsansprüche von in Silagen vorkommenden Mikroorganismen (nach Weißbach, 1993).....	5
Tabelle 3:	Einteilung der in Silagen vorkommenden Hefen nach deren Stoffwechsellleistungen (nach Pahlow, 1991) .....	9
Tabelle 4:	Systematik der Siliermitteltypen nach Wirkungsrichtung und Wirkprinzip (nach Kalzendorf, 2006).....	10
Tabelle 5:	Mykologische Befunde bei Untersuchungen von siliertem pflanzlichen Material verschiedener geographischer Herkunft .....	12
Tabelle 6:	Ausgewählte mykotoxikologische Untersuchungen von Silagen .....	14
Tabelle 7:	Klassifizierung von <i>Aspergillus fumigatus</i> (Latgé, 1999).....	17
Tabelle 8:	FTC-verwandte Diketopiperazine vom Fumitremorgen-Typ .....	32
Tabelle 9:	Überblick über die bislang beschriebenen Vertreter der Gruppe der Tryptoquivaline.....	34
Tabelle 10:	Physikalische und chemische Charakterisierung von Mitgliedern der Stoffgruppe der Fumiquinazoline.....	36
Tabelle 11:	Charakteristische Daten zu Fumigaclavin B (Cole und Cox, 1981).....	37
Tabelle 12:	Zeitliche und qualitative Verteilung der untersuchten Probenmaterialien über den Probennahmezeitraum .....	44
Tabelle 13:	Lösungsmittelzusammensetzung der Kieselgelaufreinigung .....	51
Tabelle 14:	HPLC-Gradienten zur Gewinnung von <i>Aspergillus fumigatus</i> -Stoffwechselmetaboliten .....	52
Tabelle 15:	Versuchsaufbau zur Definition des optimalen Extraktionsmittels für den Nachweis von <i>Aspergillus fumigatus</i> - und anderen Mykotoxinen aus Gras- und Maissilagen .....	54
Tabelle 16:	Ermittelte Übergänge und Quellenparameter der Analyseverfahren.....	57
Tabelle 17:	Vergleich unterschiedlicher Materialien zur Aufreinigung von artifiziell kontaminierten Reisextrakten anhand der erzielten Wiederfindungsraten .....	60
Tabelle 18:	MS/MS-Geräteeinstellungen der Multimethode zum Nachweis von <i>Aspergillus fumigatus</i> -Toxinen aus Gras- und Maissilagen .....	61
Tabelle 19:	Referenzsubstanzen .....	62
Tabelle 20:	Richtigkeit und Präzision der Nachweismethode bei artifiziell mit steigenden Toxinkonzentrationen kontaminierten Grassilagen.....	79
Tabelle 21:	Richtigkeit und Präzision der Nachweismethode bei artifiziell mit steigenden Toxinkonzentrationen kontaminierten Maissilagen.....	80
Tabelle 22:	Verteilung der Schimmelpilzgesamtkeimzahlen in Mais- und Grassilagen.....	83
Tabelle 23:	Verteilung der Hefegespaltkeimzahlen in Mais- und Grassilagen.....	84

---

Tabelle 24:	Vorkommen und Häufigkeit aus Gras- und Maissilagen isolierter Schimmelpilz-Familien, -Gattungen und -Arten .....87
Tabelle 25:	Vorkommen von <i>Aspergillus fumigatus</i> in Gras- und Maissilagen unterschiedlicher sensorischer Qualitäten (n = 584).....88
Tabelle 26:	Vorkommen von Mykophenolsäure, Roquefortin C und Monacolin K in Gras- und Maissilagen unterschiedlicher Qualitäten.....91
Tabelle 27:	Vorkommen und maximale Quantitäten von <i>A. fumigatus</i> -Toxinen in Gras- und Maissilagen unterschiedlicher Qualitäten.....92
Tabelle 28:	Qualitativer Nachweis weiterer Sekundärstoffwechselprodukte in Gras- und Maissilagen unterschiedlicher Qualitäten .....95
Tabelle 29:	Korrelationen zwischen Mykotoxinkonzentrationen und Keimzahlen von Schimmelpilzen in Silagen ..... 109

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Bakterielle Stoffwechselforgänge in Silage.....	7
Abbildung 2:	Mikroskopische Aufnahme (x 1000) eines Abklatschpräparats einer <i>Aspergillus fumigatus</i> -Kultur (auf SAB) .....	16
Abbildung 3:	Strukturformel und charakteristische Daten von Gliotoxin (Cole und Cox, 1981) .....	18
Abbildung 4:	Strukturformel und charakteristische Daten von Fumagillin (Cole und Cox, 1981) .....	21
Abbildung 5:	Ausgangssubstanzen der Biosynthese des Grundgerüsts von tremorgenen <i>Aspergillus fumigatus</i> -Toxinen .....	25
Abbildung 6:	Strukturformel und charakteristische Daten von Fumitremorgen A (Cole und Cox, 1981) .....	26
Abbildung 7:	Strukturformel und charakteristische Daten von Fumitremorgen B (Cole und Cox, 1981) .....	26
Abbildung 8:	Strukturformel und charakteristische Daten von Fumitremorgen C (FTC) (Cole und Cox, 1981).....	27
Abbildung 9:	Strukturformel und charakteristische Daten von Verruculogen (Cole und Cox, 1981) .....	29
Abbildung 10:	Strukturformel und charakteristische Daten von TR-2 Toxin (Cole und Cox, 1981) .....	31
Abbildung 11:	Stellung von TR-2 Toxin im Biosyntheseweg von Fumitremorgen B und Verruculogen (nach Willingale et al., 1983) .....	31
Abbildung 12:	Strukturformel und mögliche Fragmentierungsprodukte von Tryprostatin A und B.....	33
Abbildung 13:	Grundgerüst der Tryptoquivalin-Gruppe (nach Springer, 1979).....	33
Abbildung 14:	Mögliche Fragmentierung der Fumiquinazoline bei massenspektrometrischen Messverfahren (Takahashi et al., 1995).....	35
Abbildung 15:	Strukturformel und charakteristische Daten von Fumigaclavin A (Cole und Cox, 1981) .....	37
Abbildung 16:	Strukturformel und charakteristische Daten des Fumigaclavin C (Cole und Cox, 1981) .....	38
Abbildung 17:	Strukturformel und charakteristische Daten von Festuclavin (Cole und Cox, 1981) .....	39
Abbildung 18:	Strukturformel und charakteristische Daten von Trypacidin (Cole und Cox, 1981) .....	40
Abbildung 19:	Grundgerüst und jeweilige Substituenten der Sphingofungine A, B, C und D (nach VanMiddlesworth, 1992) .....	40
Abbildung 20:	Strukturformeln von Pseurotin A (links) und Synerazol (rechts) sowie charakteristische Daten von Pseurotin A (Cole et al., 2003).....	41
Abbildung 21:	Strukturformel und charakteristische Daten von Pyripyropen A (Cole et al., 2003).....	42

---

Abbildung 22:	Strukturformel und charakteristische Daten der Helvolsäure (Cole und Cox, 1981) .....	43
Abbildung 23:	Maßnahmen in Vorversuchen zur Isolierung kommerziell nicht verfügbarer <i>Aspergillus fumigatus</i> -Metaboliten.....	49
Abbildung 24:	Schematische Darstellung des HPLC-MS/MS-Systems zur Isolierung von <i>Aspergillus fumigatus</i> -Metaboliten .....	52
Abbildung 25:	Signalintensitäten von unterschiedlich konzentrierten (10, 100, 1000 ng/ml) Mischstandards der Mykotoxine Verruculogen, Fumitremorgen C, Gliotoxin und Fumagillin in Acetonitril an ausgewählten Messtagen (Lagerbedingungen: Dunkelheit, 4 °C) .....	59
Abbildung 26:	Produktionenspektrum (MS/MS, ESI+) von Fumitremorgen A (links) und dünnschichtchromatographischer Nachweis (rechts).....	63
Abbildung 27:	Produktionenspektrum (MS/MS, ESI+) von Fumitremorgen B (links) dünnschichtchromatographischer Nachweis (rechts) .....	64
Abbildung 28:	Produktionenspektrum (MS/MS, ESI+) von TR-2 Toxin.....	65
Abbildung 29:	Produktionenspektrum (ESI+, links) und dünnschichtchromatographischer Nachweis verschiedener Konzentrationen (rechts) von Fumigaclavin C .....	66
Abbildung 30:	Produktionenspektrum (MS/MS, ESI+) von (Mono-) Trypacidin .....	67
Abbildung 31:	Produktionenspektrum (MS/MS, ESI+) von Fumiquinazolin D.....	68
Abbildung 32:	Produktionenspektrum (MS/MS, ESI+) von Pyripyropen A.....	69
Abbildung 33:	Produktionenspektrum (MS/MS, ESI+) von Fumigaclavin A.....	70
Abbildung 34:	Produktionenspektrum (MS/MS, ESI+) von Fumiquinazolin A.....	71
Abbildung 35:	Produktionenspektrum (MS/MS, ESI+) von Fumiquinazolin F/G .....	72
Abbildung 36:	Produktionenspektrum (MS/MS, ESI+) von Sphingofungin A .....	73
Abbildung 37:	Produktionenspektrum (MS/MS, ESI+) von Sphingofungin D.....	74
Abbildung 38:	Produktionenspektrum (MS/MS, ESI+) von Tryptoquivalin F/J .....	75
Abbildung 39:	Produktionenspektrum (MS/MS, ESI+) von Pseurotin A.....	76
Abbildung 40:	Produktionenspektrum (MS/MS, ESI+) von Synerazol .....	77
Abbildung 41:	Q1-Massenspektrum von Helvolsäure.....	78
Abbildung 42:	Produktionenspektrum (MS/MS, ESI+) von Helvolsäure bzw. des Ammonium-Addukts.....	78
Abbildung 43:	Häufigkeit des Nachweises von Schimmelpilzen in Gras- und Maissilagen unterschiedlicher Qualitäten (n = 584) .....	81
Abbildung 44:	Häufigkeit von Hefen in Gras- und Maissilagen unterschiedlicher Qualitäten (n = 584) .....	82
Abbildung 45:	Häufigkeiten dominierender Schimmelpilzfamilien bzw. -gattungen in Maissilagen unterschiedlicher Qualitäten (n = 304) .....	85
Abbildung 46:	Häufigkeit dominierender Schimmelpilzfamilien bzw. -gattungen in Grassilagen unterschiedlicher Qualitäten (n = 280).....	86



---

Abbildung 47:	relative Häufigkeit des gleichzeitigen Nachweises mehrerer Schimmelpilzgattungen in Grassilagen unterschiedlicher sensorischer Qualitäten .....	89
Abbildung 48:	Relative Häufigkeit des gleichzeitigen Nachweises mehrerer Schimmelpilzgattungen in Maissilagen unterschiedlicher sensorischer Qualitäten .....	89
Abbildung 49:	Relative Häufigkeiten des gleichzeitigen Nachweises mehrerer Stoffwechselmetaboliten von Schimmelpilzen in Gras- und Maissilagen unterschiedlicher Qualitäten .....	108

## Abkürzungsverzeichnis

ACN	Acetonitril
$\epsilon$	Epsilon, Extinktionskoeffizient
ED	Effektivdosis
ESI+	Elektrospray ionisation positive
FM	Frischmasse
$g$	Erdbeschleunigung
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IC	inhibitory concentration
$\lambda$	Lambda, Wellenlänge
LC-MS/MS	Liquid chromatography - Tandem mass spectrometry
LD	Letale Dosis
ME	Umsetzbare Energie
MeOH	Methanol
Michsäurebakterien	MSB
MHK	Minimale Hemm-Konzentration
M-Phase	Mitose-Phase
$m/z$	Masse zu Ladung
$n$	Anzahl
NEL	Netto Energie Laktation
NMR	nuclear magnetic resonance, Kern(spin)resonanzspektroskopie
n.n.	nicht nachweisbar
n.u.	nicht untersucht
$r$	Korrelationskoeffizient
$R_f$	relate to front, Quotient der Laufstrecken
Smp	Schmelzpunkt
TLC	thin layer chromatography, Dünnschichtchromatographie
TM	Trockenmasse
V-79-Zellen	Lungenzellen von chinesischen Hamstern
$\bar{x}$	Mittelwert

## A Einleitung

Das Grobfutter stellt die Grundlage der Wiederkäuerfütterung dar. Für eine kontinuierliche Bereitstellung einer hohen Grobfutterqualität muss im mitteleuropäischen Raum der im Sommer und Herbst anfallende Futterberg konserviert werden. Dies kann beim Gras sowohl durch Trocknung als auch durch Silierung, beim Mais durch Silierung erreicht werden.

Die Bereitung von Gärfutter beruht auf mikrobieller Säureproduktion und Luftabschluss. Beide Faktoren sind jedoch anfällig für Störungen, welche den Erfolg der Konservierung und die Qualität des Futtermittels gefährden. Der Verderb von erfolgreich silierten Futtermitteln beginnt meist mit der überproportionalen Vermehrung von Sprosspilzen nach der Eröffnung des Silos. Der durch den Stoffwechsel von Hefen wie *Candida* oder *Hansenula* spp. entstehende Energieverlust äußert sich in der sogenannten Nacherwärmung des Silos. Häufig wird diese nicht erfasst, da es an der technischen Ausstattung fehlt.

Der schnellen Vermehrung der Hefen folgt nicht selten das Wachstum von Schimmelpilzen (Gedek, 1980). Diese Mikroorganismen sind aus mehreren Gründen unerwünscht: zum einen führt die Umwandlung der organischen Substanz in Pilzmasse zu einem Verlust an Futterwert. Zum anderen können Schimmelpilze die Gesundheit von höheren Lebewesen gefährden. So ist die Entwicklung einer Allergie gegen Schimmelpilze keine Seltenheit. Wenige Spezies, darunter *Aspergillus fumigatus*, sind zudem in der Lage, sich im tierischen Organismus, insbesondere bei einem geschwächten Immunsystem, zu etablieren und können so zu schwerwiegenden Infektionen führen. Ein dritter Grund, weshalb Schimmelpilzwachstum in Gärfuttermitteln vermieden werden sollte, ist die mögliche Produktion von Mykotoxinen, toxischen Produkten des Sekundärstoffwechsels der Schimmelpilze. Mykotoxine sind einerseits gesundheitsschädlich für das Nutztier selbst, weshalb schon aus ökonomischen Gesichtspunkten die Verfütterung verpilzter Silage unterbleiben sollte. Andererseits könnten manche Stoffe, metabolisiert oder in Reinform, mit tierischen Produkten wie Milch oder Fleisch zum Verbraucher gelangen (Bauer et al., 2000). Vertreter der Gattungen *Penicillium*, *Aspergillus* und *Monascus*, aber auch der Familie der *Mucoraceae* sind die am häufigsten vorkommenden Schimmelpilze in süddeutschen Silagen (Gedek, 1980). Das Auftreten sekundärer Stoffwechselmetaboliten von *Penicillium roqueforti* und *Monascus ruber* in Gras- und Maissilage wurde bereits untersucht (Tüller et al., 1998; Schneewis, 2000), über das Vorkommen von *Aspergillus*-Toxinen in Silagen ist dagegen bislang nur wenig bekannt. Da die Spezies *A. fumigatus* zu den wichtigen Silagepilzen gehört (Gedek, 1974; Gedek et al., 1981) und eine Vielzahl von toxischen Stoffwechselprodukten in der Kultur bilden kann (Cole et al., 1977a; Cole et al., 1977b; Cole und Cox, 1981), sollte in der vorliegenden Arbeit das natürliche Vorkommen von *Aspergillus-fumigatus*-Toxinen in Gras- und Maissilagen näher untersucht werden. Aufgrund der geringen Verfügbarkeit an Referenzsubstanzen mussten diese zu einem großen Teil zunächst aus Schimmelpilzkulturen isoliert werden.

Die Untersuchung verpilzter Bereiche war dabei unverzichtbar, um eine „worst-case“-Situation ermitteln zu können. Aufgrund der thermophilen Eigenschaften von *Aspergillus fumigatus*, welcher ansonsten als eher konkurrenzschwacher Keim in Silagen gilt (Pelhate, 1977), wurde die zusätzliche Untersuchung erwärmter Bereiche ohne erkennbare Anzeichen eines Schimmelpilzbefalls als sinnvoll erachtet. Unveränderte Bereiche im Futterstock dienten als Vergleich, um die mykotoxikologische Entwicklung von Silagen beim Verderb durch Schimmelpilze sowie die Belastung der Nutztiere abschätzen zu können.

In Zusammenarbeit mit dem Institut für Tierernährung der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft, Grub, wurden in den Zeiträumen Sommer 2006, Winter 2006/07 und Sommer 2007 insgesamt 584 Gras- und Maissilageproben unterschiedlicher Qualitäten gesammelt und am Lehrstuhl für Tierhygiene der Technischen Universität München, Weihenstephan, mykologisch sowie mykotoxikologisch untersucht. Somit konnten erste Daten über das Vorkommen von *A. fumigatus* und dessen Stoffwechselmetaboliten in Gras- und Maissilagen als Grundlage für weitere Untersuchungen hinsichtlich möglicher Konsequenzen für die Tiergesundheit generiert werden.

## **B Literatur**

### **1 Allgemeine Bedeutung des Gärfutters in der Tierernährung**

#### **1.1 Grassilage**

Gräser bilden seit Beginn der Nutztierhaltung die Grundlage der Wiederkäuerfütterung. Die meist mehrschnittigen Pflanzen bilden den Hauptbestandteil der Pflanzendecke des Grün- bzw. Graslands (Weißbach, 1993). Grünland hat in Bayern mit 1,16 Mio. ha einen Anteil von 35 % an der gesamten landwirtschaftlichen Nutzfläche. In den südlichen Regionen (Schwaben und Oberbayern) im Grünlandgürtel des Voralpenraums gelegen, beträgt dieser Anteil 55 %. In den nördlichen Regionen Bayerns hingegen liegen der Anteil der Anbaufläche und die jeweilige Nutzungsintensität unter den für Südbayern ermittelten Werten (Diepolder, 2007).

Um das pflanzliche Material sowie die Produktionsfläche optimal nutzen zu können, muss das ungleichmäßig anfallende Grüngut konserviert werden. Neben der Heuwerbung und der Heißlufttrocknung, welche auf dem Prinzip Trocknung basieren, ist die Konservierung durch Säuerung und Luftabschluss möglich (Müller und Bauer, 2006). Grassilage stellt in der Rinderfütterung und hier vor allem in der Milchviehfütterung ein Futtermittel von großer Bedeutung dar, da der relativ hohe Strukturwert, verbunden mit einem Energiegehalt von ca. 6,0 MJ NEL bzw. 10,0 MJ ME (Tabelle 1), die Pansenfunktion positiv beeinflusst, sowie die Bildung von Milch, Eiweiß und Milchfett begünstigt (Heller und Potthast, 1997).

Anwelksilage mit einem Gehalt an Trockensubstanz (TS) zwischen 25 und 35 % und einer Anwelkdauer von ein bis maximal zwei Tagen, stellt hinsichtlich der Gehalte an Rohprotein, Rohfaser sowie der Energiedichte ein ausgeglichenes Futter dar. Trockene Grassilage (TS > 35 %) erreicht annähernd den Strukturwert von Heu oder Stroh, welche diesbezüglich als optimale Raufutter angesehen werden (Weißbach, 1993). Bei stark erhöhtem TS-Gehalt von über 50 % lässt sich das Material jedoch schlechter verdichten. Auch die Aussichten auf eine schnelle Ansäuerung durch Milchsäurebakterien und einen optimalen Silierverlauf verschlechtern sich (Müller und Bauer, 2006).

#### **1.2 Maissilage**

Die Bedeutung der Maissilage in der Wiederkäuerfütterung ist durch züchterische Anpassung der ursprünglich in Mittelamerika beheimateten Pflanze an mitteleuropäische Klimata und hohe Ertragsleistungen enorm gestiegen. Mais ist die wichtigste Futterpflanze in vielen Regionen Bayerns. Der Ertrag von Silomais beträgt derzeit bei gutem Wachstumsverlauf etwa 50 t FM/ha. Erträge von 70 t/ha sind jedoch ebenso erreichbar.

Tabelle 1: Orientierungswerte für Energie- und Nährstoffgehalte, Silierung und Gärqualität von Gras- und Maissilagen (Spiekers, 2006)

Parameter	Grassilage	Maissilage
Trockenmasse [%]	30 – 40	28 - 35 <sup>1)</sup>
Rohasche [% i.d.TM]	< 10	< 4,5
Rohprotein [% i.d.TM]	< 17 <sup>2)</sup>	< 9
Rohfaser [% i.d.TM]	22 – 25	17 - 20
NDForg <sup>3)</sup> [% i.d.TM]	40 – 48	35 - 40
Strukturwert	2,6 - 2,9	1,5 - 1,7
Stärke [% i.d.TM]	Keine	> 30
ME <sup>4)</sup> [MJ/kg TM]	≥ 10,6 bzw. ≥ 10,0 <sup>5)</sup>	≥ 10,8
NEL <sup>6)</sup> [MJ/kg TM]	≥ 6,4 bzw. ≥ 6,0 <sup>5)</sup>	≥ 6,5
Nutzbares Rohprotein [g/kg TM]	> 135	> 130
Ruminale Stickstoffbilanz [g/kg TM]	< 6	-7 bis -9
Häcksellänge [mm]	< 40	4 - 7
pH-Wert		4,0 - 5,0 <sup>7)</sup>
Buttersäuregehalt [g/kg TM]		< 3
Essig- und Propionsäuregehalt [g/kg TM]		20 - 30
Ammoniak-N-Anteil [% v. N]		< 8
Aerobe Stabilität in Tagen		> 3

1) In Abhängigkeit vom Kornanteil

2) 15 % bei Ackergras

3) Nicht verdauliche Gerüstsubstanzen

4) Umsetzbare Energie

5) 1. Schnitt bzw. Folgeschnitte; NDForg - nach Aschekorrektur

6) Netto Energie Laktation

7) Mit TM-Gehalt steigend, 20 - 45 % TM

Im Jahr 2006 wurde in Deutschland auf ca. 1,35 Mio. ha Silomais angebaut, was einem prozentualen Anteil an der gesamten Ackerfläche von 11 % entspricht; in Bayern ist dieser Anteil mit 15 % und ca. 315.000 ha gegenüber dem Bundesdurchschnitt sogar noch höher. Da Maissilage nicht nur grüne Pflanzenteile, sondern auch den Kolben enthält, stellt sie ein ausgesprochen energiereiches Grundfuttermittel dar. Vor allem für die Rindermast, aber auch für die Milchviehhaltung stellt Maissilage daher das wichtigste Grundfuttermittel dar.

Der optimale Erntezeitpunkt ist aus zwei Gründen bestmöglich einzuhalten. Zum einen verliert die Pflanze schnell an Futterwert, da die proteinreicheren Stängelanteile absterben. Zum anderen steigt der Besatz an Hefen und Schimmelpilzen an, so dass sich die zu erwartende aerobe Stabilität der Silage verschlechtert (Steinwider und Wurm, 2005). Die Verfütterung von Grünmais ist, obwohl gern gefressen, kritisch zu betrachten, da er durch den hohen Gehalt an Phytoöstrogenen negativ auf die Herdenfruchtbarkeit bei Milchkühen und das Wachstum von Mastbullen wirken kann. Daher ist die Silierung, im Zuge derer ein

Großteil dieser Phytoöstrogene zu weniger wirksamen Substanzen metabolisiert wird, nahezu unverzichtbar für den Einsatz großer Mengen Mais in der Wiederkäuerfütterung. Die Bereitung von Maissilage bedarf keiner vorangehenden Behandlung, da Mais auch mit dem natürlichen Wassergehalt (Pufferkapazität ca. 35) gut vergärbar ist (Müller und Bauer, 2006).

### 1.3 Gärfutterbereitung

Das Ziel einer Silierung ist die Hygienisierung und somit Konservierung von pflanzlichem Material. Dadurch kann das ganze Jahr über ein nahezu konstantes Futterangebot gewährleistet werden. Grundsätzlich ist jedes pflanzliche Material silierbar. Die jeweilige Eignung ist von pflanzenspezifischen Faktoren, vor allem von deren Inhaltsstoffen, abhängig. Die Qualität (Farbe, Konsistenz, Geruch, Geschmack) und der Ausgangsfutterwert des Pflanzenmaterials sollen erhalten bleiben. Letzterer kann durch Fehlgärungen oder Mykotoxinbildung stark vermindert werden (Müller und Bauer, 2006).

Die aerobe Stabilität, die mikrobiologische Stabilität von Silagen nach Luftzutritt, ist ein wichtiger Faktor um den Futterwert vom Feld bis zum Pansen hoch zu halten. Sie korreliert negativ mit der Präsenz unerwünschter Mikroorganismen, wie milchsäureabbauender Hefen oder Schimmelpilze. Durch die Einhaltung einer guten Silierpraxis kann die aerobe Stabilität erhöht werden (Spiekers, 2006).

Um den Besatz an Mikroorganismen zu reduzieren, stehen verschiedene Methoden zur Verfügung. Sie basieren zum einen auf der Entwicklung einer anaeroben Atmosphäre, durch Verdichtung des Futterstocks und anschließendem Luftabschluss, zum anderen auf der Senkung des pH-Werts. Dies wird üblicherweise durch die bakterielle Produktion kurzkettiger organischer Säuren, idealerweise Milchsäure, erreicht.

Tabelle 2: Wachstumsansprüche von in Silagen vorkommenden Mikroorganismen (nach Weißbach, 1993)

Keimgruppe	Verhalten zum Luftsauerstoff	Aktivitätsgrenze bei pH
Milchsäurebakterien	fakultativ anaerob	3,6
<i>Bacillus</i> -Arten	aerob	4,5
Enterobacteriaceae	fakultativ anaerob	4,3
<i>Clostridium</i> -Arten	obligat anaerob	4,2
Schimmelpilze	aerob	3,0
Hefen	fakultativ anaerob	2,2

### *Gärverlauf*

Der Verlauf der Gärfutterbereitung kann in 4 Abschnitte untergliedert werden, nämlich in die „aerobe Phase“, die „Fermentationsphase“, die „stabile Phase“ und die „Entnahmephase“ (Bauer, 2004).

Erstere ist vom raschen Abfall des Sauerstoffpartialdrucks nach Luftabschluss gekennzeichnet. Der pH-Wert, wie auch der Gehalt an Milchsäure bleiben relativ unverändert. Aerobe Mikroorganismen werden in dieser Phase inaktiviert (Tabelle 2).

In der Fermentationsphase kommt es durch den Stoffwechsel verschiedener anaerober Mikroorganismen zur Erhöhung des Gehalts an organischen Säuren (z.B. Ameisensäure, Essigsäure, Propionsäure, Buttersäure oder Milchsäure) und auch anderer organischer Substanzen. In dieser Phase sinkt der pH-Wert in der Silage ab, so dass das Wachstum der meisten Bakterien unterdrückt wird. Aus energetischer Sicht ist der Abfall des pH-Werts idealerweise eng verknüpft mit dem Anstieg der Milchsäurekonzentration. Sinkt der pH-Wert in dieser Phase nicht ausreichend schnell ab, besteht die Gefahr einer Fehlgärung durch das Wachstum von Clostridien. Stoffwechselprodukte dieser Bakterien gefährden die Gesundheit der Nutztiere und die Qualität der tierischen Produkte (Müller und Bauer, 2006).

Sind der pH-Wert der Silage und der Sauerstoffpartialdruck ausreichend abgesenkt, befindet sich die Silage in der sogenannten „stabilen Phase“. Die Aktivität der Mikroorganismen ist stark eingeschränkt, so dass die Silage haltbar ist. Säuretolerante Enzyme spalten jedoch weiterhin Strukturkohlenhydrate und verschiedene bakterielle Enzyme (Proteasen, Ureasen u.a.) wandeln Stickstoffverbindungen langsam in Ammoniak um. Dieser Zustand besteht bis zum vollständigen Verbrauch der fermentierbaren Kohlenhydrate.

Die Entnahmephase ist durch den Anstieg des Sauerstoffpartialdrucks an der Anschnittstelle gekennzeichnet. Aerobe Mikroorganismen wie Hefen, Schimmelpilze oder Essigsäurebakterien werden reaktiviert. Diese sind in der Lage die organischen Säuren zu verstoffwechseln. Folglich steigt der pH-Wert im Futterstock an und das Wachstum weiterer Mikroorganismen wird ermöglicht. Im Bereich des Anschnitts fällt daher der Futterwert und steigt die Temperatur. In anaeroben Bereichen kann es auch zur Vermehrung von Clostridien kommen (Pahlow, 2006).

### *Milchsäuregärung*

Die Milchsäuregärung stellt die energetisch effektivste Form der Gärung dar (Abbildung 1). Auch der pH-senkende Effekt ist für Milchsäure ( $pK_s = 3,86$ ) am größten. Homo- oder heterofermentative Milchsäurebakterien (MSB) der Gattungen *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus* und *Leuconostoc*, welche zu unterschiedlichen Keimzahlen auf dem Ausgangsmaterial vorkommen, sind dort daher erwünscht.



Glucoseabbau durch Milchsäurebakterien				
homofermentativ				
$C_6H_{12}O_6$	$\longrightarrow$	$2 C_3H_6O_3$		$\uparrow$
2822 kJ/mol		2 x 1365 kJ/mol		92 kJ
heterofermentativ				
$C_5H_{10}O_5$	$\longrightarrow$	$C_3H_6O_3 +$	$C_2H_4O_2$	$\uparrow$
$C_6H_{12}O_6$	$\longrightarrow$	$C_3H_6O_3 +$	$C_2H_6O + CO_2$	$\uparrow$
"Fehlgärungen"				
saccharolytischer Buttersäurebakterien				
$C_6H_{12}O_6$	$\longrightarrow$	$C_4H_8O_2 +$	$2 CO_2 + H_2$	$\uparrow$
2822 kJ/mol		2194 kJ/mol		628 kJ
$2 C_3H_6O_3$	$\longrightarrow$	$C_4H_8O_2 +$	$2 CO_2 + H_2$	$\uparrow$
proteolytischer Buttersäurebakterien				
Aminosäure	$\xrightarrow{+ H_2}$	Carboxysäure +	$NH_3$	Desaminierung
Aminosäure	$\longrightarrow$	Amin +	$CO_2$	Decarboxylierung

Abbildung 1: Bakterielle Stoffwechselforgänge in Silage

MSB sind in der Lage pflanzliche Zucker wie Glukose oder Fruktose so zu vergären, dass als Reaktionsprodukte ein (heterofermentative Milchsäuregärung), oder im Idealfall zwei (homofermentative Milchsäuregärung) Milchsäuremoleküle entstehen. Als Beiprodukte entstehen häufig energetisch weniger hochwertige Säuren wie Essigsäure, zudem ein- oder mehrwertige Alkohole (z.B. Ethanol, Propandiol) und Gase wie  $CO_2$  (Müller und Bauer, 2006). Die Effektivität der MSB hängt stark vom möglichen Gasaustausch ab, da ein streng anaerobes Milieu eine Voraussetzung der Milchsäuregärung ist. Der epiphytische Besatz mit MSB unterliegt zwar jahreszeitlichen und Ausgangssubstanz bedingten Schwankungen, ist aber nicht ausschlaggebend für eine erfolgreiche Silierung, vielmehr das Erreichen eines günstigen Welkegrades (Weißbach, 1993). Zu späteren Zeitpunkten kann die Milchsäure wiederum als Substrat für weitere Stoffwechselforgänge dienen und abgebaut werden (Abbildung 1). Mit dem Abbau der Milchsäure geht eine Erhöhung des pH-Werts einher. Dies ermöglicht wiederum das Wachstum obligat oder fakultativ anaerober Keime.

### *Essigsäuregärung*

Essigsäure besitzt einen höheren pKs-Wert (4,75) als Milchsäure und ist daher die schwächere Säure. Sie wird durch verschiedene Bakterien unter dem Einfluss von Luftsauerstoff aus Zuckern hergestellt. Die Reaktion stellt eine unvollständige Oxidation dar und ist keine Gärung im eigentlichen Sinn. Eine Ausnahme ist die Homoacetatgärung, welche auch unter vollständig anaeroben Bedingungen ablaufen kann und beispielsweise von Vertretern der Gattung *Clostridium* betrieben wird. Auch bei der Essigsäureproduktion tritt eine effektive Senkung des pH-Werts und Wachstumshemmung von aeroben Sporenbildnern wie z.B. *Bacillus* spp. ein. Ein Verhältnis der Milchsäure zu Essigsäure von 3:1 wird als optimal angesehen, wobei eine Erhöhung des Verhältnisses auf homofermentative Milchsäuregärung hindeutet (DLG, 2006).

### *Buttersäuregärung*

Neben der Fähigkeit zur Homoacetatgärung besitzen saccharolytische Clostridien die Eigenschaft, als Hauptprodukt ihres Stoffwechsels Buttersäure zu bilden (Abbildung 1). Die Produktion dieser organischen Säure vermindert nicht nur den Futterwert beträchtlich, sie führt aufgrund des ranzigen Geruchs zu verminderter Futteraufnahme (Spiekers, 2006). Da Clostridien auch bei relativ niedrigen pH-Werten ( $\geq$  pH 4,2) ihren Stoffwechsel aufrecht erhalten können (Groß und Riebe, 1974), ist bei Ausgangssubstraten mit einer hohen Pufferkapazität besonders auf eine schnelle und nachhaltige pH-Absenkung bei der Silierung zu achten. Diese Absenkung muss dabei umso stärker ausfallen, je feuchter das Ausgangsmaterial ist. Buttersäuregehalte über 3 g/kg TM deuten auf eine bereits deutlich verminderte Silagequalität hin (DLG, 2006).

Clostridien, im Besonderen *C. tyrobutyricum*, können zu sogenannten späten Blähungen bei der Käseherstellung und *C. botulinum* zu schweren Intoxikationskrankheiten bei Nutztieren führen. Da Clostridien ubiquitär im Boden anzutreffen sind, liegt das größte Potential zur Vermeidung einer durch Clostridien bedingten Fehlgärung in der Bergung von möglichst sauberem Futter (Müller und Bauer, 2006).

### *Nacherwärmung*

Das Phänomen der Nacherwärmung basiert auf der Präsenz vermehrungsfähiger Einheiten Milchsäure abbauender Hefen und speziell in Maissilagen auch Essigsäurebakterien. Der pH-Wert der Silage ist im Wesentlichen nicht ausschlaggebend, da diese Mikroorganismen auch unter sauren Bedingungen überdauern oder wachsen können (Tabelle 2).

Der Entzug von Luftsauerstoff hemmt die Keimvermehrung, die Mikroorganismen überdauern jedoch bis zur Eröffnung des Silostocks. Der anschließende Luftzutritt ermöglicht eine temperaturabhängig rasche Vermehrung der Keime an der Oberfläche. Restzucker und hohe Stärkegehalte fördern das Wachstum zusätzlich.

Tabelle 3: Einteilung der in Silagen vorkommenden Hefen nach deren Stoffwechsellleistungen (nach Pahlow, 1991)

Hefegruppe	Substrate		Sauerstoffbedarf
	wasserlösliche Zucker	organische Säuren	
Feldhefen	+	-	+
Silagehefen Typ I	+	-	±
Silagehefen Typ II	+	+	±

Typ I: anaerobe Zuckervergärung

Typ II: aerober Lactat- und Acetat-Abbau

Substrate: + = wird vorwiegend verwertet; - = wird nicht verwertet

Sauerstoffbedarf: + = erforderlich; - = fakultativ anaerob

Bei schlecht verdichteter Silage kommt es zu einem verstärkten Gasaustausch zwischen Silage-Innerem und der Außenluft. Hefen und Schimmelpilze wachsen in diesen belüfteten Bereichen verstärkt und führen so zum lokalen Verderb der Silage. Das Wachstum der Mikroorganismen ist durch eine stoffwechselbedingte Erhöhung der Silagetemperatur zu erkennen (Pahlow, 2006). Man spricht in diesem Zusammenhang von Nacherwärmung, sobald sich die Silage deutlich (5 K) gegenüber der Umgebungstemperatur erwärmt hat (Spiekers, 2002; Pahlow, 2006). Der Verlust an Energie (Wärme), Trockenmasse und Nährstoffen kann infolge der aeroben Stoffwechselaktivität beträchtlich sein (Spiekers, 2006; Pahlow, 2006).

Pahlow (1991) teilte in Silagen vorkommende Hefen in drei Gruppen ein (Tabelle 3). Für das Nacherwärmungsgeschehen sind jedoch lediglich Hefen vom Typ II von grundlegender Bedeutung, da sie durch den Abbau kurzkettiger organischer Säuren die Bedingungen für weiteres mikrobielles Wachstum schaffen. Neben Hefen kommen jedoch auch Bakterien der Gattung *Acetobacter* in Silagen vor, welche durch den Umbau von Alkohol zu Essigsäure bzw. nach dem Verbrauch des Alkohols den Abbau von Essigsäure und Milchsäure ebenfalls zur verminderten Haltbarkeit beitragen (Pahlow, 1991). Neben Wärme werden hierbei große Mengen an Kohlendioxid und Wasser frei.

#### *Silierhilfen/Siliermittel*

Als natürliches Substrat für die Milchsäuregärung dient Zucker. Der Gehalt an Rohprotein einer Pflanze steht einer schnellen Ansäuerung entgegen. Daher unterscheidet sich Pflanzenmaterial hinsichtlich der Eignung zur Silierung beträchtlich. Die Wahrscheinlichkeit einer erfolgreichen Silagebereitung kann unter Zuhilfenahme des ermittelten kritischen pH-Werts errechnet werden. Dieser dient auch als Entscheidungshilfe für den Einsatz von Silierhilfen (Weißbach, 1993).

Grundsätzlich hat ein Siliermittel die Funktion das Wachstum unerwünschter Mikroorganismen zu unterdrücken und somit Fehlgärungen und aeroben Verderb zu vermeiden (Tabelle 4). Es werden drei Kategorien der wirksamen Bestandteile unterschieden: die Bakterienpräparate, Siliersalze und Siliersalzlösungen sowie die Siliersäuren (Kalzendorf, 2006). Mit dem Einsatz dieser Silierhilfen können vom Ausgangsmaterial abhängige, unterschiedliche Ziele angestrebt werden, um eine stabile Silage zu erhalten (Müller und Bauer, 2006).

Tabelle 4: Systematik der Siliermitteltypen nach Wirkungsrichtung und Wirkprinzip (nach Kalzendorf, 2006)

Kategorie	Wirksame Bestandteile	Wirkprinzip	Anwendungsbereich
<b>1. Siliermittel zur Verbesserung der Gärverlaufs</b>			
Bakterienpräparate	Homofermentative MSB verschiedener Gattungen und Arten	Beschleunigte Milchsäurebildung und pH-Absenkung	Leicht bis mittelschwer vergärbare Siliergut, TM max. 5% unter TMmin
Siliersalze und -salzlösungen	Konservierungsstoffe und Mischungen daraus mit spez. Hemmung von Fehlgärungserregern (z.B. Formiat, Propionat, Nitrit u.a.)	Hemmung der Fehlgärungserreger und indirekte Förderung der Milchsäuregärung	Mittelschwer und schwer vergärbare Siliergut, TM max. 10% unter TMmin
Siliersäuren	Konzentrierte org. Säuren, z.B. Ameisensäure, auch in Mischungen mit anderen org. Säuren	Direkte pH-Absenkung, schränkt Gärungs- und Fehlgärungsprozesse ein	Mittelschwer und schwer vergärbare Siliergut, TM max. 10% unter TMmin
<b>2. Siliermittel zur Verbesserung der aeroben Stabilität</b>			
Bakterienpräparate	Heterofermentative MSB	Produktion von Essigsäure zur Hemmung der Hefen	Leicht vergärbare Siliergut mit hohem TM-Gehalt (Mais, stark angewelktes Gras)
Siliersalze und -salzlösungen	Konservierungsstoffe und Mischungen daraus mit spez. Hemmung von Hefen und Schimmelpilzen (z.B. Acetat, Propionat u.a.)	Hemmung von Hefen und Schimmelpilzen durch die freigesetzten Säuren	Leicht vergärbare Siliergut mit hohem (Mais, stark angewelktes Gras) und niedrigem TM-Gehalt (Schlempe, Treber u.a.)
Siliersäuren	Konzentrierte org. Säuren, z.B. Ameisensäure, auch in Mischungen mit anderen org. Säuren	Direkte Hemmung der Hefen und Schimmelpilze	Leicht vergärbare Siliergut mit hohem (Mais, stark angewelktes Gras) und niedrigem TM-Gehalt (Schlempe, Treber u.a.)

## 2 Schimmelpilze in Silagen

Das Vorkommen von „wenigen“ Schimmelpilzsporen und -myzelfragmenten in Futtermitteln ist aufgrund deren ubiquitärer Verbreitung als „normal“ anzusehen. Das Wachstum der Schimmelpilze in Silage ist jedoch aus zwei Gründen nicht erwünscht. Zum einen verliert die Silage durch den Nährstoffverbrauch des Pilzes an Futterwert, da energiereiche Bestandteile wie Zuckerverbindungen zu energieärmeren umgewandelt werden. Zum anderen stellt das Pilzwachstum in Silagen eine direkte Gefahr für die Gesundheit des Tieres und eventuell des Menschen dar. Schimmelpilze sind bekannt als mögliche Auslöser von Allergien und können schwer behandelbare Infektionen verursachen. Darüber hinaus werden im Sekundärstoffwechsel dieser Mikroorganismen Verbindungen gebildet, welche teilweise sehr toxisch auf höhere Lebewesen wirken können.

Im erntefrischen Zustand besteht die Keimflora von Futtermitteln in der Regel aus der Primärflora der Feldfrüchte. Rund 50 verschiedene Schimmelpilzgattungen sind hierbei anzutreffen (Gedek et al., 1981). Zu den Feldpilzen gehören vor allem die *Fusarium*-Arten sowie auch Vertreter der Gattungen *Acremonium*, *Alternaria* oder *Claviceps*. Nachdem durch die konservierenden Maßnahmen die Zahl und Vielfalt stark reduziert wurde, besteht die Keimflora von Silagen vorwiegend aus saprophytär lebenden Hefen und einigen wenig anspruchsvollen Schimmelpilzen bzw. deren Konidien. Zu diesen sogenannten Lagerpilzen zählen neben den Gattungen *Penicillium*, *Mucor*, *Absidia*, *Trichoderma*, *Alternaria* oder *Rhizopus* auch die Aspergilli und deren häufigster Vertreter *Aspergillus fumigatus* (Gedek et al., 1981).

Feldpilze sind nach einer erfolgreichen Silierung nicht mehr in keimfähigem Zustand in Silagen enthalten und führen somit zu keiner weiteren Erhöhung des Mykotoxingehalts. Bereits vorhandene Toxine bleiben teilweise jedoch unverändert enthalten (Adler, 2002). Wie beim Getreide und Mischfutter (Scudamore et al., 1998), sind Kontaminationen mit sekundären Stoffwechselmetaboliten der Feldpilzflora auch in Silagen optisch meist nicht erkennbar. Die Trichothecene und Fumonisine, welche vorwiegend von *Fusarium*-Arten stammen, zählen dabei zu den am häufigsten enthaltenen Mykotoxinen.

Einige Gattungen der Lagerpilzflora, darunter *Penicillium*, *Aspergillus*, *Monascus*, *Mucor* oder *Byssochlamys* bzw. *Paecilomyces* erhalten auch unter sauerstoffarmen Bedingungen ihren Stoffwechsel aufrecht. Sie stellen nach Eröffnung des Silos die typische Schimmelpilzflora bzw. „Reliktflora“ dar (Pelhate, 1977; Gedek, 1980). *Penicillium*, insbesondere *P. roqueforti*, stellte in zahlreichen mykologischen Untersuchungen von Gärfuttermitteln die am häufigsten nachgewiesene Schimmelpilzgattung dar (Amend, 1990; Adler, 1993; Nout et al., 1993; Auerbach, 1996; Schneewis, 2000) (Tabelle 5).

Tabelle 5: Mykologische Befunde bei Untersuchungen von siliertem pflanzlichen Material verschiedener geographischer Herkunft

Silage			Schimmelpilze [%]					Literatur	
Herkunft	Art	Qualität	<i>Penicillium</i> spp.	<i>Aspergillus</i> spp.	<i>Monascus</i> spp.	<i>Mucoraceae</i>	<i>Byssochlamys/ Paecilomyces</i> spp.	<i>Scopulariopsis</i> spp.	
Süddeutschland	GS + MS	k.P.	39,2	7,3	1,5	15,8	1,5/-	1,2	Gedek, 1981
Stuttgart	MS + CCM	P.	88,9	5,6	11,1				Amend, 1990
Süddeutschland	MS + GS + CCM	k.P.	32,4	29,7	12,6	33,3	0,9	1,8	Armbruster, 1994
Süddeutschland	MS + GS	P. + k.P.	52,8	15,0	18,5	24,9		6,8	Schneweis, 2000
Deutschland	MS + GS	P. + k.P.	38,8	9,3	12,4	36,4	10,1/-	11,6	Frevel, 1985
Norddeutschland	MS + GS	P. + k.P.	89,4	3,0	3,0	16,7			Auerbach, 1996
Österreich	MS + GS	k.P.	34,7			6,4			Adler, 1993
Niederlande	Zuckerrübe	P.	40,0	8,0	4,0	23,0	4,0/-		Nout et al., 1993
Frankreich	MS	k.P.	76,0	21,0	31,0	96,0	41,0/27,0		Pelhate, 1975/77
Ägypten	MS		100	100					El-Shanawany et al., 2005
Argentinien	MS	k.P.	82,0	41,0		45,0			Tapia et al., 2005
Irland	GS-Ballen	P. + k.P.	86,0						O'Brien et al., 2005
Argentinien	MS		33,3	78,0		50,0			Gonzalés-Pereyra et al., 2007
Frankreich	MS + GS + Hirse		88,0	47,0	35,0	82,0	35,0/-	35,0	Escoula, 1972
Dominante Schimmelpilzart			<i>P. roqueforti</i>	<i>A. fumigatus</i>	<i>M. purpureus</i>	<i>Mucor hiemalis</i>	<i>B. nivea/P. varioti</i>	<i>S. brevicaulis</i>	

GS = Grassilage; MS = Maissilage; CCM = Corn Cob Mix; k.P. = kein Pilzbefall; P. = Pilzbefall

Die meisten der bislang durchgeführten Untersuchungen zu dem Bereich „Mykotoxine-Silagen“ befassten sich mit dem Toxinbildungsvermögen der aus den Silagen isolierten Pilzstämme (Cole et al., 1977b; Gedek et al., 1981; dos Santos et al., 2003). Die isolierten Stämme von *A. fumigatus* und *P. roqueforti* produzierten auf den jeweiligen Medien Stoffe wie Verruculogen, Fumitremorgen B, Gliotoxin, Fumagillin, Helvolsäure bzw. Roquefortin C (Tüller, 1994; Auerbach, 1996; El-Shanawany et al., 2005; Boudra und Morgavi, 2005). Die Bildung von Mykotoxinen in Maissilagen konnte unter Laborbedingungen demonstriert werden (Müller und Amend, 1997). Die Autoren inokulierten Gärfutterproben mit *P. roqueforti* und wiesen darin nach aerober Lagerung Mykophenolsäure, Patulin, Penicillinsäure und PR Toxin nach. In den Untersuchungen zur Kontamination von Silagen mit Mykotoxinen unter praktischen Bedingungen wurden in der Regel Stoffwechselprodukte von *Penicillium* und *Monascus*-Spezies nachgewiesen (Auerbach et al., 1998; Schneweis et al., 2000; Schneweis et al., 2001; O'Brien et al., 2006; Mansfield et al., 2008), nur selten gelang dies für *Aspergillus*-Toxine (Richard et al., 2007; Driehuis et al., 2008) (Tabelle 6). Die beschriebenen Untersuchungen basierten im Wesentlichen auf dünnschichtchromatographischen (DC), gaschromatographischen (GC) oder hochleistungsflüssigkeitschromatographischen (HPLC) Methoden sowie immunologischen Verfahren (ELISA). Chromatographische Methoden wurden meist in Verbindung mit UV- bzw. fluoreszenzbasierten Detektionssystemen entwickelt und angewandt, welche hinsichtlich der Nachweisbarkeit verschiedener Mykotoxine deutliche Unterschiede aufweisen (Scudamore, 2005).

*Aspergillus* zählt ebenfalls zu den dominanten Schimmelpilzgattungen bei mykologischen Untersuchungen von Gärfuttermitteln. In weiter südlich gelegenen Ländern ist die Gattung in Gärfuttermitteln stärker verbreitet als in nördlichen. Mykologische Untersuchungen in Ägypten zeigten, dass dort mindestens die Hälfte der Silagen Aspergillen enthalten, mit hohen Anteilen von *A. flavus* und *A. fumigatus* (El-Shanawany et al., 2005). Auch in Indien und Argentinien konnten häufig Schimmelpilze der Gattung *Aspergillus* in Futtermitteln nachgewiesen werden (Mor und Singh, 2000; Tapia et al., 2005). O'Brien et al. (2005) isolierten aus 64 irischen Grassilagen (Ballenwickelsilage) dagegen keine Vertreter dieser Gattung.

Auch innerhalb Deutschlands zeigte sich bei der Untersuchung von Silagen ein Süd-Nord-Gefälle hinsichtlich der Prävalenz von Aspergillen in Gärfuttermitteln. Das hoch kanzerogene *Aspergillus*-Toxin Aflatoxin B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) konnte bislang nur in wärmeren Klimaregionen in Silagen nachgewiesen werden (Garon et al., 2006; González Pereyra et al., 2007).

Einen besondereren Vertreter der Gattung *Aspergillus* stellt die Spezies *A. fumigatus* dar. Diese wurde in der Vergangenheit häufig aus Silagen isoliert und beschrieben (Escoula et al., 1972; Pelhate, 1977; Gedek et al., 1981; Dutkiewicz et al., 1989; Schneweis, 2000; dos Santos et al., 2003; El-Shanawany et al., 2005; O'Brien et al., 2005; Garon et al., 2006; Richard et al., 2007; González Pereyra et al., 2007).

Tabelle 6: Ausgewählte mykotoxikologische Untersuchungen von Silagen

Silageart	Anzahl	Analyten	Methode	Literatur
Gras- und Maissilage	47	DON, ZEA, Roquefortin, Mykophenolsäure u.a.	HPLC-MS/MS	Driehuis et al., 2008
Maissilage	120	Roquefortin, Mykophenolsäure u.a.	HPLC-MS	Mansfield et al., 2008
Maissilage	60	AFB1, ZEA, DON, FB1	HPLC	González Pereyra et al, 2007
Maissilage	2	Citrinin, Gliotoxin, DON	HPLC-MS	Richard et al., 2007
Grassilageballen	5	Mykophenolsäure, Roquefortin, Festuclavin u.a.	HPLC-MS	O'Brien et al., 2006
Maissilage	9	AFB1, Citrinin, ZEA, DON	HPLC-MS	Garon et al., 2006
Gras- und Maissilage	233	Monacolin K, Mykophenolsäure, Citrinin	HPLC-MS	Schneweis, 2000
Gras- und Maissilage	24	Roquefortin	HPLC-UV	Auerbach et al., 1998
artifiziell kontaminierte Maissilage	8	Verruculogen, Fumitremorgen B	HPLC-UV	Tüller, 1994
verschiedene Gras- und Maissilage	111	Roquefortin	HPLC-UV	Armbruster, 1994



Schneweis et al. (2000) fanden in 9 % bayerischer Silagen *A. fumigatus*. Frühere Untersuchungen führten zu ähnlichen Ergebnissen (Frevel et al., 1985; Amend, 1990; Armbruster, 1994). In Norddeutschland scheint dagegen eine geringere Prävalenz von *A. fumigatus* vorzuliegen (Auerbach, 1996). In den USA wurde *A. fumigatus* bereits im Zusammenhang mit dem Krankheitsgeschehen in Rinderherden in Verbindung gebracht (Smith und Lynch, 1973; Cole et al., 1977a) und gilt als Produzent einer ganzen Reihe von teils toxischen Verbindungen (Cole et al., 1977a; Cole et al., 1977b; Cole und Cox, 1981; Cole et al., 2003). Daher werden diese Schimmelpilzspezies und deren sekundäre Stoffwechselmetaboliten im Folgenden genauer beschrieben.

### 3 *Aspergillus fumigatus*

#### 3.1 Eigenschaften und Verbreitung

Bei *A. fumigatus* handelt es sich um einen saprophytären Schimmelpilz, dessen ökologische Nische der Boden ist. Aufgrund der leichten Verbreitung der sehr kleinen Sporen ist er allerdings auf einer Vielzahl verschiedener Medien zu finden (Latgé, 1999; Rementeria et al., 2005).

Auch unter extremen Bedingungen ist der Schimmelpilz überlebens- und wachstumsfähig (Domsch et al., 1993). Er wurde auf und im Erdboden auf unterschiedlichsten Materialien gefunden. Aus erwärmtem Heu und Mais, Kompost sowie Silagen wurde *A. fumigatus* isoliert. Im Boden wurden auch in 45 cm Tiefe noch keimfähige Teile des Schimmelpilzes nachgewiesen (Domsch et al., 1993).

Die Verbreitung erfolgt über Sporen oder andere keimfähige Zellen. Die Konidio- bzw. Exosporen haben einen Durchmesser von weniger als 3 µm, sind sehr leicht und werden daher mit der Luft über weite Strecken transportiert (Latgé, 1999; Rementeria et al., 2005). Bei geeigneten Umweltbedingungen kommt es zur Keimung, der Ausbildung eines Keimschlauchs und zur Bildung von neuen Hyphen und Myzel durch einfache Zellteilung. Gießkannenförmige Konidiophoren (Abbildung 2) werden gebildet, an welchen neue haploide, durch mitotische Teilung entstandene Exosporen reifen (ca. 10<sup>9</sup> Keimbildende Einheiten (KBE)/cm<sup>2</sup> Kulturoberfläche (Panaccione und Coyle, 2005)). Diese werden durch biotische (Insekten o.ä.) oder abiotische (Wind, Regen, Substratbewegung) Faktoren weiter verbreitet (Latgé, 1999). In normaler Außenluft konnten von *Aspergillus fumigatus* bis zu 200 KBE/m<sup>3</sup> gemessen werden (Solomon und Burge, 1984).

Im Gegensatz zu anderen Saprophyten verfügt *A. fumigatus* nicht über Ligninperoxidasen oder Manganperoxidasen, welche zum Ligninabbau benötigt werden. Daher verbessert der Aufschluss des Rohmaterials durch andere Mikroorganismen die Nährstoffverfügbarkeit für den Schimmelpilz (Beffa et al., 1994; Tekaia und Latgé, 2005).

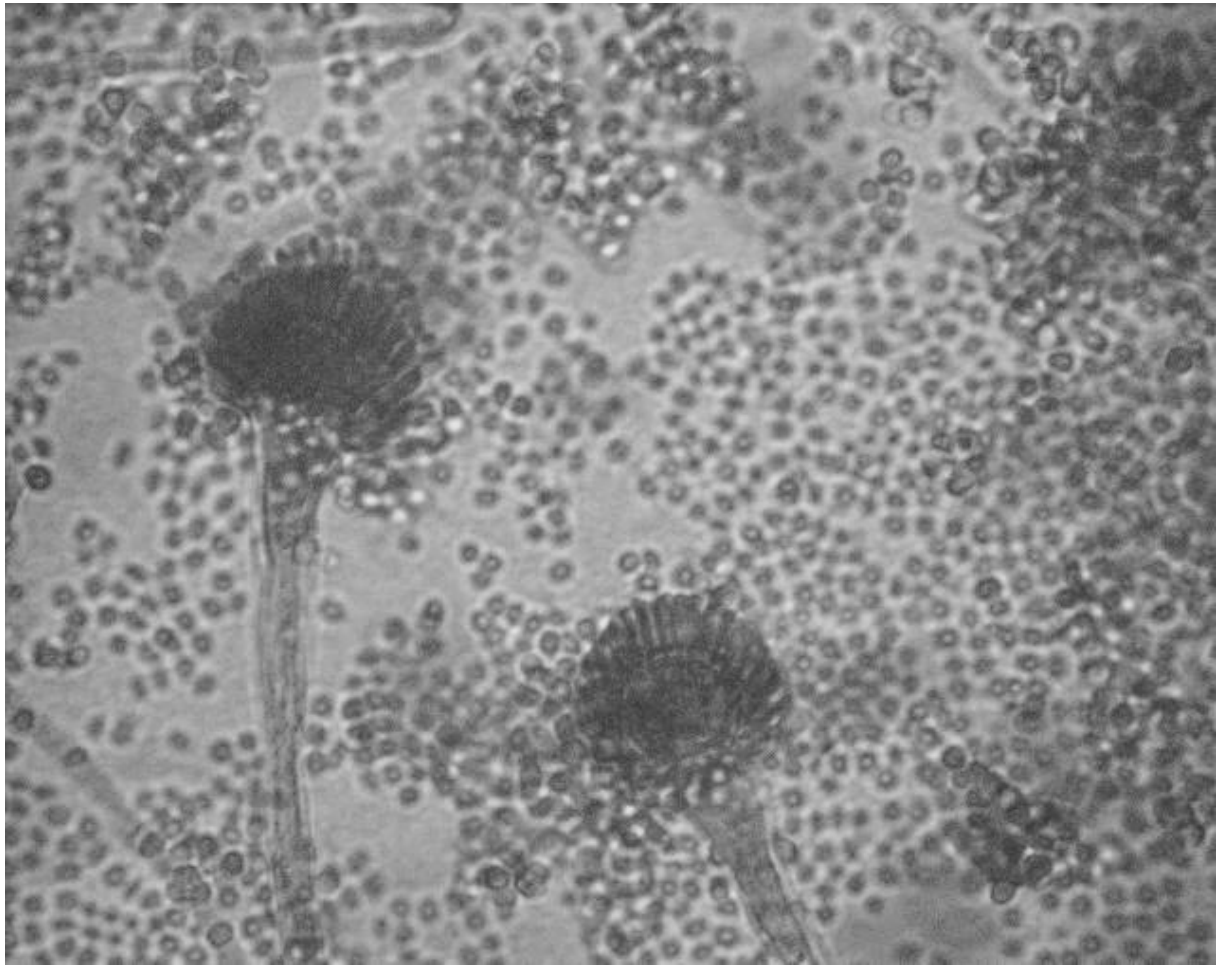


Abbildung 2: Mikroskopische Aufnahme (x 1000) eines Abklatschpräparats einer *Aspergillus fumigatus*-Kultur (auf SAB)

Die hohe Thermotoleranz, welche ein Wachstum zwischen 12 und 55 °C ermöglicht, ist besonders bei der Besiedelung von sich durch aeroben, mikrobiellen Abbau erwärmenden Medien wie Biomüll, Kompost oder von zur Trocknung erwärmten Medien wie Heu von Vorteil (Lacey und Crook, 1988; Domsch et al., 1993; Göttlich et al., 1994; Fischer et al., 1998; Ryckeboer et al., 2003; Tekaiia und Latgé, 2005). Es ist daher nicht verwunderlich, dass diese Schimmelpilzspezies häufig auf Silagen zu finden ist. Vor allem in wärmeren Regionen ist er aufgrund der hohen Thermotoleranz und des schnellen Wachstums konkurrenzfähig.

### 3.2 Phylogenetische Einordnung

Nach der mykologischen Klassifizierung ist der saprophytär lebende, bodenbürtige und ubiquitäre Schimmelpilz der Gattung *Aspergillus* (Gießkannenschimmel) zuzuordnen, welche wiederum der Familie der *Trichocomaceae* angehört (Tabelle 7).

Die Art *Aspergillus fumigatus* verfügt lediglich über eine asexuelle Vermehrungsform (Anamorph). Eine morphologisch sehr ähnliche, aber sexuelle Form (Teleomorph) ist

*Neosartorya fischeri*. Nachdem das Genom von *A. fumigatus* (Stamm Af293) vollständig sequenziert wurde (Nierman et al., 2005b), konnte allerdings bewiesen werden, dass die genetische Ähnlichkeit der beiden Spezies eher gering ist. Das Genom des klinischen *A. fumigatus*-Isolats Af293 ist 29,4 Megabasen (Mb) groß und besteht aus acht Chromosomen mit Größen zwischen 1,8 und 4,9 Mb. Etwa einem Drittel der Gene ließ sich bislang keine Funktion zuordnen (Ronning et al., 2005; Nierman et al., 2005a; Nierman et al., 2005b).

Tabelle 7: Klassifizierung von *Aspergillus fumigatus* (Latgé, 1999)

Reich:	Fungi
Abteilung/Stamm:	Ascomycota
Klasse:	Eurotiomycetes
Unterklasse:	Eurotiomycetidae
Ordnung:	Eurotiales
Familie:	Trichochoomaceae
Gattung:	<i>Aspergillus</i>
Art:	<i>Aspergillus fumigatus</i>

### 3.3 Sekundäre Stoffwechselmetaboliten

Das Toxinbildungsvermögen von *Aspergillus fumigatus* wurde bereits mehrfach beschrieben (Cole et al., 1977a; Cole et al., 1977b; Gedek et al., 1981; Land et al., 1993; Fischer et al., 1999; dos Santos et al., 2003; Garon et al., 2006; Larsen et al., 2007). Es zeigte sich, dass eine große Bandbreite von Stoffen gebildet werden kann. Einige wichtige sind im Folgenden näher charakterisiert.

#### 3.3.1 Gliotoxin

Gliotoxin (Abbildung 3) ist ein von den Aminosäuren Phenylalanin und Serin hergeleitetes Mykotoxin der Epipolythio-Dioxopiperazine (Beecham et al., 1966) mit antimikrobieller wie auch immunmodulatorischer Aktivität. Es wurde erstmals 1936 aus einer Kultur von *Trichoderma* sp. isoliert und beschrieben (Weindling und Emerson, 1936).

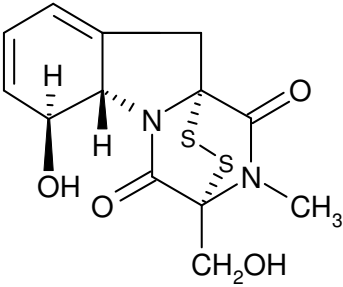
	
Molekulargewicht (MW):	326,0393
Summenformel:	C <sub>13</sub> H <sub>14</sub> O <sub>4</sub> S <sub>2</sub>
Chemische Charakteristika:	Smp 221 °C [α] <sub>589 nm</sub> -840° (C = 0,103 in Chloroform); -936° (C = 0,0675 in Dioxan)
UV Daten:	λ <sup>EtOH</sup> <sub>max</sub> nm (ε): 216 (2900) und 272 (6300)
CD Daten:	Δε (methanolische Lösung) nm: 234(-30) und 270 (+7,7)
Produzenten:	<i>Penicillium terlikowskii</i> <i>P. obscurum</i> <i>Aspergillus terreus</i> <i>A. chevalieri</i> <i>A. fumigatus</i> <i>Gliocladium fimbriatum</i> ( <i>Trichoderma viride</i> )
Toxizität:	starke antibiotische, sowie antimyzetische, antivirale und immunsuppressive Wirkungen
LD <sub>50</sub> Dosis:	Kaninchen = 45 mg/kg, Mäusen = 50 mg/kg, Ratten = 50-65 mg/kg.

Abbildung 3: Strukturformel und charakteristische Daten von Gliotoxin (Cole und Cox, 1981)

Neben *A. fumigatus* sind auch andere *Aspergillus*-Arten zur - wenn auch verminderten - Gliotoxinbildung fähig (Lewis et al., 2005b). Die antibiotische Wirksamkeit, welche vom Vorhandensein der Disulfid- oder Cystingruppe am Piperazinring abhängig ist (Gardiner et al., 2005), wurde zuerst erkannt. Später, 1943, stellten Johnson et al. eine hemmende Wirkung des Gliotoxins auf das Wachstum von Pilzen fest. Auch eine antivirale Wirksamkeit, welche auf der Hemmung der reversen Transkriptase beruht (de Clercq et al., 1978), konnte nachgewiesen werden (Johnson et al., 1943; Larin et al., 1965).

Eine Vielzahl weiterer Eigenschaften wurden nach den Untersuchungen verschiedener Autoren für Gliotoxin beschrieben werden. Es handelt sich dabei um immunsuppressive (Müllbacher und Eichner, 1984; Müllbacher et al., 1985; Sutton et al., 1994; Yamada et al., 2000; Spikes et al., 2008), DNS-brechende (Braithwaite et al., 1987), zytotoxische (Müllbacher et al., 1986; Richard et al., 1994; Piva, 1994; Richard et al., 1996; Zhou et al., 2000; Wenehed et al., 2003), antibiotische (Brewer et al., 1967), apoptotische (Waring et al., 1988; Upperman et al., 2003) und neurotoxische (Wenehed et al., 2003) Wirksamkeiten. Gliotoxin hemmt die Proteinbiosynthese (Eichner et al., 1986) und steht im Verdacht eine allergiefördernde Wirkung zu besitzen (Wichmann et al., 2002). Darüber hinaus wird durch Gliotoxin die ziliäre Schlagfrequenz verlangsamt, ein sehr wichtiger Abwehrmechanismus der Atemwege gegen die Ansiedelung von Mikroorganismen (Amitani et al., 1995).

Die zytotoxische Wirksamkeit von Gliotoxin wurde an Makrophagen (Müllbacher et al., 1986), Nager-Fibroblasten- ( $IC_{50} = 0,1 \mu\text{g/ml}$ ) und Neuroblastenzellen ( $IC_{50} = 0,4 \mu\text{g/ml}$ ) (Piva, 1994; Büniger et al., 2004), Truthuhn-Lymphozyten ( $LD_{100} < 100 \text{ ng/ml}$ ) (Richard et al., 1994), porcinen Nierenzellen ( $LD_{100} = 1,2 \mu\text{g/ml}$ ) (Zhou et al., 2000), humanen Lungen- ( $IC_{50} = 0,1 \text{ mg/ml}$ ) und Leberkrebszellen ( $IC_{50} = 0,2 \text{ mg/ml}$ ) (Büniger et al., 2004) nachgewiesen.

Gliotoxin induziert primär die Apoptose phagozytischer Zellen (Notebaert et al., 2005), hemmt somit die Funktion von Monozyten, Granulozyten oder dendritischen Zellen und besitzt daher eine immunsuppressive Wirksamkeit, welche sowohl *in vitro* als auch *in vivo* nachgewiesen werden konnte (Müllbacher und Eichner, 1984; Eichner et al., 1986; Sutton et al., 1994; Stanzani et al., 2005). Auch die Aktivierung von Mastzellen und zytotoxischen T-Lymphozyten wird durch Gliotoxin unterdrückt (Yamada et al., 2000; Stanzani et al., 2005; Niide et al., 2006). Dies wurde bereits bei geringeren Gliotoxinkonzentrationen beobachtet ( $< 300 \text{ ng/ml}$ ), als sie in Sera von Patienten mit invasiver Aspergillose gemessen wurden ( $785 \text{ ng/ml}$ ) (Lewis et al., 2005a).

Die Bedeutung von Gliotoxin für die Pathogenese der Aspergillose ist nicht abschließend geklärt: erste Hinweise für eine wichtige Rolle der Verbindung bei der Besiedelung höherer Organismen durch *A. fumigatus* lieferten die Untersuchungen von Bauer et al. (1989), Korbelt et al. (1993) und Richard und DeBey (1995). Im Eutergewebe einer Kuh mit *A. fumigatus*-Mastitis wurden sehr hohe Gliotoxin-Konzentrationen von bis zu  $9,2 \text{ mg/kg}$  Eutergewebe

nachgewiesen (Bauer et al., 1989). In Lunge und Luftsäcken von mit *A. fumigatus* infizierten Vögeln wurden ebenfalls große Mengen der Verbindung (bis zu 6,8 mg/kg) detektiert (Korbel et al., 1993; Richard und Debey, 1995).

Durch die einmalige Injektion von 100 µg Gliotoxin konnte bei Mäusen ein Anstieg der Prävalenzrate künstlich induzierter Aspergillosen beobachtet werden (Sutton et al., 1996). Auch bei Wachsmotten wurde eine Korrelation von *in vitro* produzierter Menge an Gliotoxin und der Pathogenität des Schimmelpilz-Stamms festgestellt (Reeves et al., 2004).

Die entscheidende Rolle von Gliotoxin bei der Besiedelung von Wirtsgewebe durch den Schimmelpilz scheint daher unumstritten (Richard et al., 1996; Lewis et al., 2005a; Bauer und Meyer, 2006)

Versuche mit gentechnisch veränderten *A. fumigatus*-Stämmen, welche kein Gliotoxin produzieren konnten, lassen jedoch den Schluss zu, dass Gliotoxin nicht ausschlaggebend für die Entwicklung einer pulmonalen Aspergillose bei immunsupprimierten Mäusen ist (Kupfahl et al., 2006; Bok et al., 2006; Cramer, Jr. et al., 2006).

Die Ergebnisse weiterer Arbeiten zeigten hingegen eine deutliche Abhängigkeit der Pathogenität von *A. fumigatus*-Stämmen von deren Fähigkeit, Gliotoxin zu produzieren (Stanzani et al., 2005; Pardo et al., 2006; Sugui et al., 2007). Die unterschiedlichen Ergebnisse wurden mit den verschiedenen Regimen der pharmakologischen Immunsupprimierung der Versuchsmäuse begründet (Sugui et al., 2007).

Die Wirkung von Gliotoxin auf die Pansenmikrobiologie wurde *in vitro* untersucht. Es zeigte sich, dass das Toxin in seiner reinen Form nur eine sehr geringe hemmende Wirkung auf die Pansenfermentation besitzt. Bis zu einer Konzentration von 20 µg/ml wurden keine Effekte festgestellt. Mehr als 80 µg/ml Gliotoxin führten jedoch zu Veränderungen des Trockenmasseabbaus (-24 %), der Gasproduktion und der Produktion kurzkettiger Fettsäuren (-7 und -18 %). Des Weiteren wurde ein Ab- oder Umbau von Gliotoxin beobachtet. Nach sechs Stunden waren lediglich 10 % der zu Pansensaft zugegebenen Gliotoxinmenge wiederzufinden. Als Ursache wurde ein kombinierter Effekt aus biotischen und abiotischen Faktoren vermutet (Morgavi et al., 2004).

Pansenbakterien oder auch -pilze scheinen einen stark metabolisierenden Effekt auf Gliotoxin zu besitzen. Der Vergleich von nicht autoklavierter und autoklavierter Pansenflüssigkeit deutet aufgrund geringerer Toxinverluste darauf hin, jedoch zeigte auch die autoklavierte Pansenflüssigkeit metabolisierendes Potential. Dies könnte auf hitzestabile Enzyme zurückzuführen sein (Morgavi et al., 2004).

Die Zugabe von Cystein bewirkte die Umwandlung von Gliotoxin zu einer reduzierten, polareren Form. Des Weiteren konnte die Existenz von Gliotoxin-Glutathion Addukten belegt werden, welche auch in Säugerzellen gebildet werden. Die Gleichgewichtskonstante wurde mit  $1200 \pm 100 \text{ M}^{-1}$  angegeben (Bernardo et al., 2001). Die Aufnahme von Gliotoxin erfolgt in dessen oxidierten, natürlicher Form. Allerdings wird das Toxin in der Zelle reduziert, was die

Ausschleusung verhindert und zu einer Anreicherung der Substanz führt (Bernardo et al., 2003).

Eine kürzlich veröffentlichte Untersuchung belegt das Vorkommen von Gliotoxin in Maissilage (Richard et al., 2007), die höchste festgestellte Konzentration betrug dabei 877 µg/kg.

### 3.3.2 Fumagillin

Das Sesquiterpen Fumagillin (2,4,6,8-decatetraendisäure-mono-[5-methoxy-4-[2-methyl-3-(3-methyl-2-butenyl)-oxiranyl]-1-oxaspirol-[2,5]-oct-6-yl]) (Abbildung 4) wurde erstmals 1949 aus einer *Aspergillus*-Spezies als eine Substanz mit hemmender Wirkung gegenüber *Staphylococcus aureus*-Bakteriophagen isoliert (Hanson und Eble, 1949). Die festgestellte antibakterielle und fungizide Wirksamkeit war gering. Eine damals hergestellte Referenzsubstanz zeigte bei subkutaner Verabreichung an Mäuse schwache bis mittlere Toxizität ( $LD_{50} = 9,6$  mg). Die Dosis von 3 mg, jedoch nicht von 1 mg je Maus führte bei Polio- bzw. Influenzainfizierten Mäusen zu einer verminderten Letalität der Krankheiten. Später wurde gezeigt, dass auch *A. fumigatus* einer der Produzenten dieser Substanz ist (Eble und Hanson, 1951).

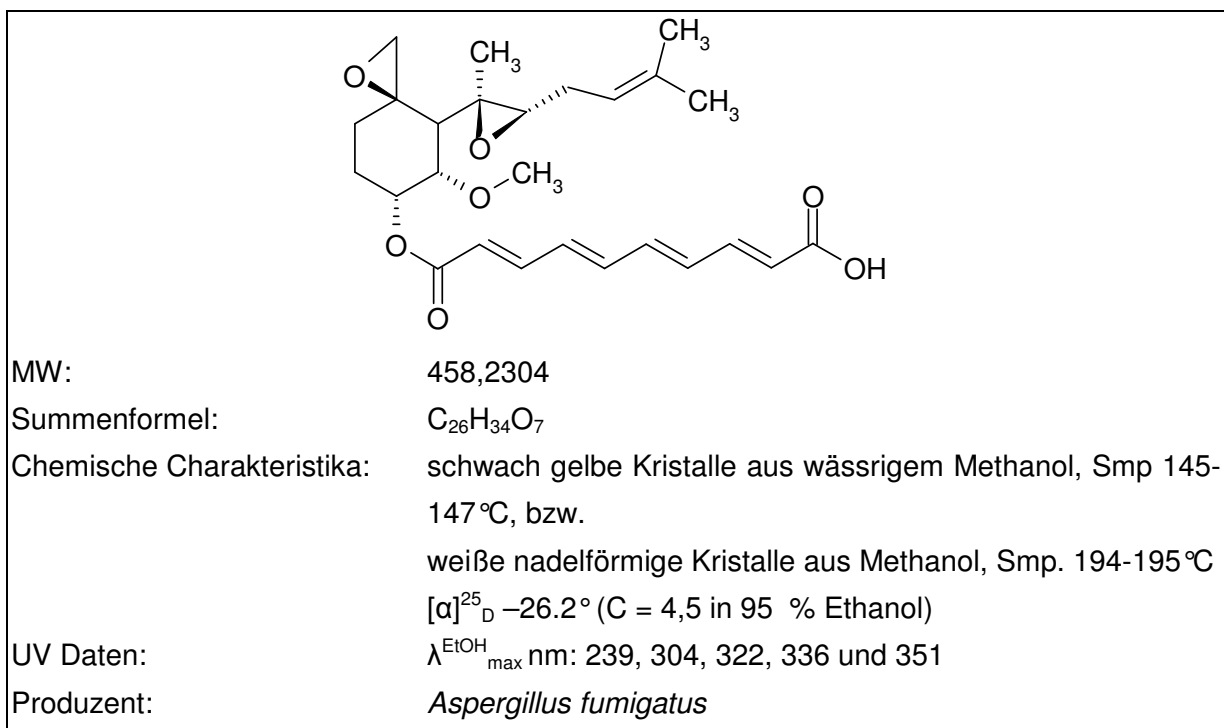


Abbildung 4: Strukturformel und charakteristische Daten von Fumagillin (Cole und Cox, 1981)

Nachdem amöbicide Eigenschaften für Fumagillin festgestellt wurden, kam die Verbindung bei der Therapie von mit *Entamoeba histolytica* infizierten Bienenvölkern zum Einsatz. Auch andere parasitäre Infektionskrankheiten an Bienen und Fischen wurden mit Fumagillin therapiert (Guyonnet et al., 1995). Seit Januar 2000 ist die Substanz in der EU nicht mehr als Arzneimittel erhältlich. In den USA ist Fumagillin zur Behandlung von mit *Nosema apis* infizierten Bienenvölkern noch zugelassen (Dupuy et al., 2006a).

Aktuelle Studien zeigten, dass Therapieerfolge bei der Verwendung makrozyklischer Laktone in Verbindung mit Fumagillin gesteigert werden könnten, da die intrazelluläre Konzentration der Wirkstoffe aufgrund einer hemmenden Wirkung des Fumagillins auf die P-gp-Aktivität (ein ABC Transporter) erhöht wird. Als ED<sub>50</sub> wird eine Konzentration von 34 µM angegeben (Dupuy et al., 2006a).

Die LD<sub>50</sub> (Maus) von Fumagillin beträgt bei subkutaner Verabreichung 800 mg/kg Körpergewicht, bei oraler Verabreichung mehr als 2 g/kg (Eble und Hanson, 1951; Eble und Garrett, 1954; Garrett und Eble, 1954; Garrett, 1954). Aufgrund von Nebenwirkungen wie starkem Gewichtsverlust, wurde Fumagillin nicht für einen therapeutischen Einsatz in der Humanmedizin in Erwägung gezogen und verlor daher zunächst an Aufmerksamkeit.

Vor knapp zwei Jahrzehnten konnte allerdings bereits gezeigt werden, dass Fumagillin eine sehr wirksame die Angiogenese hemmende Substanz darstellt (Ingber et al., 1990). In der Folge war Fumagillin für die Krebsforschung von großem Interesse. Aufgrund der Nebenwirkungen kommt Fumagillin zwar nicht selbst als Medikament in Frage, allerdings wurden zahlreiche hiervon abgeleitete Substanzen synthetisch hergestellt. Derivate wie CDK-732, PPI-2458, AGM-1470 oder TNP-470 gelten als sehr vielversprechend für die Krebstherapie (Ingber et al., 1990; Griffith et al., 1997; Griffith et al., 1998; Liu et al., 1998; Zhang et al., 2000; Nahari et al., 2007).

Im Zuge weiterer Forschungen wurde gezeigt, dass Fumagillin die Nidation der Eizelle verhindern kann (Lalithkumar et al., 2000). Die einmalige intravaginale Verabreichung von 2 mg führte bei Rhesusaffen zur teilweisen Verhinderung der Blastozysteneinnistung und Aufrechterhaltung einer Trächtigkeit. Das Gewicht der Versuchstiere wurde nicht beschrieben.

Die Spiro-Epoxid-Gruppe ist von essentieller Bedeutung für die antiangiogenetische Wirksamkeit, die Epoxid-Gruppe der terpenoiden Seitenkette scheint dagegen unbedeutend. Der Carbonsäure-Substituent kann die Wirkung verstärken, ist für diese jedoch nicht essentiell. Um herausfinden zu können, welches Protein für die Wirkung von Fumagillin verantwortlich ist, wurde ein molekulares Targeting durchgeführt (Sin et al., 1997; Liu et al., 1998). Daraus konnte geschlossen werden, dass der Methionin-Aminopeptidase-Komplex II die entscheidende Angriffsstelle für die Spiro-Epoxid-Gruppe darstellt (Liu et al., 1998).

Hanson und Eble (1949) beschrieben Glukose-Maismehl-Medium als geeignetes Nährmedium zur Produktion von Fumagillin. Die Biosynthese kann durch hohe Gehalte von



Xylan, Mannose und L-Glutamat im Medium weiter gefördert werden (Yang et al., 2003). Die Photoinstabilität von Fumagillin führte zu Problemen hinsichtlich dessen Analytik. Auch mit speziell entwickelten Nachweismethoden konnten höchstens 70 % der Substanz wiedergefunden werden (Brackett et al., 1988; Assil und Sporns, 1991; Guyonnet et al., 1995; Kochansky und Nasr, 2004).

### 3.3.3 Tremorgene

Bestimmte Mykotoxine, welche von bestimmten Aspergillen, aber auch von anderen Schimmelpilzgattungen gebildet werden und sich bezüglich ihrer biologischen Eigenschaften und ihrem primären Zielorgan im tierischen Organismus, dem Zentralnervensystem (ZNS), sehr ähnlich sind, werden als Tremorgene bezeichnet. Der Name leitet sich vom Krankheitsbild betroffener höherer Organismen ab, welche nach der Aufnahme dieser Mykotoxine dosisabhängige Anzeichen neuronaler Beeinträchtigungen aufweisen. Durch die rhythmische, jedoch verschieden frequente, Kontraktion antagonistisch wirkender Muskeln zeigt sich das typische Erscheinungsbild eines Tremors. Bei der parenteralen Gabe geringerer Konzentration zeigten sich bei Mäusen erste feinschlägige Beeinträchtigungen im Bereich des Kopfes und Halses (Weiser, 1990). Durch gesteigerte Aktivität wurden die Symptome verstärkt. Höhere Konzentrationen führten zu einem verstärkten Tremorgeschehen, welches die gesamte Körpermuskulatur betraf. Dabei zeigten die Dauer bis zum Eintritt des Tremors, die Persistenz der Symptome, wie auch deren Intensitäten eine weitgehend lineare Dosisabhängigkeit. Weiter ansteigende Toxinkonzentrationen führten zu Konvulsionen, Opisthoni und Stereotypien. Die Krampfphase wechselte sich dabei mit Ruhephasen ab, wobei der Exitus der Tiere spontan während einer Krampfphase eintrat. Weiser (1990) vermutete als Todesursache eine Hypoglykämie.

Die biologische Wirksamkeit der Tremorgene ist weitgehend auf das zentrale Nervensystem begrenzt. Durch das vegetative Nervensystem gesteuerte Körperfunktionen, wie der Speichelfluss, wurden nicht beeinträchtigt. Jedoch konnten Veränderungen wie Diarrhoe, Diurese, Nystagmus und Hypnoea beobachtet werden. Organveränderungen wurden weder in Folge letaler noch subletaler Dosen festgestellt (Weiser, 1990). Durch Tremorgene ausgelöste klinische Symptome sind reversibel. Bei Entzug der Toxinquelle kommt es zu einer spontanen und vollständigen Erholung der betroffenen Tiere.

Neurotoxine, die von Mikromyceten gebildet werden, werden aufgrund ihrer chemischen Struktur in unterschiedliche Gruppen eingeteilt. Tremorgene gehören zur Gruppe der Indolderivate (Cole et al., 1977b; Mantle und Penny, 1981). Das gemeinsame Strukturmerkmal stellt der Indolring, ein Kondensationsprodukt aus 7-Methoxytryptophan und Prolin bzw. Histidin dar.

Die Gruppe der Indolderivate kann wiederum in weitere Untergruppen eingeteilt werden:

Paspalitrems-Gruppe:	1 N-Atom
Penitrems-Gruppe:	2 N-Atome
Fumitremorgen-Verruculogen-Gruppe:	3 N-Atome
Tryptoquivalin-Gruppe:	4 N-Atome

Jedoch wurden auch Mykotoxine wie Janthitrems, Teritrems oder Lolitrems, welche strukturell nicht zu diesen Gruppen gehören aber eine ähnliche biologische Wirksamkeit besitzen, den Tremorgenen zugeordnet (Steyn und Vleggaar, 1985).

Eine Beteiligung tremorgener Mykotoxine am sogenannten „stagger syndrome“ bei Weidetieren wurde in Betracht gezogen (Gallagher und Latch, 1977; Cole und Cox, 1981). Die im Boden gebildeten Toxine werden letztlich vom Tier über die Pflanze aufgenommen. In Weidelgras konnten hohe Konzentrationen an tremorgenen Substanzen nachgewiesen werden (White et al., 1980).

#### *Fumitremorgen-Verruculogen-Gruppe*

Diese Gruppe umfasst mehrere Substanzen mit tremorgenen Eigenschaften wie die Fumitremorgene A, B und C (SM-Q) (Yamazaki et al., 1971; Cole et al., 1977a; Cole et al., 1977b), Verruculogen (Cole et al., 1972) oder TR-2 Toxin (Cole et al., 1975).

Sie bestehen aus den Grundbausteinen L-Tryptophan, L-Prolin, Methionin und Mevalonat (Abbildung 5). Aus diesen vier Aminosäuren entsteht das Grundgerüst für eine ganze Reihe von Metaboliten. Brevinamid F wurde als ein Vorläufer der Tryprostatine diskutiert und diese wiederum als Ausgangssubstanz der Fumitremorgenproduktion (Maiya et al., 2006). Relativ hohe Temperaturen, Feuchtigkeit und hohe Zuckergehalte begünstigten die Produktion von Fumitremorgen A und C sowie die des Verruculogens durch *Neosartorya fischeri* (Nielsen et al., 1988). Mais wurde als ein geeignetes Substrat zur Produktion von Mykotoxinen der Fumitremorgen-Verruculogen-Gruppe beschrieben. Von *A. caespitosus* wurden auf autoklaviertem, gecracktem Mais 172 mg/kg Verruculogen und 325 mg/kg Fumitremorgen B (FTB) gebildet (Schroeder et al., 1975).

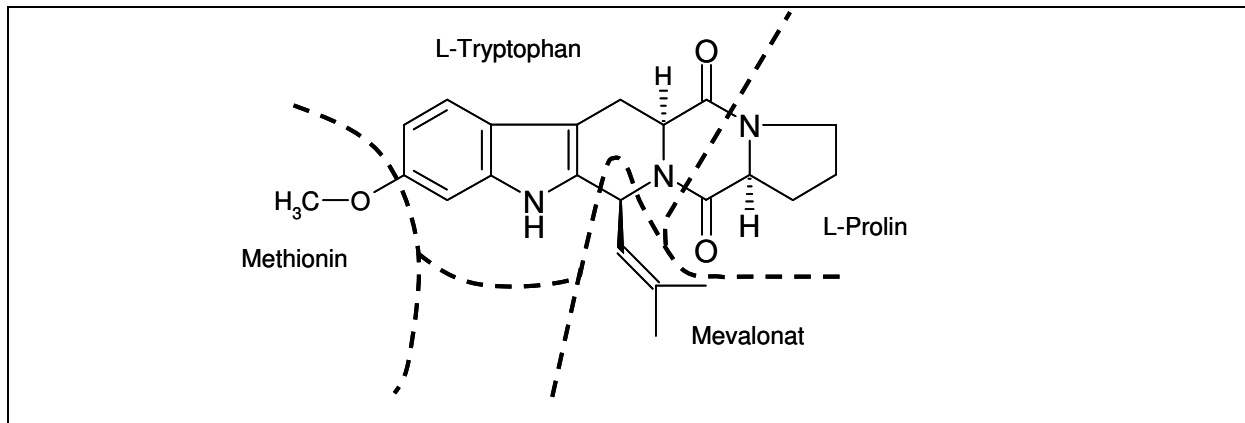


Abbildung 5: Ausgangssubstanzen der Biosynthese des Grundgerüsts von tremorgenen *Aspergillus fumigatus*-Toxinen

Die Diketopiperazine des Fumitremorgen-Typs unterscheiden sich vorwiegend in der Zahl und Art von Seitenketten sowie dem Ringschluss an der Mevalonat-Bindungsstelle (Tryprostatine). Da es sich bei allen Mitgliedern dieser Stoffgruppe um relativ lipophile Substanzen handelt, überwinden diese die Blut-Hirn-Schranke und führen dort zu Störungen im Zentralen Nervensystem. Typische Symptome von Nutztieren nach der Aufnahme verschimmelter Silage waren neurologischer Natur (Steyn und Vlegaar, 1985).

Die allgemeine Aktivität von Versuchstieren war nach der Verabreichung tremorgener Substanzen herabgesetzt. Übererregbarkeit und Krampfstände schlossen sich daran an. Ebenfalls waren Muskelzittern, Ataxie und Wundstarrkrampf ähnliche Krämpfe zu beobachten (Cole und Cox, 1981). Darüber hinaus zeigten die Substanzen aus dieser Gruppe eine hemmende Wirkung auf den Zellzyklus von Säugerzellen (Cui et al., 1996a; Cui et al., 1996b).

#### *Fumitremorgene A und B*

Die Fumitremorgene A und B (Abbildung 6, Abbildung 7) wurden erstmals von Yamazaki et al. (1971) aus einer *A. fumigatus*-Kultur isoliert und nach intraperitonealer Injektion deren tremorgene Wirkung an Mäusen festgestellt. Die Verabreichung von 1 mg/kg FTA bzw. FTB führte zu Muskelzittern und periodischen Krampfständen. Die Injektion von 5 mg/kg führte bei 70 % der Versuchstiere zum Tod.

Fumitremorgen A zeigte in einem weiteren Versuch an Mäusen sehr hohes neurotoxisches Potential. Die LD<sub>50</sub> betrug 0,185 mg/kg bei intravenöser Verabreichung (Yamazaki et al., 1979b). Die Ergebnisse dieser Arbeit deuteten darauf hin, dass sowohl das serotonerge System, als auch das Gamma-Hydroxy-Buttersäure (GABA)-System in den Wirkungsmechanismus von FTA involviert sind. In dezerebrierten Kaninchen verursachte FTA die Ausbildung eines Tremors, was darauf schließen lässt, dass untere Hirnregionen wichtige Angriffspunkte darstellen (Nishiyama und Kuga, 1986; Nishiyama und Kuga, 1989; Nishiyama und Kuga, 1990).

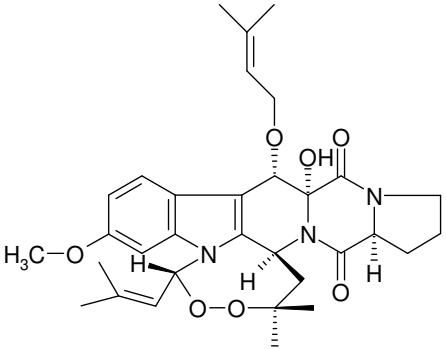
	
MW:	579,2945
Summenformel:	$C_{32}H_{41}O_7N_3$
Produzenten:	<i>Aspergillus fumigatus</i> <i>Aspergillus caespitosus</i>
TLC-Daten:	Kieselgel G-HR, Toluol-Ethylacetat-Ameisensäure (v/v/v; 5/4/1) $R_f$ : 0,65 senffarbener Fleck nach dem Besprühen mit ethanolischer Schwefelsäure
UV $\lambda^{EtOH}$ :	226, 277, 296 nm

Abbildung 6: Strukturformel und charakteristische Daten von Fumitremorgen A (Cole und Cox, 1981)

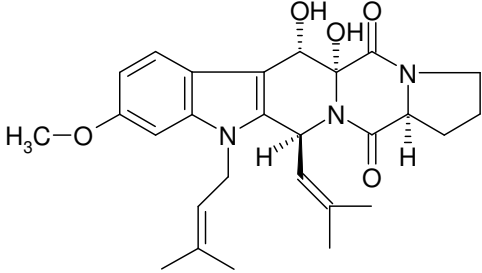
	
MW:	479,2420
Summenformel:	$C_{27}H_{33}O_5N_3$
Produzenten:	<i>Aspergillus fumigatus</i> <i>Aspergillus caespitosus</i> <i>Penicillium lanosum</i> <i>Penicillium piscarium</i> <i>Penicillium simplicissimum</i>
TLC-Daten:	Kieselgel 60 HR, Aceton-Dichlormethan (v/v; 5/95) $R_f$ : 0,38; heller blauer Fleck nach dem Besprühen mit ethanolischem Aluminiumchlorid
UV $\lambda^{EtOH}$ :	228, 278, 297 nm

Abbildung 7: Strukturformel und charakteristische Daten von Fumitremorgen B (Cole und Cox, 1981)

Fumitremorgen B ist dem Verruculogen strukturell sehr ähnlich (Yamazaki et al., 1974; Yamazaki und Fujimoto, 1975). Durch Reduktion von FTB über einen Palladium-Katalysator entsteht ein Dihydro-Derivat mit der Masse  $[M]^+ = 481$ , durch Hydrogenierung mittels einem Platin-Katalysator ein Tetrahydro-Derivat mit der Masse  $[M]^+ = 483$  (Yamazaki et al., 1974).

### Fumitremorgen C

Fumitremorgen C (Abbildung 8) wurde, obwohl es die einfachste Struktur der Fumitremorgene besitzt, erst 10 Jahre nach den anderen Tremorgenen Substanzen vollständig charakterisiert. Isoliert wurde es bereits 1975 als SM-Q (Cole et al., 1977b). Die orale Verabreichung von 25 mg/kg FTC an männliche Eintagsküken induzierte Tremora (Cole et al., 1977a). Die tremorgene Wirkung ist daher gegenüber den anderen bekannten Tremorgenen als schwächer zu bewerten. Neben der tremorgenen Wirksamkeit konnten für FTC weitere interessante biologische Eigenschaften nachgewiesen werden. So hemmte FTC den Zellzyklus muriner Brustkrebszellen, welche in der M-Phase der Zellteilung verblieben. FTC stellte in diesen Untersuchungen nach Demethoxy-Fumitremorgen C die stärkste den Zellzyklus hemmende Substanz dar. Andere Produkte des Sekundärstoffwechsels von *A. fumigatus* wie Tryprostatin A und B, oder die Spirotryprostatine A, B, C und D zeigten ebenfalls diese Wirkung, jedoch erst bei höheren Konzentrationen (Cui et al., 1996a; Cui et al., 1996b; Cui et al., 1996c).

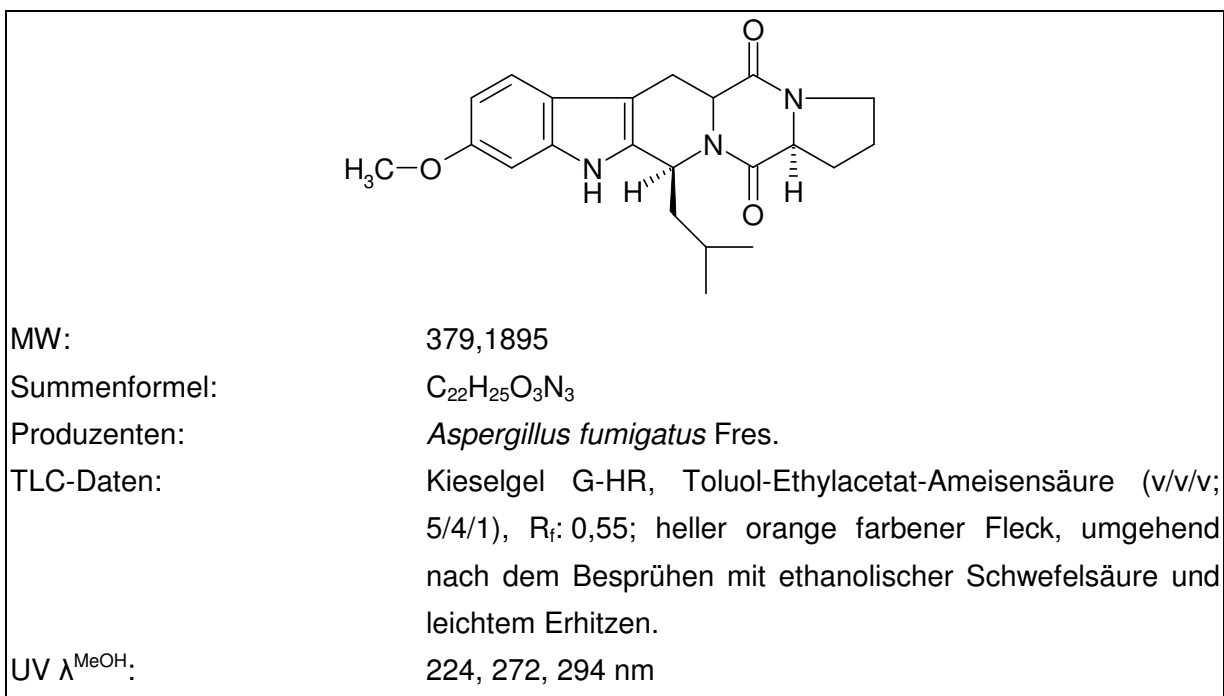


Abbildung 8: Strukturformel und charakteristische Daten von Fumitremorgen C (FTC) (Cole und Cox, 1981)

FTC ist ein Inhibitor des Breast Cancer Resistance Proteins (BCRP) (Rabindran et al., 1998; Rabindran et al., 2000; Allen und Schinkel, 2002). Beim BCRP handelt es sich um einen ABC-Transporter, welcher an der Ausschleusung zellschädigender Stoffe beteiligt und in unterschiedlichen Geweben verschieden stark vorhanden ist. Besonders hohe Konzentrationen an BCRP wurden im Plazentagewebe, den Nieren, der Leber und im Darm nachgewiesen. FTC steigerte, über die beschriebene Hemmung, die Mitoxantron induzierte Toxizität bei Dickdarmkrebszellen (Rabindran et al., 2000).

Die Wirksamkeit gegenüber BCRP, jedoch nicht P-gp oder MRP1 (ebenfalls ABC-Transporter), ist so spezifisch und effektiv, dass Fumitremorgen C in medizinischen Studien als Referenzsubstanz zur Abschätzung der hemmenden Wirkung anderer Substanzen auf das BCRP Verwendung findet (Dupuy et al., 2006b). Gegenüber der toxischen Konzentration ( $IC_{50} = 80 \mu\text{M}$ ) liegt die effektive hemmende Dosis für BCRP exprimierende Zellen ( $1\text{-}5 \mu\text{M}$ ) deutlich niedriger (Rabindran et al., 1998; Rabindran et al., 2000; Allen und Schinkel, 2002). Die neurotoxische Wirksamkeit von Fumitremorgen C verhindert jedoch die Anwendung der Substanz im medizinischen Bereich. Auf Basis von Fumitremorgen C wurden für die Krebstherapie interessante Substanzen, wie beispielsweise GF120918, entwickelt (van Loevezijn et al., 2001).

### *Verruculogen*

Das von Vertretern der Gattungen *Penicillium* und *Aspergillus* produzierte Mykotoxin wurde erstmals 1972 aus einer Kultur von *Penicillium verruculosum* isoliert und beschrieben (Cole et al., 1972). Die Strukturaufklärung sowie Angaben zu den chemisch-physikalischen Eigenschaften der Substanz folgten kurze Zeit später (Cole und Kirksey, 1973; Fayos et al., 1974). Es wurde berichtet, dass sich die erhaltenen Kristalle verdunkelten, was auf eine Photoinstabilität der Substanz hinweist (Fayos et al., 1974). Die Behandlung von Verruculogen (Abbildung 9) mit einem Palladium-Katalysator in ethanolischer Lösung lieferte unter anderem Isovaleriansäure und TR-2 Toxin (Cole und Kirksey, 1973). Verruculogen wurde als Endprodukt des Stoffwechselwegs beschrieben, da sowohl TR-2 Toxin, als auch das strukturell sehr ähnliche FTB in Verruculogen umgewandelt wurden (Cole und Kirksey, 1973; Fayos et al., 1974). Bestärkt wurde diese Aussage durch die Beobachtungen von Nielsen et al. (1988) während eines Tremorgen-Biosyntheseversuchs mit *Neosartorya fischeri*. Bei allen getesteten Bedingungen waren die messbaren Konzentrationen an Verruculogen, welches sowohl in den Hyphen als auch den Sporen der Schimmelpilze vorkommt (Khoufache et al., 2007), die höchsten.

Cole et al. (1972) beobachteten bei Mäusen eine  $ED_{50}$  nach intraperitonealer Verabreichung von  $0,39 \text{ mg/kg}$ , bei männlichen Eintagsküken von  $0,33 \text{ mg/kg}$ . Diese Konzentrationen wurden später bestätigt (Patterson et al., 1981). Bei oraler Verabreichung des Toxins zeigte sich ein 40 bis 75fach schwächerer tremorgener Effekt. Die  $LD_{50}$  wurde mit  $2,4$  bzw.  $15,2 \text{ mg/kg}$  für Mäuse und männliche Eintagsküken nach intraperitonealer Verabreichung angegeben (Cole et al., 1972; Fayos et al., 1974).

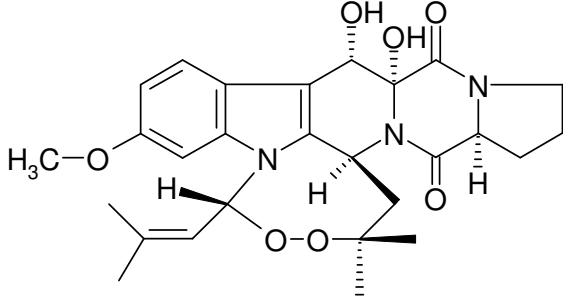
	
MW:	511,2318
Summenformel:	$C_{27}H_{33}O_7N_3$
Produzenten:	<i>Aspergillus fumigatus</i> <i>A. caespitosus</i> <i>Penicillium verruculosum</i> <i>P. piscarium</i> <i>P. simplicissimum</i> <i>P. paraherquei</i> <i>P. janthinellum</i>
TLC-Daten:	Kieselgel G-HR, Chloroform-Aceton (v/v; 93/7) $R_f$ : 0,30, Toluol-Ethylacetat-Ameisensäure (v/v/v; 5/4/1), $R_f$ : 0,65, schiefergrau-blauer Fleck unter sichtbarem Licht bzw. senffarbener Fleck unter UV-Licht nach dem Besprühen mit ethanolischer Schwefelsäure, gleicht hierbei FTA
UV $\lambda^{EtOH}$ :	226, 277, 295 nm

Abbildung 9: Strukturformel und charakteristische Daten von Verruculogen (Cole und Cox, 1981)

Verruculogen von *P. paraherquei* zeigte typische tremorgene Wirksamkeit an ddY-Mäusen nach intraperitonealer Verabreichung von 0,9 mg/kg, bzw. eine durchschnittliche letale Konzentration von 6,3 mg/kg (Yoshizawa et al., 1976). Weiser (1990) berichtete eine  $ED_{50}$  von 0,14 mg/kg bei Mäusen nach intraperitonealer Verabreichung, die  $LD_{50}$  wurde mit 0,41 mg/kg angegeben. Verglichen mit anderen tremorgen wirksamen Substanzen besitzt Verruculogen somit die stärkste toxische Wirkung bei Mäusen. Die Beteiligung von Verruculogen an dem bereits erwähnten „stagger syndrome“ wurde schon bald nach dessen Entdeckung diskutiert (Gallagher und Latch, 1977; Gallagher et al., 1977; Shreeve et al., 1983).

Verruculogen hemmt die Funktion des Neurotransmitter-Inhibitors GABA. Wie auch andere tremorgen wirkende Substanzen verminderte Verruculogen den durch GABA induzierten Influx von Chlor-Ionen in Rattenhirnvesikel und die Bindung von t-Butyl-bicyclo-Phosphorthionat (TBPS) an die Membranen von Ratten-Hirnzellen. Es handelt sich vermutlich um eine sterische Hinderung, verursacht durch die Bindung von Verruculogen in unmittelbarer Umgebung zum Cl<sup>-</sup>-Kanal des GABA-Rezeptors. Im Gegensatz zu den GABA-

abhängigen Cl<sup>-</sup>-Kanälen, zeigten spannungsabhängige Chlor-Kanäle erst bei sehr hohen Konzentrationen an Verruculogen eine beeinträchtigte Funktion (Gant et al., 1987). Diese Vermutung bestätigend, konnte ein Einfluss adrenerg wirkender Pharmaka auf die Wirksamkeit der tremorgenen Stoffwechselmetabolite nachgewiesen werden (Weiser, 1990). Verruculogen verursachte über eine Störung der Calmodulinwirksamkeit eine Inhibierung der Phosphodiesterase. Ebenso wurde eine Hemmung der Protein Kinase C (PKC) beobachtet (IC<sub>50</sub> = 38,4 µM). Dies könnte bei geringen Toxinkonzentrationen zu einer Störung des Neurotransmittergleichgewichts führen und entgegen der GABA-Theorie für die neuronalen Ausfälle verantwortlich sein (Pala et al., 1999).

Der Abbau von Verruculogen erfolgt vorwiegend in der Leber. Hier wird es zu vier hydrophileren Substanzen umgewandelt, zwei isomere Formen des Deoxy-Verruculogens sowie TR-2 Toxin und vorwiegend dessen Isomer. Die Ausschleusung der Abbauprodukte erfolgt zum größten Teil über die Galle (Perera et al., 1982a; Perera et al., 1982b).

Der Nachweis von Verruculogen erfolgte meist mittels Dünnschichtchromatographie. Mit Etablierung der Massenspektrometrie konnte Verruculogen auch in sehr geringen Konzentrationen von 20 ng/g Analysematerial nachgewiesen werden (Rundberget und Wilkins, 2002). Dabei wurde, je nach Ionisierungsmethode, nicht das Mutterion für die Quantifizierung verwendet, sondern signalintensivere Quellenfragmente oder temporäre NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-, Na<sup>+</sup>- oder K<sup>+</sup>-Addukte (Rundberget und Wilkins, 2002; Khoufache et al., 2007). Die einfache Wasserabspaltung scheint ein typischer Vorgang bei der Ionisierung von Verruculogen zu sein, so dass nicht vom positiv ionisierten Mutterion [M+H]<sup>+</sup> = 512 ausgegangen wird, sondern von einem Fragment der Masse [M-OH]<sup>+</sup> = 494. Rundberget und Wilkins (2002) berichten von einer Nachweisgrenze von 5 ng/ml mittels MS/MS-Detektion aus Standardlösungen und 20 ng/g aus artifiziell kontaminierten Nahrungsmittelmixproben.

### *TR-2 Toxin*

Die Verbindung (Abbildung 10) wurde erstmals 1973 isoliert (Cole und Kirksey, 1973) und konnte durch die Hydrogenierung von Verruculogen mittels Palladium-Katalysator chemisch dargestellt werden. Die Strukturaufklärung folgte zwei Jahre nach der Entdeckung (Cole et al., 1975). Es handelt sich um ein tremorgenes Toxin, welches vermutlich ein Zwischenprodukt im natürlichen Syntheseweg (Abbildung 11) der Substanzen Verruculogen und FTB darstellt (Willingale et al., 1983).

Durch die Metabolisierung von Verruculogen in Lebergewebe entstanden TR-2 Toxin und ein isomeres Produkt (Perera et al., 1982a). Die Ausscheidung der Verbindung erfolgt vorwiegend über die Galle. Junghähne zeigten bei oraler Verabreichung von 12 mg/kg TR-2 Toxin typische Symptome einer Intoxikation mit tremorgenen Stoffwechselmetaboliten (Cole et al., 1975).



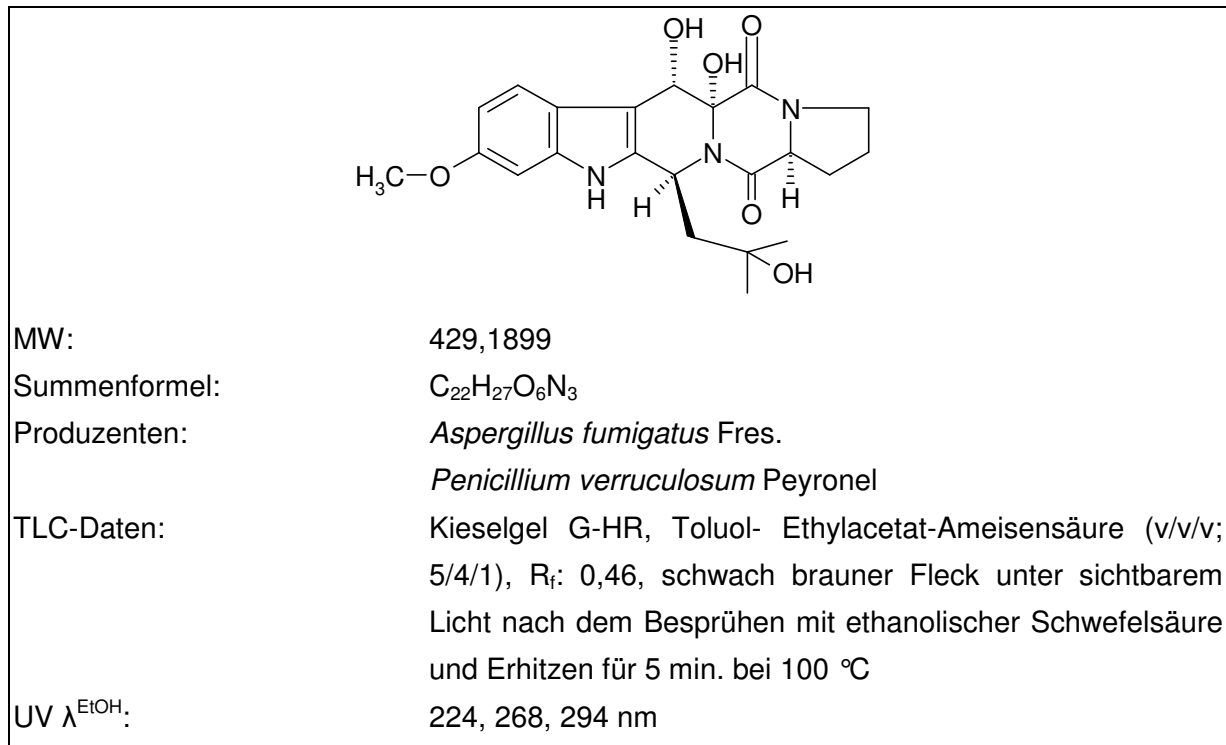


Abbildung 10: Strukturformel und charakteristische Daten von TR-2 Toxin (Cole und Cox, 1981)

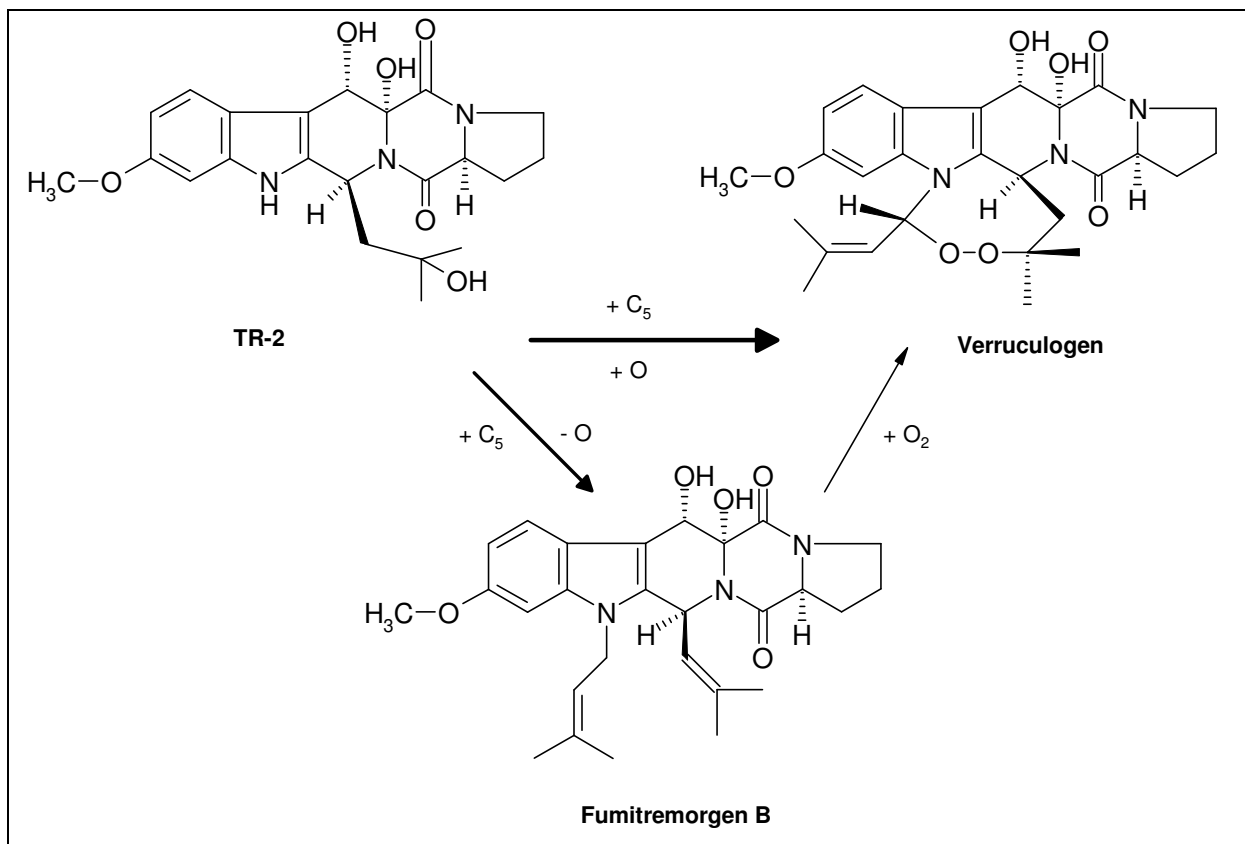


Abbildung 11: Stellung von TR-2 Toxin im Biosyntheseweg von Fumitremorgen B und Verruculogen (nach Willingale et al., 1983)

Tabelle 8: FTC-verwandte Diketopiperazine vom Fumitremorgen-Typ

Substanz	molare Masse	Summenformel	Grundgerüst
Tryprostatin A	381,2050	$C_{22}H_{27}N_3O_3$	
Tryprostatin B	351,1944	$C_{21}H_{25}N_3O_2$	
Spirotryprostatin A	363,1612	$C_{21}H_{21}N_3O_3$	
Spirotryprostatin B			
Cyclotryprostatin A	411,1768	$C_{22}H_{25}N_3O_5$	
Cyclotryprostatin B	425,1944	$C_{23}H_{27}N_3O_5$	
Cyclotryprostatin C	381,1694	$C_{21}H_{23}N_3O_4$	
Cyclotryprostatin D	379,1466	$C_{21}H_{21}N_3O_4$	

#### Weitere Stoffe dieser Gruppe

Weitere Substanzen mit vergleichbarer chemischer Struktur wurden charakterisiert. Hierzu gehören 6-demethoxy-Fumitremorgen C (O'Malley und Cava, 1987) und 12,13-dihydroxy-Fumitremorgen C (Cui et al., 1996b).

Die Tryprostatine A und B (Tabelle 8, Abbildung 12) sind Fumitremorgen C bzw. Demethoxy-Fumitremorgen C ebenfalls strukturell sehr ähnlich. Ihnen fehlt allerdings der Ringschluss an der Isoprenyl-Untereinheit (Cui et al., 1995; Cui et al., 1996a). Verbindungen wie Spirotryprostatin A, B, C und D stellen oxidierte Formen von FTC dar (Cui et al., 1996a; Cui et al., 1996b; Cui et al., 1996c; Cui et al., 1997). Diese Substanzen erlangten größere Beachtung, da sie bei geringer Zytotoxizität eine stark hemmende Wirkung auf den Zellzyklus von Mäusekrebszellen zeigten. Sie unterdrückten die Ausbildung des Spindelapparats und führten so zu einem Verbleib der Zelle in der G2/M Phase (Cui et al., 1995; Osada et al., 1997; Osada, 1998).

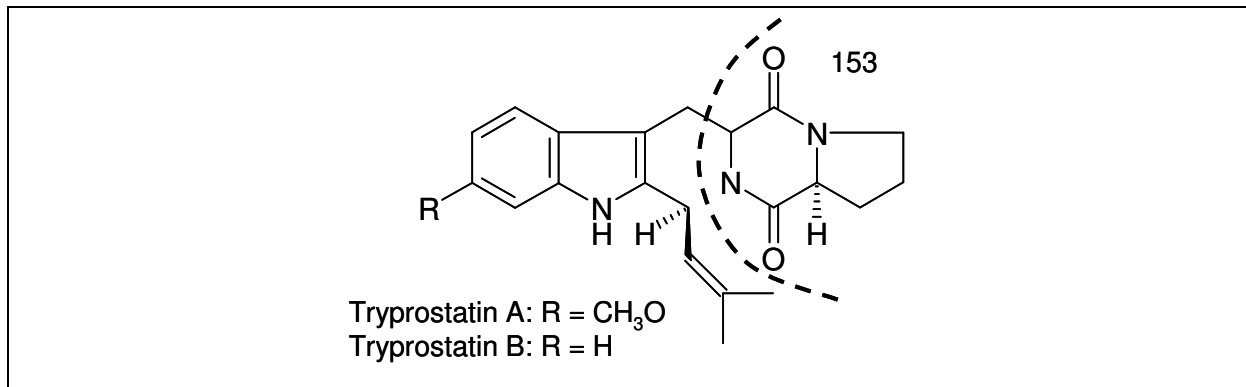


Abbildung 12: Strukturformel und mögliche Fragmentierungsprodukte von Tryprostatin A und B

### *Tryptoquivaline*

Die Tryptoquivaline gehören ebenfalls den tremorigenen Substanzen an (Cole und Cox, 1981). Es handelt sich um Tetrapeptide, welche über einen einheitlichen Stoffwechselweg aus Tryptophan, Anthranilsäure, Valin und Methylalanin oder Alanin gebildet werden (Clardy et al., 1975; Yamazaki et al., 1978). Das komplexe Molekül besteht aus sechs Ringen, davon ein Spiro-γ-Lacton (D'yankonov und Telezhenetskaya, 1997). Die Chinazolin-Untereinheit ist über eine N<sub>17</sub>-C<sub>12</sub>-Bindung mit dem Spiro-γ-Lacton-Ring verbunden.

Tryptoquivaline besitzen vier bzw. fünf asymmetrische Zentren, was zu einer großen Anzahl möglicher Isomere führt (Abbildung 13). Die Toxingruppe (Tabelle 9) wurde in Folge der tödlichen Vergiftung eines thailändischen Kindes durch *Aspergillus clavatus*-kontaminierte Lebensmittel vergleichsweise spät entdeckt (Glinsukon et al., 1974).

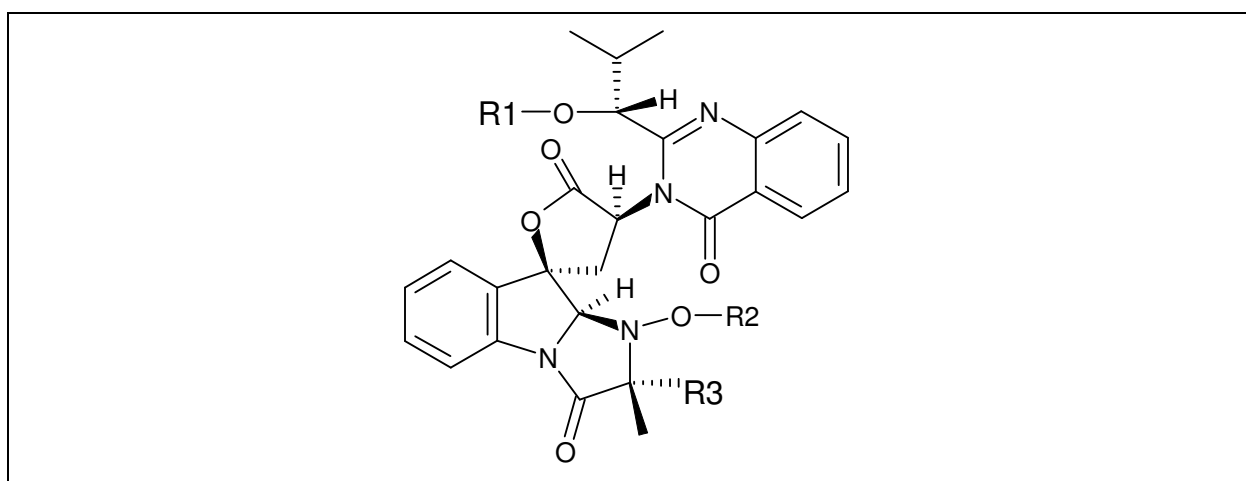


Abbildung 13: Grundgerüst der Tryptoquivalin-Gruppe (nach Springer, 1979)

Bei der intensiven Suche nach tremorgenen Toxinen des Schimmelpilzes wurden zuerst Tryptoquivalin A und Nortryptoquivalon beschrieben (Clardy et al., 1975). Später kamen weitere Metaboliten und Isomere hinzu, welche teilweise auch von anderen Arten der Gattung *Aspergillus* produziert werden können (Büchi et al., 1977). Hierzu gehören die Tryptoquivaline C, D, E, F, G, H, I, J, L, M und N (Yamazaki et al., 1977; Yamazaki et al., 1978; Yamazaki et al., 1979a).

Bis heute sind weitere Mitglieder der Tryptoquivalin-Gruppe charakterisiert worden, deren Toxizität ist jedoch weitgehend unerforscht geblieben. Bestimmte Molekülstrukturen deuten allerdings auf eine tremorgene Wirksamkeit hin (Springer, 1979).

Tabelle 9: Überblick über die bislang beschriebenen Vertreter der Gruppe der Tryptoquivaline

Substanz	Produzent	Summenformel	molare Masse	Wirksamkeit
Tryptoquivalin A/C	<i>A. clavatus</i> / <i>fumigatus</i>	C <sub>29</sub> H <sub>30</sub> O <sub>7</sub> N <sub>4</sub>	546,2114	tremorgen
Nortryptoquivalon/ Tryptoquivalin B	<i>A. clavatus</i>	C <sub>26</sub> H <sub>24</sub> O <sub>6</sub> N <sub>4</sub>	488,1696	
Nortryptoquivalin/ Tryptoquivalin D	<i>A. clavatus</i> / <i>fumigatus</i>	C <sub>28</sub> H <sub>28</sub> O <sub>7</sub> N <sub>4</sub>	532,1958	vermutlich tremorgen
Desoxytryptoquivalin		C <sub>29</sub> H <sub>30</sub> O <sub>6</sub> N <sub>4</sub>	530,2165	
Desoxynortryptoquivalon	<i>A. clavatus</i>	C <sub>26</sub> H <sub>24</sub> O <sub>5</sub> N <sub>4</sub>	472,1747	
Desoxynortryptoquivalin		C <sub>28</sub> H <sub>28</sub> O <sub>6</sub> N <sub>4</sub>	516,2009	
Tryptoquivalin E/H		C <sub>22</sub> H <sub>18</sub> O <sub>5</sub> N <sub>4</sub>	418,1277	
Tryptoquivalin F/J		C <sub>22</sub> H <sub>18</sub> O <sub>4</sub> N <sub>4</sub>	402,1328	
Tryptoquivalin G		C <sub>23</sub> H <sub>20</sub> O <sub>5</sub> N <sub>4</sub>	432,1433	
Tryptoquivalin I	<i>A. fumigatus</i>	C <sub>27</sub> H <sub>26</sub> O <sub>6</sub> N <sub>4</sub>	502,1852	
Tryptoquivalin L		C <sub>23</sub> H <sub>20</sub> O <sub>5</sub> N <sub>4</sub>	432,1433	
Tryptoquivalin M		C <sub>28</sub> H <sub>28</sub> O <sub>7</sub> N <sub>4</sub>	532,1958	
Tryptoquivalin N		C <sub>26</sub> H <sub>24</sub> O <sub>5</sub> N <sub>4</sub>	472,1746	

### 3.3.4 Fumiquinazoline/Fumichinazoline

Die Fumiquinazoline (A-G) stellen eine weitere Gruppe sekundärer *Aspergillus fumigatus*-Stoffwechselmetaboliten dar. Sie wurden während der Suche nach biogenen Pharmazeutika entdeckt (Numata et al., 1992; Takahashi et al., 1995). Der produzierende *A. fumigatus*-Stamm wurde aus dem Verdauungstrakt eines Meerestisches, *Pseudolabrus japonicus*, isoliert. Andere Fumiquinazoline (H und I) konnten aus dem Extrakt einer *Acremonium* sp.-Kultur gewonnen werden (Numata et al., 1992; Belofsky et al., 2000). Von *Neosartorya fischeri* ist ein sehr ähnlicher Stoffwechselmetabolit bekannt, Fiscalin B. Die bis heute beschriebenen Fumiquinazoline zeigten schwache bis mäßige zytotoxische und fungistatische Wirksamkeiten gegenüber P-388 Zellen bzw. *Candida albicans* (Numata et al., 1992; Belofsky et al., 2000).

Bei der tandemmassenspektrometrischen Messung fragmentieren Mitglieder der Fumiquinazolin-Gruppe sehr ähnlich (Tabelle 10). Eine Herleitung bestimmter, häufig auftretender Fragmente ist in Abbildung 14 dargestellt.

Die Fumiquinazoline und Tryptoquivaline verfügen vermutlich über einen gemeinsamen Biosyntheseweg. Erstere weisen jedoch keinen  $\gamma$ -Lactonring in ihrer Struktur auf. Beide Stoffgruppen enthalten eine Chinazolin-, sowie eine Indol-Untereinheit.

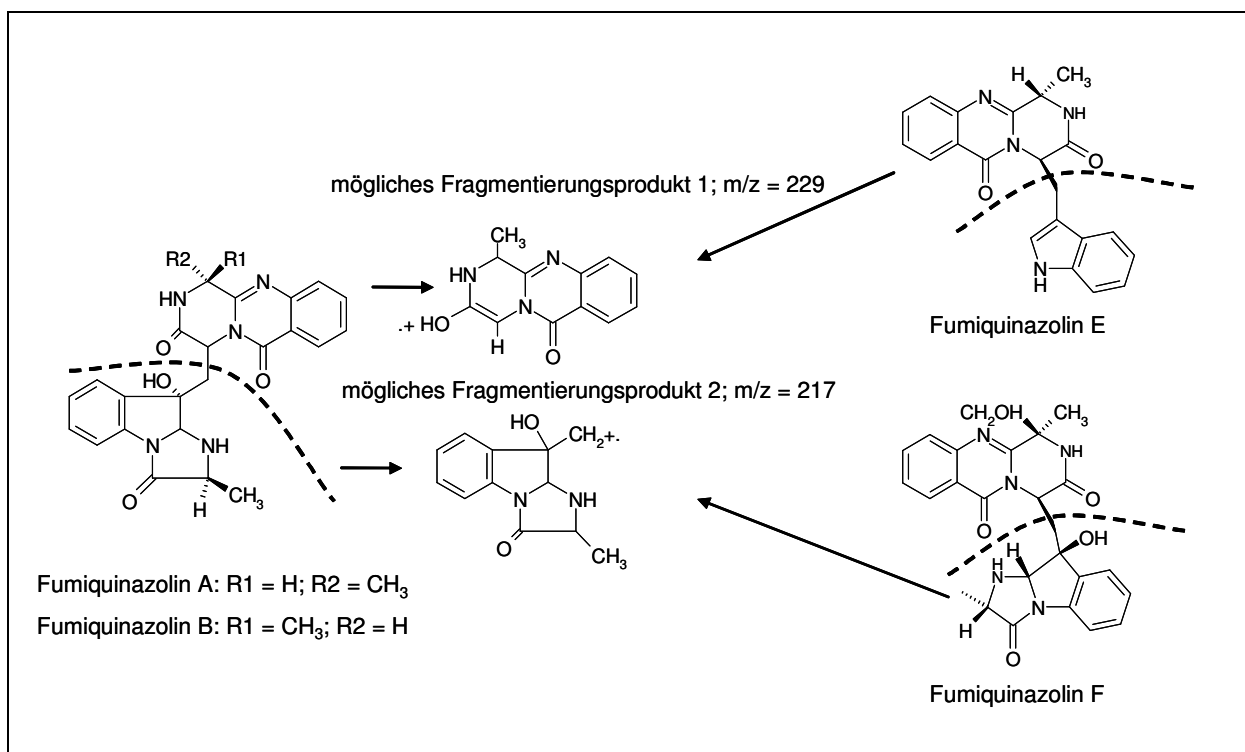


Abbildung 14: Mögliche Fragmentierung der Fumiquinazoline bei massenspektrometrischen Messverfahren (Takahashi et al., 1995)

Tabelle 10: Physikalische und chemische Charakterisierung von Mitgliedern der Stoffgruppe der Fumiquinazoline

Fumiquin- azolin	Summen- formel	molare Masse [g/mol]	kristalline Struktur	charakteristische Massen
A	$C_{24}H_{23}N_5O_4$	445,1750	schwach gelbes Pulver	445, 428, 229, <u>217</u> , 199, 146
B	$C_{24}H_{23}N_5O_4$	445,1750	schwach gelbes Pulver	445, 229, 228, <u>217</u> , 199, 146
C	$C_{24}H_{21}N_5O_4$	443,1594	farblose Prismen	443, 372, 256, 228, 227, 217, 216, <u>199</u> , 146
D	$C_{24}H_{21}N_5O_4$	443,1594	farblose Prismen aus Aceton	443, 372, 256, 228, 227, 217, <u>199</u> , 146
E	$C_{24}H_{25}N_5O_5$	475,1856	schwach gelbes Pulver	FAB: 475, 442, 228 217, 199, <u>154</u> , 136
F	$C_{21}H_{18}N_4O_2$	358,1430	schwach gelbes Pulver	358, 229, 228, <u>130</u>
G	$C_{21}H_{18}N_4O_2$	358,1430	schwach gelbes Pulver	358, 229, 228, <u>130</u>
H	$C_{27}H_{27}N_5O_4$	485,2060	schwach gelbes Pulver	FAB: 485, 428, 413, 391, <u>279</u> , 241, 228, 192
I	$C_{27}H_{29}N_5O_4$	487,2220	weißer Feststoff	FAB: 488 [M+H+], <u>470</u> , 369, 241, 229, 213

nach Numata (1992), Takahashi (1995) und Belofsky (2000)

### 3.3.5 Fumigaclavine

#### *Fumigaclavin A*

Fumigaclavin A (Abbildung 15) gehört der Gruppe der Indolalkaloide an (Cole und Schweikert, 2003b) und wurde erstmals aus verschimmelter Maissilage isoliert (Cole et al., 1977b). Die chemische Bezeichnung der Substanz lautet 9-Acetoxy-6,8-dimethylergolin.

Fumigaclavine nehmen als partielle Agonisten oder auch Antagonisten verschiedener Serotonin-, Dopamin- und alpha-adrenergen Rezeptoren Einfluss auf das nervale, zirkuläre und reproduktive System sowie auf das Immunsystem. Symptome wie niedriger Blutdruck, reduzierte Fruchtbarkeit oder eine Störung des Tag-Nacht-Rhythmus wurden beobachtet (Cole und Cox, 1981; Cole und Schweikert, 2003b). Bei sehr hohen Konzentrationen treten Halluzinationen und Gangrän an den Extremitäten auf. Fumigaclavin A stellt das Hauptprodukt der Alkaloidsynthese durch *A. tamarii* dar (Janardhanan et al., 1984).

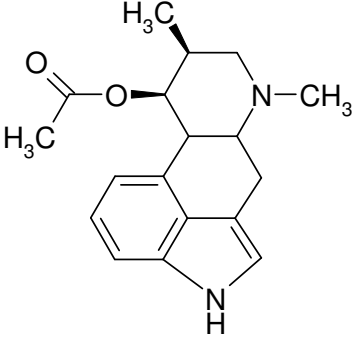
	
MW:	298,16813
Summenformel:	C <sub>18</sub> H <sub>22</sub> O <sub>2</sub> N <sub>2</sub>
chemische Charakteristika:	farblose nadelförmige Kristalle; Smp 84-85 °C; [α] <sub>5461</sub> <sup>22</sup> - 56,7° (Pyridin); Hypochlorit: Prismen aus Ethanol; Smp 304-305 °C; [α] <sub>5461</sub> <sup>22</sup> - 56,7° (c = 1,5 in Methanol)
UV Daten:	λ <sub>max</sub> nm: 225, 275, 282 und 293 (ε <sub>max</sub> unbekannt)
Produzenten:	<i>Aspergillus fumigatus</i> Fres. <i>Aspergillus tamaraii</i> Kita. <i>Rhizopus arrhizus</i>

Abbildung 15: Strukturformel und charakteristische Daten von Fumigaclavin A (Cole und Cox, 1981)

### *Fumigaclavin B*

Fumigaclavin B (Tabelle 11) ist ebenfalls den Indolalkaloiden zuzuordnen und konnte aus dem Filtrat einer *Aspergillus fumigatus*-Kultur isoliert werden (Cole et al., 1977b). Die chemische Bezeichnung von Fumigaclavin B lautet 9-Hydroxy-6,8-dimethylergolin. Es handelt sich um das Deacetylierungsprodukt von Fumigaclavin A, dessen Vorkommen in Abhängigkeit zur Konzentration an Fumigaclavin A und des vorherrschenden pH-Werts steht. In saurem Milieu, wie es in Silagen anzutreffen ist, liegt vor allem die acetylierte Form vor. Die Wirkung von Fumigaclavin B gleicht jener von Fumigaclavin A (Spilsbury und Wilkinson, 1961; Ohmomo et al., 1989).

Tabelle 11: Charakteristische Daten zu Fumigaclavin B (Cole und Cox, 1981)

MW:	256,15756
Summenformel:	C <sub>16</sub> H <sub>20</sub> N <sub>2</sub> O
chemische Charakteristika:	farblose nadelförmige Kristalle; Smp 244-245 °C [α] <sub>5461</sub> <sup>22</sup> - 6,3° (c = 1,2 in Methanol); - 113° (c = 0,6 in Pyridin)
UV Daten:	λ <sub>max</sub> <sup>MeOH</sup> nm: 225(ε = 30900), 275(6200), 282(6600)
Produzenten:	<i>Aspergillus fumigatus</i> Fres. <i>Rhizopus arrhizus</i>

*Fumigaclavin C*

Fumigaclavin C, 2-Dimethylallyl-9-acetoxy-6,8-dimethylergolin (Abbildung 16), gilt als das meist produzierte Indolalkaloid von *Aspergillus fumigatus* und konnte in sehr hohen Konzentrationen, 0,93 µg/g Frischmasse und 16,0 mg/g Trockenmasse, in Konidien nachgewiesen werden (Palmgren und Lee, 1986; Panaccione und Coyle, 2005). Vermutlich entsteht die Substanz durch die Anheftung einer Dimethylallyl-Einheit an Fumigaclavin A mittels einer reversen Prenyltransferase (Unsöld und Li, 2006). Fumigaclavin C hemmt die Proliferation und Zytokinausschüttung von T-Zellen (Zhao et al., 2004; Wu et al., 2005).

Anhand eines Mäuseversuchs konnte gezeigt werden, dass Fumigaclavin C bei einer künstlich induzierten Dickdarmentzündung (Colitis) zur Genesung beitragen kann. Die gemessenen Parameter Körpergewicht, Überlebensrate und Zytokingehalte sowie deren Gehalt an mRNA, deuteten auf eine Verbesserung des Zustands und eine lineare Konzentrationsabhängigkeit zur verabreichten Menge an Fumigaclavin C (5-20 mg/kg i.p.) hin. Die Autoren führten dieses Ergebnis auf eine Hemmung der T-Zellproliferation sowie der Th1-Zytokinausschüttung zurück. Des Weiteren konnten sie nachweisen, dass Fumigaclavin C die Aktivität der Matrix Metalloproteinase in sakralen und intestinalen Lymphknoten sowie im Dickdarm hemmt. Der Einsatz von Fumigaclavin C gegen T-Zellen vermittelte chronische Entzündungskrankheiten wurde daher diskutiert (Wu et al., 2005).

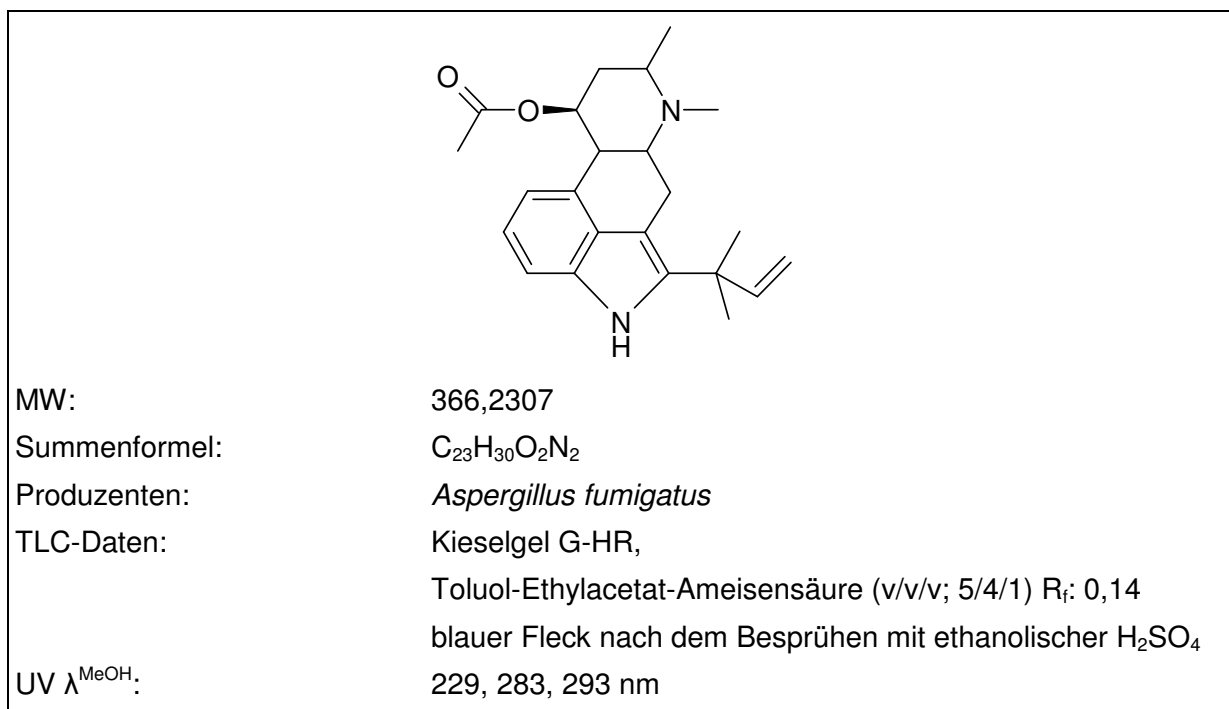


Abbildung 16: Strukturformel und charakteristische Daten des Fumigaclavin C (Cole und Cox, 1981)



Des Weiteren führte Fumigaclavin C zur Relaxierung isolierter Ratten-Aortenringe (Ma et al., 2006). Bereits bei einer Konzentration von 1,58  $\mu\text{mol}$  (580 ng/ml) kam es nach zuvoriger Kontraktion durch Phenylephrin zu diesem Effekt, der nicht von epithelialen Mediatoren abhängig war.

### *Festuclavin*

Festuclavin (Abbildung 17) gehört derselben Stoffgruppe wie die oben genannten Fumigaclavine an und kommt auch in ähnlichen Konzentrationen, bis zu 1 % der Trockenmasse, auf oder in Konidien vor (Panaccione und Coyle, 2005). Des Weiteren interagiert das Toxin mit den gleichen Rezeptoren und führt daher zu ähnlichen Symptomen wie die oben genannten Fumigaclavine. Bislang wurde keine immunsuppressive Wirkung nachgewiesen. Im Mutagenitätstest (Ames-Test) zeigte Festuclavin linear dosisabhängige mutagene Eigenschaften (Glatt et al., 1992). In dieser Untersuchung wurde für 1-alkylierte Derivate eine starke antibakterielle Wirksamkeit festgestellt ( $\text{LD}_{50} = 0,03 \mu\text{mol/Plättchen}$ ).

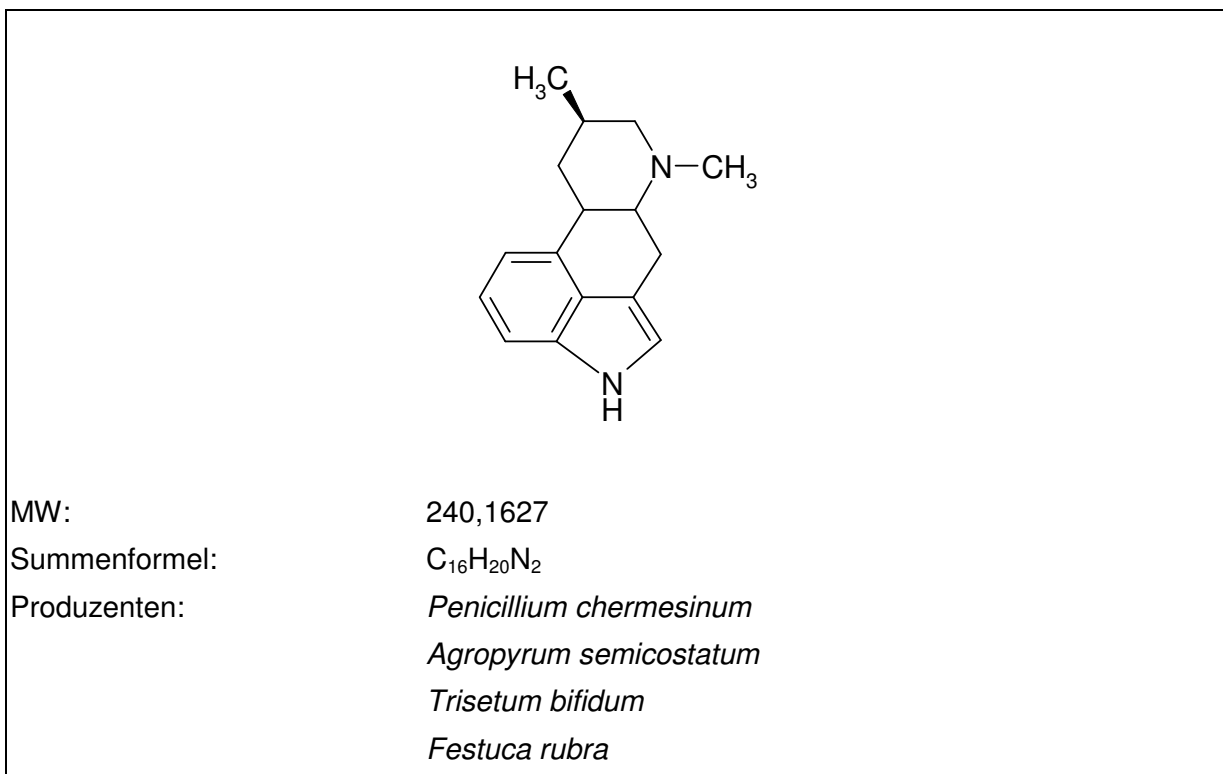


Abbildung 17: Strukturformel und charakteristische Daten von Festuclavin (Cole und Cox, 1981)

### 3.3.6 Trypacidin

Trypacidin (Abbildung 18) wurde erstmals 1963 aus einer *A. fumigatus*-Kultur isoliert und als antiprotozoische Substanz gegenüber *Trypanosoma cruzi* und *Toxoplasma gondii* beschrieben (Balan et al., 1964). Die vorgeschlagene Molekülstruktur wurde 1965 bestätigt (Turner, 1965). Bislang ist wenig bekannt über die biologischen Wirksamkeiten von Trypacidin. Die Substanz soll nur in den Sporen des Schimmelpilzes vorkommen (Parker und Jenner, 1968).

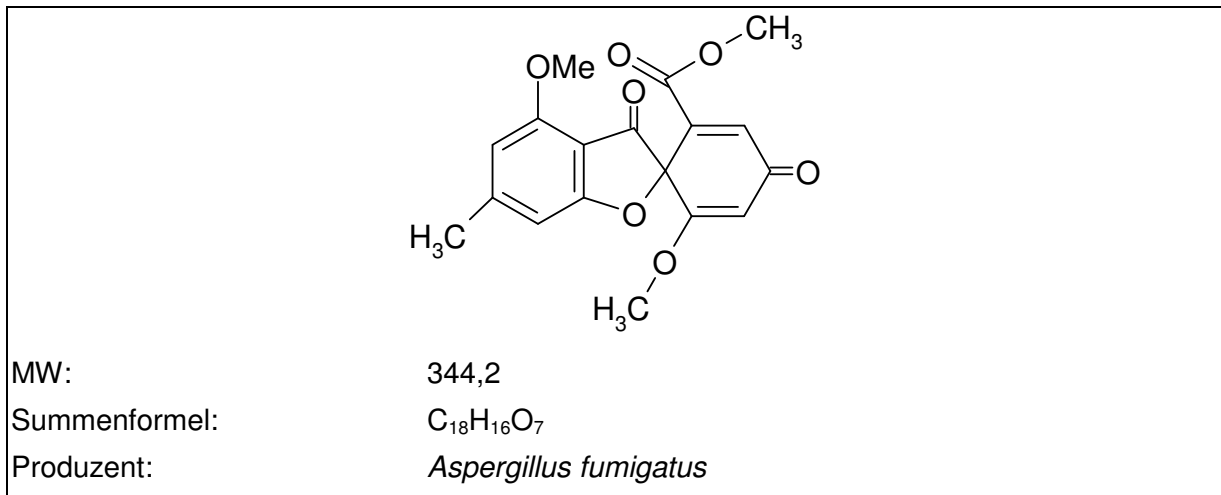


Abbildung 18: Strukturformel und charakteristische Daten von Trypacidin (Cole und Cox, 1981)

### 3.3.7 Sphingofungine

Bei der Suche nach biotischen, fungiziden Substanzen wurden die Sphingofungine A, B, C und D aus dem Extrakt einer *A. fumigatus*-Kultur isoliert (VanMiddlesworth et al., 1992). Die fungizide Aktivität ist gering, allerdings zeigte sich eine verstärkte antibiotische Wirksamkeit gegenüber *Cryptococcus* spp..

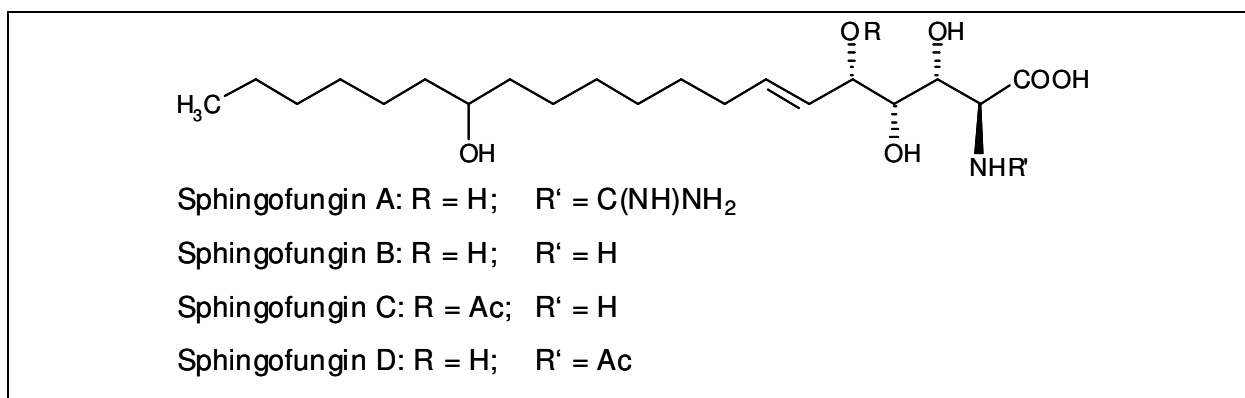


Abbildung 19: Grundgerüst und jeweilige Substituenten der Sphingofungine A, B, C und D (nach VanMiddlesworth, 1992)

Das am häufigsten vorkommende Produkt, Sphingofungin C, ist Ausgangspunkt zur Bildung anderer Sphingofungine (Abbildung 19). Vor allem die Sphingofungine B und C sind sehr potente Inhibitoren der Serin-Palmitoyltransferase, dem Schlüsselenzym für die Sphingolipidproduktion in Säugerzellen (Zweerink et al., 1992). Eine hemmende Wirkung auf den Sphingolipidmetabolismus besitzen auch die Fumonisine, wie beispielsweise Fumonisin B<sub>2</sub> von *A. niger* (Frisvad et al., 2007; Frisvad et al., 2008). Diese wirken darüber hinaus krebserregend und stark phytotoxisch (Cole et al., 2003).

### 3.3.8 Pseurotin A

Pseurotin A (Abbildung 20) wurde erstmals aus einem Kulturfiltrat von *Pseudeurotium ovalis* Stolk isoliert (Bloch et al., 1976). Biosynthetisch wird Pseurotin A von L-Phenylalanin, Propionat, Malonat und L-Methionin hergeleitet (Mohr und Tamm, 1981; Igarashi et al., 2004). Die neutrale Substanz ist leicht löslich in polaren Lösungsmitteln, weniger hingegen in unpolaren organischen Solventen (Bloch et al., 1976).

Pseurotin A zeigte neuritogene Aktivität an PC12-Phäochromozytomzellen (Komagata et al., 1996) und wirkt insektizid gegen Kiefernholz nematoden (Hayashi et al., 2007). Sowohl Pseurotin A als auch Synerazol, eine strukturell ähnliche Substanz, welche wie Pseurotin A ebenfalls von *Aspergillus fumigatus* gebildet wird, zeigten keine Toxizität gegenüber Mäusen. Allerdings konnte, zumindest für Synerazol, eine gewisse antibiotische und zellzerstörende Wirksamkeit nachgewiesen werden (Ando et al., 1991; Igarashi et al., 2004). Asami et al. (2002) entdeckten eine sehr ähnliche Substanz in einem *Neosartorya* sp.-Filtrat (Azaspiren). Diese weist sehr große strukturelle Ähnlichkeit mit Pseurotin A und Synerazol auf. Für die Verbindung konnte eine antiangiogene Wirkung festgestellt werden. Darüber hinaus wurde ein gemeinsamer Stoffwechselweg diskutiert (Asami et al., 2002).

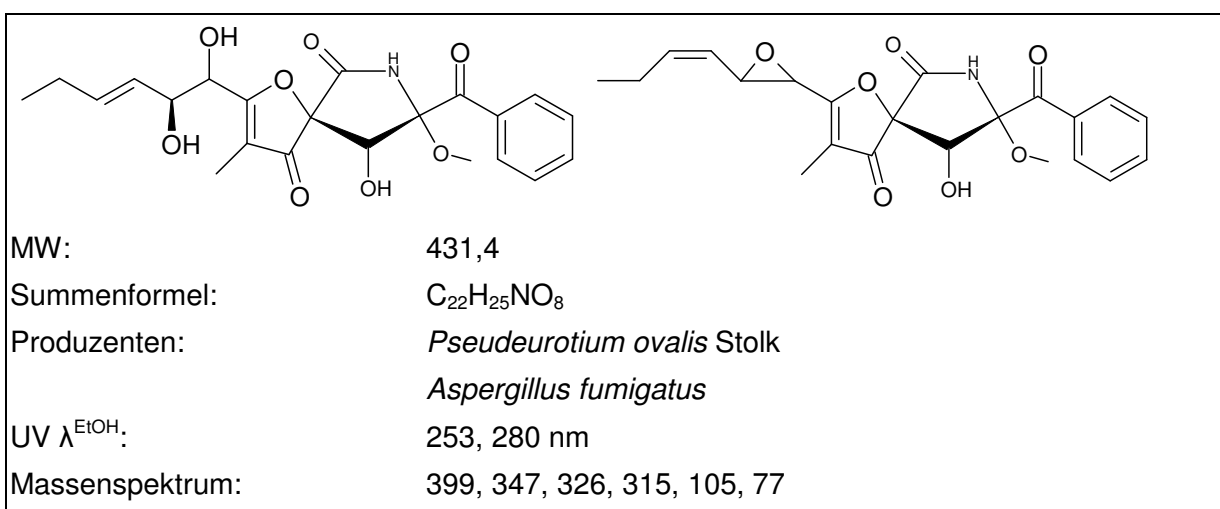


Abbildung 20: Strukturformeln von Pseurotin A (links) und Synerazol (rechts) sowie charakteristische Daten von Pseurotin A (Cole et al., 2003)

### 3.3.9 Pyripyropen A

Die Pyripyropene A-R sind Inhibitoren der Acyl-CoA-Cholesterol-Acyltransferase (ACAT), welche eine Veresterung von Cholesterin in der Zelle und eine damit verbundene Lagerfähigkeit bewirkt (Omura et al., 1993; Tomoda et al., 1994; Tomoda et al., 1995; Tomoda et al., 1996). Pyripyropen A (Abbildung 21) hemmt dabei die ACAT II um den Faktor 2000 stärker als die ACAT I (Lada et al., 2004a; Das et al., 2008). Die  $IC_{50}$  bei Mikrosomen aus Rattenlebern betrug 58 nM (33,8 ng/ml), aus Mäuselebern 110 nM (64,1 ng/ml) und aus humanen Lebern 180 nM (105 ng/ml) (Tomoda et al., 1994; Lada et al., 2004b). Beim Hamster wurde die Cholesterolabsorption dosisabhängig vermindert (Tomoda et al., 1994). Die Substanz zeigte auch bei hoher Konzentration von 1 mg/ml keine antibiotische Aktivität gegenüber *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Candida albicans* oder *Aspergillus niger*. Ebenso konnte keine Zytotoxizität an Vero-Zellen (100 µg/ml) oder Toxizität gegenüber Mäusen (200 mg/kg i.p.) nachgewiesen werden (Tomoda et al., 1994). Die Biosynthese der steroidähnlichen Substanz Pyripyropen A erfolgt aus drei Molekülen Mevalonat, fünf Acetat und einem Molekül Nikotinsäure (Kim et al., 1994).

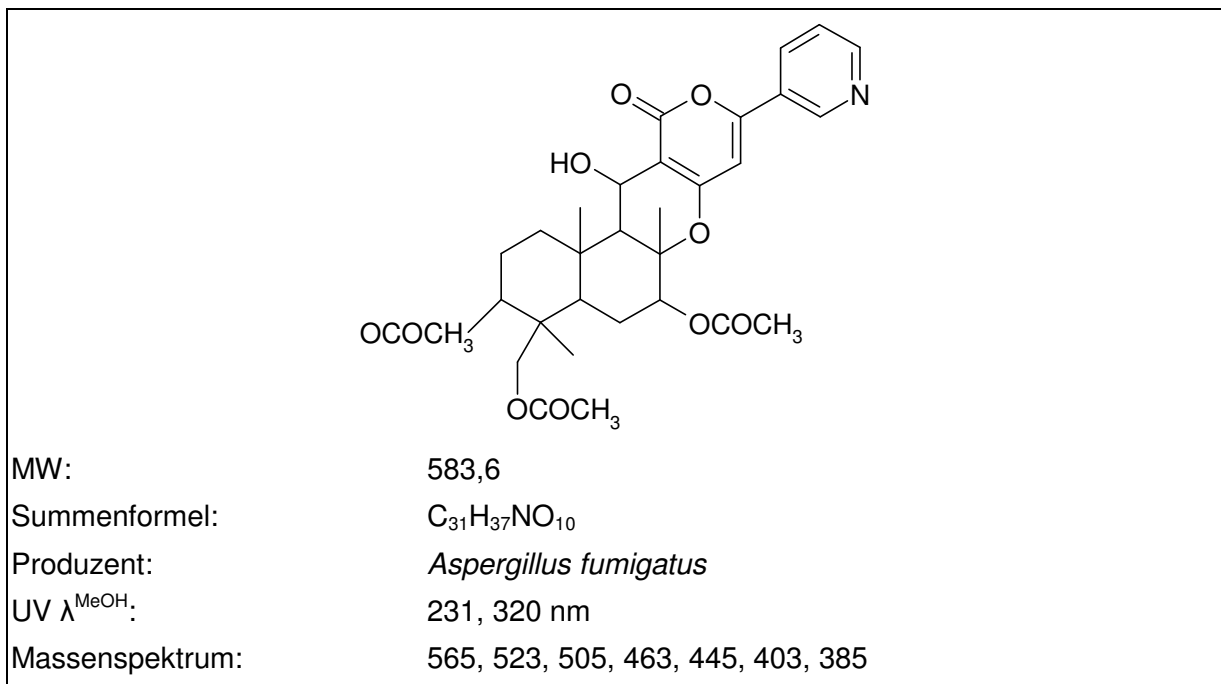


Abbildung 21: Strukturformel und charakteristische Daten von Pyripyropen A (Cole et al., 2003)

### 3.3.10 Helvolsäure

Helvolsäure (Abbildung 22) wurde erstmals 1943 beschrieben (Chain et al., 1943). Es handelt sich um eine farblose, nadelförmig kristalline und in einer Vielzahl an Lösungsmitteln lösliche Substanz, deren Schmelzpunkt bei 212 °C liegt. Helvolsäure ist nicht in Wasser löslich, jedoch existiert ein hydrophiles Natriumsalz. Die Summenformel wurde mit  $C_{33}H_{44}O_8$  angegeben (Williams, 1952; Shigenobu et al., 1964).

Die antibiotische Wirkung von Helvolsäure wurde aufgrund einer Kontamination mit Gliotoxin anfangs überschätzt. Allerdings reagieren, vor allem grampositive, Bakterien sensibel auf die Substanz (Okuda et al., 1966; Cole und Cox, 1981). Versuche an Mäusen deuteten auf eine geringe Toxizität ( $LD_{50} = 400$  mg/kg intraperitoneal) gegenüber Säugetieren hin (Menzel et al., 1944).

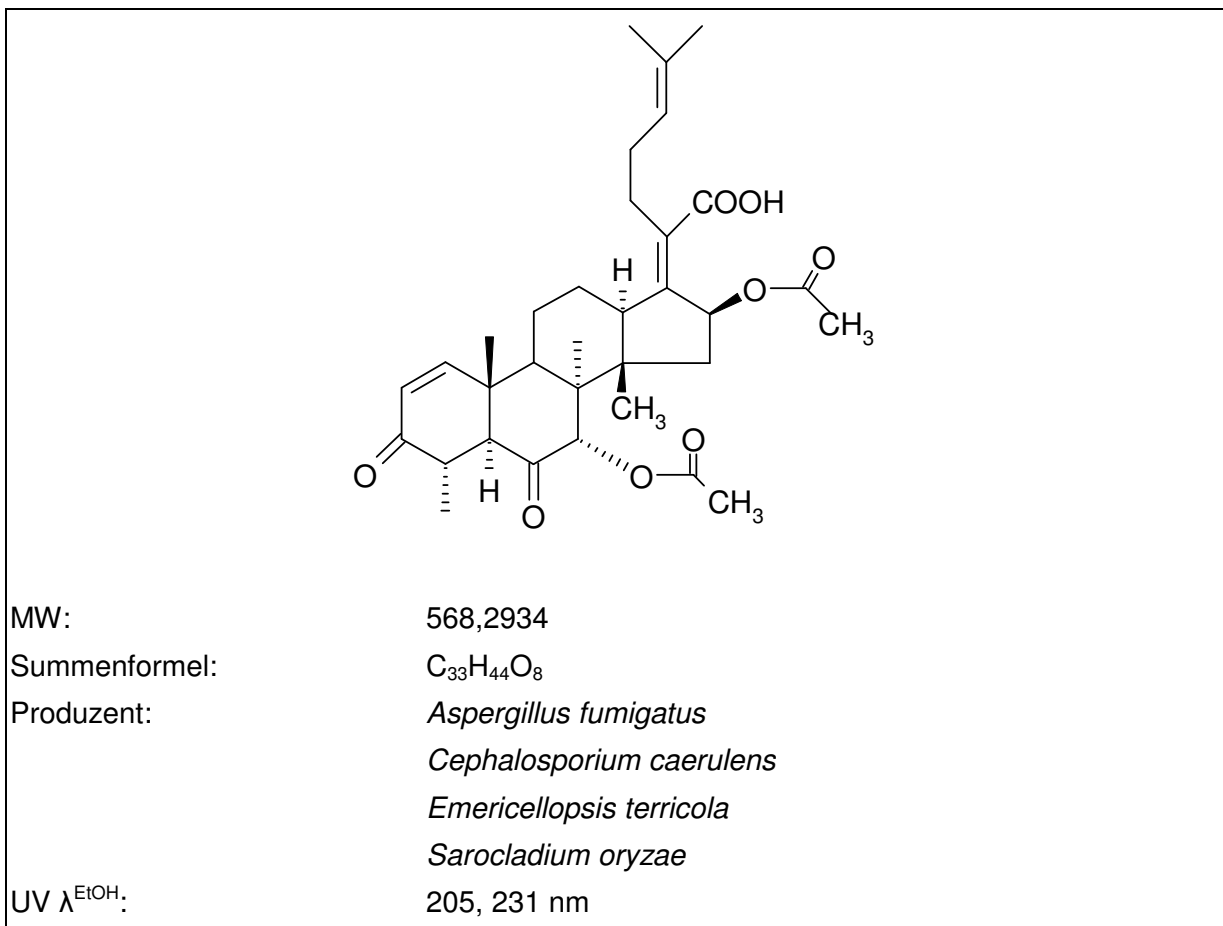


Abbildung 22: Strukturformel und charakteristische Daten der Helvolsäure (Cole und Cox, 1981)

## C Material und Methoden

### 1 Material

#### 1.1 Proben

Als Basis für die Methodenentwicklung sowie die Herstellung von Matrix assistierten Standards dienten Gras- und Maissilagen der Herkunft Versuchsgut Hirschau (TU München) und Versuchsstation Grub (Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft). Die Lagerung des Probenmaterials erfolgte lichtgeschützt bei -20 °C.

Durch die Zusammenarbeit mit der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft (LfL), den Ämtern für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten Rosenheim, Roth und Schwandorf, sowie den Lehr-, Versuchs- und Fachzentren der LfL konnten in den Jahren 2006 und 2007 insgesamt 584 Gärfutterproben für die mykologische und mykotoxikologische Untersuchung gewonnen werden. Diese gliederten sich in sensorisch einwandfreie, erwärmte und offensichtlich verpilzte Silagen (Tabelle 12). Eine Erwärmung des Silos, bzw. des Siloanschnitts wurde mittels Temperaturmesssonde und Wärmebildkamera detektiert und lokalisiert, so dass eine zielgerichtete Probennahme erfolgen konnte. Um Kontaminationen des Probenmaterials zu vermeiden, wurden, je nach Vorkommen, zuerst die unauffälligen, anschließend die erwärmten und zuletzt die „verpilzten“ Proben unter Verwendung jeweils neuer Einweghandschuhe entnommen. Das Material wurde noch vor Ort unter Vakuum in Folie verschweißt und gekühlt. Bis zur mikrobiologischen Untersuchung wurden die Silagen bis zu drei Wochen bei 4 °C gelagert.

Tabelle 12: Zeitliche und qualitative Verteilung der untersuchten Probenmaterialien über den Probennahmezeitraum

Probenart	Probenqualität	2006	2006/2007	2007	gesamt
Grassilage	normal	49	31	46	126
	erwärmt	25	7	17	49
	verpilzt	44	27	34	105
Maissilage	normal	45	27	46	118
	erwärmt	35	15	28	78
	verpilzt	43	26	39	108
<b>gesamt</b>		<b>241</b>	<b>133</b>	<b>210</b>	<b>584</b>

Nach der gekühlten Überführung des Probenmaterials an den Lehrstuhl für Tierhygiene der TU München wurden 15-20 g für die mikrobiologische Untersuchung entnommen und weitere 50-100 g in Plastikbeutel gegeben, welche bis zur mykotoxikologischen Untersuchung bei einer Temperatur von -20 °C gelagert wurden.

## 1.2 Mykologische Untersuchungen

### Gebrauchsmaterial

Laborschüttler (JAHNKE & KUNKEL KS 250)

### Verbrauchsmaterial

Peptonlösung 1 %:

10 g Pepton (MERCK Nr. 7213),

8,5 g NaCl

1000 ml H<sub>2</sub>O

### Sabouraud-Agar

Sabouraud-2 % Glucose-Agar (MERCK Nr. 7315)

400.000 IE Penicillin G (SIGMA Nr. PEN-NA)/1000 ml

40 mg Streptomycin (SIGMA Nr. S 6501)/1000 ml

### Dichloran-Glycerin-18-Agar (DG-18 Agar)

Dichloran-Glycerol-Agar (OXOID Nr. CM 729)

20 mg Chlortetracyclin HCl (SIGMA Nr. C 4881)/1000 ml

## 1.3 Mykotoxikologische Untersuchungen

Alle Arbeiten mit *Aspergillus fumigatus*-Stämmen wurden unter Einhaltung der notwendigen Sicherheitsmaßnahmen in einem Labor der Sicherheitsstufe 2 durchgeführt.

### Referenzsubstanzen

*Aspergillus fumigatus*-Toxine: Gliotoxin, Verruculogen, Fumitremorgen C und Fumagillin (alle SIGMA).

weitere verwendete Mykotoxine: Mykophenolsäure, Roquefortin C, Monacolin K<sub>L</sub>, Aflatoxin B<sub>1</sub> (alle SIGMA)

Lösungsmittel für Stammlösung: Acetonitril

Konzentration der Stammlösungen: 100 bzw. 10 µg/ml

Hergestellte Standardlösungen wurden bei -20 °C aufbewahrt.

### Gebrauchsmaterial

Laborschüttler (JAHNKE & KUNKEL KS 250)  
Vakuumzentrifuge (CHRIST, RVC 2-25, Osterode)  
Kühlfalle (CHRIST, CT 04-50, Osterode)  
Gefriertrocknungsanlage (CHRIST, Alpha I-5, Osterode)  
Ultraturrax (IKA-Werke, T25-BASIC, Staufen)

### Hochleistungsflüssigkeitschromatographie-Tandemmassenspektrometrie:

HPLC-Anlage (PERKIN-ELMER, Series 200)  
- Probeninjektor (PERKIN-ELMER, Series 200)  
- Säulenofen (PERKIN-ELMER, Series 200)  
- 2 HPLC-Pumpen (PERKIN-ELMER, Series 200)  
API 3200™ (Applied Biosystems Inc, Foster City, USA)  
C<sub>18</sub>-RP HPLC-Säule „SunFire“™ 5 µm, 10 x 150 mm (WATERS, Nr. 186002563)  
C<sub>18</sub>-RP HPLC-Säule „SunFire“™ 3,5 µm, 2,1 x 150 mm (WATERS, Nr. 186002535)  
Security Guard Cartridge, Gemini C<sub>18</sub> 4 x 2,0 mm (PHENOMENEX, AJO-7596)

### Verbrauchsmaterial

Zentrifugenröhrchen 50 ml (GREINER, Nr. 227261)  
Faltenfilter (GLW, Nr. FF18)  
Glasfaser Mikrofilter, 691 (VWR, Nr. VWRI-516-0075)  
Kieselgel 60 (MERCK, Nr. 1.07734.1000)  
Millex-HV Filter, 0,45 µm, PVDF (Millipore)  
Einmalspritzen 2 ml, 2-teilig, (HENKE SASS WOLF GmbH, Nr. 3M01048)  
C<sub>18</sub> RP Festphasenextraktionskartuschen, strata-X, 33µm polymeric sorbent, 200 mg/6 ml (PHENOMENEX, Nr. 8B-S100-FCH)  
HPTLC-Fertigplatten, Kieselgel 60 (MERCK, Nr. 5633)  
HPLC Crimp-Top Vials 1.1 ml (BGB Analytik, Nr. 110411)  
HPLC Crimp-Caps 11 mm (BGB Analytik, Nr. 11031201)  
Reis (UNCLE BEN'S®, parboiled)

### Chemikalien

Methanol (MeOH) (BAKER, Nr. 8402)  
Acetonitril (ACN) (BAKER, Nr. 9017)  
n-Hexan, 95 % (BAKER, Nr.8668)  
Ethylacetat (EA) (BAKER, Nr. 9260)  
Ammoniumformiat (SIGMA-ALDRICH, Nr. 70221)  
Toluol (MERCK, Nr. 1.08325.6025)  
Aceton (BAKER, Nr. 8002)  
Chloroform (MERCK, Nr. 1.02495.6025)



---

Alle verwendeten Chemikalien wiesen HPLC-Qualität auf. Reinstwasser wurde über eine Millipore-Anlage (MILLIPORE, Milli-Q<sub>plus</sub>) hergestellt.

#### Mikroorganismen

*Aspergillus fumigatus* (Stämme A5, A7, A8, A19; Lehrstuhl für Tierhygiene, TUM)

*Neosartorya fischeri* (Wehmer) Malloch & Cain (Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), DSM No. 3700)

*Penicillium simplicissimum* (Oudemans) Thom (DSMZ, DSM No. 1097)

## 2 Methoden

### 2.1 Überprüfung der Stabilität gelagerter Referenzsubstanzen

Um eine Aussage über die Stabilität von abgedunkelt und gekühlt gelagerten Referenzsubstanzen treffen zu können, wurde ein entsprechender Vorversuch durchgeführt. Aus Stammlösungen der Mykotoxine Gliotoxin, Fumagillin, Fumitremorgen C und Verrucologen wurden in ACN gelöste Mixstandards dreier verschiedener Konzentrationsstufen (10, 100 und 1000 ng/ml) hergestellt. Umgehend nach deren Fertigstellung wurden die jeweiligen Konzentrationsstufen dreifach in das HPLC-MS/MS-System injiziert und die durchschnittlichen Peakflächen bestimmt. Der ermittelte Wert entsprach „Tag 1“. Nach Abschluss der Messung wurden die HPLC-Fläschchen zur Lagerung in einen Gefrierschrank (-20 °C) gegeben. Weitere Messungen erfolgten an den Tagen 2, 3, 4, 7, 8, 9, 10, 15 und 22.

### 2.2 Herstellung kommerziell nicht angebotener Referenzsubstanzen

Da sich die Untersuchungen nicht nur auf käuflich erwerbbar *A. fumigatus*-Stoffwechselmetaboliten beschränken sollten, war ein bedeutender Teil dieser Arbeit die Herstellung von weiteren Referenzsubstanzen.

#### 2.2.1 Toxinproduktion

Von verschiedenen *A. fumigatus*-Kulturen (Stämme A 5, A 7, A 8, A 19) auf Sabouraud-Dextrose (SAB)-Agarplatten wurden Sporensuspensionen in PBS-Lösung hergestellt (Konzentration =  $10^8$  Sporen/ml) und von diesen je 1 ml gleichmäßig auf autoklaviertem Reis (100 g Reis + 100 ml Wasser, 121 °C, 15 min) verteilt. Anschließend wurden die Ansätze 14 Tage bei Raumtemperatur (ca. 20 °C) in Dunkelheit inkubiert. Mit den erhaltenen Ausgangssubstraten wurden Vorversuche durchgeführt, um eine optimale Ausbeute und Reinheit an zusätzlichen Referenzsubstanzen zu erreichen (Abbildung 23).

Im Vorfeld der Isolierung von bestimmten Mykotoxinen wurden die den gesuchten Verbindungen entsprechenden Molekülmassen mittels eines massenspektrometrischen Scans detektiert und bei ausreichender Signalintensität die substanzspezifischen Fragmente bestimmt. Hierzu wurde ein mit Acetonitril/Wasser (50/50, v/v) verdünntes und filtriertes (0,2 µm) Acetonitril/Wasser-Extrakt (84/16, v/v) der *A. fumigatus*-Reiskultur mit einer 1 ml-Spritze direkt in die Ionen-Quelle des Tandem-Massenspektrometers injiziert. Der Massenbereich zwischen  $m/z = 100$  bis 700 Da wurde abschnittsweise in Schritten von 100 Da im Q1-Scan Modus auf zutreffende Massen untersucht. Mögliche Massen von Addukt- bzw. Abspaltungsprodukten wurden ebenfalls berücksichtigt. Beide Elektrospray-Ionisierungsmöglichkeiten ESI+ und ESI- des Massenspektrometers wurden dabei genutzt.

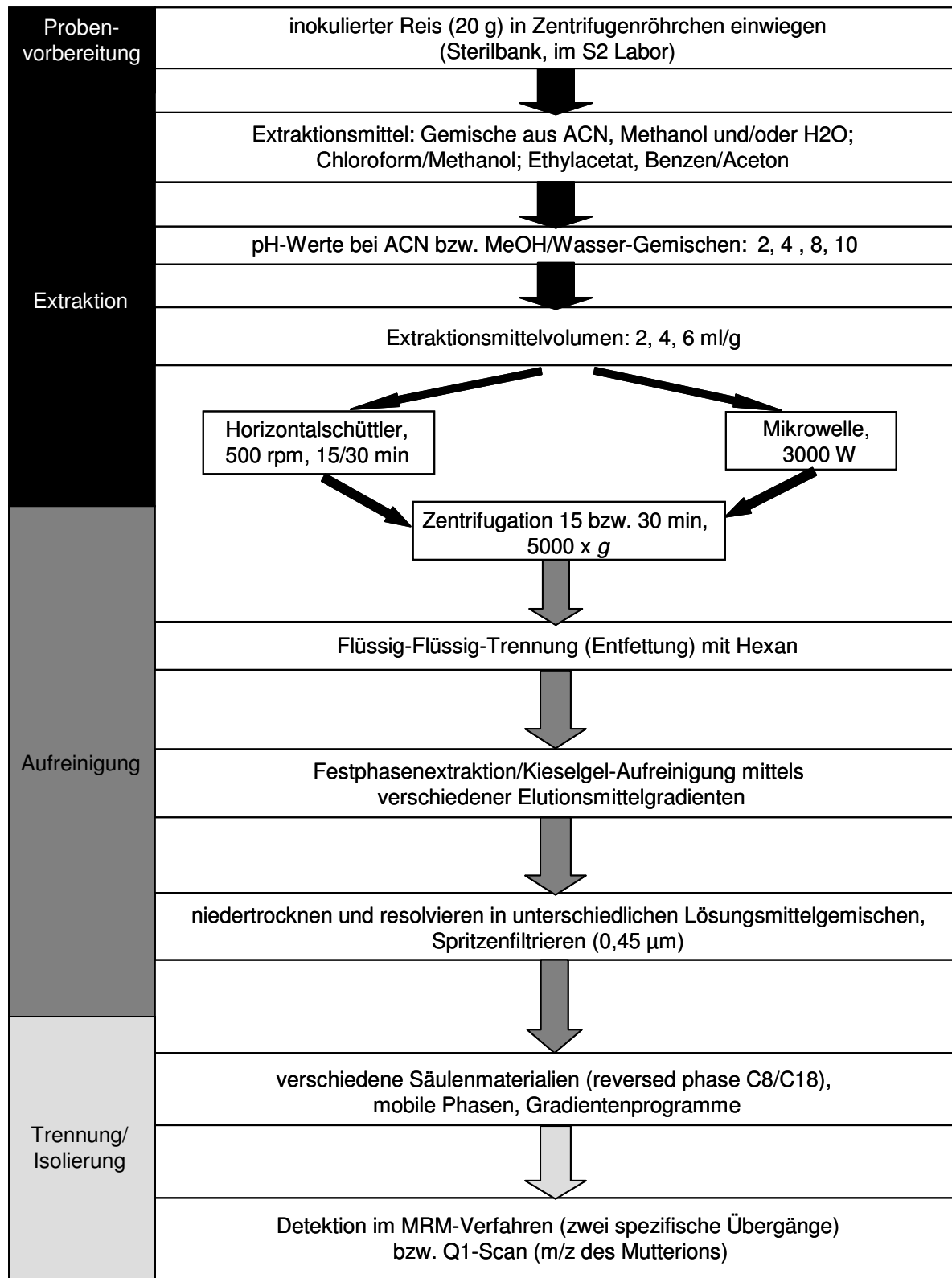


Abbildung 23: Maßnahmen in Vorversuchen zur Isolierung kommerziell nicht verfügbarer *Aspergillus fumigatus*-Metaboliten

Konnte den detektierten Quasimolekülmassen eine nach Literaturangaben potentiell von *Aspergillus fumigatus* gebildete Verbindung zugeordnet werden, wurden entsprechende Massenübergänge mit Hilfe der Gerätesoftware automatisch bestimmt. War die Konzentration hierfür zu gering, wurden manuell optimierte Spektren erstellt und die ermittelten Fragmentmassen und Parameterwerte in die für die Aufreinigung bestimmte HPLC-MS/MS-Methode aufgenommen.

### 2.2.2 Extraktion kommerziell nicht verfügbarer *A. fumigatus*-Stoffwechselprodukte

Die in Reiskultur gebildeten sekundären Stoffwechselmetaboliten wurden mit einem Acetonitril/Wasser-Gemisch (84/16, v/v), bzw. mit Ethylacetat extrahiert. Hierzu wurden je Gramm Ausgangsmaterial 4 ml des jeweiligen Extraktionsmittels verwendet. Die Suspension wurde für 30 min geschüttelt, bevor partikuläre Bestandteile des Extrakts abzentrifugiert wurden (5000 g, 20 min). Der Überstand wurde unter Vakuum vollständig eingeeengt.

### 2.2.3 Aufreinigung kommerziell nicht verfügbarer *A. fumigatus*-Stoffwechselprodukte

Der Rückstand wurde entweder in einem Methanol/Wasser-Gemisch (RP-Festphasenextraktion) oder Chloroform (Kieselgel-Säulenaufreinigung) gelöst. Zur Aufreinigung mit RP-Festphasenextraktionskartuschen wurde wie folgt vorgegangen:

Konditionierung:	Methanol (100 %, 5 ml);
Equilibrierung:	Reinstwasser (5 ml);
Beladung:	Methanol/Wasser-Lösung (5 ml);
Waschschritt:	Methanol/Wasser (40/60, v/v; 5 ml)
Elution:	Methanol (100 %, 7,5 ml).

Das Eluat wurde in einer Vakuumzentrifuge vollständig niedergetrocknet, der Rückstand in 1 ml eines Acetonitril/Wasser-Gemischs (50/50, v/v) resolviert und nicht gelöste Stoffe mittels Spritzenfilter (Porenweite = 0,45 µm) abgetrennt. Die Lagerung bis zur weiteren Verwendung erfolgte lichtgeschützt bei -20 °C.

Zur Aufreinigung der Rohextrakte wurde auch auf eine säulenchromatographische Trennung mittels Kieselgel 60-Material zurückgegriffen. Die verwendeten Lösungsmittel und deren Volumen sowie Angaben über die jeweils gewonnenen Toxine sind in Tabelle 13 zusammengefasst. Die Fraktionen dieses Aufreinigungsprozesses wurden analog zu den Eluaten der Festphasenextraktion behandelt.

Tabelle 13: Lösungsmittelzusammensetzung der Kieselgelaufreinigung

Fraktion	Lösungsmittelzusammensetzung	Volumen	enthaltene Substanzen
1	Aceton/Toluol (2/98, v/v)	25 ml	Trypacidin, Fumitremorgen A, Spuren von Verrucologen und Fumitremorgen B
2	Aceton/Toluol (5/95, v/v)	25 ml	Verrucologen, Fumitremorgen B, Fumiquinazoline A/B, Tryptoquivalin F/J
3	Diethylether (100 %)	20 ml	Fumitremorgen C, TR 2, Fumigaclavin C
4	Acetonitril/Essigsäure (99/1, v/v)	20 ml	TR 2, Fumiquinazolins C/D, Fumitremorgen C, Fumagillin
5	Methanol (100 %)	20 ml	Fumigaclavine A, B, Festuclavin

#### 2.2.4 Isolierung der Substanzen mittels semipräparativer HPLC

Die aufgereinigten Extrakte wurden in das HPLC-MS/MS-System injiziert und mittels schwach azider mobiler Phase (Methanol/Wasser + 5 mM Ammoniumformiat bzw. Acetonitril/Wasser + 0,005 % Ameisensäure) an C<sub>18</sub> RP-Material getrennt (Tabelle 14). Die Detektion der Substanzen erfolgte mit Hilfe eines Tandem-Massenspektrometers im positiven Ionisierungsmodus (ESI<sup>+</sup>) anhand der ermittelten Massenübergänge bzw. im Q1-Scan-Verfahren, sofern noch keine spezifischen Massenübergänge der jeweiligen Substanzen bekannt waren.

Zur Gewinnung einzelner Fraktionen wurde ein T-Stück in die von der HPLC-Anlage zum Tandem-Massenspektrometer führende Kapillare eingefügt (Abbildung 24). Durch die Teilung des Flüssigkeitsstroms war eine anteilige Separierung des Eluats zum Zeitpunkt der Retention substanzspezifischer Signale möglich. Das Lösungsmittel wurde in einer Vakuumzentrifuge vollständig verdampft, der Rückstand in Acetonitril (100 µl) aufgenommen und bei -20 °C für weitere Untersuchungen gelagert.

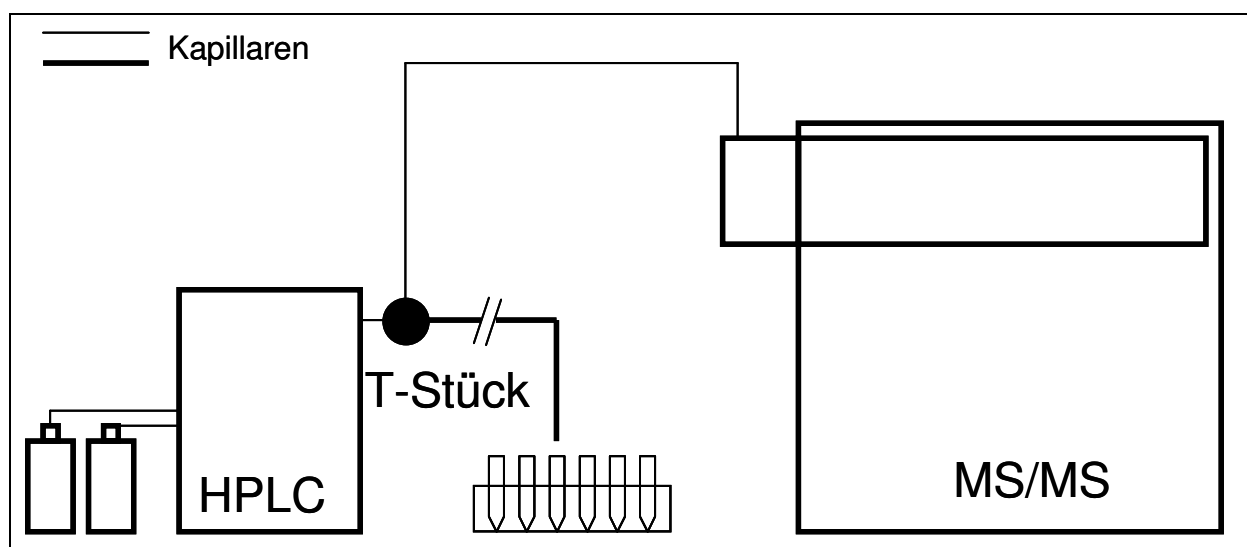
Tabelle 14: HPLC-Gradienten zur Gewinnung von *Aspergillus fumigatus*-Stoffwechselmetaboliten

Gradient	Dauer [min]	Mobile Phase 1* (v/v)	Mobile Phase 2** (v/v)	Fluss [ $\mu$ l]
konstant	5	30/70	40/60	1500
linear	30	100/0	100/0	1500
konstant	3	100/0	100/0	1500
linear	0,5	30/70	40/60	1500

\* Methanol/Wasser + 5 mM Ammoniumformiat

\*\* Acetonitril/Wasser + 0,005 % Ameisensäure

Um eine hohe Reinheit der isolierten Substanzen zu erreichen, wurden diese in entsprechenden Lösungsmitteln bis zur Kristallisation aufkonzentriert. Nach vollständiger Evaporation wurden die Kristalle erneut in organischen Solventen gelöst. Die Lösung wurde in ein zuvor mit einer Feinwaage gewogenes Glasfläschchen gegeben, die flüchtigen Anteile durch Gefriertrocknung entzogen und das Glasfläschchen erneut gewogen. Durch Differenzrechnung konnte die enthaltene Menge bestimmt werden.

Abbildung 24: Schematische Darstellung des HPLC-MS/MS-Systems zur Isolierung von *Aspergillus fumigatus*-Metaboliten

Bei den Fumigaclavinen A, B und C sowie auch bei Festuclavin handelt es sich um Alkaloide. Sie unterscheiden sich bezüglich ihrer chemisch-physikalischen Eigenschaften deutlich von anderen *A. fumigatus*-Metaboliten. Daher wurden diese Substanzen mit einem gesonderten Verfahren aus inokuliertem Reis extrahiert und aufgereinigt. Die Aufreinigung beruht auf der Unlöslichkeit dieser Stoffklasse in Basen, bzw. der guten Löslichkeit in Säuren. Die dreifache Extraktion (100 ml) erfolgte mit alkalisiertem Ethylacetat. Die Ethylacetat-Phasen wurden vereinigt und eingengt. Das Konzentrat wurde mit 30 ml Salzsäure (0,01 molar) verdünnt und die Lösung kurz geschüttelt (Vortex). Die wässrige Phase wurde mit Ammoniaklösung auf pH 10 eingestellt und dreimal mit dem gleichen Volumen an Ethylacetat ausgeschüttelt. Die organischen Phasen wurden vereinigt und niedertrocknet, der Rückstand in Acetonitril/Wasser (10/90, v/v) aufgenommen und die Lösung in das HPLC-System injiziert. Unter Verwendung eines isokratischen HPLC-Programms (Acetonitril/Wasser, 20/80, v/v) konnten die Substanzen nahezu vollständig voneinander getrennt werden.

### 2.3 Bestimmung des Keimgehaltes und der Keimarten

Zum qualitativen und quantitativen Nachweis von Schimmelpilzen wurde das von Gedek (1974) beschriebene Oberflächenkultur-Spatelverfahren herangezogen. Von den jeweiligen Gärfuttermitteln wurden 10 g in Erlenmeyerkolben eingewogen und mit 90 ml steriler 1 %iger Peptonlösung versetzt. Anschließend wurde der Inhalt auf einem Horizontalschüttler 30 min (200 U/min) bei Raumtemperatur suspendiert. Abhängig von der sensorischen Bewertung des Verderbnisgrades wurde von den Suspensionen eine Verdünnungsreihe bis zu  $10^{-6}$  hergestellt. Jeweils 100  $\mu$ l dieser Verdünnungsstufen wurden auf zwei Selektivmedien (Sabouraud-, Dichloran-Glycerin-18-Agar) ausgespatelt, so dass sich bei geringster Verdünnungsstufe  $10^{-2}$  Grammäquivalent Futtermittel auf einer Agarplatte befanden, bei der höchsten noch  $10^{-7}$  Grammäquivalent. Hieraus resultierte eine Nachweisgrenze von 100 Kolonien bildende Einheiten (KBE) pro Gramm Futtermittel. Die Agarplatten wurden im Brutschrank für 24 h bei 37 °C und anschließend für weitere 8 Tage lichtgeschützt bei 20 °C aerob bebrütet.

Für die quantitative Auswertung wurden Agarplatten mit bis zu 500 Kolonien ausgezählt. Dabei wurde für verschiedene Mikroorganismen jener Agartyp verwendet, welcher das bessere Wachstum ermöglichte. Unterschiedliche Verdünnungsstufen konnten mit dem jeweiligen Reziproken multipliziert und der Mittelwert daraus abgeleitet werden. Daraus ergab sich die Anzahl KBE pro Gramm Silage. Die qualitative Differenzierung der einzelnen Schimmelpilze erfolgte anhand koloniemorphologischer und mikroskopischer Merkmale. Sprosspilze wurden nicht genauer bestimmt und unter dem Sammelbegriff Hefen zusammengefasst.

## 2.4 Voruntersuchungen zur mykotoxikologischen Analyse der Silageproben

Für den bestmöglichen Nachweis von *A. fumigatus*-Metaboliten in Silagen mittels HPLC-MS/MS wurden zahlreiche Vorversuche durchgeführt. Zur artifiziellen Kontamination der Proben diente mit Acetonitril verdünntes Reisextrakt (Acetonitril/Wasser, 84/16, v/v, Verdünnung = 1:100), welches mit den Mykotoxinen Gliotoxin, Fumagillin, Mykophenolsäure, Roquefortin C und Monacolin K<sub>L</sub> supplementiert wurde (je 100 ng/ml). Diese Lösung wird im Folgenden als „Reisextrakt +“ bezeichnet.

### Probenmenge

Das maximale Probengewicht war aufgrund des teilweise sehr trockenen Probenmaterials (bis zu 50 % Trockenmasse) auf 10 g Silage begrenzt. Die Extraktion größerer Mengen Probenmaterials wäre mit einem deutlichen Anstieg der eingesetzten Chemikalien, sowie des Arbeitsaufwands verbunden gewesen. Die zu erwartende Steigerung der Aussagekraft erschien dagegen gering.

Tabelle 15: Versuchsaufbau zur Definition des optimalen Extraktionsmittels für den Nachweis von *Aspergillus fumigatus*- und anderen Mykotoxinen aus Gras- und Maissilagen

Extraktionsmittel				
MeOH/H <sub>2</sub> O	ACN/MeOH/H <sub>2</sub> O	ACN/H <sub>2</sub> O	C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> O/MeOH	Ethylacetat
(50/50)	(25/50/25)	(84/16)	(90/10)	100%

je fünf Gramm Silage (Dreifachansatz) artifiziell kontaminiert (Reisextrakt +)

+ 20 ml Extraktionsmittel

Horizontalschüttler 30 min.

Zentrifuge 30 min., 5000 x g

200 µl abnehmen

+ 600 µl Reinstwasser	niedertrocknen, in 800 µl Acetonitril/Wasser (20/80) lösen
Filtration (Porenweite 0,45 µm)	
HPLC-MS/MS-Analyse, externe Quantifizierung (Reisextrakt +)	



### *Extraktionsmittel*

Zur Optimierung des Extraktionserfolgs wurden unterschiedliche Lösungsmittel und Lösungsmittelgemische auf deren Eignung untersucht (Tabelle 15). Die Extraktion von 5 g artifiziell kontaminiertem Probenmaterial erfolgte mit je 20 ml Lösungsmittel. Der jeweilige Extraktionserfolg wurde mittels eines direkten Vergleichs mit „Reisextrakt +“ bestimmt.

### *Aufreinigung*

Um eine möglichst effektive Aufreinigung des Extrakts zu erreichen, wurden verschiedene Festphasenextraktionssäulen und auf dem Filtrationsprinzip basierende Aufreinigungssäulen miteinander verglichen:

- strata-X 33  $\mu\text{m}$ , 30 mg/1 ml; Phenomenex
- strata 50  $\mu\text{m}$ , Tri-Func., C18-E, 100 mg/ml, Phenomenex
- Bond Elut®, Varian
- MycoSep® 226 AflaZon+, Romer Labs®

### *Auftrennung und Detektion*

Für die HPLC-Trennmethode wurden mehrere Parameter optimiert und aufeinander abgestimmt. Einerseits sollte die Ionisierung des Analyten im Detektionssystem durch das Fließmittel nicht negativ beeinträchtigt werden, andererseits sollten die untersuchten Analyten aufgetrennt werden. Das Säulenmaterial musste außerdem für die verwendeten Fließmittel geeignet sein. Folgende Säulenmaterialien wurden verglichen:

- Synergi, C<sub>18</sub> RP, PHENOMENEX
- Atlantis, C<sub>18</sub> RP, WATERS
- Gemini, C<sub>18</sub> RP, PHENOMENEX
- Sunfire, C<sub>18</sub> RP, WATERS
- Luna, C<sub>8</sub> RP, WATERS

Dabei wurden jeweils folgende Lösungsmittelgemische als mobile Phase verwendet:

- Methanol/Wasser rein
- Methanol/Wasser + 5 mM Ammoniumformiat
- Methanol/Wasser + 0,005 % Ameisensäure
- Acetonitril/Wasser rein
- Acetonitril/Wasser + 5 mM Ammoniumformiat (nur in der wässrigen Phase)
- Acetonitril/Wasser + 0,005 % Ameisensäure

Die Detektion der Analyten mittels Tandem-Massenspektrometrie wurde, nachdem diese aufgereinigt und aufkonzentriert wurden, unter Verwendung der Gerätesoftware erneut automatisch optimiert (Kapitel 2.2.1). Für jede Verbindung wurden die optimalen Parametereinstellungen des Massenspektrometers ermittelt (Quellentemperatur,

Ionisationsspannung, Gasflüsse und elektrische Potentiale). Hierzu wurde der betreffende Analyt in einem Lösungsmittelgemisch aufgenommen, welches der Zusammensetzung zum Zeitpunkt der Elution der Substanz von der Säule entsprach. Die eingestellte Konzentration des jeweiligen Analyten betrug ca. 1 µg/ml. Je zwei der besten Massenübergänge (Mutterion/Tochterion) der jeweiligen Moleküle wurden in die Messmethode integriert, einer als sogenannter „Quantifier“ zur Quantifizierung der Substanz, der andere als „Qualifier“, um die Wahrscheinlichkeit einer falsch-positiven Messungen minimieren zu können.

Für die Entwicklung einer Multimethode, der gleichzeitigen Messung möglichst vieler Substanzen, galt es einen Kompromiss zu finden, der aufgrund der Einstellung der Quellenparameter (Temperatur, Spannung, Gasfluss) sowie der verwendeten Kollisionsenergie zur Fragmentierung der Moleküle die Detektion aller Substanzen in befriedigendem Maße ermöglichte. Hierzu wurden Messreihen durchgeführt, wobei jeweils nur ein Quellenparameter schrittweise verändert wurde. Um matrixabhängige Unterschiede hinsichtlich der erfassten Signalintensitäten abschätzen zu können, wurden sowohl reine Lösungen als auch in Probenmatrix gelöste Standards gleicher Konzentration verwendet.

## 2.5 Analyse von Mykotoxinen in Silage mittels HPLC-MS/MS

Aufgrund der Ergebnisse der Vorversuche zur Gewinnung sekundärer *Aspergillus fumigatus*-Stoffwechselprodukten sowie zur Analyse von artifiziell kontaminierten Silagen wurde folgende Analyseverfahren zur Untersuchung des Probenmaterials gewählt.

Die Einwaage von 10 g Gras- oder Maissilage erfolgte in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen. Zur Extraktion wurden 30 ml eines Acetonitril/Wasser-Gemisches im Verhältnis 84/16 (v/v) hinzugegeben und die Suspension 30 min geschüttelt (Horizontalschüttler, 500 U/min). Anschließend wurden die Proben für 15 min zentrifugiert (5000 x g) und 1,5 ml des Überstands (äquivalent zu 0,25 g Frischmasse) in ein Reagenzglas überführt. Das Lösungsmittel wurde unter Vakuum vollständig verdampft (ca. 2 h, 50 °C) und der Rückstand in 0,5 ml Methanol/Wasser (50/50, v/v) aufgenommen. Nach Behandlung mit Ultraschall (2 min, 20 °C) wurden die Proben mit einer Einzelspritze über einen aufgesetzten Spritzenfilter (Porenweite = 0,45 µm) in ein HPLC-Fläschchen (Crimp Vial) überführt. Dabei wurden nicht gelöste Bestandteile abgetrennt, das Probenfläschchen unverzüglich verschlossen und bei -20 °C lichtgeschützt gelagert.

Zur Auftrennung der einzelnen Substanzen mittels HPLC wurden 15 µl der aufgetauten und geschüttelten (Vortex) Probe durch ein automatisches Probenaufgabesystem in einen Loop des Volumens 100 µl injiziert. Der Ventilationsmodus war auf partielle Befüllung und Entleerung eingestellt.

Tabelle 16: Ermittelte Übergänge und Quellenparameter der Analysemethode

Substanz	Q1	Q3	Dwell	DP	EP	CEP	CE	CXP
Gliotoxin	327.224	263.0	20	26	4	14	15	24
	327.224	245.0	20	26	4	14	19	24
Fumagillin	459.412	177.0	20	26	7	16	19	6
	476.406	131.3	20	16	4	18	39	12
Verruculogen	494.353	352.2	20	36	8	20	19	32
	512.285	352.2	20	30	3	20	21	30
TR-2 Toxin	394.500	310.1	20	41	8	16	17	30
	412.351	394.0	20	36	7	16	15	36
	430.366	310.1	20	36	4	14	25	28
Fumitremorgen A	562.498	420.3	20	40	6	26	20	15
	580.246	352.1	20	36	4	22	25	34
Fumitremorgen B	462.531	281.1	20	51	7	20	21	28
	480.345	462.3	20	21	2	20	15	42
Fumitremorgen C	380.422	226.1	20	51	6	14	23	20
	380.564	211.9	20	46	4	16	37	22
Pyripyropen A	584.426	148.1	20	106	10	20	43	16
	584.426	201.8	20	86	10	20	33	20
Festuclovin	241.289	153.9	20	51	5	14	37	14
	241.199	168.0	20	61	6	12	33	16
Fumigaclavin A /Isofumigalcalvin A	299.354	208.1	20	51	6	14	25	20
	299.354	167.9	20	51	6	14	35	16
Fumigaclavin C	367.449	238.2	20	61	7	14	27	22
	367.449	276.1	20	61	7	14	25	24
Trypacidin	345.142	301.1	20	26	7	14	15	10
	345.142	312.9	20	26	7	14	15	28
Fumiquinazolin A/B	446.478	199.1	20	51	4	14	25	16
	446.478	170.9	20	51	4	14	37	16
Fumiquinazolin C/D	444.358	199.1	20	36	5	18	21	18
	444.358	426.0	20	36	5	18	37	16
Fumiquinazolin E	476.436	199.1	20	46	6	16	15	10
	476.436	154.1	20	46	6	16	37	16
Fumiquinazolin F/G	359.236	130.0	20	30	5	18	37	18
	359.236	230.0	20	30	5	18	25	16
Tryptoquivalin E	419.613	171.0	20	50	8	22	18	23
	419.613	199.1	20	50	8	22	18	23
Tryptoquivalin F/J	403.389	199.1	20	81	6	16	27	18
	403.389	147.2	20	81	6	16	35	14
Tryptoquivalin G	433.597	171.0	20	50	8	22	23	40
	433.597	147.1	20	50	8	22	23	40
Tryptoquivalin I	503.458	229.2	20	26	5	23	15	36
	503.458	252.3	20	26	5	23	27	30
Tryptoquivalin N	473.441	171.1	20	26	5	23	15	36
	473.441	229.2	20	26	5	23	27	30
Sphingofungin A	432.456	372.3	20	221	3	14	15	34
	432.456	354.3	20	221	3	14	17	32
Sphingofungin D	448.497	388.3	20	86	4	18	15	14
	448.497	370.3	20	86	4	18	15	14
Helvolsäure	586.362	509.3	20	16	4	22	17	18
	509.352	449.2	20	56	5	25	20	19
Tryprostatin B	352.511	130.0	20	41	7	20	21	18
	352.511	198.1	20	41	7	20	15	28
Demethoxy- Fumitremorgen C	350.474	196.0	20	16	4	19	21	22
	350.474	294.1	20	31	9	19	13	28
Dihydroxy- Fumitremorgen C	412.480	394.3	20	41	8	16	17	30
	412.480	310.2	20	41	8	16	17	30
Pseurotin A	432.448	316.1	20	31	11	12	13	34
	432.169	104.9	20	31	4	16	27	6
Synerazol	414.514	382.2	20	60	6	21	20	15
	414.514	104.9	20	60	6	21	20	15
Deacetyl-Fumigaclavin C	325.320	294.0	20	26	5	14	15	8
	325.320	276.0	20	26	5	14	19	24

DP = declustering potential; EP = entrance potential; CEP = collision cell entrance potential; CE = collision energy; CXP = collision cell exit potential

Nach der Injektion der Probe in den Hochdruckbereich des HPLC-Systems wurden die Bestandteile mit einem Gemisch aus Methanol, Wasser (10/90, v/v) und Ammoniumformiat (5 mM) zur Trennsäule transportiert (Volumenstrom: 200 µl/min); diese war mit einer Vorsäule versehen. Die Zusammensetzung des Fließmittels wurde für 3 min beibehalten. Anschließend wurde der Anteil des Methanols (+ 5 mM Ammoniumformiat) linear auf 100 % erhöht. Dieser wurde weitere 10 Minuten beibehalten, um das C<sub>18</sub>-Material der Trennsäule zu spülen. Anschließend wurde das Verhältnis von Methanol zu Wasser innerhalb einer halben Minute erneut auf 10/90 (v/v) gebracht. Während der Equilibrierung des Systems (3 min) und der Injektion der nachfolgenden Probenlösung wurde dieses Verhältnis konstant gehalten.

Die Detektion erfolgte im positiven Elektrospray-Ionisierungs-Modus (ESI<sup>+</sup>). Je zwei substanzspezifische Übergänge wurden gemessen (Tabelle 16). Diese und das Verhältnis der Signalintensitäten sowie die Retentionszeit wurden zur Identifizierung der jeweiligen Substanz herangezogen. Die Zeit zwischen zwei Messpunkten eines spezifischen Übergangs betrug ca. 1,5 Sekunden. Die Quantifizierung erfolgte anhand der ermittelten Peakflächen von Probe und in Matrix gelösten, externen Standards.

## 2.6 Bestimmung der Wiederfindungsraten und Nachweisgrenzen

Je fünf Konzentrationsstufen wurden im 5fach-Ansatz für Gras- und Maissilagen getestet. Durch den Zusatz einer unmittelbar zuvor hergestellten Stocklösung (100 µg/ml in Acetonitril) bzw. deren 1:10-Verdünnungen, wurden jeweils 10 g Silage mit 1, 10, 100, 500 bzw. 1000 ng/g Frischmasse der jeweiligen Verbindung kontaminiert. Die Proben wurden nach der in Kapitel 2.5 beschriebenen Methode aufbereitet. Die Validierung des quantitativen Nachweises wurde für Verruculogen, Fumitremorgen A, B und C, TR-2 Toxin, Gliotoxin, Fumagillin, Pyripyropen A, Trypacidin, Fumiquinazolin D und Fumigaclavin C (alle *A. fumigatus*-Metabolite), sowie für Monacolin K und Roquefortin C durchgeführt.

## 2.7 Statistische Auswertungen

Die statistischen Auswertungen erfolgten unter Zuhilfenahme von parametrischen und nicht-parametrischen Testverfahren der Statistik-Software SigmaStat<sup>®</sup> 3.5 (Firma Systat Software GmbH, San José, Kalifornien, USA).

## D Ergebnisse

### 1 Mykotoxikologische Voruntersuchungen

#### *Stabilität von Referenzsubstanzen*

Bei der Untersuchung der Stabilität von in Acetonitril gelösten *A. fumigatus*-Toxinen (Gliotoxin, Fumagillin, Fumitremorgen C und Verruculogen) wurde festgestellt, dass bei konsequenter Kühlung (4 °C) und lichtgeschützter Lagerung in den ersten drei Wochen nach Herstellung der Standardlösung keine Umwandlung der Substanzen zu beobachten war (Abbildung 25). Die Verwendung externer Standards über diesen Zeitraum sollte daher eine korrekte Quantifizierung ermöglichen. Darüber hinaus wurde deutlich, dass bei geringeren Konzentrationen stärkere Messungenauigkeiten hinzunehmen sind.

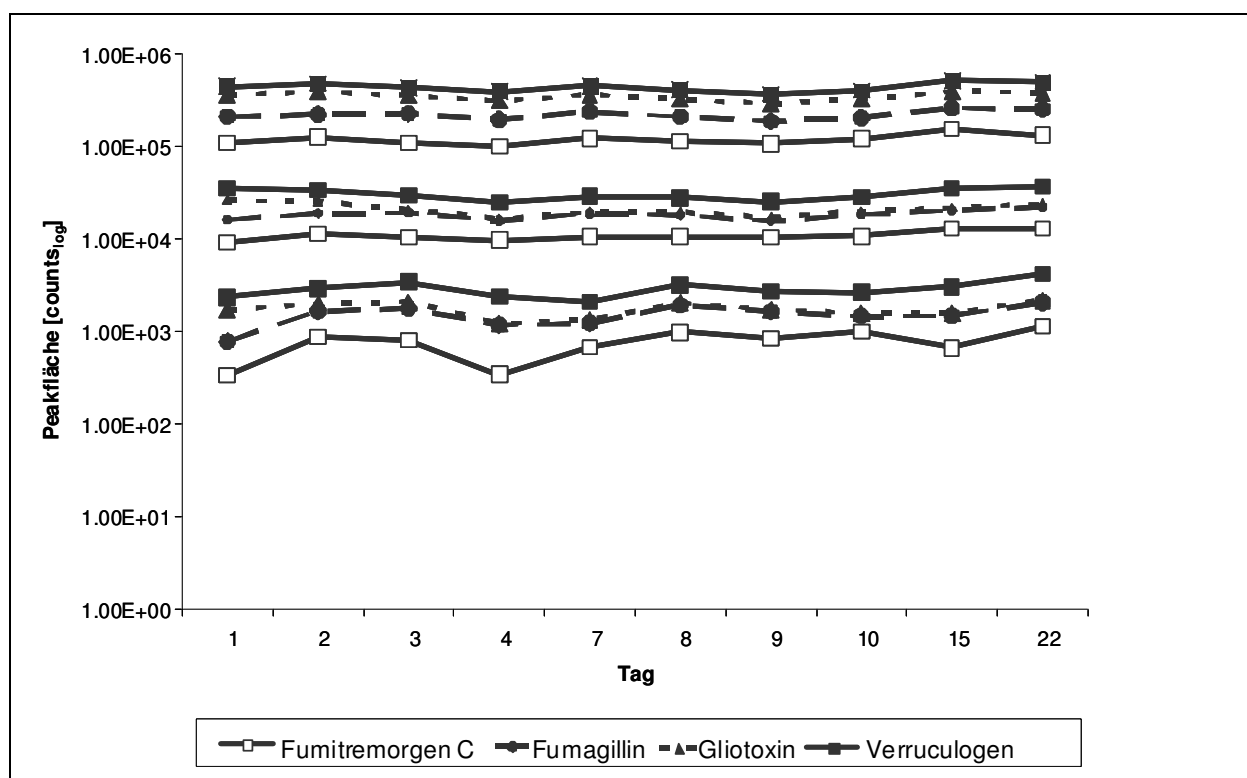


Abbildung 25: Signalintensitäten von unterschiedlich konzentrierten (10, 100, 1000 ng/ml) Mischstandards der Mykotoxine Verruculogen, Fumitremorgen C, Gliotoxin und Fumagillin in Acetonitril an ausgewählten Messtagen (Lagerbedingungen: Dunkelheit, 4 °C)

### Aufreinigung, Trennung und Detektion

Der Vergleich verschiedener Aufreinigungsverfahren nach dem Adsorptionsprinzip (polymerbasiertes RP<sub>18</sub>-Material) machte die Problematik der uneinheitlichen chemisch-physikalischen Eigenschaften der untersuchten Stoffwechselprodukte bei einem Multi-Nachweisverfahren deutlich (Tabelle 17).

Mykotoxine der Fumitremorgen-Verruculogen-Gruppe konnten zu einem größeren Teil, die Alkaloide (Festoclavin sowie die Fumigaclavine A, B und C) lediglich zu geringen Teilen wiedergefunden werden. Das auf dem Filtrationsprinzip beruhende Mycosep 226-Aufreinigungsverfahren entzog dem aufgetragenen Extrakt nahezu vollständig die untersuchten Substanzen. Aufgrund dieser Ergebnisse wurden diese Möglichkeiten einer Probenaufbereitung für den Nachweis von *A. fumigatus*-Stoffwechselmetaboliten in Silagen nicht weiter verfolgt. Die weitgehende Reduzierung der Extraktions- und Aufreinigungsverfahren führte zu der unter Kapitel C 2.5 beschriebenen Analysemethode.

Die Voruntersuchungen zur Optimierung des Nachweises mittels Tandem-Massenspektrometrie zeigten, dass hohe Ionisationsspannungen (5500 V) und Quellentemperaturen (750 °C) bei den meisten Analyten zur höchsten Ionenausbeute führen. Einige Verbindungen fragmentierten jedoch bereits in der Ionenquelle, zudem stieg das Grundrauschen deutlich an. Daraus resultierte eine erhöhte Nachweisgrenze der Substanzen. Die Messungen erfolgten daher mit den in Tabelle 18 dargestellten Einstellungen des Tandem-Massenspektrometers.

Tabelle 17: Vergleich unterschiedlicher Materialien zur Aufreinigung von artifiziell kontaminierten Reisextrakten anhand der erzielten Wiederfindungsraten

	Wiederfindungsrate [%]								
	Festu-clavin	Fumiga-clavin A	Fumiga-clavin B	Fumiga-clavin C	Fumagillin	FQD	FTC	Gliotoxin	Verruculogen
Mycosep 226	0,1	0,1	6,1	0,9	0,1	0,0	0,0	0,0	8,0
Bond Elut	33,4	25,8	1,3	15,4	0,1	23,6	44,5	8,6	22,0
C18-E	5,9	27,0	21,1	3,0	36,6	53,5	51,1	13,7	59,9
StrataX	37,8	30,1	24,9	23,9	32,7	55,7	46,9	43,1	51,8

FQD = Fumiquinazolin D, FTC = Fumitremorgen C

Tabelle 18: MS/MS-Geräteeinstellungen der Multimethode zum Nachweis von *Aspergillus fumigatus*-Toxinen aus Gras- und Maissilagen

Quellenparameter			Spektrometerparameter	
Scan-Modus		MRM	Resolution Q1	mittel
Curtain Gas	CUR	20	Resolution Q3	mittel
Collision Gas	CAD	3	Intensity threshold	10
IonSpray Spannung [V]	IS	5.500	Settling time [ms]	0
Temperatur [°C]	TEM	400	Pause between	
IonSource Gas 1	GAS 1	40	mass ranges [ms]	5
IonSource Gas 2	GAS 2	50		
Interface Heater	Ihe	aktiv		

## 2 Referenzsubstanzen

Zur Herstellung von Referenzsubstanzen wurden *A. fumigatus*-Kulturen angelegt und mykotoxikologisch untersucht. Somit konnten neben den käuflich erwerbbaaren Substanzen Gliotoxin, Verruculogen, Fumagillin und Fumitremorgen C 30 weitere Substanzen aufgrund ihrer spezifischen Massenübergänge identifiziert und isoliert werden (Tabelle 19). Sieben Verbindungen wurden dabei in ausreichender Menge und Reinheit gewonnen um eine quantitative Bestimmung dieser Substanzen zu ermöglichen. Zusätzlich standen Mykophenolsäure, Roquefortin C und Monacolin K als weitere in Silage relevante Referenzsubstanzen zur Verfügung, so dass die Silageproben auf insgesamt 37 Pilzstoffwechselprodukte untersucht werden konnten.

Tabelle 19: Referenzsubstanzen

Erworbene, quantitativ nachweisbare <i>A. fumigatus</i> -Stoffwechselprodukte	Selbst isolierte, qualitativ nachweisbare <i>A. fumigatus</i> -Stoffwechselprodukte
Gliotoxin Fumitremorgen C (FTC) Fumagillin Verruculogen	Deacetyl-Fumigaclavin C Demethoxy-FTC Dihydroxy-FTC Festuclavin Fumigaclavin/Isofumigaclavin A
Selbst isolierte, quantitativ nachweisbare <i>A. fumigatus</i> -Stoffwechselprodukte	Fumiquinazolin A Fumiquinazolin B Fumiquinazolin C Fumiquinazolin E Fumiquinazolin F Fumiquinazolin G Helvolsäure Pseurotin A Sphingofungin A Sphingofungin D Synerazol
Erworbene, quantitativ nachweisbare Mykotoxine anderer Schimmelpilzarten	Tryprostatin B Tryptoquivalin D Tryptoquivalin E Tryptoquivalin F/J Tryptoquivalin G Tryptoquivalin I Tryptoquivalin N
Mykophenolsäure Roquefortin Monacolin K	



## 2.1 Quantitativ nachweisbare Stoffwechselmetaboliten

### *Fumitremorgen A (aus Neosartorya fischeri)*

MW: 579,2945; gefunden  $[M+H]^+ = 580,4$

Produzent: *Neosartorya fischeri*

TLC-Daten: Kieselgel 60, Toluol-Ethylacetat-Ameisensäure (v/v/v; 5/4/1)  $R_f$ : 0,68  
senffarbener Fleck nach dem Besprühen mit ethanolischer Schwefelsäure

MS/MS  $[M+H]^+$ : 580,4; 511,0; 494,0; 352,0; 312,0; 266,0; 240,0

Um Fumitremorgen A zu isolieren, musste ein *Neosartorya fischeri*-Stamm auf Reis angezüchtet werden, da die verwendeten *A. fumigatus*-Stämme kein Fumitremorgen A produzierten oder dieses nicht detektiert werden konnte (vgl. Larsen et al. 2007). Die Extraktion der Kultur erfolgte mit Ethylacetat. Die Aufreinigung mittels Kieselgelsäule ermöglichte eine effektive Abtrennung von Begleitsubstanzen. Ein anschließender HPLC-Aufreinigungsschritt und die Kristallisation aus Methanol lieferten das Referenzmaterial. Das Fragment mit der Masse  $m/z = 511$  ergibt sich vermutlich aus der Abspaltung der veresterten  $-C_5H_9$  Seitenkette (Abbildung 26). Das weitere Fragmentierungsverhalten glich zu einem hohen Maß jenem von käuflich erworbenem, kristallinem Verruculogen. Einen weiteren Hinweis auf die Identität der Substanz lieferte die dünnschichtchromatographische Untersuchung der gewonnenen Kristalle:  $R_f$ -Wert und Färbverhalten stimmten mit den Angaben der Literatur überein (Cole und Schweikert, 2003b).

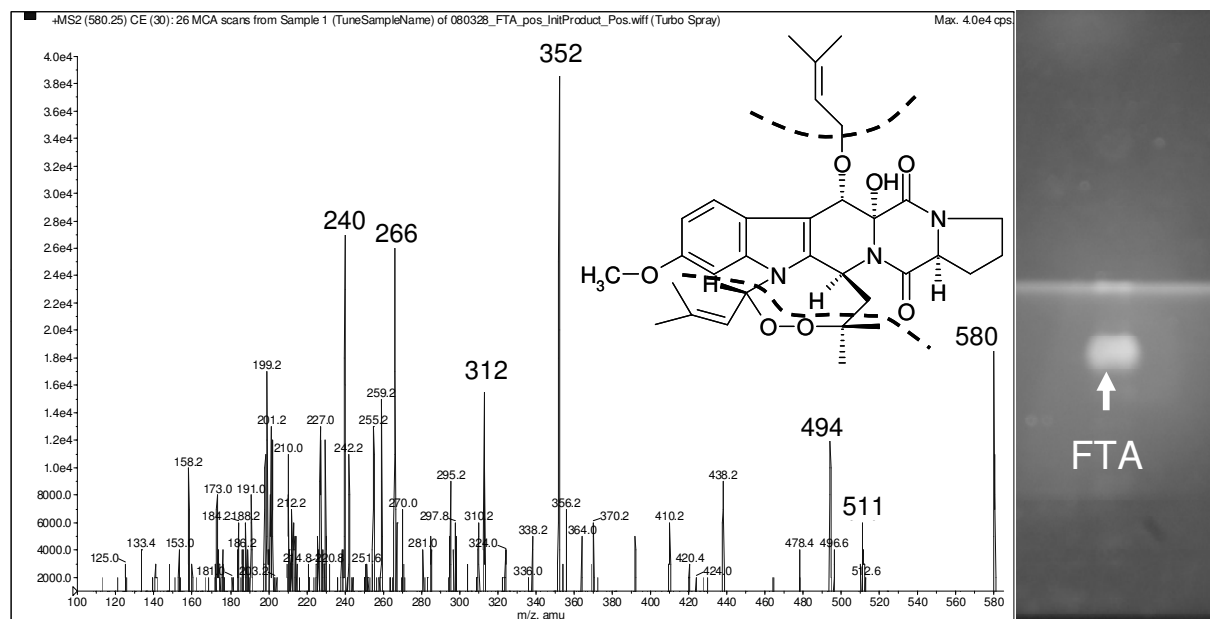


Abbildung 26: Produktionenspektrum (MS/MS, ESI+) von Fumitremorgen A (links) und dünnschichtchromatographischer Nachweis (rechts)

*Fumitremorgen B*MW: 479,2420; gefunden  $[M+H]^+ = 480,3$ Produzenten: *Aspergillus fumigatus*  
*Penicillium simplicissimum*TLC-Daten: Kieselgel 60, Aceton-Dichlormethan (v/v; 5/95)  $R_f$ : 0,38; heller blauer Fleck nach dem Besprühen mit ethanolischem AluminiumchloridMS/MS  $[M+H]^+$ : 480,3; 462,3; 394,3; 310,3; 281,3; 213,3

Die Produktion von Fumitremorgen B konnte sowohl für die verwendeten *Penicillium simplicissimum*- als auch die *Aspergillus fumigatus*-Stämme nachgewiesen werden. Die gefällten Kristalle wurden in Acetonitril gelöst und dünnschichtchromatographisch getrennt. Durch Verunreinigungen zeigten sich weitere fluoreszierende Banden außerhalb des erwarteten  $R_f$ -Bereichs (Abbildung 27).

Die erzielte Reinheit von Fumitremorgen B war demzufolge nicht so hoch wie von Fumitremorgen A. Zwar zeigte sich bei einer massenspektrometrischen Untersuchung des Standards mit der verwendeten HPLC-MS/MS-Multimethode keine detektierbare Verunreinigung, eingewogenes kristallines Fumitremorgen B wurde dennoch um den Faktor 0,9 korrigiert, um Überschätzungen von in Silagen vorkommenden Toxinkonzentrationen zu nivellieren. Das Fragment  $m/z = 462$  resultiert mit großer Wahrscheinlichkeit aus einer Wasserabspaltung (Larsen et al., 2007) und konnte bereits als Quellenfragment der Ionisierung detektiert werden. Die Masse  $m/z = 394$  kann mit dem zusätzlichen Verlust der  $C_5H_9$ - Seitenkette am zentralen Stickstoffatom erklärt werden.

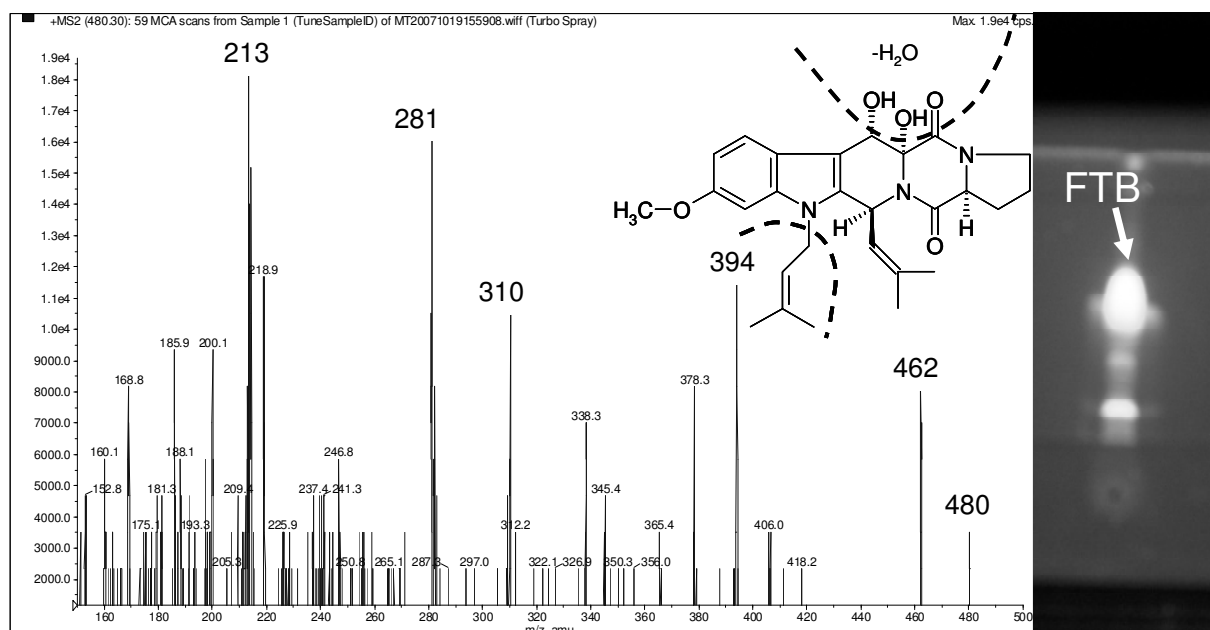


Abbildung 27: Produktionenspektrum (MS/MS, ESI+) von Fumitremorgen B (links) dünnschichtchromatographischer Nachweis (rechts)

*TR-2 Toxin*MW: 429,1899; gefunden  $[M+H]^+ = 430,3$ Produzenten: *Penicillium simplicissimum*  
*Aspergillus fumigatus*  
*Neosartorya fischeri*TLC-Daten: Kieselgel 60, Toluol-Ethylacetat-Ameisensäure (v/v/v; 5/4/1)  $R_f$ : 0,46;  
schwach brauner Fleck nach dem Besprühen mit ethanolischer  $H_2SO_4$ MS/MS  $[M+H]^+$ : 430,3; 412,0; 394,0; 356,0; 310,0; 214,0

Alle Produzenten von Verruculogen produzierten auch TR-2 Toxin. Im Zuge der HPLC-Trennung zeigte sich, dass abhängig von der Schimmelpilzgattung vermutliche Isomere gebildet wurden (Cole et al., 1975; Willingale et al., 1983). Diese wiesen identische Fragmentierungsmuster, aber unterschiedliche Retentionszeiten auf. Die Fragmente mit den Massen  $m/z = 412$  und  $394$  deuten auf zwei Wasserabspaltungen hin (Abbildung 28). Darüber hinaus war die Abspaltung einer  $-C_5H_8O$  Seitenkette zu beobachten (vgl. Cole und Schweikert, 2003), welche das Fragment der Masse  $m/z = 310$  erklärt. Einen weiteren Hinweis auf die Identität der Verbindung ergab die dünnschichtchromatographische Untersuchung der isolierten Kristalle. Sowohl der  $R_f$ -Wert als auch die bräunliche Färbung nach dem Besprühen mit ethanolischer  $H_2SO_4$  stimmen mit den Literaturangaben überein (Cole und Schweikert, 2003b).

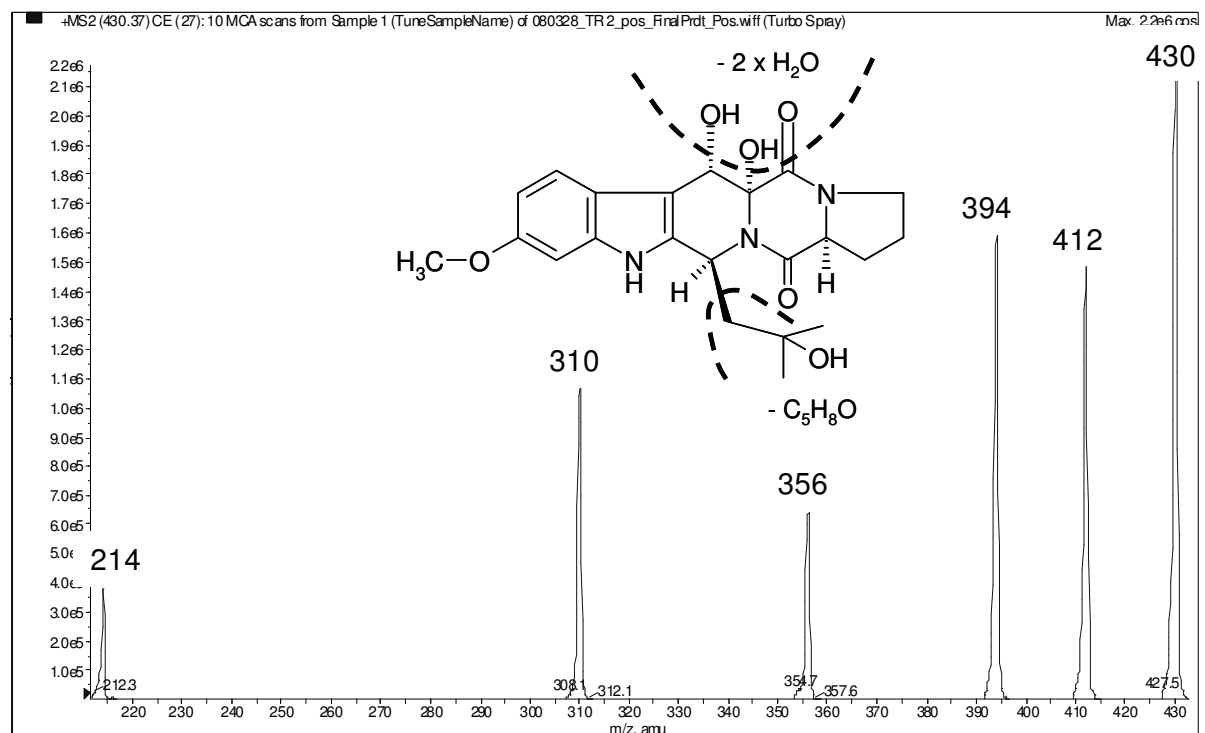


Abbildung 28: Produktionspektrum (MS/MS, ESI+) von TR-2 Toxin



und Aufreinigung mittels Säulenchromatographie (Kieselgel 60), konnte Trypacidin mit der ersten Fraktion gewonnen werden. Die weitere Aufreinigung über das HPLC-Trennverfahren lieferte farblose Kristalle. Die Identität der isolierten Substanz wurde mittels NMR-Spektrometrie bestätigt<sup>1</sup>.

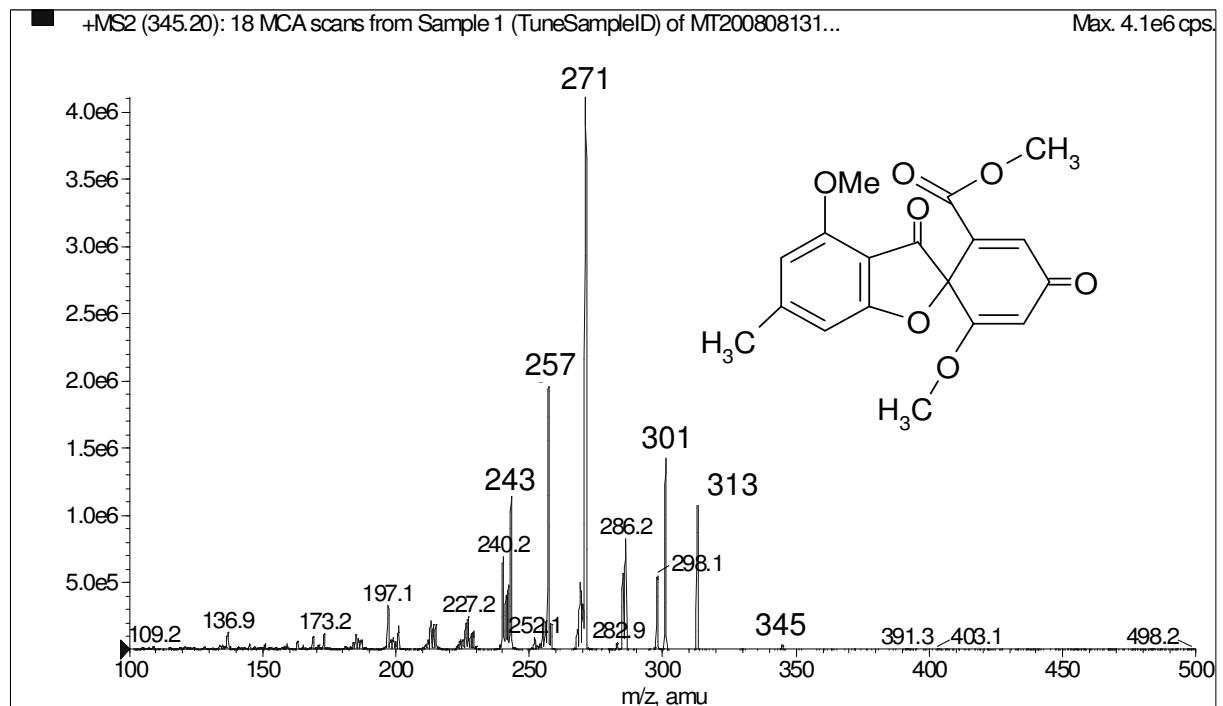


Abbildung 30: Produktionsenspektrum (MS/MS, ESI+) von (Mono-) Trypacidin

#### *Fumiquinazolin D*

MW: 443,1594; gefunden  $[M+H]^+ = 444,3$

Produzenten: *Aspergillus fumigatus*  
*Neosartorya fischeri*

MS/MS  $[M+H]^+$ : 444,2; 426,0; 372,9; 256,0; 240,1; 228,2; 199,0; 171,1

Fumiquinazolin D zeigte durchwegs eine höhere Signalintensität als andere Fumiquinazoline. Auf die Herleitung der spezifischen Fragmente wurde bereits in Kapitel B 8.4 eingegangen. Jedoch konnte weniger das Fragment  $m/z = 217$  detektiert werden als vielmehr die Masse  $m/z = 199$  (Abbildung 31), welche durch eine weitere Wasserabspaltung erklärt werden kann (Takahashi et al., 1995). Die Präsenz des Ions  $m/z = 426$  lässt auf die Identität Fumiquinazolin D rückschließen (Takahashi et al., 1995; Larsen et al., 2007). Dieses Mykotoxin verfügt in der Molekülstruktur, im Gegensatz zu Fumiquinazolin C, über eine Hydroxygruppe, welche bevorzugt abgespalten wird.

<sup>1</sup> Der Dank für die freundliche Unterstützung beim Nachweis der Identität von Trypacidin gilt Dr. Frank, Lehrstuhl für Lebensmittelchemie und Molekulare Sensorik, TUM, Prof. Dr. Hofmann

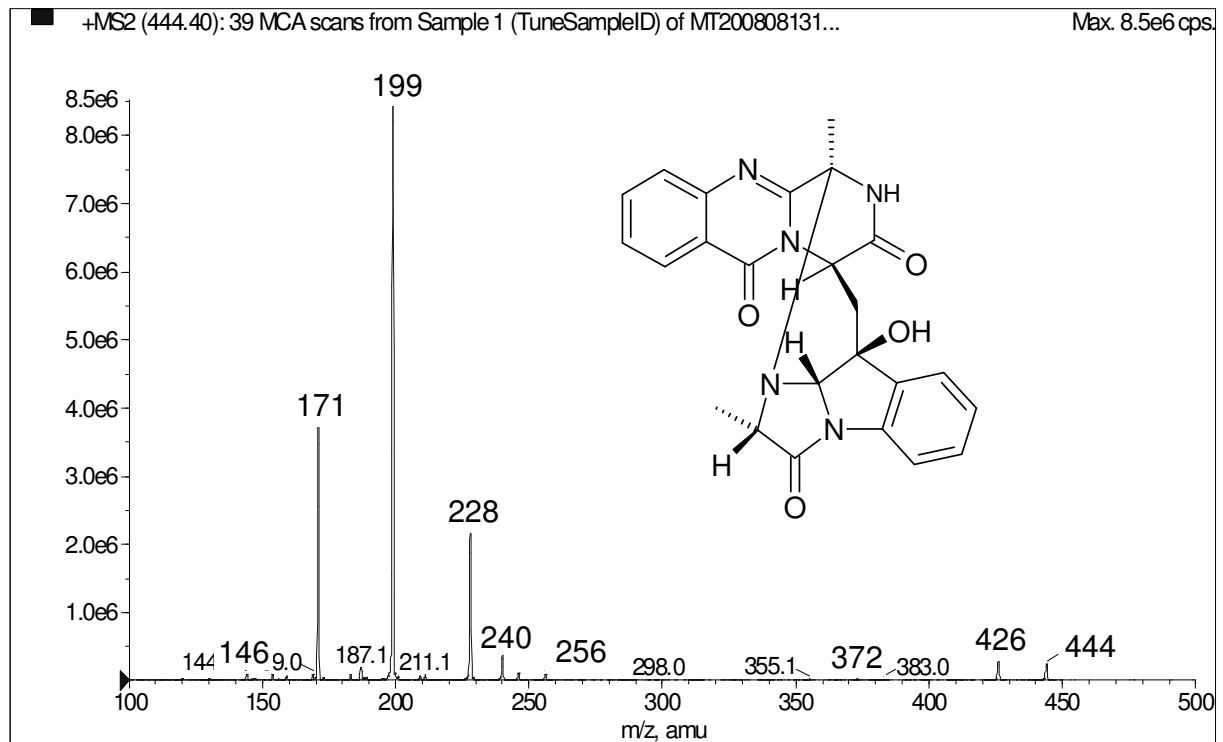


Abbildung 31: Produktionenspektrum (MS/MS, ESI+) von Fumiquinazolin D

#### Pyripyropen A

MW: 583,6; gefunden  $[M+H]^+ = 584,4$

Produzenten: *Aspergillus fumigatus*  
*Neosartorya fischeri*

MS/MS  $[M+H]^+$ : 584,0; 524,1; 506,2; 446,3; 404,2; 386,2; 265,1; 239,1; 201,9; 197,0;  
185,1; 171,2; 148,2; 106,1

Der ACAT-Inhibitor konnte sowohl in Extrakten von *A. fumigatus* als auch von *Neosartorya fischeri* detektiert werden. Das Molekül scheint eine hohe Stabilität zu besitzen, da nur unter bestimmten Bedingungen (hohe CAD-Gas-Zufuhr, hohe Kollisionsenergie) eine deutliche Fragmentierung erfolgte (Abbildung 32). Die Fragmente sind mit dem Verlust von Acetoxygruppen und Wassermolekülen zu erklären ( $m/z = 524 (M - \text{AcOH} + H^+)$ ;  $506 (M - \text{AcOH} - \text{H}_2\text{O} + H^+)$ ;  $446 (M - 2 \times \text{AcOH} - \text{H}_2\text{O} + H^+)$ ;  $404 (M - 3 \times \text{AcOH} + H^+)$ ;  $386 (M - 3 \times \text{AcOH} - \text{H}_2\text{O} + H^+)$ ) und wurden bereits beschrieben (Kim et al., 1994).

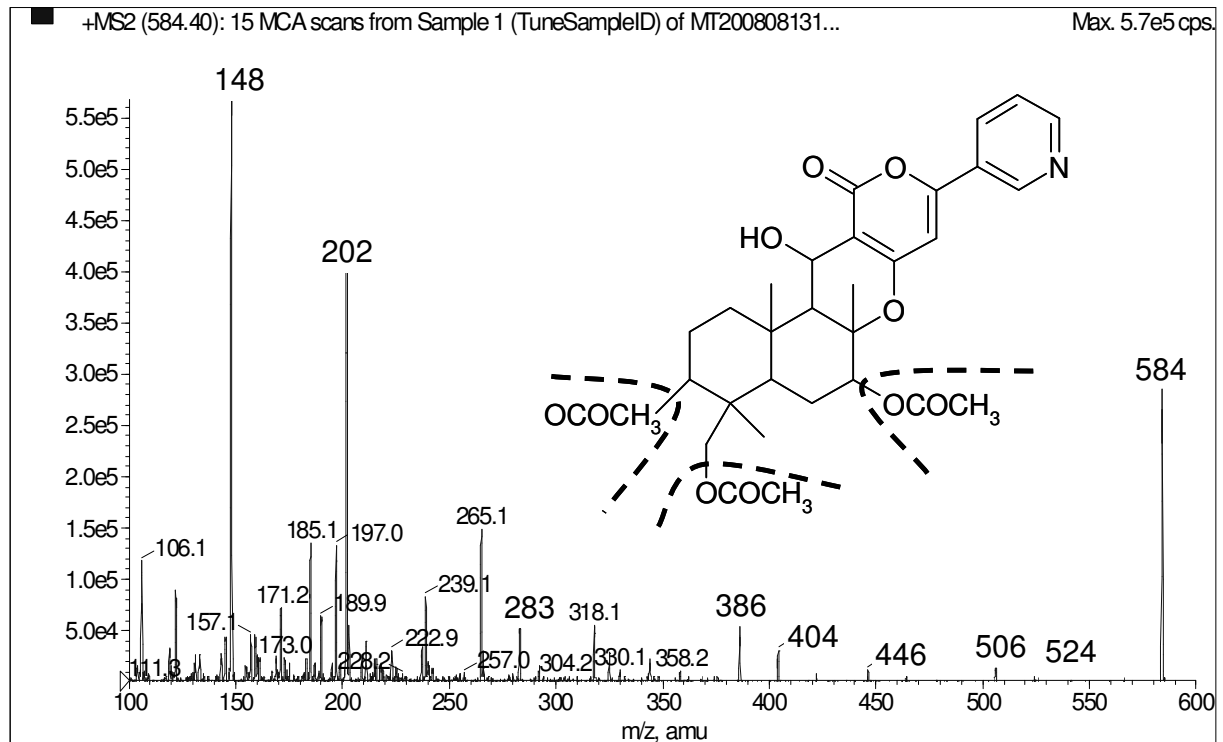


Abbildung 32: Produktionspektrum (MS/MS, ESI+) von Pyripyropen A

## 2.2 Qualitativ nachweisbare Stoffwechselmetaboliten

### *Fumigaclavin A*

MW: 298,1681; gefunden  $[M+H]^+$  = 299,3

Produzenten: *Aspergillus fumigatus*  
*Neosartorya fischeri*

TLC-Daten: Kieselgel 60, Toluol-Ethylacetat-Ameisensäure (v/v/v; 5/4/1) R<sub>f</sub>: 0,05 ;  
violetter Fleck nach dem Besprühen mit ethanolischer H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

MS/MS  $[M+H]^+$ : 299,3; 280,7; 257,4; 239,3; 224,3; 210,2; 208,2; 192,2; 183,1; 168,1;  
153,9; 144,2; 84,1

Fumigaclavin A war in Acetonitril/Wasser-Extrakten, weniger in Ethylacetat-Extrakten, vertreten. Aufgrund sehr ähnlicher chemisch-physikalischer Eigenschaften konnte es nicht von Festuclavin getrennt werden. Die Herstellung eines semiquantitativen Mischstandards war jedoch möglich. Die Identität ist aufgrund mehrerer Hinweise anzunehmen. Zum einen entstammt die isolierte Substanz einer *A. fumigatus*-Kultur, zum anderen wurde die Verbindung mittels einer speziellen Isolierungsmethode für Alkaloide gewonnen. Außerdem kann das beobachtete Fragmentmuster mit dem Verlust von Seitenketten begründet werden (Abbildung 33). Besonders hervorzuheben sind die Fragmente der Massen  $m/z = 239$  ( $M - H_2O + H^+$ ); 208 ( $M^+ - H_2O - 2 \times CH_3$ ). Diese Übergänge wurden zeitgleich auch von einer anderen Arbeitsgruppe ermittelt (Storm et al., 2008).

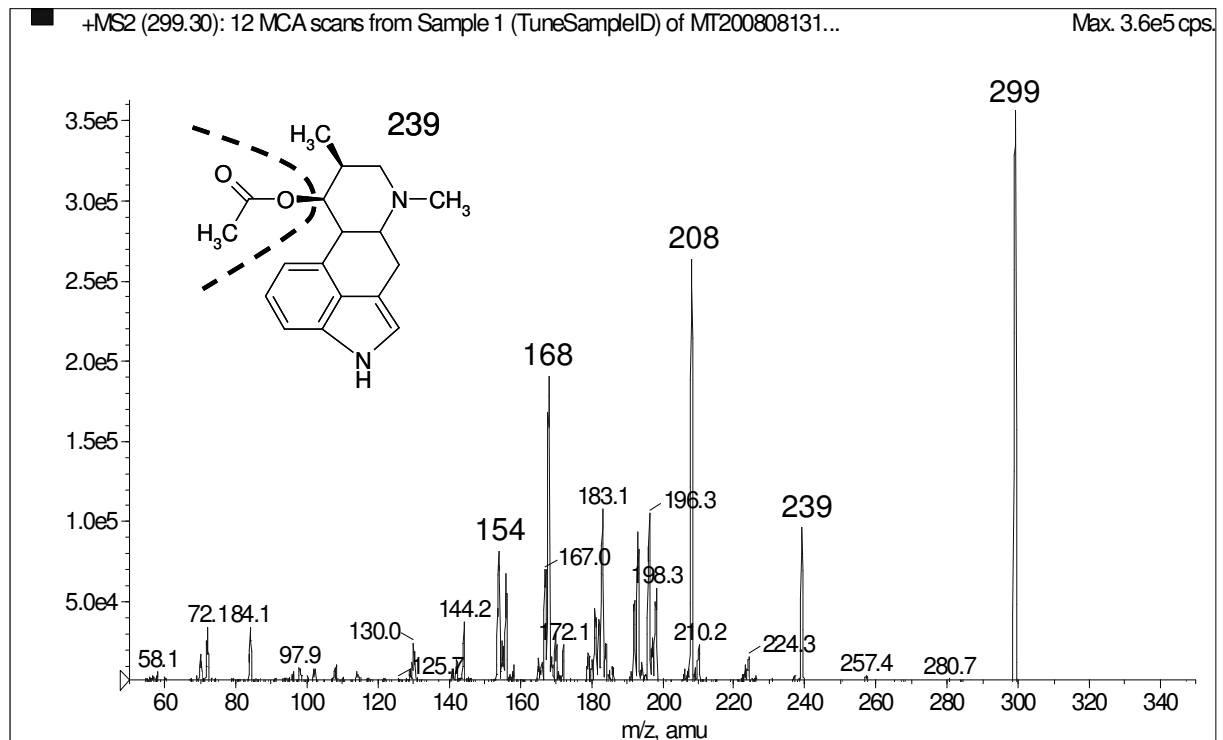


Abbildung 33: Produktionenspektrum (MS/MS, ESI+) von Fumigaclavin A

#### *Festuclavin*

MW: 240,1627; gefunden  $[M+H]^+$  = 241,2

Produzent: *Aspergillus fumigatus*

MS/MS  $[M+H]^+$ : 241,2; 226,2; 210,2; 208,2; 192,2; 183,2; 167,2; 156,2; 144,0

Das Fragmentmuster der als „Festuclavin“ angenommenen Verbindung zeigte große Übereinstimmung mit den Literaturangaben (Cole und Schweikert, 2003b). Weitere Hinweise ergaben sich aus der biologischen Herkunft der Verbindung sowie den chemisch-physikalischen Eigenschaften, welche den Fumigaclavinen ähnlich waren. Darüber hinaus erwies sich eine selektive Alkaloid-Isolierungsmethode als erfolgreich bei der Extraktion der Verbindung. Daher wurden die ermittelten Übergänge in die Analyseverfahren integriert.

#### *Fumiquinazolin A/B*

MW: 445,1750; gefunden  $[M+H]^+$  = 446,3

Produzent: *Aspergillus fumigatus*

Massenspektrum: 445, 428, 229, 228, 217, 199, 146

MS/MS  $[M+H]^+$ : 446,3; 428,3; 409,6; 242,1; 230,0; 199,0; 171,0

Die Signalintensitäten der Stereoisomere Fumiquinazolin A und B waren stets niedriger als jene der Fumiquinazoline C und D.



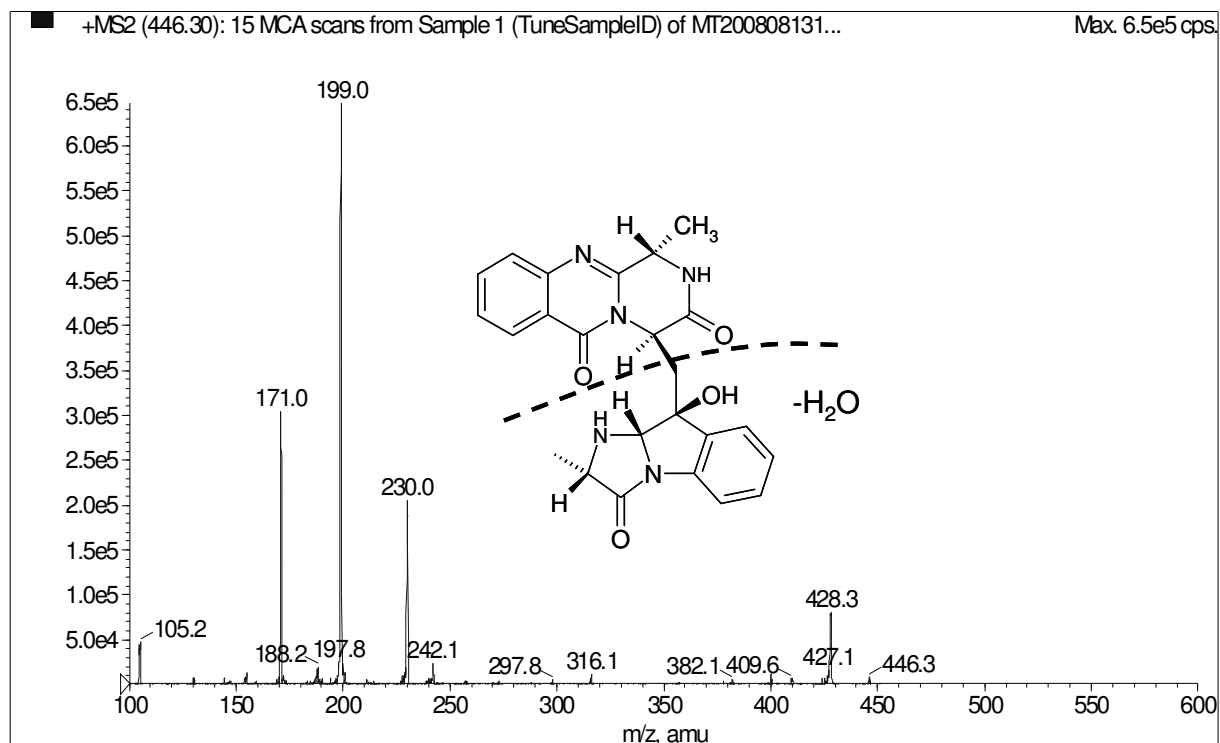


Abbildung 34: Produktionenspektrum (MS/MS, ESI+) von Fumiquinazolin A

Durch Säulenaufreinigung (Kieselgel) konnten die Fumiquinazoline wesentlich effektiver voneinander getrennt werden, als dies für die polymerbasierten Festphasenextraktionskartuschen der Fall war. Die Gewinnung von Reinsubstanz in ausreichender Menge war für die Fumiquinazoline A und B trotzdem nicht möglich. Auch mittels HPLC-Verfahren konnten die Vertreter dieser Stoffgruppe nur schwer getrennt werden, da eine Vielzahl isomerer Strukturen vorhanden war und sich deren Retentionszeiten überlagerten.

Des Weiteren musste eine Verwechslung der Fumiquinazoline C/D mit den Fumiquinazolinen A/B ausgeschlossen werden, da die Signale deren natürlicher Isotope die Signale der Fumiquinazoline A und B teilweise überlagerten. Die Fragmentmuster der Fumiquinazoline A und B unterschieden sich nur geringfügig von jenen der Fumiquinazoline C und D (Abbildung 34) und waren mit den Literaturangaben vereinbar (Takahashi et al., 1995).

#### *Fumiquinazolin F/G*

MW: 358,1430; gefunden  $[M+H]^+$  = 359,2

Produzenten: *Aspergillus fumigatus*

*Neosartorya fischeri*

MS/MS  $[M+H]^+$ : 359,2; 242,2; 230,0; 228,2; 216,0; 199,9; 188,0; 170,0; 130,2

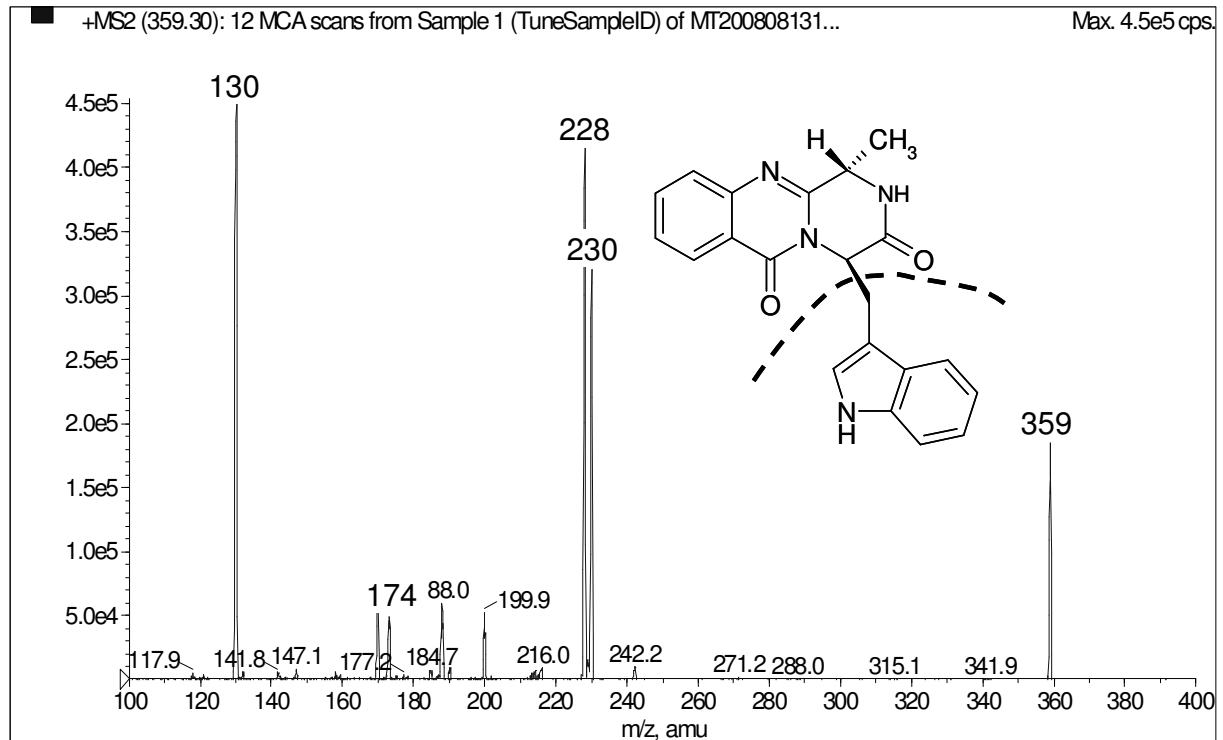


Abbildung 35: Produktionenspektrum (MS/MS, ESI+) von Fumiquinazolin F/G

Die Fumiquinazoline F bzw. G konnten in Acetonitril/Wasser- sowie Ethylacetat-Extrakten mit den in der Literatur beschriebenen Übergängen detektiert werden (Takahashi et al., 1995). Die Konzentration der Substanzen nahm mit zunehmendem Alter der Schimmelpilzkulturen stärker ab, als dies beispielsweise für Fumiquinazolin D der Fall war. Die Reindarstellung der Stoffe war aufgrund von koeludierenden, quantitativ stärker vertretenen Substanzen nicht möglich. Die mögliche Entstehung der Hauptfragmente zeigt Abbildung 35.

#### Sphingofungin A

MW: 431,2995; gefunden  $[M+H]^+$  = 432,3

Produzent: *Aspergillus fumigatus*

MS/MS  $[M+H]^+$ : 432,3; 414,1; 396,4; 382,0; 372,3; 354,3; 336,1; 145,8; 104,0

Die höchsten Konzentrationen an Sphingofungin A fanden sich in Acetonitril/Wasser-Extrakten von jungen Pilzkulturen. Ethylacetat zeigte einen wesentlich geringeren Extraktionserfolg. Die Unterscheidung von Pseurotin A und Sphingofungin A gestaltete sich als schwierig. Daher konnte diese antimyzetische Verbindung nicht in ausreichender Menge und Reinheit isoliert werden, um eine quantitative Aussage über das Vorkommen in Silagen treffen zu können. Die Tochterionen mit den Massen  $m/z = 414$  und  $396$  sind mit einfachen Wasserabspaltungen begründbar. Das Fragment mit der Masse  $m/z = 372$  lässt sich über eine Abspaltung von  $-CNH_2NH$  sowie einer Wasserabspaltung erklären (Abbildung 36). Aus weiteren Abspaltungen von  $H_2O$ -Molekülen resultieren die Massen  $m/z = 354$  und  $336$ .

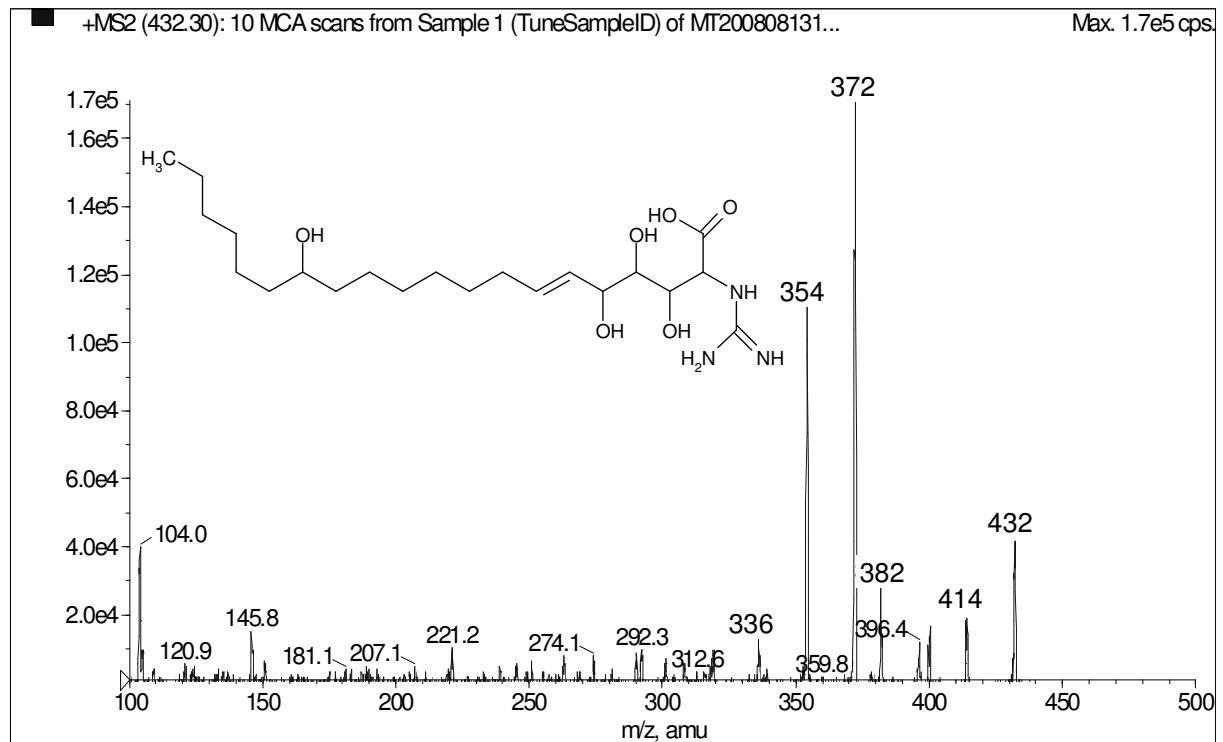


Abbildung 36: Produktionenspektrum (MS/MS, ESI+) von Sphingofungin A

Die biologische Quelle der Substanz und das Fragmentierungsverhalten lassen die Annahme zu, dass es sich bei der Verbindung mit hoher Sicherheit um Sphingofungin A handelt.

#### *Sphingofungin D*

MW: 447,2832; gefunden  $[M+H]^+$  = 448,3

Produzent: *Aspergillus fumigatus*

MS/MS  $[M+H]^+$ : 448,3; 430,1; 412,2; 388,2; 370,3; 352,3; 147,1; 104,0

Der Vergleich der Produktionenspektren der Massen  $m/z = 448$  (Sphingofungin D) und  $m/z = 432$  (Sphingofungin A) zeigte deutliche Ähnlichkeiten, welche auf eine strukturelle Verwandtschaft schließen ließen. Die Fragmentmasse  $m/z = 388$  lässt sich durch den Verlust einer  $-COCH_3$ -Gruppe, sowie eines Wassermoleküls erklären (Abbildung 37). Die folgenden Massen  $m/z = 370$  und  $352$  resultieren vermutlich aus weiteren Wasserabspaltungen. Auch die Tochterionen mit den Quasimolekülmassen  $m/z = 430$  und  $412$  können durch Wasserabspaltungen hergeleitet werden. Da die Sphingofungine als typische Metaboliten von *A. fumigatus* beschrieben wurden (VanMiddlesworth et al., 1992), trägt die biologische Quelle der Verbindungen ebenfalls zu deren Identitätsbestimmung bei.

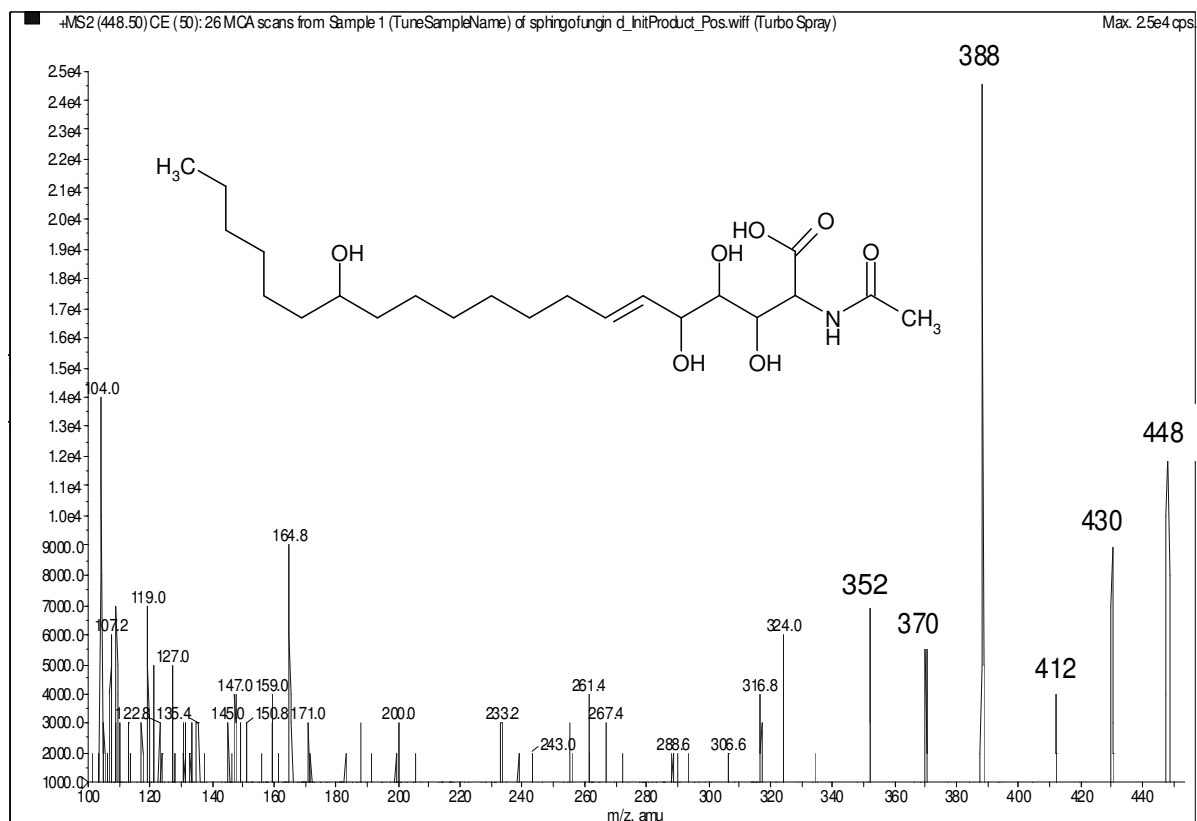


Abbildung 37: Produktionspektrum (MS/MS, ESI+) von Spingofungin D

#### Tryptoquivalin F/J

MW: 402,1328; gefunden  $[M+H]^+ = 403,2$

Produzent: *Aspergillus fumigatus*

MS/MS  $[M+H]^+$ : 403,3; 394,4; 314,0; 256,9; 239,1; 229,0; 211,1; 202,9; 199,1; 183,2; 171,0; 147,1; 130,0

Tryptoquivalin F sowie das Stereoisomer Tryptoquivalin J waren in Acetonitril/Wasser- und Ethylacetat-Extrakten nachweisbar. Für die Tryptoquivalin-Gruppe blieben Tryptoquivalin F/J die einzigen dominanten Vertreter. Weitere in der Literatur beschriebene Tryptoquivaline kamen selten vor. Die relativ geringen Konzentrationen ließen eine Isolierung dieser Substanzen nicht zu.

Besonders die Fragmente der Massen  $m/z = 147$  und  $199$  deuten auf die Identität der Substanzen hin und lassen die strukturelle Verwandtschaft zu den Fumiquinazolinen erkennen (Yamazaki et al., 1978; Takahashi et al., 1995) (Abbildung 38). Wie für diese Verbindungen zu erwarten war, traten Wasserabspaltungen anzeigende Massenpaare nur schwach erkennbar auf. Sowohl das für die Tryptoquivaline typische Fragmentierungsverhalten als auch die biologische Herkunft belegen mit hoher Sicherheit die angenommene Identität der Substanzen.

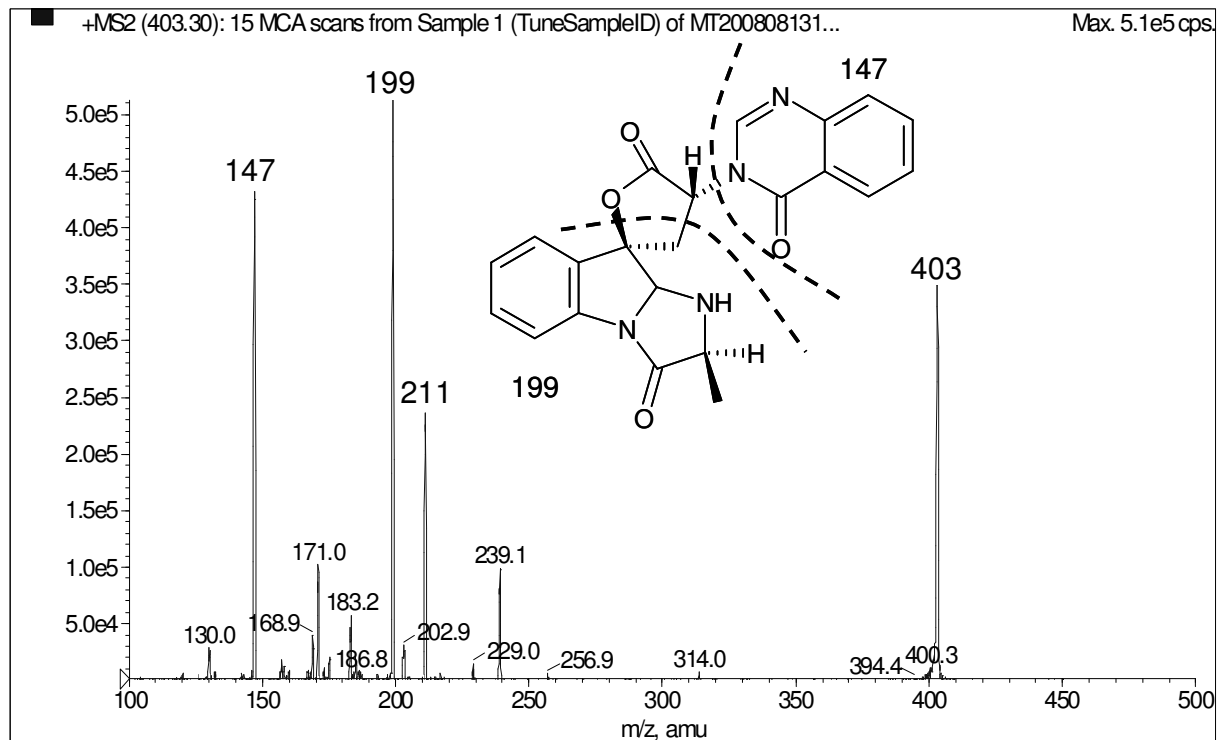


Abbildung 38: Produktionenspektrum (MS/MS, ESI+) von Tryptoquivalin F/J

### Pseurotin A und Synerazol

#### Pseurotin A

MW: 431,4; gefunden  $[M+H]^+ = 432,4$

Produzent: *Aspergillus fumigatus*

MS/MS  $[M+H]^+$ : 432,2; 400,1; 382,3; 348,0; 334,1; 316,1; 298,0; 273,0; 244,1; 203,0; 194,0; 163,9; 155,0; 146,2; 104,8

Pseurotin A konnte aufgrund der Massengleichheit nur schwer von Spingofungin A unterschieden werden. Dies führte dazu, dass die klare Unterscheidung der beiden Verbindungen erst zu einem späten Zeitpunkt der Voruntersuchungen gelang. Daher war es nicht mehr möglich Pseurotin A in ausreichender Menge für einen quantitativen Standard zu isolieren. Jedoch konnte die Substanz aufgrund des Produktionenspektrums mit hoher Sicherheit identifiziert werden (Abbildung 39). Die Masse  $m/z = 400$  im Produktionenspektrum ist durch die Abspaltung einer Methanolgruppe erklärbar ( $m/z = 32$ ). Auch die weiteren Fragmente stehen im Einklang mit den Literaturangaben (Bloch et al., 1976). Besonders hervorzuheben sind die Fragmente der Massen  $m/z = 348$ , 316, 105 welche von Bloch et al. (1976) als wichtiges Identifikationskriterium beschrieben wurden.

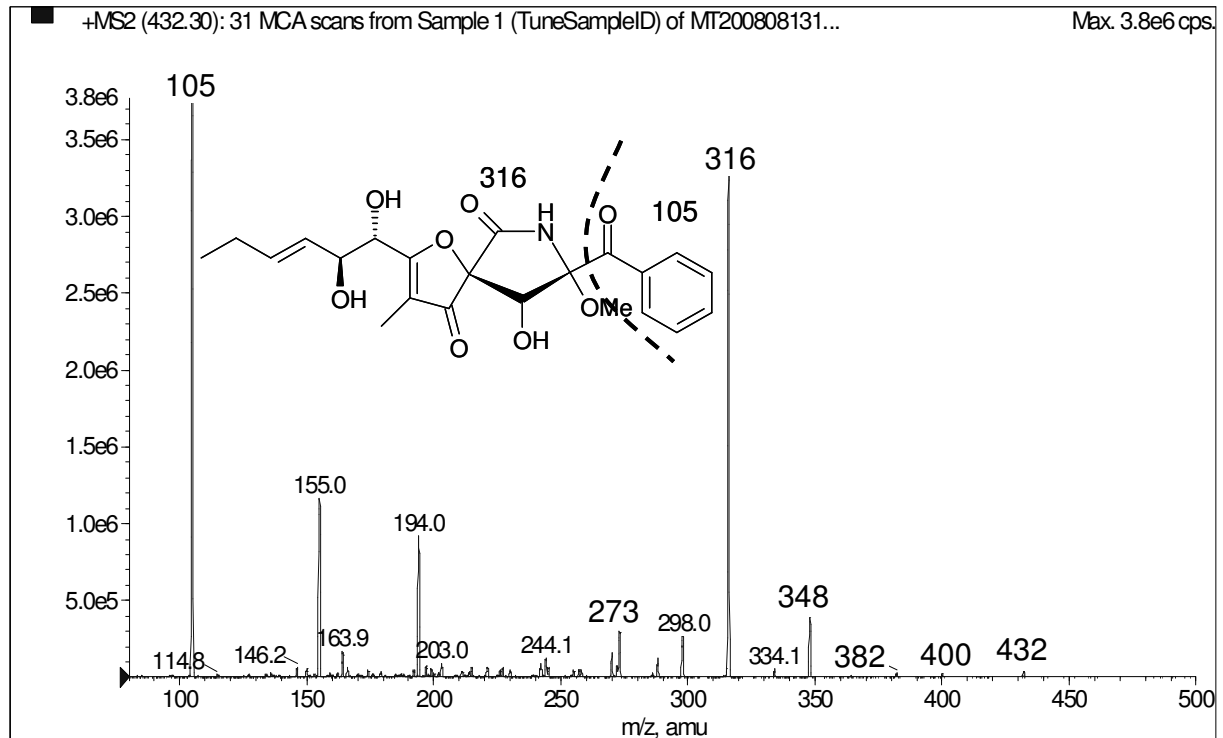


Abbildung 39: Produktionspektrum (MS/MS, ESI+) von Pseurotin A

#### Synerazol

MW: 413,15; gefunden  $[M+H]^+$  = 414,2

Produzent: *Aspergillus fumigatus*

MS/MS  $[M+H]^+$ : 414,2; 396,0; 382,3; 354,0; 339,3; 285,9; 253,2; 221,1; 203,1; 190,0; 163,2; 136,8; 105,0

Synerazol ist strukturell dem Pseurotin A sehr ähnlich. Auch das Vorkommen beider Substanzen schien auf dem Medium Reis relativ eng miteinander verknüpft zu sein. Synerazol wurde aber, verglichen mit Pseurotin A, seltener und in geringeren Mengen in den Kulturextrakten detektiert.

Die Masse  $m/z = 382$  im Produktionspektrum ist durch die Abspaltung einer Methanolgruppe erklärbar ( $m/z = 32$ ) (Abbildung 40). Die Herkunft des Fragments der Masse  $m/z = 105$  kann aufgrund der strukturellen Verwandtschaft mit Pseurotin A von diesem abgeleitet werden.

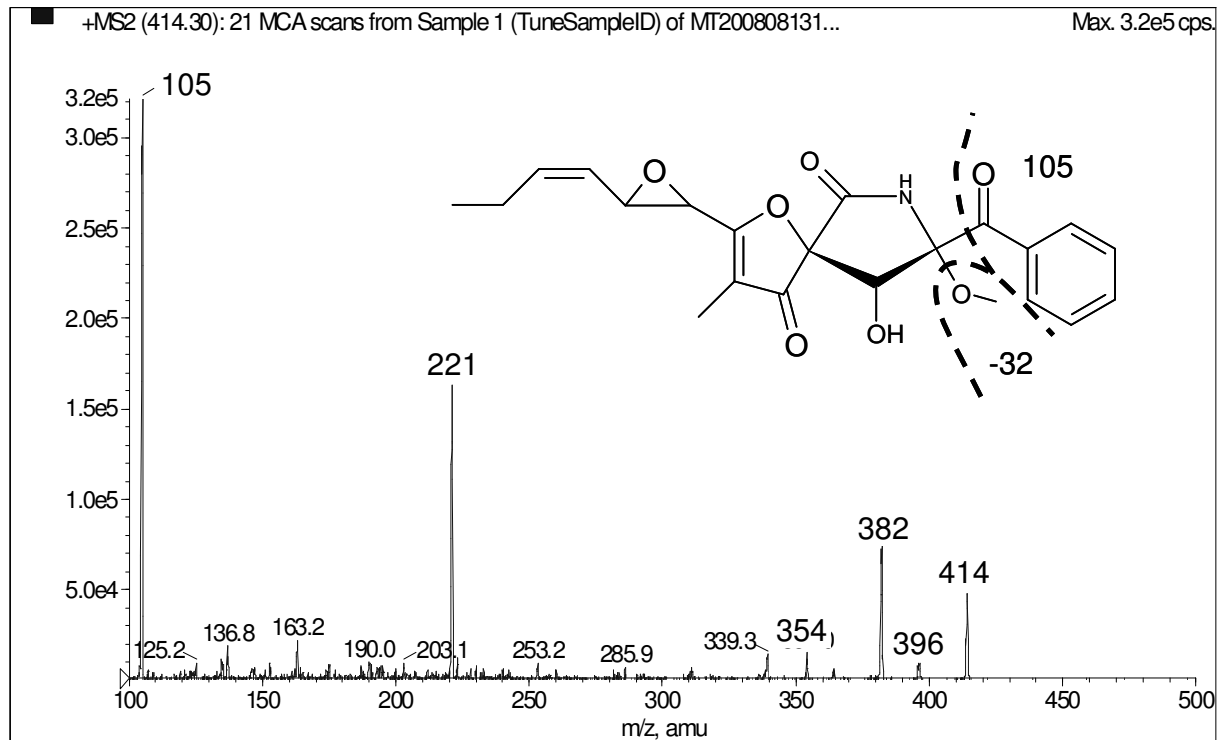


Abbildung 40: Produktionenspektrum (MS/MS, ESI+) von Synerazol

#### Helvolsäure

MW: 568,2934; gefunden  $[M+NH_4]^+ = 586$

Produzent: *Aspergillus fumigatus*

MS/MS  $[M+NH_4]^+$ : 586,0; 509,2 (Basispeak); 490,0; 463,3; 449,2; 439,2; 403,0; 363,1; 343,2; 212,9; 177,1; 138,9

Die Hauptmasse der Helvolsäure wurde spektrometrisch kaum erfasst. Allerdings sollte die Masse  $m/z = 586$  das Ammonium-Addukt der Verbindung darstellen (Abbildung 41). Ein in der Literatur beschriebener Basispeak bei  $m/z = 509$  konnte ebenso detektiert werden (Cole und Schweikert, 2003a; Larsen et al., 2007). Dieser ist wie das Fragment  $m/z = 449$  durch den Verlust einer Acetoxygruppe zu erklären (Abbildung 42).

Larsen et al. (2007) berichten, dass alle verwendeten *A. fumigatus*-Stämme Helvolsäure bildeten, jedoch keiner der *N. fischeri*-Stämme. Dieser Sachverhalt wurde in der vorliegenden Untersuchung ebenfalls beobachtet. Sowohl die biologische Herkunft der Verbindung als auch die spektrometrischen Beobachtungen lassen also mit großer Sicherheit auf die Identität Helvolsäure schließen.

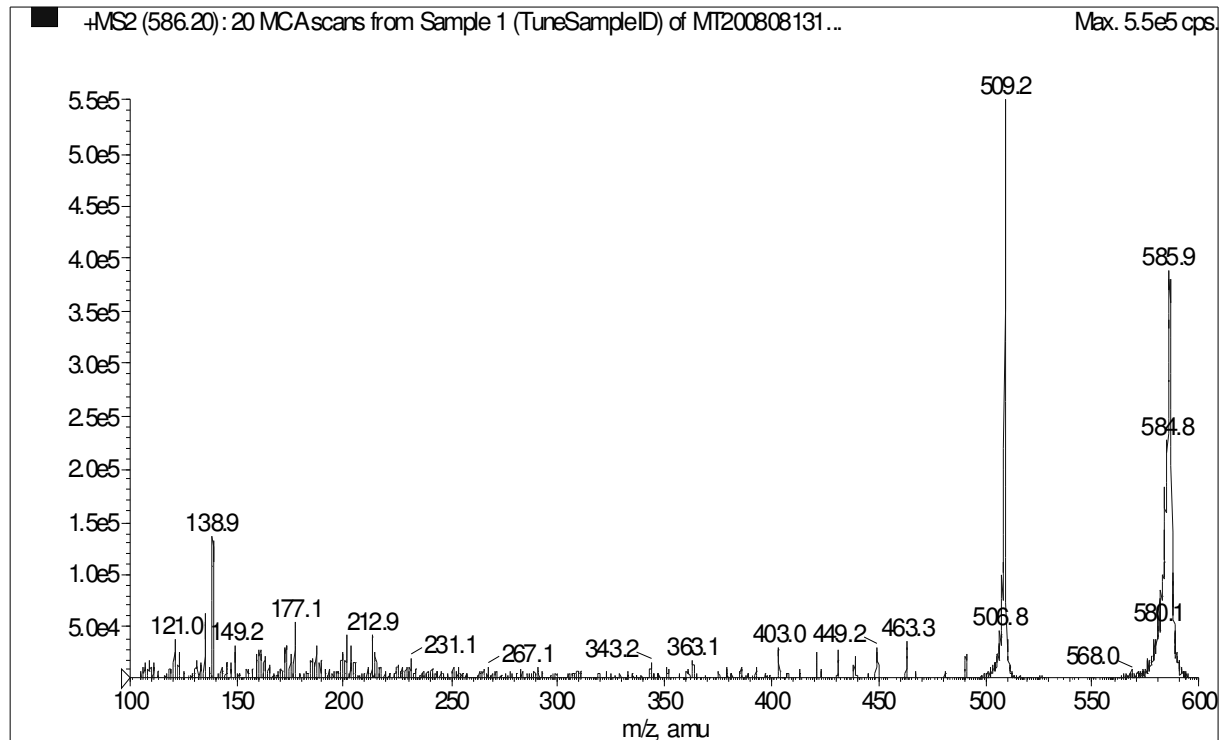


Abbildung 41: Q1-Massenspektrum von Helvolsäure

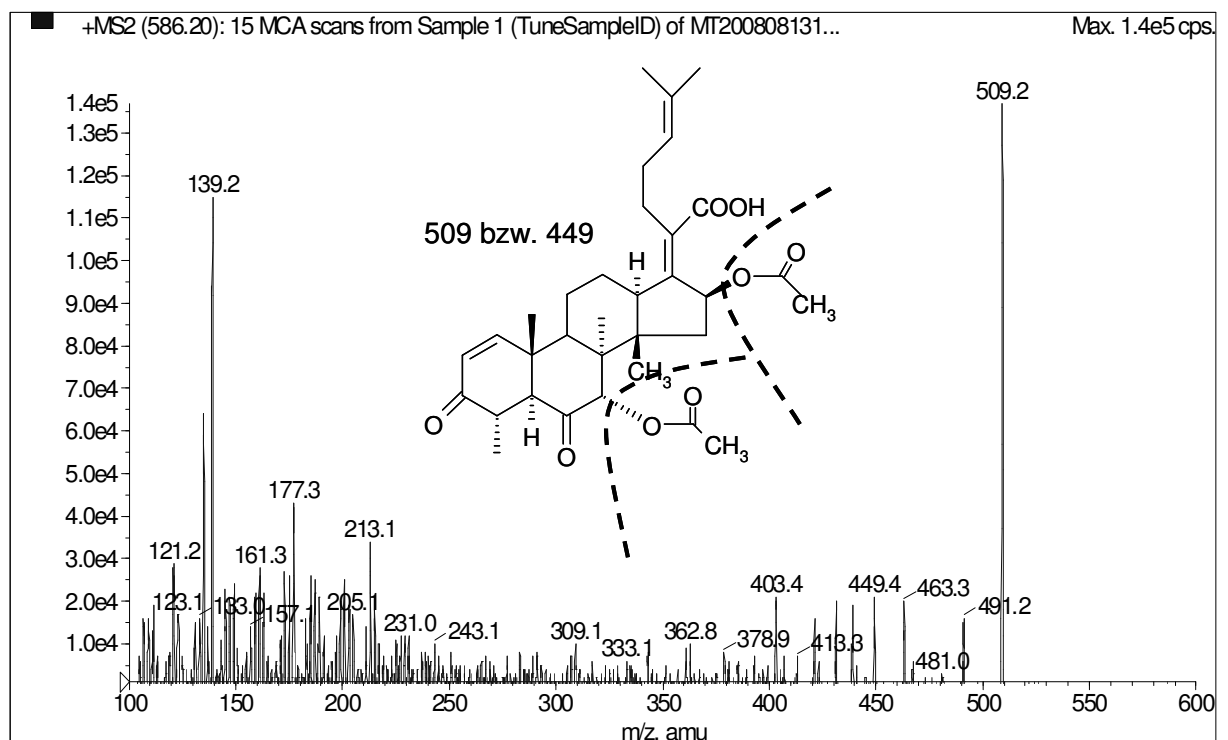


Abbildung 42: Produktionenspektrum (MS/MS, ESI+) von Helvolsäure bzw. des Ammonium-Addukts



### 3 Validierung der Analysemethode

Die Validierung der Multimethode zum Nachweis von *A. fumigatus*-Stoffwechselprodukten in Gras- und Maissilagen führte zu den in Tabelle 20 und Tabelle 21 dargestellten Ergebnissen. Der Nachweis geringer Konzentrationen von unter 10 ng/g Probenmaterial erwies sich als ungenau, da vor allem die Matrix von Grassilage sehr störend auf die Messung wirkte. Vorversuche belegten substanzspezifisch matrixbedingte Signalsuppressionen bis zu 80 %. Die Richtigkeit der Ergebnisse konnte durch die Verwendung matrixassistierter Standards erhöht werden, die Präzision blieb bei geringen Konzentrationsstufen (10 ng/g) niedrig. Maissilage beeinflusste die Bestimmung in dieser Hinsicht weitaus weniger.

Die Nachweisgrenzen (NWG) der Reinsubstanzen wurden anhand des Signal-Rausch-Verhältnisses (S/N-Verhältnis) von Standardlösungen bestimmt. Bei einem S/N-Verhältnis von 3 lagen die ermittelten Werte substanzabhängig in einem Bereich zwischen 0,2 (Verruculogen) und 5,0 (Monacolin K) ng/ml. Die Wiederfindungsraten für *A. fumigatus*-Stoffwechselprodukte bewegten sich zwischen 53,0 % für Fumigaclavin C aus Grassilage bei einer artifiziellen Konzentration von 1000 ng/g und 144,0 % für Trypacidin aus Grassilage bei 10 ng/g.

Tabelle 20: Richtigkeit und Präzision der Nachweismethode bei artifiziell mit steigenden Toxinkonzentrationen kontaminierten Grassilagen

	Konzentrationsstufe [ng/g]					NWG [ng/ml]
	1	10	100	500	1000	
	Wiederfindungsrate [%] (Standardabweichung)					
Fumagillin	n.b.	93,5 (22,3)	86,8 (6,4)	67,0 (4,8)	68,9 (6,2)	3,4
Fumigaclavin C	n.b.	96,4 (65,1)	74,4 (6,3)	55,2 (4,9)	53,0 (3,7)	1,2
Fumiquinazolin D	n.b.	94,3 (17,9)	77,7 (6,3)	68,3 (4,6)	70,5 (4,5)	0,9
Fumitremorgen B	n.b.	75,8 (50,9)	75,1 (20,0)	51,4 (5,1)	53,2 (6,5)	1,0
Fumitremorgen C	75,8 (169,5)	93,2 (16,9)	95,1 (7,3)	97,4 (6,3)	n.u.	0,3
Gliotoxin	n.b.	106 (18,6)	131 (10,0)	113 (6,3)	123 (7,1)	0,8
Monacolin K	n.b.	159 (69,2)	76,3 (22,7)	65,4 (6,9)	67,5 (7,4)	5,0
Pyripyropen A	n.b.	138 (78,8)	97,8 (34,2)	143 (23,9)	n.u.	1,2
Roquefortin C	n.b.	66,3 (17,8)	59,5 (4,5)	49,8 (4,5)	52,2 (5,0)	0,4
TR 2-Toxin	n.b.	93,0 (22,6)	80,6 (10,7)	64,6 (3,8)	68,9 (3,7)	3,1
Trypacidin	97,0 (42,4)	144,0 (30,3)	94,7 (6,1)	87,6 (10,1)	89,7 (7,3)	0,3
Verruculogen	92,8 (127,1)	58,4 (12,8)	58,5 (7,0)	56,2 (6,7)	57,6 (6,4)	0,2

NWG = Nachweisgrenze, n.b. = nicht bestimmbar, n.u. = nicht untersucht

Tabelle 21: Richtigkeit und Präzision der Nachweismethode bei artifiziell mit steigenden Toxinkonzentrationen kontaminierten Maissilagen

	Konzentrationsstufe [ng/g]					NWG [ng/ml]
	1	10	100	500	1000	
	Wiederfindungsrate [%] (Standardabweichung)					
Fumagillin	n.b.	78,3 (22,6)	75,0 (27,8)	75,9 (2,7)	67,3 (2,6)	3,4
Fumigaclavin C	n.b.	75,3 (41,8)	68,1 (38,6)	76,2 (5,3)	71,6 (4,7)	1,2
Fumiquinazolin D	n.b.	79,2 (10,2)	83,1 (5,8)	81,0 (2,6)	80,7 (1,6)	0,9
Fumitremorgen B	74,0 (64,5)	72,6 (23,4)	78,6 (18,4)	71,0 (1,6)	60,3 (2,3)	1,0
Fumitremorgen C	n.b.	71,5 (23,7)	86,7 (10,3)	81,6 (3,5)	n.u.	0,3
Gliotoxin	n.b.	105 (14,8)	101 (5,6)	94,6 (4,4)	94,4 (3,7)	0,8
Monacolin K	n.b.	121 (24,7)	113 (20,0)	86,8 (7,1)	82,4 (8,3)	5,0
Pyripyropen A	n.b.	n.b.	26,7 (30,2)	76,2 (8,6)	n.u.	1,2
Roquefortin C	n.b.	82,3 (21,0)	83,2 (9,9)	75,0 (3,4)	71,5 (3,9)	0,4
TR 2-Toxin	n.b.	73,5 (18,6)	84,4 (15,5)	81,4 (4,2)	77,2 (2,7)	3,1
Trypacidin	99,2 (33,8)	100 (9,2)	100 (8,7)	95,1 (5,1)	95,4 (2,4)	0,3
Verruculogen	86,7 (30,2)	83,2 (26,9)	85,6 (19,8)	74,4 (5,8)	70,4 (4,1)	0,2

NWG = Nachweisgrenze, n.b. = nicht bestimmbar, n.u. = nicht untersucht

## 4 Untersuchung der Feldproben

### 4.1 Mykologische Untersuchungen

Es wurden insgesamt 584 Silageproben hinsichtlich des Vorkommens von Schimmel- und Sprosspilzen untersucht. Dabei unterschieden sich sensorisch unauffällige (n = 244) erwartungsgemäß deutlich von erwärmten (n = 127) und verpilzten Proben (n = 213).

Die Schimmelpilzbefunde in Gras- und Maissilagen unterschiedlicher Qualitäten sind in Tabelle 22 und Abbildung 43 zusammenfassend dargestellt. In 52 % des gesamten Probenmaterials konnten Schimmelpilze nachgewiesen werden. Die Zuordnung der Befunde zu den einzelnen Qualitätsstufen (normal, erwärmt und verpilzt) ergab erwartungsgemäß höhere Prävalenzraten bei Proben aus Wärme- oder Schimmelnestern als bei Proben aus „unauffälligen“ Silagen.

In den meisten „unauffälligen“ Gras- (84,1 %) und Maissilagen (89,8 %) konnten keine Schimmelpilze nachgewiesen werden. Zudem enthielten die Proben mit positivem Schimmelpilznachweis nur selten mehr als 1.000 KBE/g Futtermittel. Unauffällige Grassilagen (15,9 %) waren insgesamt häufiger mit Schimmelpilzen kontaminiert als vergleichbare Maissilagen (10,2 %).

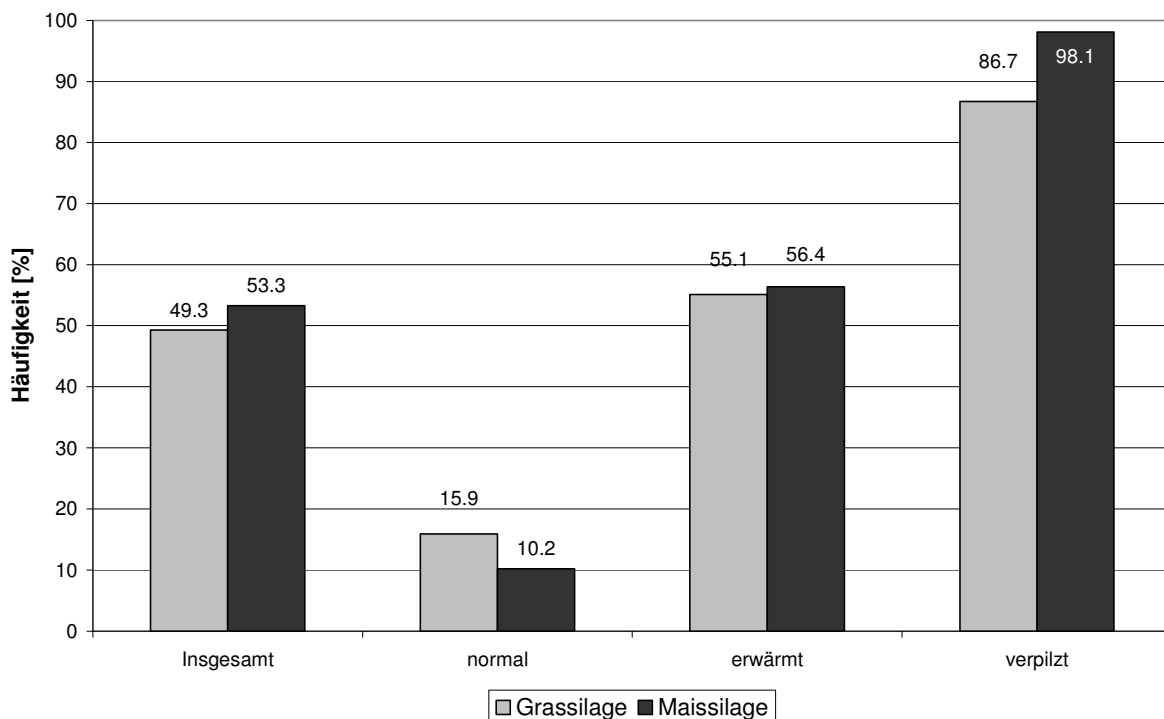


Abbildung 43: Häufigkeit des Nachweises von Schimmelpilzen in Gras- und Maissilagen unterschiedlicher Qualitäten (n = 584)

Die durchschnittlichen Schimmelpilzkeimzahlen in verpilzten Silagen überstiegen dabei deutlich jene in erwärmten Gärfuttermitteln. „Warme“ Grassilagen enthielten im Mittel 4,8  $\text{KBE}_{\log}/\text{g}$ , Maissilagen 5,4  $\text{KBE}_{\log}/\text{g}$  (Median = 2,18 bzw. 2,54  $\text{KBE}_{\log}/\text{g}$ ). Demgegenüber waren „verpilzte“ Grassilagen mit einer durchschnittlichen Schimmelpilzkeimzahl von 6,6  $\text{KBE}_{\log}/\text{g}$ , Maissilagen von 7,5  $\text{KBE}_{\log}/\text{g}$  belastet (Median = 5,6 bzw. 7,0  $\text{KBE}_{\log}/\text{g}$ ).

Erwärmte Grassilagen (32,7 %) wiesen seltener als entsprechende Maissilagen (43,6 %) Keimgehalte  $\geq 10^3$   $\text{KBE}/\text{g}$  auf. Die maximale Schimmelpilzkeimzahl erwärmter Silagen (7,0  $\text{KBE}_{\log}/\text{g}$ ) wurde bei einer Maissilage festgestellt. In sichtbar verpilztem Probenmaterial wurden vermehrt Keimgehalte von  $\geq 10^7$   $\text{KBE}/\text{g}$  gefunden. Für Maissilagen war dies zu 55,6 %, für Grassilagen zu 9,6 % der Fall. Für eine „verpilzte“ Maissilage wurde der höchste Schimmelpilzgehalt von  $5 \times 10^8$   $\text{KBE}/\text{g}$  Futtermittel ermittelt.

Betrachtet man die Keimzahlverteilung von Sprosspilzen, ergibt sich ein vergleichbares Bild (Abbildung 44). Hefen wurden jedoch insgesamt häufiger als Schimmelpilze nachgewiesen (64 % bzw. 51 %). Insbesondere in „erwärmten“ Gärfutterproben wurden Hefen (78,7 %) häufiger gefunden als Schimmelpilze (55,9 %). In unauffälligen Grassilagen waren deutlich seltener Hefen nachzuweisen (19,8 %) als in Maissilagen (47,5 %) der gleichen Qualitätsbeurteilung.

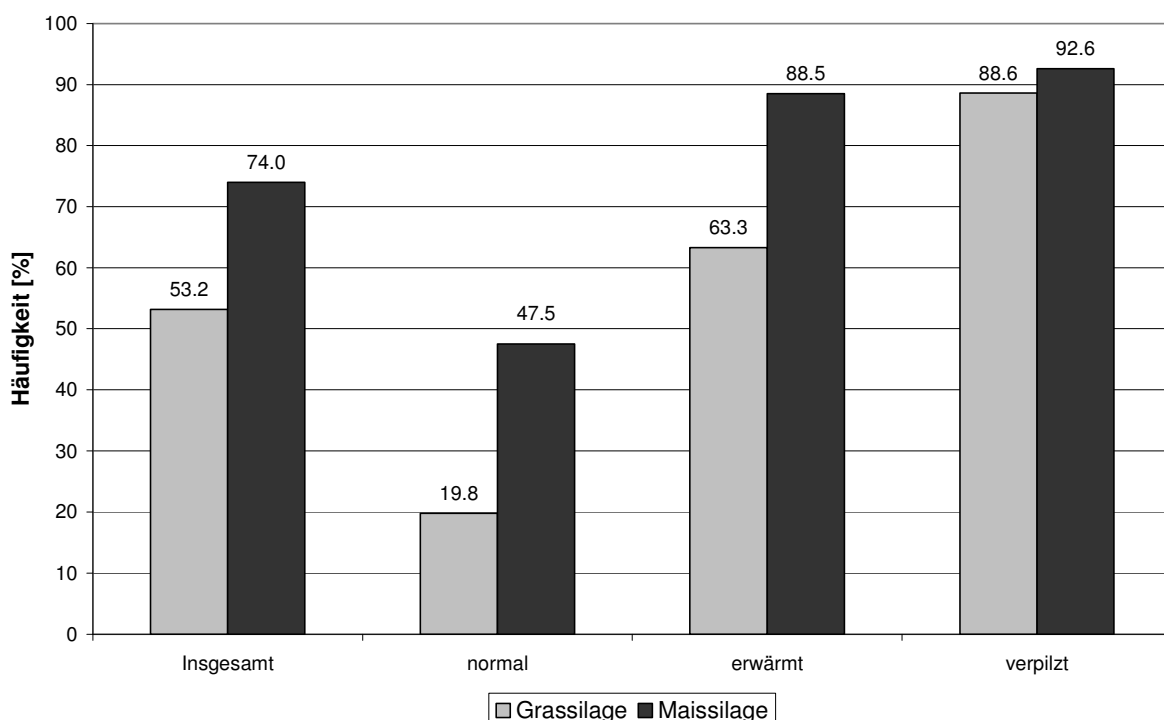


Abbildung 44: Häufigkeit von Hefen in Gras- und Maissilagen unterschiedlicher Qualitäten (n = 584)

Tabelle 22: Verteilung der Schimmelpilzgesamtkeimzahlen in Mais- und Grassilagen

Silageart/ Qualität	Probenanzahl		Schimmelpilzkeimzahlen [ $\text{KBE}_{\log}/\text{g}$ Futtermittel]							Bereich [ $\text{KBE}_{\log}/\text{g}$ ]
	gesamt N	positiv n (%)	2,00 - 2,99 n (%)	3,00 - 3,99 n (%)	4,00 - 4,99 n (%)	5,00 - 5,99 n (%)	6,00 - 6,99 n (%)	7,00 - 7,99 n (%)	$\geq 8,00$ n (%)	
Grassilagen										
normal	126	20 (15,9)	17 (13,5)	1 (0,8)	-	2 (1,6)	-	-	-	2,0 - 5,6
erwärmt	49	27 (55,1)	11 (22,4)	6 (12,2)	6 (12,2)	3 (6,1)	1 (2,0)	-	-	2,0 - 6,2
verpilzt	105	91 (86,7)	7 (6,7)	8 (7,6)	12 (11,4)	19 (18,1)	35 (33,3)	9 (8,6)	1 (1,0)	2,0 - 6,6
gesamt	280	138 (49,3)	35 (12,5)	15 (5,4)	18 (6,4)	24 (8,6)	36 (12,9)	9 (3,2)	1 (0,4)	2,0 - 6,6
Maissilagen										
normal	118	12 (10,2)	8 (6,8)	3 (2,5)	-	-	1 (0,8)	-	-	2,0 - 6,5
erwärmt	78	44 (56,4)	10 (12,8)	11 (14,1)	11 (14,1)	8 (10,3)	3 (3,8)	1 (1,3)	-	2,0 - 7,0
verpilzt	108	106 (98,1)	1 (0,9)	2 (1,9)	5 (4,6)	5 (4,6)	33 (30,6)	50 (46,3)	10 (9,3)	3,0 - 8,7
gesamt	304	162 (53,3)	19 (6,3)	16 (5,3)	16 (5,3)	13 (4,3)	37 (12,2)	51 (16,8)	10 (3,3)	2,0 - 8,7
Gras- und Maissilagen										
normal	244	32 (13,1)	25 (10,2)	4 (1,6)	-	2 (0,8)	1 (0,4)	-	-	2,0 - 6,5
erwärmt	127	71 (55,9)	21 (16,5)	17 (13,4)	17 (13,4)	11 (8,7)	4 (3,1)	1 (0,8)	-	2,0 - 7,0
verpilzt	213	197 (92,5)	8 (3,8)	10 (4,7)	17 (8,0)	24 (11,3)	68 (31,9)	59 (27,7)	11 (5,2)	2,0 - 8,7
gesamt	584	300 (51,4)	54 (9,2)	31 (5,3)	34 (5,8)	37 (6,3)	73 (12,5)	60 (10,3)	11 (1,9)	2,0 - 8,7

Tabelle 23: Verteilung der Hefegesamtkeimzahlen in Mais- und Grassilagen

Silageart/ Qualität	Probenanzahl		Hefekeimzahlen [ $\text{KBE}_{\log}/\text{g}$ Futtermittel]							Bereich [ $\text{KBE}_{\log}/\text{g}$ ]
	gesamt n	positiv n (%)	2,00 - 2,99 n (%)	3,00 - 3,99 n (%)	4,00 - 4,99 n (%)	5,00 - 5,99 n (%)	6,00 - 6,99 n (%)	7,00 - 7,99 n (%)	$\geq 8,00$ n (%)	
Grassilagen										
normal	126	25 (19,8)	8 (6,3)	11 (8,7)	2 (1,6)	3 (2,4)	1 (0,8)	-	-	2,0 - 6,3
erwärmt	49	31 (63,3)	6 (12,2)	3 (6,1)	6 (12,2)	7 (14,3)	4 (8,2)	3 (6,1)	2 (4,1)	2,0 - 8,0
verpilzt	105	93 (88,6)	6 (5,7)	12 (11,4)	10 (9,5)	17 (16,2)	25 (23,8)	21 (20,0)	2 (1,9)	2,2 - 8,0
gesamt	280	149 (53,2)	20 (7,1)	26 (9,3)	18 (6,4)	27 (9,6)	30 (10,7)	24 (8,6)	4 (1,4)	2,0 - 8,0
Maissilagen										
normal	118	56 (47,5)	9 (7,6)	13 (11,0)	17 (14,4)	8 (6,8)	8 (6,8)	1 (0,8)	-	2,0 - 7,4
erwärmt	78	69 (88,5)	2 (2,6)	9 (11,5)	11 (14,1)	17 (21,8)	17 (21,8)	8 (10,3)	5 (6,4)	2,0 - 8,5
verpilzt	108	100 (92,6)	1 (0,9)	3 (2,8)	8 (7,4)	21 (19,4)	25 (23,1)	31 (28,7)	11 (10,2)	3,0 - 8,7
gesamt	304	225 (74,0)	12 (3,9)	25 (8,2)	36 (11,8)	46 (15,1)	50 (16,4)	40 (13,2)	16 (5,3)	2,0 - 8,7
Gras- und Maissilagen										
normal	244	81 (33,2)	17 (7,0)	24 (9,8)	19 (7,8)	11 (4,5)	9 (3,7)	1 (0,4)	-	2,0 - 7,4
erwärmt	127	100 (78,7)	8 (6,3)	12 (9,4)	17 (13,4)	24 (18,9)	21 (16,5)	11 (8,7)	7 (5,5)	2,0 - 8,5
verpilzt	213	193 (90,6)	7 (3,3)	15 (7,0)	18 (8,5)	38 (17,8)	50 (23,5)	52 (24,4)	13 (6,1)	2,2 - 8,7
gesamt	584	374 (64,0)	32 (5,5)	51 (8,7)	54 (9,2)	73 (12,5)	80 (13,7)	64 (11,0)	20 (3,4)	2,0 - 8,7

Ein Großteil dieser Grassilagen (95,2 %) enthielt weniger als 10.000 KBE an Hefen pro Gramm Futtermittel. Dies war nur für 71,2 % der Maissilagen der Fall (Tabelle 23). Der durchschnittliche Keimgehalt betrug bei unauffälligen Grassilagen 4,4 KBE<sub>log</sub>/g, bei Maissilagen 5,6 KBE<sub>log</sub>/g.

Insgesamt wurden aus 91,0 % der verpilzten und 78,7 % der erwärmten Silagen Sprosspilze isoliert. Bei Maissilage bestand nur ein geringer Unterschied bezüglich des Vorkommens von Hefen zwischen erwärmten (88,5 %) und verpilzten (92,6 %) Proben. Verpilzte Grassilagen (88,6 %) wiesen dagegen signifikant häufiger Hefen auf als erwärmtes Probenmaterial (63,3 %,  $p < 0,01$ ).

Die durchschnittlichen Hefekeimzahlen erwärmter und verpilzter Grassilagen betragen 6,9 bzw. 7,0 KBE<sub>log</sub>/g (Median = 3,0 bzw. 5,7 KBE<sub>log</sub>/g), die von Maissilagen 7,2 bzw. 7,5 KBE<sub>log</sub>/g (Median = 5,4 bzw. 6,5 KBE<sub>log</sub>/g).

Betrachtet man die in Gras- und Maissilagen dominanten Schimmelpilzgattungen *Aspergillus*, *Penicillium*, *Monascus* und die Familie der *Mucoraceae*, zeigen sich Gemeinsamkeiten, aber auch einige Unterschiede zwischen den Silagearten (Abbildung 45 und Abbildung 46).

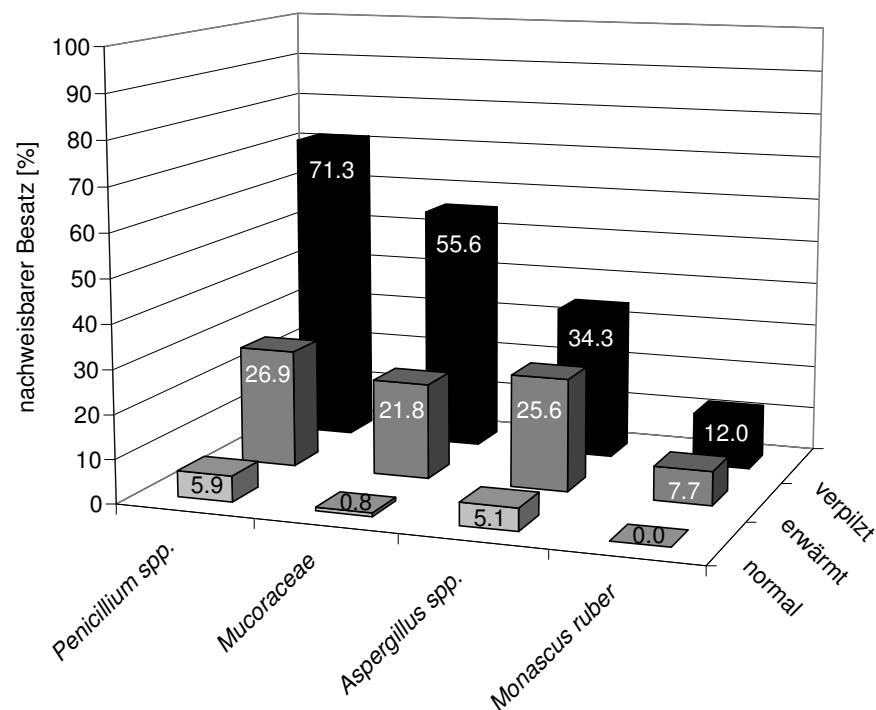


Abbildung 45: Häufigkeiten dominierender Schimmelpilzfamilien bzw. -gattungen in Maissilagen unterschiedlicher Qualitäten (n = 304)

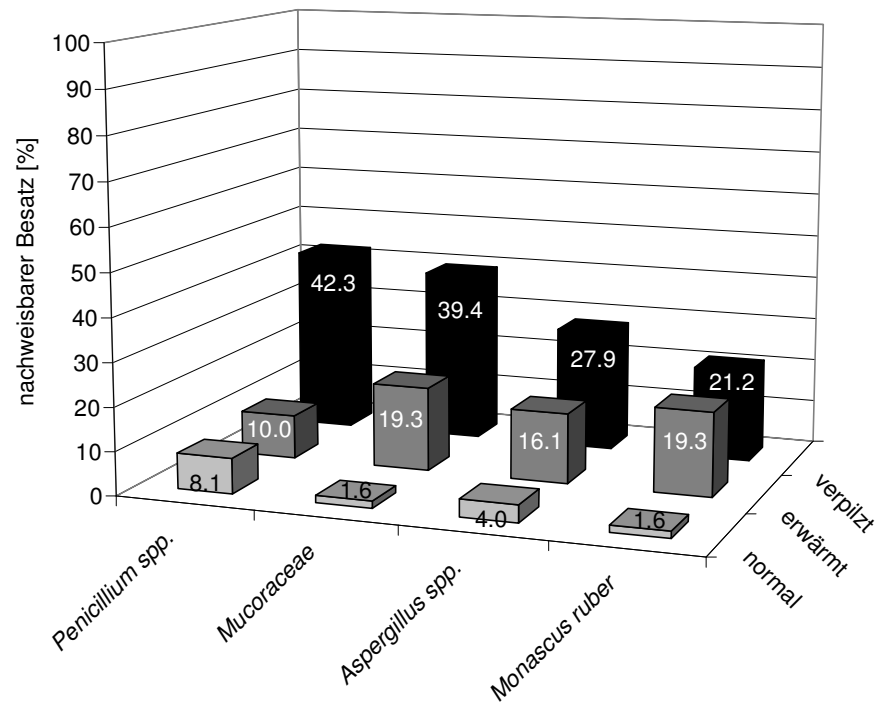


Abbildung 46: Häufigkeit dominierender Schimmelpilzfamilien bzw. -gattungen in Grassilagen unterschiedlicher Qualitäten (n = 280)

Aus sensorisch „unauffälligen“ Gras- und Maissilagen wurden – wenn Schimmelpilze anzüchtbar waren - vor allem *Aspergillus*- und *Penicillium*-Arten isoliert; andere Schimmelpilze wie *Monascus ruber* oder Vertreter der Mucoraceae kamen deutlich seltener vor.

In erwärmten Gras- und Maissilagen konnte dieses Keimspektrum häufiger nachgewiesen werden als in „unauffälligen“. Hier traten neben *Penicillium* und *Aspergillus* spp. auch vermehrt Mucoraceae auf. Bei Grassilagen dieser Qualitätsstufe wurde zudem ein vermehrtes Vorkommen von *Monascus ruber* festgestellt.

Erwartungsgemäß am häufigsten waren die genannten Schimmelpilzgattungen und -familien in „verpilzten“ Gras- und Maissilagen anzutreffen, wobei jedoch substratabhängige Unterschiede festzustellen waren. So wurden Vertreter der Gattung *Penicillium* (meist *P. roqueforti*) signifikant häufiger aus Maissilage (71,3 %) als aus Grassilage (42,3 %) isoliert ( $p < 0,001$ ). Vergleichbares gilt für Mucoraceae, die aus 39,4 % der verschimmelten Grassilagen und 55,6 % der Maissilagen angezüchtet wurden. Ein umgekehrtes Bild ergab sich für *Monascus ruber*. Diese Pilzspezies kam häufiger in verschimmelten Gras- (21,2 %) als in Maissilagen (12,0%) vor, während für *Aspergillus* spp. keine signifikanten Unterschiede ermittelt werden konnten (34,3 % Maissilage versus 27,9 % Grassilage).

Es fällt auf, dass *Aspergillus*-Arten in „unauffällig“ bzw. „erwärmt“ bonitierten Silagen mit am häufigsten vorkommen. Im als „verpilzt“ eingestuften Material waren dagegen *Penicillium* spp. und *Mucoraceae* die vorherrschenden Schimmelpilze. Allerdings konnte aus nahezu



jeder dritten Probe dieser Qualitätsstufe auch *Aspergillus fumigatus* angezüchtet werden (Tabelle 25).

Bei der Differenzierung der Pilzisolat ergab sich das in Tabelle 24 dargestellte Bild. Insgesamt wurden 19 verschiedene Schimmelpilzgattungen im untersuchten Probenmaterial nachgewiesen. Die Gattungen *Rhizopus*, *Mucor* und *Absidia* wurden in der Familie der *Mucoraceae* zusammengefasst. Die Arten *Penicillium roqueforti*, *Aspergillus fumigatus* und *Monascus ruber* stellten dabei die dominanten Vertreter der jeweiligen Gattung dar.

Tabelle 24: Vorkommen und Häufigkeit aus Gras- und Maissilagen isolierter Schimmelpilz-Familien, -Gattungen und -Arten

Schimmelpilz-Familie, -Gattung, -Art	positive Proben n (%)		
	Grassilage	Maissilage	gesamt
<i>Aspergillus</i> spp.	38 (13,6)	63 (20,7)	101 (17,3)
<i>Aspergillus fumigatus</i>	31 (11,1)	60 (19,7)	91 (15,6)
<i>Aspergillus niger</i>	2 (0,7)	(0,0)	2 (0,3)
<i>Aspergillus terreus</i>	1 (0,4)	2 (0,7)	3 (0,5)
<i>Aspergillus flavus</i>	(0,0)	1 (0,3)	1 (0,2)
<i>Neosartorya fischeri</i>	1 (0,4)	(0,0)	1 (0,2)
<i>Eurotium</i> spp.	2 (0,7)	(0,0)	2 (0,3)
<i>Penicillium</i> spp.	64 (22,9)	105 (34,5)	169 (28,9)
<i>Penicillium roqueforti</i>	36 (12,9)	69 (22,7)	105 (18,0)
<i>Mucoraceae</i>	54 (19,3)	78 (25,7)	132 (22,6)
<i>Monascus ruber</i>	33 (11,8)	19 (6,3)	52 (8,9)
<i>Scedosporium</i> spp.	18 (6,4)	18 (5,9)	36 (6,2)
<i>Geotrichum candidum</i>	18 (6,4)	15 (4,9)	33 (5,7)
<i>Byssochlamys</i> spp.	20 (7,1)	7 (2,3)	27 (4,6)
<i>Paecilomyces</i> spp.	3 (1,1)	2 (0,7)	5 (0,9)
<i>Fusarium</i> spp.	13 (4,6)	5 (1,6)	18 (3,1)
<i>Trichoderma</i> spp.	6 (2,1)	10 (3,3)	16 (2,7)
<i>Scorulariopsis</i> spp.	7 (2,5)	(0,0)	7 (1,2)
<i>Wallemia</i> sp.	1 (0,4)	6 (2,0)	7 (1,2)
<i>Cladosporium</i> spp.	1 (0,4)	3 (1,0)	4 (0,7)
<i>Alternaria</i> sp.	1 (0,4)	(0,0)	1 (0,2)
<i>Acremonium</i> sp.	1 (0,4)	(0,0)	1 (0,2)

Weitere Schimmelpilze der Gattungen *Scedosporium*, *Geotrichum*, *Byssosclamyces* oder *Peacilomyces*, *Fusarium* und *Trichoderma* wurden deutlich seltener aus dem Probenmaterial isoliert. Darüber hinaus nachgewiesene Schimmelpilzgattungen bzw. -Spezies bildeten die Ausnahme. Die Art *A. fumigatus* wurde in 15,6 % des Probenmaterials nachgewiesen, wobei die höchste Keimzahl von  $2,0 \times 10^8$  KBE/g bei einer als verpilzt eingestuften Maissilage ermittelt wurde (Tabelle 25). Berücksichtigt man die Qualität der Silagen, so war festzustellen, dass diese Spezies verstärkt in verschimmelten Gras- und Maissilagen bzw. erwärmten Bereichen von Maissilos präsent war. In unauffälligem Probenmaterial war *A. fumigatus* nur vereinzelt zu finden (4,1 % positive Befunde).

Vergleicht man die Silagearten hinsichtlich des gleichzeitigen Nachweises verschiedener Schimmelpilzgattungen, zeigen sich vor allem für verpilztes Probenmaterial Unterschiede zwischen Gras- und Maissilagen. Verschimmelte Maissilage enthielt zu fast drei Vierteln (72 %) mehr als eine Schimmelpilzgattung, Grassilagen derselben Klasse nur zur Hälfte (51 %). In den anderen Qualitätsklassen unterschieden sich Gras- und Maissilagen dagegen kaum (Abbildung 47 und Abbildung 48).

Tabelle 25: Vorkommen von *Aspergillus fumigatus* in Gras- und Maissilagen unterschiedlicher sensorischer Qualitäten (n = 584)

Silagenart	Qualität	Probenzahl n	<i>A. fumigatus</i> n (%)	max. KBE <sub>log</sub> /g
Grassilage	normal	126	4 (3,2)	2,30
	erwärmt	49	4 (8,2)	3,90
	verpilzt	105	23 (21,9)	5,30
	gesamt	280	31 (11,1)	5,30
Maissilage	normal	118	6 (5,1)	3,00
	erwärmt	78	19 (24,4)	6,54
	verpilzt	108	35 (32,4)	8,30
	gesamt	304	60 (19,7)	8,30
Insgesamt		584	91 (15,6)	8,30

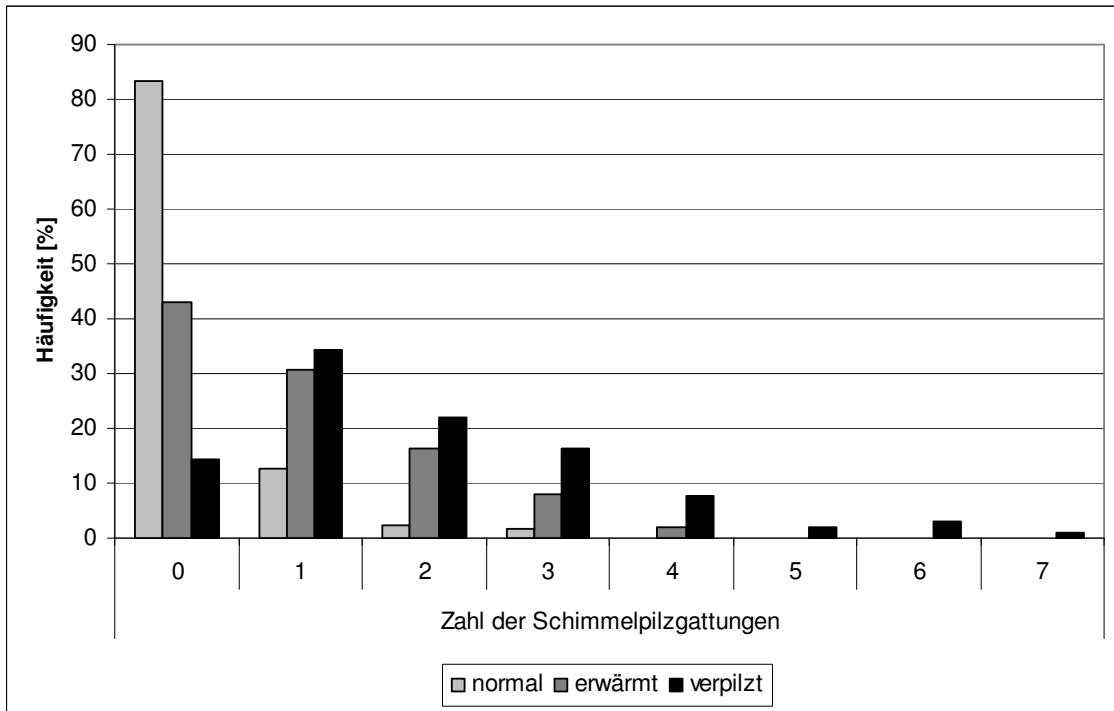


Abbildung 47: relative Häufigkeit des gleichzeitigen Nachweises mehrerer Schimmelpilzgattungen in Grassilagen unterschiedlicher sensorischer Qualitäten

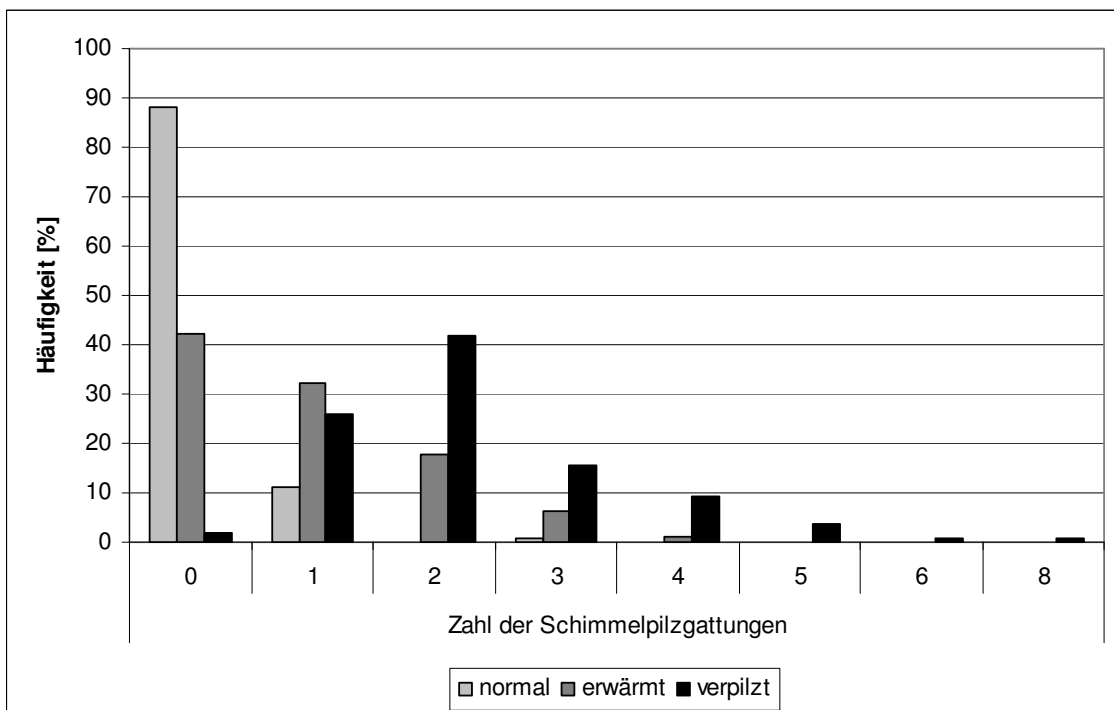


Abbildung 48: Relative Häufigkeit des gleichzeitigen Nachweises mehrerer Schimmelpilzgattungen in Maissilagen unterschiedlicher sensorischer Qualitäten

## 4.2 Mykotoxikologische Untersuchung

Bei der Analyse von 584 Gärfuttermittelproben auf 37 Pilzstoffwechselprodukte wurde in 410 Proben mindestens eine dieser Verbindungen nachgewiesen. Im Allgemeinen wiesen vor allem erwärmte und verpilzte Silagen eine Vielzahl von Mykotoxinen in teilweise beträchtlichen Konzentrationen auf. Für die einzelnen Toxine stellt sich die Situation wie folgt dar:

### *Vorkommen von Mykophenolsäure, Roquefortin und Monacolin K*

Das Vorkommen von Mykophenolsäure, Roquefortin C und Monacolin K war weitestgehend auf als „verpilzt“ eingestufte Silagen begrenzt (Tabelle 26). Die Verbindungen Mykophenolsäure und Roquefortin C konnten vermehrt in verschimmelten Maissilagen nachgewiesen werden, die höchsten Konzentrationen (21,4 bzw. 12,9 mg/kg) wurden allerdings in Grassilagen gemessen. Gegenteilig verhielt es sich für Monacolin K, welches häufiger in Grassilagen nachgewiesen werden konnte, die höchste Konzentration der Substanz aber in Maissilage gemessen wurde (54,6 mg/kg).

### *Metaboliten von Aspergillus fumigatus*

**Gliotoxin** konnte in insgesamt 45 Proben gefunden werden (Tabelle 27). Davon waren 32 der Kategorie „verpilzt“ zuzuordnen. Gras- und Maissilagen waren vergleichbar häufig kontaminiert, allerdings waren die ermittelten Konzentrationen in letzteren tendenziell höher. So betrug der maximale Gehalt an Gliotoxin in Grassilage 0,1 mg/kg, in Maissilage dagegen 0,5 mg/kg. Gliotoxin wies von allen untersuchten Verbindungen die höchste Korrelation ( $r = 0,87$ ) zum Nachweis von *A. fumigatus* in den Silagen auf.

Bezüglich **Fumagillin** erwiesen sich 27 Proben als positiv. Auffällig ist, dass dieser Metabolit von *A. fumigatus* signifikant häufiger in Mais- ( $n = 23$ ) als in Grassilagen ( $n = 4$ ) nachgewiesen wurde ( $p < 0,001$ ). Die maximalen Konzentrationen in den Wärme- bzw. Schimmelnestern betrugen 0,7 mg/kg (Grassilage) bzw. 1,7 mg/kg (Maissilage).

Vertreter der **Fumitremorgen-Verruculogen-Gruppe** wurden in insgesamt 198 Proben nachgewiesen, davon waren 86 den Gras- und 112 den Maissilagen zuzuordnen.

**Verruculogen** trat in Proben „normaler“ Grassilage (12,7 %) häufiger auf ( $p < 0,05$ ) als in vergleichbaren Maissilagen (5,9 %). Dagegen konnte zwischen den anderen Qualitätsklassen kein Unterschied festgestellt werden. Die ermittelten maximalen Gehalte waren in Gras- (532 µg/kg) und Maissilagen (604 µg/kg) ähnlich hoch.

**Fumitremorgen B** war in insgesamt 58 Gärfuttermittelproben (24 Gras- und 34 Maissilagen) nachzuweisen. In Grassilagen wurde ein Maximalwert von 514 µg/kg bestimmt. Dieser entsprach etwa dem von Verruculogen (532 µg/kg). Insgesamt wurden in erwärmten und verpilzten Maissilagen jedoch deutlich höhere Gehalte an Fumitremorgen B als an Verruculogen ermittelt.

Tabelle 26: Vorkommen von Mykophenolsäure, Roquefortin C und Monacolin K in Gras- und Maissilagen unterschiedlicher Qualitäten

Toxin	Silagequalität					
	n (%)	normal Bereich ( $\bar{x}$ ) [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ]	n (%)	erwärmt Bereich ( $\bar{x}$ ) [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ]	n (%)	verpilzt Bereich ( $\bar{x}$ ) [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ]
	<b>Grassilage</b>					
Mykophenolsäure	4 (3,2)	17 - 1020 (295)	2 (4,1)	30 - 36 (33)	53 (50,5)	7 - 21400 (1779)
Roquefortin	4 (3,2)	10 - 482 (310)	2 (4,1)	16 - 209 (113)	44 (41,9)	4 - 12900 (1503)
Monacolin K	3 (2,4)	114 - 1010 (432)	6 (12,2)	60 - 2190 (604)	31 (29,5)	74 - 33700 (4988)
	<b>Maissilage</b>					
Mykophenolsäure	4 (3,4)	2 - 263 (68)	5 (6,4)	5 - 4330 (1154)	68 (63,0)	9 - 10200 (1175)
Roquefortin	6 (5,1)	3 - 2350 (554)	7 (9,0)	1 - 3280 (598)	77 (71,3)	5 - 10600 (1455)
Monacolin K	8 (6,8)	14 - 449 (131)	2 (2,6)	14 - 58 (36)	16 (14,8)	28 - 54600 (7323)

Tabelle 27: Vorkommen und maximale Quantitäten von *A. fumigatus*-Toxinen in Gras- und Maissilagen unterschiedlicher Qualitäten

Toxin	Silagequalität					
	normal		erwärmt		verpilzt	
	n (%)	Bereich ( $\bar{x}$ ) [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ]	n (%)	Bereich ( $\bar{x}$ ) [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ]	n (%)	Bereich ( $\bar{x}$ ) [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ]
	<b>Grassilage</b>					
Gliotoxin	5 (4,0)	5,2 - 25,7 (17,0)	1 (2,0)	35,0	17 (16,2)	2,0 - 103,0 (23,3)
Fumagillin	1 (0,8)	9,3	1 (2,0)	722,0	2 (1,9)	19,0 - 23,7 (21,4)
Verruculogen	16 (12,7)	0,3 - 119,0 (23,9)	10 (20,4)	3,2 - 358,0 (53,9)	19 (18,1)	0,6 - 532,0 (45,4)
Fumitremorgen B	8 (6,3)	5,0 - 130,0 (36,9)	7 (14,3)	9,4 - 280,0 (54,3)	9 (8,6)	12,1 - 514,0 (81,1)
Fumitremorgen C	3 (2,4)	2,0 - 20,3 (9,6)	1 (2,0)	390,0	5 (4,8)	4,4 - 15,6 (9,3)
TR 2-Toxin	2 (1,6)	7,2 - 19,4 (13,3)	2 (4,1)	47,0 - 74,4 (60,7)	4 (3,8)	13,9 - 98,4 (51,3)
Trypacidin	37 (29,4)	5,8 - 316,0 (42,9)	20 (40,8)	9,0 - 13200,0 (792,4)	34 (32,4)	8,2 - 469,0 (47,8)
Fumigaclavin C	7 (5,6)	7,1 - 1500,0 (273,3)	8 (16,3)	7,0 - 304,0 (54,1)	23 (21,9)	3,7 - 62,0 (23,3)
Fumiquinazolin D	7 (5,6)	1,8 - 68,9 (13,6)	3 (6,1)	1,1 - 463,0 (156,1)	9 (8,6)	1,3 - 31,1 (9,1)
Pyripyropen A	1 (0,8)	69,0	2 (4,1)	17,2 - 242,0 (129,6)	1 (1,0)	20,0
	<b>Maissilage</b>					
Gliotoxin	3 (2,5)	2,9 - 10,0 (6,9)	4 (5,1)	3,9 - 40,6 (15,0)	15 (13,9)	2,2 - 513,0 (89,7)
Fumagillin	1 (0,8)	10,7	5 (6,4)	1,2 - 295,0 (64,0)	17 (15,7)	3,0 - 1740,0 (262,8)
Verruculogen	7 (5,9)	0,5 - 20,1 (7,5)	9 (11,5)	0,9 - 604,0 (77,9)	15 (13,9)	0,9 - 247,0 (47,4)
Fumitremorgen B	9 (7,6)	11,9 - 38,2 (19,3)	10 (12,8)	5,1 - 1540,0 (170,5)	15 (13,9)	2,3 - 2080,0 (204,2)
Fumitremorgen C	2 (1,7)	1,0 - 1,7 (1,3)	6 (7,7)	1,5 - 2020,0 (344,6)	15 (13,9)	2,0 - 524,0 (106,0)
TR 2-Toxin	1 (0,8)	19,0	8 (10,3)	25,5 - 390,4 (105,8)	15 (13,9)	7,3 - 685,0 (139,1)
Trypacidin	42 (35,6)	1,6 - 60,3 (23,1)	22 (28,2)	0,9 - 277,0 (31,5)	49 (45,4)	3,6 - 3520,0 (160,5)
Fumigaclavin C	4 (3,4)	22,3 - 37,3 (29,5)	17 (21,8)	5,6 - 198,0 (35,3)	50 (46,3)	2,8 - 18792,7 (915,5)
Fumiquinazolin D	8 (6,8)	0,6 - 6,3 (3,0)	13 (16,7)	0,6 - 70,6 (13,4)	38 (35,2)	0,5 - 9940,0 (566,0)
Pyripyropen A	1 (0,8)	3,6	4 (5,1)	3,6 - 86,2 (29,2)	15 (13,9)	3,6 - 3558,2 (517,9)

**TR-2 Toxin** wurde insgesamt seltener detektiert ( $n = 32$ ) als Verrucologen und Fumitremorgen B ( $p < 0,001$  bzw.  $0,01$ ). Die höchste Belastung wurde in einer verschimmelten Maissilage festgestellt ( $0,7 \text{ mg/kg}$ ). Verpilzte Maissilagen enthielten häufiger TR-2 Toxin als Grassilagen derselben Klasse ( $p < 0,05$ ).

Dieselbe Beobachtung konnte für das Vorkommen von **Fumitremorgen C** gemacht werden, welches ebenfalls in Maissilagen gegenüber Grassilagen vermehrt nachzuweisen war ( $p < 0,05$ ). Darüber hinaus wurden in dieser Silageart deutlich höhere maximale Konzentrationen ermittelt (erwärmt =  $2020 \text{ } \mu\text{g/kg}$ , verpilzt =  $524 \text{ } \mu\text{g/kg}$ ).

**Fumitremorgen A** konnte als einziges untersuchtes Fumitremorgen nicht im untersuchten Probenmaterial nachgewiesen werden.

**Trypacidin** wurde in 204 der untersuchten Silageproben gefunden (35 %). Somit war diese Verbindung hochsignifikant häufiger vertreten als alle anderen untersuchten Substanzen. Dabei begrenzte sich das Vorkommen von Trypacidin nicht nur auf sensorisch veränderte Silageproben. Auch 32 % der als „unauffällig“ bonitierten Silagen enthielten diese Verbindung. Die maximalen ermittelten Konzentrationen betragen in Grassilagen  $13200 \text{ } \mu\text{g/kg}$  und in Maissilagen  $3520 \text{ } \mu\text{g/kg}$ .

Der Nachweis von **Fumigaclavin C** gelang in 109 Silagen. Im Gegensatz zu Trypacidin wurde die Verbindung vermehrt in erwärmten und vor allem verpilzten Silageproben gefunden. Insbesondere verschimmelte Maissilagen enthielten häufig Fumigaclavin C (46 %), wobei Gehalte bis zu  $18,8 \text{ mg/kg}$  gemessen wurden.

**Fumiquinazolin D** konnte als einziger Vertreter der Fumiquinazolin-Gruppe quantifiziert werden. Das Vorkommen variierte zwischen den Bonitätsklassen in Grassilagen kaum, in Maissilagen jedoch deutlich. Hier war ein Anstieg der Prävalenzrate von 6,8 % in unauffälligem Probenmaterial auf 35,2 % in verpilzten Maissilagen zu beobachten. Die maximale Konzentration von Fumiquinazolin D betrug in einer verpilzten Maissilage  $9940 \text{ } \mu\text{g/kg}$ .

**Pyripyropen A** wurde in Grassilagen vereinzelt ( $n = 4$ ), in Maissilagen etwas häufiger detektiert ( $n = 20$ ). Dieser Unterschied war signifikant ( $p < 0,01$ ). Die Verbindung war vor allem in verpilzten Maissilagen nachzuweisen ( $n = 15$ ). Auch die maximale Konzentration von  $3558 \text{ } \mu\text{g/kg}$  wurde hier ermittelt.

Neben diesen quantitativ bestimmten Stoffwechselprodukten von *A. fumigatus* konnten weitere Verbindungen qualitativ nachgewiesen werden (Tabelle 28):

Von der **Fumiquinazolin-Gruppe** waren die Fumiquinazoline C, D und B/A am häufigsten in Silagen zu finden ( $n = 65, 78$  bzw.  $26$ ), seltener dagegen die Fumiquinazoline E und F/G

(n = 12 bzw. 16). Fumiquinazolin C und D wurden in Grassilagen stets gemeinsam nachgewiesen. Dies war in Maissilagen nicht der Fall, hier konnte Fumiquinazolin D wesentlich häufiger detektiert werden als Fumiquinazolin C.

Vertreter der **Tryptoquivalin-Gruppe**, welche als potentiell tremorgene Substanzen eingeschätzt werden und als typische *A. fumigatus*-Toxine gelten, wurden deutlich seltener nachgewiesen als Vertreter der Fumiquinazolin-Gruppe. Tryptoquivalin F/J traten zahlreicher als andere Tryptoquivaline auf (n = 35) und konnten als einzige Vertreter dieser Gruppe in Gras- (n = 11) und Maissilagen (n = 24) gefunden werden, der Unterschied zwischen den Silagearten war signifikant ( $p < 0,05$ ). Dagegen gelang für die Tryptoquivaline D, G und I der qualitative Nachweis ausschließlich in Maissilagen, der von Tryptoquivalin E in erwärmten und verpilzten Grassilagen. Tryptoquivalin N war in *A. fumigatus*-Kulturen nur in Spuren, in Gras- oder in Maissilagen jedoch nicht nachzuweisen.

**Festuclavin** und **Fumigaclavin A** konnten in 115 bzw. 96 Proben detektiert werden. Betroffen waren vor allem als „verpilzt“ eingestufte Gras- und Maissilagen.

**Helvolsäure** war relativ häufig in erwärmten oder verpilzten Gras- (n = 6 bzw. 11) und Maissilagen (n = 11 bzw. 24) zu finden, war teilweise aber auch in sensorisch unauffälligem Probenmaterial enthalten.

In allen untersuchten Silagearten und -qualitäten konnte **Pseurotin A** nachgewiesen werden, jedoch signifikant häufiger in verpilzten Maissilagen als in anderen Probenmaterialien ( $p < 0,001$ ). Der Nachweis der **Sphingofungine A** und **D** (n = 6 bzw. 1) und **Synerazol** (n = 6) gelang dagegen nur in wenigen Proben, vorwiegend in verpilzten Maissilagen.



Tabelle 28: Qualitativer Nachweis weiterer Sekundärstoffwechselprodukte in Gras- und Maissilagen unterschiedlicher Qualitäten

		Grassilage (n = 280)			Maissilage (n = 304)		
		normal (n = 126)	erwärmt (n = 49)	verpilzt (n = 105)	normal (n = 118)	erwärmt (n = 78)	verpilzt (n = 108)
Toxin		n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
Fumiquina- zoline	A/B	-	1 (2,0)	4 (3,8)	-	4 (5,1)	17 (15,7)
	C	7 (5,6)	3 (6,1)	9 (8,6)	7 (5,9)	9 (11,5)	30 (27,8)
	E	1 (0,8)	1 (2,0)	-	-	-	10 (9,3)
	F/G	-	1 (2,0)	-	1 (0,8)	1 (1,3)	15 (13,9)
Tryptoquivaline	D	-	-	-	-	-	2 (1,9)
	G	-	-	-	-	-	3 (2,8)
	F	4 (3,2)	1 (2,0)	6 (5,7)	1 (0,8)	5 (6,4)	18 (16,7)
	E	-	1 (2,0)	2 (1,9)	-	-	-
	I	-	-	-	1 (0,8)	-	15 (13,9)
	N	-	-	-	-	-	-
weitere Stoffwechselprodukte	Deacetyl- Fumigaclavin C	-	1 (2,0)	1 (1,0)	-	-	8 (7,4)
	Demethoxy-FTC	2 (1,6)	1 (2,0)	2 (2,0)	1 (0,8)	4 (5,1)	6 (5,6)
	Dihydroxy-FTC	2 (1,6)	-	1 (1,0)	9 (7,6)	4 (5,1)	25 (23,1)
	Festucaclavin	4 (3,2)	2 (4,1)	23 (21,9)	-	11 (14,1)	75 (69,4)
	(Iso-) Fumigaclavin A	1 (0,8)	3 (6,1)	23 (21,9)	3 (2,5)	16 (20,5)	50 (46,3)
	Helvolsäure	3 (2,4)	6 (12,2)	11 (10,5)	10 (8,5)	11 (14,1)	24 (22,2)
	Pseurotin A	8 (6,3)	5 (10,2)	11 (10,5)	10 (8,5)	12 (15,4)	50 (46,3)
	Sphingofungin A	-	-	1 (1,0)	1 (0,8)	-	4 (3,7)
	Sphingofungin D	-	-	-	-	-	1 (0,9)
	Synerazol	-	1 (2,0)	-	-	-	5 (4,6)
	Tryprostatin B	-	1 (2,0)	2 (2,0)	-	-	6 (5,6)

## E Diskussion

Die Beurteilung des Hygienestatus von Silagen ist nicht unproblematisch, da die einzelnen untersuchten abiotischen oder biotischen Parameter immer nur eine begrenzte Aussagekraft über den tatsächlichen Zustand des Futtermittels besitzen. Die mikrobiologische bzw. mykologische Untersuchung des Probenmaterials ist zwar nur eine Momentaufnahme des futtermittelhygienischen Zustands, mit welcher nur noch keimfähige Mikroorganismen nachgewiesen werden können; bei der Untersuchung von Silagen auf Stoffwechselprodukte der Lagerpilzflora ist sie jedoch sinnvoll, da deren Vorkommen in direktem Zusammenhang stehen sollten. Die Verknüpfung einer mikrobiologischen mit einer chemisch-physikalischen Analyse kann zweifellos zu einer genaueren Qualitätsbeurteilung von Gärfuttermitteln beitragen als die gesonderten Verfahren. Da diese Methoden aufgrund des hohen Aufwands für die Praxis in der Regel nicht finanzierbar sind, bedarf es stichprobenartiger Untersuchungen, welche einen Rückschluss auf die Gesamtsituation ermöglichen. Aus diesem Grund wurden 584 Silageproben sowohl mikrobiologisch als auch mit einer neu entwickelten HPLC-MS/MS-Nachweismethode auf *Aspergillus fumigatus*-Metaboliten und andere Mykotoxine untersucht.

### *Mykologisches Verfahren*

Die Untersuchung der Keimgehalte mit dem Spatelverfahren nach Gedek (1974) hat sich bereits vielfach bewährt. Die Anzucht von Schimmelpilzen aus Futtermitteln auf Sabouraud-Dextrose-Agar (SAB) verleiht einen guten Überblick über die darin vorkommenden Hefen und Schimmelpilze. Neben SAB wurde auch Dichloran-Glycerin 18% Agar verwendet, welcher genauere Aussagen über das Vorkommen vor allem xerophiler Pilze zulässt. Diese besitzen auf SAB eine zu geringe Konkurrenzskraft, um neben schnell wachsenden Schimmelpilzen wie den Mucoraceen oder auch Sprosspilzen bestehen zu können. Des Weiteren wurden viele der bereits beschriebenen mykologischen Untersuchungen von Silagen auf der Basis dieser beiden Kulturmedien durchgeführt, so dass die aktuellen Ergebnisse hiermit verglichen werden konnten.

Die Aussagekraft einer mykologischen Untersuchung von Stichproben im Hinblick auf den Zustand des gesamten Silos ist allerdings begrenzt. Da das Gärfutter zuerst an Stellen des Gasaustauschs verdirbt, ist die Verteilung der verderbanzeigenden Mikroorganismen im Futterstock inhomogen. Eine repräsentative Probenziehung ist daher nahezu unmöglich. Die Anschnittfläche als Ort der Beprobung dürfte auch der mit der größten mikrobiellen Aktivität sein. Aus diesem Grund wurde eine Einteilung der Untersuchungen in unauffällige, erwärmte und verpilzte Silageproben vorgenommen, um den normalen mykologischen Status guter Gärfutter zum einen und die Situation des beginnenden und des vollständigen Verderbs von Silagen zum anderen zu charakterisieren. Die große Zahl an Proben sollte über die inhomogene Verteilung hinweg ein aussagekräftiges mykologisches Gesamtbild ermöglichen.

### *Herstellung von Referenzsubstanzen*

Die analytische Bestimmung von Substanzen ohne die Zuhilfenahme von Referenzsubstanzen stellte unter den gegebenen Voraussetzungen eine besondere Herausforderung dar. Vor allem waren nur sehr wenige Berichte über das Fragmentierungsverhalten von *A. fumigatus*-Metaboliten in einem Tandem-Massenspektrometer (MS/MS) verfügbar. Dennoch gelang es, eine Vielzahl sekundärer Stoffwechselprodukte mit großer Sicherheit zu identifizieren. Für Trypacidin war zudem die Bestätigung der Identität mittels NMR möglich. Ein Teil der Verbindungen konnte in ausreichender Menge isoliert werden, um externe Standards herzustellen.

**Fumitremorgen B** wurde zunächst nicht erkannt, da durch die Abspaltung eines Wassermoleküls vorwiegend ein Quellenfragment mit der Masse  $m/z = 462$  detektiert wurde (Larsen et al., 2007). In der verfügbaren Literatur wurde diese Masse jedoch nicht als dominantes Fragment beschrieben (Cole und Cox, 1981). Darüber hinaus stimmte diese Quasimolekülmasse mit einer bislang unbekanntem Verbindung, evtl. einem Fumiquinazolin, überein. Das aus einem Kulturextrakt generierte Produktionenspektrum der Masse 462 lieferte vorwiegend nicht beschriebene Fragmente. Diese waren vermutlich der unbekanntem Verbindung zuzuordnen und erschwerten somit die Identifizierung von Fumitremorgen B. Durch Zuhilfenahme der verfügbaren dünnschichtchromatographischen Daten (Cole und Cox, 1981) und die Verwendung eines weiteren Fumitremorgen B-Produzenten (*Penicillium simplicissimum*) gelang es dennoch, die Verbindung mit hinreichender Sicherheit zu identifizieren und zu isolieren.

**Fumitremorgen A** wurde erst durch die Verwendung eines *Neosartorya fischeri*-Stamms isoliert und identifiziert. Vermutlich wurde es vom verwendeten *A. fumigatus*-Stamm nicht produziert. Beobachtungen von Larsen et al. (2007) bestätigen diese Vermutung, da auch die von diesen Autoren untersuchten *A. fumigatus*-Stämme kein Fumitremorgen A produzierten, allerdings alle getesteten *N. fischeri*-Stämme.

Die Masse des Mutterions  $m/z = 580$  (Cole und Cox, 1981) wurde beim Q1-Scan kaum, die einer Wasserabspaltung (Larsen et al., 2007) ebenfalls nur in geringem Maße gefunden. Anders beim Q3-Scan, hier waren diese beiden Massen deutlich erkennbar vorhanden (vgl. Kapitel D 2.1). Bei den gegebenen Quellenparametern entstand bei der Ionisierung vorwiegend ein Fragment mit der Masse  $m/z = 494$ . Dieses war ebenfalls bei Verruculogen, sowohl als Quellenfragment wie auch als Produkt-Ion zu detektieren, was einerseits die strukturelle Ähnlichkeit der beiden Verbindungen aufzeigte, andererseits aber die Zuordnung des Fragments auf die betreffende Ausgangsverbindung bei fehlenden Referenzsubstanzen erschwerte.

**TR-2 Toxin** wurde sowohl von *A. fumigatus*, *N. fischeri* als auch *Penicillium simplicissimum* gebildet. Die zweifelsfreie Detektion dieses Toxins erwies sich dennoch als problematisch, da auch TR-2 Toxin bei den voreingestellten Quellenparametern stark fragmentierte und die Massen dieser Bruchstücke mit Fragmentmassen anderer Metaboliten wie Cyclotryprostatin oder Dihydroxy-Fumitremorgen C übereinstimmten. Nach dünnschichtchromatographischen

Untersuchungen der verschiedenen Fraktionen der Säulenaufreinigung konnten jedoch die jeweiligen Retentionszeiten bestimmt und TR-2 Toxin in ausreichender Menge isoliert werden, um es als Referenzsubstanz einsetzen zu können. Das von Cole und Cox (1981) beschriebene Massenspektrum stimmte mit dem beobachteten Fragmentierungsmuster in der Kollisionszelle des MS/MS nur wenig überein. Die Abspaltung von zwei Wassermolekülen (Larsen et al., 2007) konnte jedoch beobachtet werden. Die Umwandlung von Verruculogen zu TR-2 Toxin über einem Palladium-Katalysator lieferte zusätzlich weitere Verbindungen derselben Masse, jedoch mit anderen Retentionszeiten bei der Trennung über HPLC. Isomere dieser Verbindung wurden bereits von Willingale et al. (1983) beschrieben.

**Trypacidin** konnte unter den gegebenen Bedingungen relativ einfach und in ausreichender Menge zur Herstellung eines externen Standards gewonnen werden. Obwohl für diese Substanz kein vergleichendes Massenspektrum verfügbar war, konnten durch die Fragmentierung einer Verbindung mit der Masse ( $m/z$ ) 345,1 (Larsen et al., 2007) die Produktionen 313,1, 301,1, 286,2, 271,1 und 257,2 detektiert und Trypacidin anhand dieser identifiziert werden (vgl. Kapitel D 2.1). Weitere Hinweise ergaben sich aus der Herkunft der isolierten Substanz, der relativ großen produzierten Menge sowie den mit Literaturangaben äquivalenten Retentionszeiten (Fischer et al., 1999; Larsen et al., 2007). Beide Autoren verwendeten vergleichbares Säulenmaterial sowie HPLC-Fließmittel. Schließlich konnte auch die Struktur der Substanz mittels NMR bestätigt werden.

**Fumigaclavin C** ist als ein ebenfalls in großen Mengen produzierter Stoffwechselmetabolit von *A. fumigatus* bekannt. Allerdings ist das Vorkommen der Substanz, wie auch das von Trypacidin (Parker und Jenner, 1968), mit der Produktion von Sporen verknüpft (Panaccione und Coyle, 2005). Alkaloide unterschieden sich chemisch-physikalisch deutlich von anderen *A. fumigatus*-Stoffwechselprodukten. Daher wurde Fumigaclavin C, wie auch die weiteren **Fumigaclavine A** und **B** sowie **Festuclavin**, mit einer spezifischen Methode aus den Reiskulturen isoliert (vgl. Kapitel C 2.2.4). Die massenspektrometrische Untersuchung der Substanzen lieferte die in der Literatur beschriebenen Hauptfragmente (Cole und Cox, 1981).

Für **Fumiquinazolin D** ( $m/z = 444$ ) waren keine Angaben zum Fragmentierungsverhalten in einer MS/MS-Kollisionszelle verfügbar, dennoch konnte diese Verbindung in ausreichender Menge zur Herstellung eines externen Standards isoliert werden. Das Auftreten des Fragments  $m/z = 426$  ist durch eine einfache Wasserabspaltung erklärbar. Dieser Befund deutet auf Fumiquinazolin D, nicht aber **C**, hin (Larsen et al., 2007). Da diese beiden Verbindungen ansonsten sehr ähnlich fragmentierten, wurde zur Unterscheidung der entsprechende Übergang benutzt. **Fumiquinazoline A** und **B** sind reine Stereoisomere (Numata et al., 1992; Takahashi et al., 1995) und konnten anhand der Massenspektren nicht eindeutig unterschieden werden.

**Pyripyropen A** wurde anhand des einfach protonierten Moleküls detektiert (Larsen et al., 2007). Die von Kim et al. (1994) beschriebenen Fragmente waren ebenfalls zu beobachten.

Pyripyropen A wurde von den verwendeten *A. fumigatus*- und *N. fischeri*-Stämmen in relativ hohen Konzentrationen gebildet und in kristalliner Form gewonnen.

Bisher wurde lediglich die Strukturformel von Trypacidin mittels NMR bestätigt. Andere Verbindungen konnten zwar in ausreichender Menge für die Herstellung eines externen Standards isoliert und rein dargestellt werden, eine NMR-Untersuchung wurde für diese Verbindungen bislang jedoch nicht durchgeführt. So wurden neben den biologischen Parametern (Schimmelpilzart, Bildungsbedingungen) lediglich chromatographische (DC, HPLC) und massenspektrometrische (Fragmentierungsmuster) Kennzeichen zur Identifizierung herangezogen.

Für weitere, qualitativ analysierte Verbindungen fanden sich ebenfalls Übereinstimmungen zu den entsprechenden Literaturstellen. Eine Herstellung von Referenzsubstanzen wurde jedoch auch aufgrund der Vielzahl der sekundären Stoffwechselmetaboliten von *A. fumigatus* in dieser Arbeit nicht durchgeführt. Die Herstellung großer Mengen Reinsubstanz ist ohne die entsprechende technische Ausrüstung sehr arbeitsintensiv. Zudem ist eine optimale Aufreinigung mit größeren Mengen an Ausgangssubstanz wesentlich leichter zu erreichen. Da für den quantitativen Nachweis von *A. fumigatus*-Stoffwechselmetaboliten Referenzsubstanzen jedoch unabdingbar sind, wäre die weitergehende Verfügbarkeit von quantifizierten Standards von großem Interesse.

#### *Analysemethode zum Nachweis von Aspergillus fumigatus-Metaboliten in Silagen*

Zur Entwicklung einer Nachweismethode für *A. fumigatus*-Toxine musste zunächst ein geeignetes Extraktionsmittel ermittelt werden. Zu diesem Zweck wurden mehrere Lösungsmittel und Lösungsmittelgemische hinsichtlich des Extraktionserfolgs verglichen. Da das Spektrum der chemisch-physikalischen Eigenschaften der gesuchten Mykotoxine groß war, zeigte auch hier das Lösungsmittelgemisch Acetonitril/Wasser (84/16, v/v), welches bereits als geeignetes Extraktionsmittel für Multimethoden beschrieben wurde (Gottschalk et al., 2007; Gottschalk et al., 2008), die besten Resultate.

Um die gesuchten Stoffe im erhaltenen Extrakt möglichst effektiv von der Begleitmatrix abtrennen zu können, wird häufig auf eine Kombination aus Flüssig-Flüssig-Trennung (Entfettung) und Festphasenextraktion zurückgegriffen (Scudamore, 2005). Auch in der vorliegenden Arbeit wurden entsprechende Vorversuche zur Eignung verschiedener Festphasenextraktionsmaterialien durchgeführt sowie auf dem Filtrationsprinzip beruhende Verfahren getestet. Da diese Methoden jedoch in allen Fällen zu hohen Verlusten entweder von lipophilen oder von hydrophilen Substanzen führten, waren diese für die Gesamtheit der zu analysierenden Substanzen nicht geeignet.

Daher wurde das erhaltene Extrakt lediglich niedertrocknet und in einer definierten Menge HPLC-Fließmittel resolviert. Darin unlösliche Bestandteile wurden mittels Spritzenfiltration abgetrennt und das Filtrat zur HPLC-MS/MS-Analyse bereitgestellt.

Um das bestgeeignete HPLC-Säulenmaterial zu finden, wurden verschiedene Säulen anhand zweier unterschiedlicher Fließmittel verglichen (Kapitel C 2.4). C<sub>18</sub>-Materialien zeigten dabei bessere Eigenschaften als C<sub>8</sub>-Materialien. Aufgrund der sehr hohen Trennschärfe einerseits und der Tolerierung eines hohen Wasseranteils in der mobilen

Phase andererseits, wurde eine Sunfire-RP<sub>18</sub>-Trennsäule (Phenomenex) für die Analyse der Silagen verwendet.

Gärfutter wurde schon mehrfach als besonders anspruchsvolle Matrix beschrieben (Amend und Müller, 1984; Armbruster, 1994; Schneweis, 2000; González Pereyra et al., 2007). Dies konnte auch in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden. Matrixbedingte Signalsuppressionen bis zu 80 % wurden bei einzelnen Substanzen festgestellt. Andere Autoren beobachteten weitaus geringere Matrixeffekte (Rundberget und Wilkins, 2002). Diese Suppressionen beruhen vermutlich auf der gleichzeitigen Ionisierung von Begleitmatrix bzw. anderer sekundärer Stoffwechselprodukte und machen den Einsatz matrixassistierter Standards für die Quantifizierung von Mykotoxinen aus Gras- und Maissilageproben unabdingbar, wenn keine Isotopenstandards verfügbar sind (Rundberget und Wilkins, 2002). Insgesamt ermöglicht die beschriebene Analysemethode mit Nachweisgrenzen zwischen 0,5 und 5 µg/kg Silage für die jeweiligen quantitativ untersuchten Substanzen einen sensitiven, selektiven, schnellen und robusten Nachweis von 34 *A. fumigatus*-Stoffwechselmetaboliten sowie drei weiteren Silagetoxinen.

#### *Mykologische Untersuchungen der Feldproben*

Die mykologische Untersuchung ergab, dass Hefen und Schimmelpilze häufig in Silagen anzutreffen sind. Vor allem erwärmte und verpilzte Bereiche sind davon betroffen. Die Ergebnisse dieser Untersuchung bestätigen im Allgemeinen jene vorangegangener Arbeiten von Gedek (1981), Amend (1990) und Schneweis (2000). Allerdings wurden aus den als „normal“ eingestuften Silageproben deutlich seltener Schimmelpilze isoliert. Nur 3 der insgesamt 244 „unauffälligen“ Gras- und Maissilagen, das entspricht 1,2 % dieser Proben, wiesen ein Schimmelpilzkeimgehalt von  $\geq 5,00 \text{ KBE}_{\log}/\text{g}$  Futtermittel auf. Schneweis (2000) berichtete von 51 % der 102 „einwandfreien“ Silagen, welche diesen Wert überschritten. Diese Unterschiede könnten mit einer verbesserten Silierpraxis, dem verstärkten Einsatz von Siliermitteln oder einer verbesserten Probennahme erklärt werden. Zudem wurden in nur 13,1 % der untersuchten Silagen dieser Gruppe (Grassilagen 15,9 %; Maissilagen 10,2 %) Schimmelpilze überhaupt nachgewiesen. Dies deutet auf eine hohe Aussagekraft der sensorischen Prüfung von Futtermitteln hin. Allerdings sollte erwähnt werden, dass die „Normalproben“ in dieser Untersuchung stets aus dem Zentrum der Anschnittfläche entnommen wurde. Mit Verderb muss in diesem Bereich am wenigsten gerechnet werden.

Als „erwärmt“ klassifiziertes Probenmaterial wurde zu 55,9 % positiv auf Schimmelpilze untersucht. Nach Gedek (1974) müssen gesundheitliche Schäden bei Tieren befürchtet werden, welche Futtermittel mit einer Schimmelpilzkeimbelastung von  $\geq 5,00 \text{ KBE}_{\log}/\text{g}$  aufnehmen. Dieser Wert wurde von 4 (8,1 %) der Gras- und 12 (15,4 %) der Maissilagen überschritten. Die durchschnittlich 12,6 % des „erwärmten“ Probenmaterials deuten somit auf eine erhebliche Risikoerhöhung für die Tiergesundheit durch die Erwärmung von Silagen hin. „Verpilztes“ Probenmaterial wurde zu 92,5 % positiv auf Schimmelpilze untersucht. Als „verschimmelt“ klassifizierte Grassilagen enthielten dabei zu lediglich 86,7 % nachweisbare

Schimmelpilzkeimzahlen. Dies könnte mit dem verstärkten Wachstum von Aktinomyzeten zu begründen sein, welche bei der visuellen Beurteilung nicht als solche erkannt, sondern für Schimmelpilze gehalten wurden.

Grassilagen dieser Qualitätsstufe waren zu 61 % mit Schimmelpilzgehalten  $\geq 5,00 \text{ KBE}_{\log}/\text{g}$  belastet, verschimmelte Maissilagen sogar zu 90,7 %. Einen Erklärungsansatz für diesen Unterschied stellt das Ausgangsmaterial selbst dar. Maissilage verfügt über einen höheren Anteil schnell verfügbarer C-Quellen. Dies kann im Besonderen das Wachstum von Schimmelpilzen fördern, welche selbst nicht in der Lage dazu sind, Strukturkohlenhydrate schnell zu verstoffwechseln.

Bei den Schimmelpilzen dominierten die Arten *P. roqueforti*, *M. ruber* und *A. fumigatus*. Auch Gattungen aus der Familie der *Mucoraceae*, wie *Mucor*, *Absidia* oder *Rhizopus*, gehörten der Schimmelpilzflora in Silagen an. Die am häufigsten vorkommende Schimmelpilzspezies war jedoch *P. roqueforti*. Mit Ausnahme erwärmter Grassilagen war diese Spezies in allen untersuchten Silagequalitäten vorherrschend. Besonders deutlich war dies bei verpilzten Maissilagen zu erkennen, in 71,3 % der Proben war *P. roqueforti* nachzuweisen. Dieser Sachverhalt steht im Einklang mit den Beobachtungen von Escoula (1972), Pelhate (1977), Gedek (1984), Amend (1990), Nout et al. (1993), Auerbach (1996) und Schneewis (2000).

Mucoraceen waren in „unauffälligem“ Probenmaterial selten nachzuweisen. Besonders häufig dagegen waren Mucoraceen auf verschimmelten Maissilagen zu finden, was mit den Ergebnissen von Schneewis (2000) übereinstimmt. Aber auch in erwärmten Grassilagen war der relative Anteil dieser thermotoleranten Schimmelpilze auffällig hoch. Dieser Sachverhalt war in bisherigen Untersuchungen nicht zu beobachten.

*Monascus ruber* war verstärkt auf Grassilagen zu finden; diese Beobachtung bestätigt die Ergebnisse von Gedek (1981), Nout et al. (1993), Auerbach (1996) und Schneewis (2000).

Die im Zentrum der vorliegenden Untersuchungen stehende Art *A. fumigatus* wurde häufiger nachgewiesen als in früheren Untersuchungen. Aus 15,6 % des gesamten Probenmaterials konnte diese Spezies isoliert werden. Besonders häufig war *A. fumigatus* in erwärmten (24,4 %) und verpilzten Maissilagen (32,4 %) zu finden. Der große Anteil sensorisch veränderter Silagen an der Gesamtprobenzahl könnte eine Erklärung für die erhöhte Prävalenz des Schimmelpilzes darstellen.

Ein direkter Zusammenhang mit hohen Hefekeimzahlen konnte zwar nicht ermittelt werden, allerdings werden Hefen als Hauptverursacher der sogenannten Nacherwärmung beschrieben und diese könnte *A. fumigatus* aufgrund seiner thermophilen Eigenschaften zu verstärkter Konkurrenzfähigkeit verhelfen. Zudem können auch klimatische Einflüsse als mögliche Ursache der veränderten Schimmelpilzflora in Betracht gezogen werden.

Das häufige Vorkommen der genannten Pilzarten dürfte vor allem mit ihrer hohen Tenazität gegenüber niedrigen pH-Werten und Sauerstoffpartialdrücken sowie hohen Kohlendioxidgehalten zu erklären sein. Aus veterinär- und humanmedizinischer Sicht ist ihr

Vorkommen in Silagen differenziert zu betrachten. Dabei spielt einerseits die Einschätzung ihres infektiösen und Allergie induzierenden Potentials eine Rolle (Ferry und Abedi, 1983; Latgé, 2001), andererseits die toxikologische Bewertung der von ihnen produzierten Verbindungen.

*P. roqueforti* ist nicht als Erreger von Mykosen bekannt, bestimmte Stämme dieser Pilzspezies werden sogar zur Herstellung von Blauschimmelkäsen verwendet. Vergleichbares gilt für *Monascus ruber*. Infektionen bei Mensch und Tier wurden bisher nicht beschrieben, vielmehr werden auch hier bestimmte Stämme zur Herstellung fermentierter Lebensmittel, vor allem von rotem Reis in China, eingesetzt. Aufgrund dieser Situation ist davon auszugehen, dass Infektionen durch diese beiden Pilzspezies – wenn überhaupt – ein äußerst seltenes Ereignis darstellen.

Anders stellt sich die Situation bei Mucoraceen und Aspergillen, v.a. *A. fumigatus* dar. Diese Schimmelpilze sind Problemkeime in der Humanmedizin wie auch in der Veterinärmedizin. Mucoraceen verursachen in seltenen Fällen systemische Erkrankungen, welche nicht selten tödlich verlaufen (Abedi et al., 1984). Vor allem aber ist *A. fumigatus* bekannt dafür, dass er bei Mensch und Tier (Vögel, Rind, Pferd, Hund, Delphine) schwere Systemmykosen auslösen kann (Bauer et al., 1989; Breitner et al., 1990; Podstatzky et al., 1999; Bleul et al., 2002; Eggimann et al., 2006). Auch wenn dies bei Säugern im Gegensatz zu Vögeln (in der Geflügelmast war die Aspergillose eine der häufigsten Todesursachen) eher selten vorkommt, stellen mit *A. fumigatus* kontaminierte Silagen grundsätzlich ein infektiöses Risiko für Tierbestände und Landwirte dar. So sind durch *A. fumigatus* ausgelöste Mastitiden bei der Kuh oder Darmulzera beim Kalb in der Praxis durchaus bekannt (Bauer et al., 1989; Breitner et al., 1990; Podstatzky et al., 1999; Bleul et al., 2002). Auch beim Menschen spielt zudem der Immunstatus eine wesentliche Rolle; immunsupprimierte Personen (z.B. nach Organtransplantationen) sind besonders gefährdet (Eggimann et al., 2006).

Darüber hinaus können Schimmelpilze allergen wirken und auf diese Weise Symptome von Asthma oder Heuschnupfen auslösen. *A. fumigatus* scheint dafür besonders prädestiniert zu sein (Latgé, 1999; Latgé, 2001).

Die Pathogenität von *A. fumigatus* verbunden mit dem häufigen Nachweis in verschimmelten Gras- (21,9 %) und vor allem Maissilagen (32,4 %) sowie die teilweise sehr hohen Keimzahlen von bis zu  $5 \times 10^8$  KBE/g Futtermittel belegen dessen Bedeutung hinsichtlich gesundheitlicher Risiken in der Landwirtschaft. Die Exposition mit hohen *A. fumigatus*-Keimzahlen sollte daher vermieden und schimmelige Stellen in Silagen rasch entsorgt werden. Aus Sicht des Arbeitsschutzes sind entsprechende Vorsichtsmaßnahmen, wie beispielsweise das Tragen eines Mundschutzes, bei der Beseitigung von Schimmelnestern anzuraten.



Das Hauptaugenmerk bei der Silagebereitung gilt daher der Prävention. Durch hohe Standards bei der Silierpraxis kann ein Verderb von Silage durch Schimmelpilze wie *A. fumigatus* vermindert werden. Die Behandlung gefährdeter Silagen mit geeigneten Silierhilfen ist zu empfehlen.

#### *Mykotoxikologische Befunde*

Eine Beurteilung der Bedeutung der mykotoxikologischen Ergebnisse ist aufgrund der wenigen toxikologischen Daten, speziell für Wiederkäuer, nur begrenzt möglich. Im Folgenden soll eine erste Abschätzung aufgezeigt werden.

Bei der Einordnung der Daten fällt zunächst auf, dass in den als „normal“ eingestuften Proben nur selten die untersuchten pilzlichen Stoffwechselprodukte nachzuweisen waren. Dies zeigt die große Bedeutung der sensorischen Beurteilung von Silagen durch den Landwirt. Erwärmte und insbesondere verpilzte Proben wiesen erwartungsgemäß häufiger toxische Schimmelpilzmetaboliten und diese in höheren Konzentrationen auf als unauffälliges Probenmaterial. Vergleicht man die Befunde in Gras- und Maissilagen, so wird deutlich, dass die Stoffwechselprodukte fast durchwegs in Maissilage stärker produziert wurden als in Grassilage. Dieser Unterschied war für mehrere Substanzen signifikant.

Dies könnte einerseits analytisch bedingt sein, da Grassilage die stärkeren Matrixeffekte verursacht und daher erhöhte Nachweisgrenzen bedingt; enthaltene Stoffwechselprodukte wurden möglicherweise nicht erkannt. Andererseits stellt Maissilage vermutlich ein besseres Medium für das Wachstum von Schimmelpilzen und die Produktion von sekundären Stoffwechselmetaboliten dar als Grassilage, vor allem aufgrund der reichlich vorhandenen Stärke.

In den untersuchten Silagen wurden neben *A. fumigatus*-Metaboliten auch Roquefortin C und Mykopenolsäure nachgewiesen, welche von *Penicillium* spp. gebildet werden, und Monacolin K, welches von verschiedenen Schimmelpilzen wie *Monascus ruber* produziert wird. Das Vorkommen dieser Substanzen in Silagen ist bereits bekannt (Armbruster, 1994; Schneweis et al., 2000; Schneweis et al., 2001) und deren Wirkung auf Wiederkäuer zumindest teilweise untersucht.

**Roquefortin C** wurde in der vorliegenden Untersuchung vorwiegend in verpilztem Probenmaterial nachgewiesen. Verschimmelte Grassilagen (41,9%) waren seltener betroffen als Maissilagen (71,3%). Die ermittelten Konzentrationen erreichten dabei Werte bis zu 12,9 mg/kg. Vergleicht man die Ergebnisse mit den Untersuchungen anderer Autoren (Armbruster, 1994; Auerbach et al., 1998; Driehuis et al., 2008), so zeigt sich, dass die festgestellten Maximalkonzentrationen in ähnlichen Bereichen liegen. Vermutlich führte das sensitivere Analyseverfahren dazu, dass Roquefortin C in der aktuellen Untersuchung häufiger als in älteren Studien nachgewiesen werden konnte. In Fütterungsversuchen mit Schafen konnte bereits gezeigt werden, dass selbst die Aufnahme großer Mengen (25 mg/kg Lebendgewicht) an Roquefortin C zu keinen gesundheitlichen Beeinträchtigungen beim

Wiederkäuer führt (Tüller et al., 1998), allerdings wurde eine Absenkung des pH-Werts der Pansenflüssigkeit beobachtet.

In 50,5% der verpilzten Gras- und 63,0% der Maissilagen konnte **Mykophenolsäure** nachgewiesen werden. Die höchste Konzentration von 21,4 mg/kg wurde in einer Grassilage gemessen. Der Wert ist vergleichbar mit den Ergebnissen früherer Arbeiten (Schneweis et al., 2001; Driehuis et al., 2008). Mykophenolsäure weist eine relativ geringe akute Toxizität auf und zeigt keine hepatotoxische, nephrotoxische oder neurotoxische Wirkung (Sievers et al., 1997). Nach oraler Verabreichung von 300 mg Mykophenolsäure/Tag über 44 Tage hinweg konnte bei Schafen keine Beeinträchtigung des Allgemeinzustands festgestellt werden (Mohr et al., 2007). Allerdings ist Mykophenolsäure ein hochwirksames Immunsuppressivum (Fulton und Markham, 1996), so konnten bei den behandelten Schafen immunmodulatorische Wirkungen beobachtet werden (Dzidic et al., 2004; Baum et al., 2005; Dzidic et al., 2006).

**Monacolin K** wurde in 29,5% der verpilzten Gras- und 14,8% der Maissilagen nachgewiesen. Die maximale Konzentration von 54,6 mg/kg wurde in einer verschimmelten Maissilage gemessen. Ähnliche Beobachtungen wurden auch von Schneweis et al. (2001) gemacht, hier war Monacolin K in 20% der vorselektierten Gras- und Maissilagen nachweisbar, der Höchstgehalt betrug 65,4 mg/kg. Die Bedeutung von Monacolin K in Silagen für das landwirtschaftliche Nutztier ist bislang unklar. Für die Säureform der Verbindung, Monacolin K<sub>A</sub>, wurde eine Hemmung der 3-Hydroxymethylglutaryl-Coenzym-A-Reduktase, ein Schlüsselenzym der Mevalonatsynthese, nachgewiesen (Endo, 1980). Da die Lactonform Monacolin K<sub>L</sub> im Organismus zur Säureform umgewandelt wird, sind beide als äquivalent zu betrachten. Monacolin K wird in der Humanmedizin als Cholesterinsynthesehemmer therapeutisch angewendet. Cholesterin stellt wiederum eine Vorläufersubstanz der Steroidsynthese dar. Da Wiederkäuer Cholesterin nicht mit der Nahrung aufnehmen, kann die Hemmung der Synthese zu einem Absinken des Cholesterinspiegels führen, was letztendlich zu reproduktionsbiologischen Problemen führen könnte. So konnte in epidemiologischen Untersuchungen gezeigt werden, dass eine niedrige Cholesterinkonzentration im Blut mit einer schlechten Herdenfruchtbarkeit korreliert (Burke et al., 2001). Darüber hinaus hemmt Monacolin K<sub>A</sub> das Wachstum vieler Pilze. Darunter fallen auch anaerobe Pansenpilze wie z.B. *Neocallimastix* sp., welche am Abbau der Rohfaser im Pansen beteiligt sind (Orpin und Joblin, 1997). Der Zusammenhang zwischen Rohfaserverwertung und Stoffwechselleistung der Pansenpilze sowie deren mögliche Beeinflussung durch Monacolin K wurde diskutiert (Bauer und Meyer, 2006).

Im Gegensatz zu diesen Verbindungen sind die Wirkungen von *A. fumigatus*-Metaboliten auf den Wiederkäuer relativ unbekannt. Sie werden im Folgenden anhand ihrer bisher beschriebenen primären Wirksamkeiten diskutiert:

Zu den **neurotoxischen** Verbindungen gehören die Vertreter der **Fumitremorgen-Verruculogen-Gruppe** (vgl. Kapitel B 3.3.3). Im untersuchten Probenmaterial konnten neben Verruculogen und TR-2 Toxin auch die Fumitremorgene B und C nachgewiesen werden. Die maximalen Konzentrationen der Substanzen betragen 604, 685, 2080 bzw. 2020 µg/kg Frischmasse (FM), das entspricht 1812, 2055, 6240 bzw. 6060 µg/kg Trockenmasse (TM) der jeweiligen Silagen. Verruculogen wurde in Grassilagen häufiger nachgewiesen als die anderen Vertreter dieser Gruppe. Diese Beobachtung könnte mit der möglichen Bildung der Verbindung durch Schimmelpilzarten der Gattung *Penicillium* im Zusammenhang stehen (Cole und Cox, 1981).

Die Vertreter der Fumitremorgen-Verruculogen-Gruppe wurden bereits mit dem Auftreten neuronaler Störungen in Rinderherden in Verbindung gebracht (Cole et al., 1977a; Dorner et al., 1984). Die LD<sub>50</sub> bei oraler Applikation wurde 50-fach höher gegenüber intraperitonealer Verabreichung angegeben (Cole et al., 1972), die ED<sub>50</sub> (i. p.) von Verruculogen bei Mäusen lag bei 0,39 mg/kg (Weiser, 1990). Eine Aufnahme von 25 kg der am höchsten kontaminierten Maissilage durch eine Kuh von 700 kg Lebendgewicht entspräche aber lediglich einer oral verabreichten Konzentration von 0,2 mg/kg. Neurologische Beeinträchtigungen von Wiederkäuern allein durch die Aufnahme neurotoxischer *A. fumigatus*-Verbindungen sind daher eher unwahrscheinlich.

**Gliotoxin** wurde in insgesamt 45 Silagen nachgewiesen. Meist handelte es sich um als verpilzt eingestufte Gras- (n = 17) oder Maissilagen (n = 15). In einer verschimmelten Maissilage konnten 513 µg/kg FM (1546 µg/kg TM) der Substanz gemessen werden.

Gliotoxin besitzt neben antimyzetischen, zytotoxischen, apoptotischen und immunsuppressiven Eigenschaften (vgl. Kapitel B 3.3.1) eine starke antibakterielle Wirksamkeit (Müllbacher und Eichner, 1984; Braithwaite et al., 1987; Upperman et al., 2003; Li et al., 2006). *In vivo* Untersuchungen zur Beeinflussung der Pansenfunktion durch Gliotoxin liegen nicht vor, in einer *in vitro* Studie wurde allerdings die Reduktion des Trockenmasseabbaus bei einer Konzentration von 80 µg Gliotoxin/ml Pansenflüssigkeit festgestellt (Morgavi et al., 2004). Die in den untersuchten Silagen nachgewiesenen Mengen der Verbindung reichen nicht annähernd aus, um diese Konzentration im Pansen zu erreichen. Daher ist eine Beeinträchtigung der Pansenfunktion durch Gliotoxin nicht zu erwarten.

Die Bedeutung der Verbindung für die Entwicklung und Etablierung von *A. fumigatus*-Infektionen beim Rind wurde bereits diskutiert (Bauer et al., 1989). So wurde Gliotoxin im infizierten Eutergewebe, Sera von Aspergillose-Patienten und aviären Organen nachgewiesen (Bauer et al., 1989; Richard et al., 1996; Lewis et al., 2005a) und als äußerst wichtiger Virulenzfaktor von *Aspergillus fumigatus* beschrieben (Sutton et al., 1994; Sutton et al., 1996; Stanzani et al., 2005). Die immunsuppressiven Eigenschaften basieren auf der Hemmung der zellulären Immunantwort. Hier wird die Funktion phagozytischer Zellen beeinträchtigt, welche insbesondere im Darm eine wichtige Abwehrfunktion besitzen. Da

Gliotoxin, eigenen orientierenden *in vitro* Untersuchungen zur Folge, im Pansen vermutlich nicht abgebaut wird, könnte es bis zu diesen Immunzellen gelangen. Eine Schwächung der zellulären Abwehr durch die orale Aufnahme von Gliotoxin mit der Silage ist somit nicht auszuschließen.

In 204 der untersuchten Silageproben wurde die Verbindung **Trypacidin** nachgewiesen. Die maximale Konzentration von 13,2 mg/kg wurde in einer „erwärmten“ Grassilage gemessen. Die antiprotozoische Wirksamkeit von Trypacidin gegen *Trypanosoma cruzi* ist bereits seit langer Zeit bekannt (Gutteridge et al., 1969). Ab einer Konzentration von 3 µg/ml beobachteten die Autoren eine Wachstumshemmung von extrazellulären Trypanosomen, über 10 µg/ml wurde das Absterben der Protozoen nachgewiesen. Protozoen stellen einen nicht unwesentlichen Bestandteil der normalen Pansenflora dar und sind in der Lage, leicht abbaubare Kohlenhydrate zu resorbieren und somit eventuell zu einer Stabilisierung des Pansenmilieus bei hohen Kraftfuttermengen beizutragen. Darüber hinaus besitzen sie die Fähigkeit, schädliche Futterbestandteile zu binden. Die Aufnahme von 25 kg des erwärmten Futters durch eine Kuh mit 100 Litern Pansenflüssigkeitsvolumen hätte rechnerisch eine Konzentration von 3,3 µg/ml zur Folge. Die Möglichkeit einer Beeinträchtigung der Pansenfunktion hochleistender Kühe durch die Aufnahme von Trypacidin mit dem Futter kann somit nicht ausgeschlossen werden.

**Fumigaclavin C** wurde in 38 Gras- und 71 Maissilagen nachgewiesen. „Erwärmte“ Maissilage enthielt zu 21,8%, „verpilzte“ zu 46,3% diese Verbindung. Die maximale Konzentration von 18,8 mg/kg wurde in einer verschimmelten Maissilage gemessen. Fumigaclavin C wurde im Zusammenhang mit dem Krankheitsgeschehen in einer Rinderherde entdeckt (Cole et al., 1977a). Darüber hinaus zeigten neuere Untersuchungen, dass durch den Einfluss von Fumigaclavin C die Th1-Zytokinproduktion sowie die Aktivität der Matrix Metalloproteinase gehemmt werden und einer künstlich induzierten Darmentzündung bei Mäusen entgegengewirkt werden kann (Zhao et al., 2004; Wu et al., 2005). Die Effekte wurden ab einer Konzentration von 5 mg/kg (i.p.) beobachtet (Wu et al., 2005). Um diese Konzentration (oral) zu erreichen, müsste eine 700 kg schwere Kuh 186 kg der am höchsten kontaminierten Silage aufnehmen. Die beschriebenen Wirkungen von Fumigaclavin C sind daher beim Rind durch die Aufnahme von verschimmeltem Futter nicht zu erwarten. Ein Einfluss auf das Immunsystem von Wiederkäuern durch die Aufnahme großer Mengen an Fumigaclavin C mit dem Futter wäre jedoch zu prüfen. Es sei außerdem darauf hingewiesen, dass aufgrund der ähnlichen Struktur zu verschiedenen gefäßverengenden und wehenfördernden Mutterkornalkaloiden wie Ergometrin neben Fumigaclavin C auch andere *A. fumigatus*-Metaboliten wie **Fumigaclavin A, B** oder **Festuclavin** im Verdacht stehen, ebenfalls diese Wirkungen hervorzurufen (Cole und Cox, 1981).

Die Verbindung **Fumagillin** wurde in 27 Silagen, vorwiegend in verschimmelten Maissilagen (n = 17) nachgewiesen. Es wurde eine Höchstmenge von 1740 µg/kg festgestellt. Fumagillin ist bereits seit 1949 bekannt und fand als therapeutisches Mittel zur Bekämpfung von *Entamoeba histolytica* und *Nosema apis* in Bienenvölkern Verwendung. Die Substanz verlor aufgrund zahlreicher Nebenwirkungen zunächst an Interesse, wurde aber inzwischen wiederentdeckt (Ingber et al., 1990). Das gesteigerte Interesse der Krebsforschung an dieser Verbindung beruht auf deren antiangiogenetischen Eigenschaften. Weiterhin wurde gezeigt, dass Fumagillin die Nidation der Eizelle verhindern kann (Lalitikumar et al., 2000). Die einmalige intravaginale Verabreichung von 2 mg führte zur teilweisen Verhinderung der Blastocystenimplantation und Aufrechterhaltung einer Schwangerschaft. Das Gewicht der Versuchstiere wurde dabei nicht beschrieben. Wird von 5 kg Körpergewicht der Rhesusaffen ausgegangen, entspricht dies einer Dosis von 0,4 mg/kg. Die Aufnahme von 15 kg der höchstkontaminierten Silage (1,7 mg/kg) durch ein 350 kg schweres Jungvieh entspräche einer Konzentration 0,07 mg/kg bei oraler Aufnahme. Ob Fumagillin in Silagen neben anderen Xenobiotika für die Fruchtbarkeit von Milchkühen von Bedeutung sein kann, bleibt zu prüfen.

Die Gruppe der **Fumiquinazoline** ist bislang weitgehend unerforscht. Über die biologische Aktivität ist wenig bekannt. Eine schwache zytotoxische Wirksamkeit wurde beobachtet, jedoch nur an murinen Leukämiezellen (P-388) (Numata et al., 1992; Takahashi et al., 1995). Weitere Fumiquinazoline zeigten in einer jüngeren Untersuchung auch antimyzetische Eigenschaften (Snider und Zeng, 2003). Fumiquinazolin D wurde in teilweise hohen Konzentrationen, bis zu 10 mg/kg FM, im Probenmaterial nachgewiesen. Um mögliche Wirkungen auf den Wiederkäuer abschätzen zu können, bedarf es weiterer Untersuchungen, welche sich mit den biologischen Eigenschaften dieser Stoffgruppe befassen.

Für die **Sphingofungine** wurde ebenfalls eine antimyzetische Wirksamkeit berichtet (VanMiddlesworth et al., 1992). Sphingofungin A wurde vorwiegend in verschimmelten Silagen nachgewiesen, insgesamt jedoch in nur ca. 1 % des Probenmaterials. Ein Grund hierfür könnte eine relativ hohe Nachweisgrenze für diesen Stoffwechselmetaboliten sein. Andererseits wurde berichtet, dass auch in Kultur nur wenig dieser Substanz gebildet wurde (VanMiddlesworth et al., 1992). Eine Beeinträchtigung der Vormagenverdauung ist hinsichtlich der antimyzetischen Wirkung und der bereits erwähnten Zusammenhänge mit dem Verdau von Rohfaser denkbar, jedoch aufgrund des seltenen und gering konzentrierten Vorkommens in Silagen eher unwahrscheinlich.

Von *A. fumigatus* gebildete **Tryptoquivaline** gelten aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit zu anderen Vertretern dieser Stoffgruppe von *A. clavatus* (Clardy et al., 1975) als potentiell tremorgen (Springer, 1979). Für Tryptoquivaline von *A. clavatus* wurde die tremorgene Wirksamkeit nachgewiesen. Vertreter der Stoffgruppe waren nur selten im untersuchten

Probenmaterial detektierbar, mit Ausnahme der Tryptoquivaline F und I, welche vor allem in verpilzten Maissilagen zu finden waren. Diese Tryptoquivaline konnten nicht quantifiziert werden, jedoch waren die ermittelten Signale, verglichen mit denen anderer Stoffwechselmetaboliten, relativ groß. Das kann zum einen eine sehr gute Ionisierbarkeit der Substanz bedeuten, zum anderen hohe Konzentrationen im Ausgangsmaterial. Weitere Untersuchungen wären zur Klärung des Sachverhalts angebracht.

Da keine weiteren Daten zu den biologischen Wirksamkeiten dieser Stoffgruppe verfügbar sind, ist die mögliche Beeinträchtigung von Wiederkäuern durch Aufnahme tryptoquivalinhaltiger Silagen weitgehend unbekannt.

Die toxikologische Einschätzung der Einzelsubstanzen spiegelt nur sehr bedingt die Realität wider. Die Auswertung der Daten zeigt, dass vor allem in erwärmten und verpilzten Proben mit dem Vorkommen einer großen Anzahl verschiedener Pilzstoffwechselprodukte, in vorliegender Arbeit bis zu 27, gerechnet werden kann (vgl. Abbildung 49). Wie diese Gemische an Wirkstoffen die Gesundheit von Wiederkäuern beeinflussen ist aufgrund des derzeitigen Wissensstands nicht zu beurteilen. Da aber kaum mit gesundheitsförderlichen Effekten zu rechnen ist, sollte in der landwirtschaftlichen Praxis größte Sorgfalt auf die Verhinderung des Wachstums von Schimmelpilzen in der Silage gelegt werden.

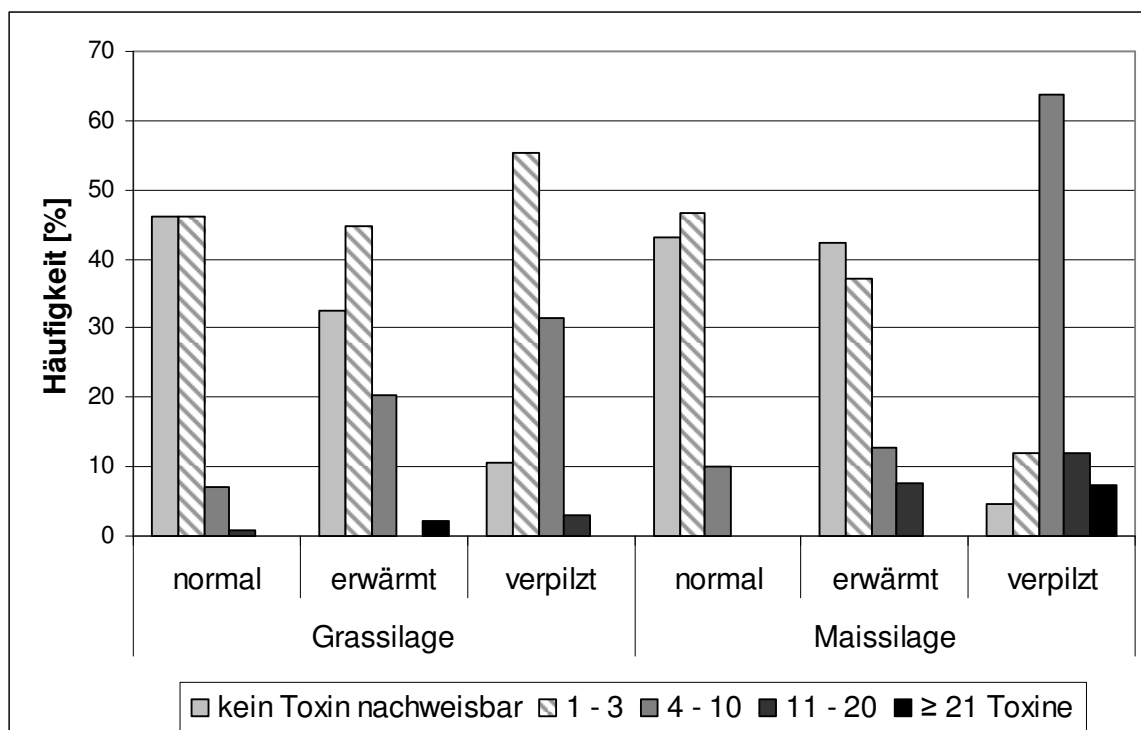


Abbildung 49: Relative Häufigkeiten des gleichzeitigen Nachweises mehrerer Stoffwechselmetaboliten von Schimmelpilzen in Gras- und Maissilagen unterschiedlicher Qualitäten

### Vergleich der mykologischen und mykotoxikologischen Befunde

Der Vergleich der mykologischen und mykotoxikologischen Befunde führte zu teilweise signifikanten Korrelationen. Besonders hervorzuheben sind die engen Zusammenhänge zwischen den Mykotoxinen Gliotoxin und Fumiquinazolin A/B und dem Nachweis von *A. fumigatus* ( $r = 0,86$  und  $0,81$ ). Andere *A. fumigatus*-Toxine korrelierten schwächer mit der kulturellen Nachweisbarkeit des Schimmelpilzes. So beispielsweise die Tremorgene Verruculogen, Fumitremorgen B und TR-2 Toxin ( $r = 0,03, 0,08, 0,14$ ), wie auch Pseurotin A mit einem  $r$ -Wert von  $0,17$ . Da diese Verbindungen auch nicht mit dem Vorkommen anderer anzüchtbarer Schimmelpilze korrelierten, liegt die Vermutung einer Produktion durch endophytische Organismen vor der Ernte und Silierung nahe. Andererseits könnte auch ein mikrobieller Abbau der Verbindungen durch andere Mikroorganismen während der Fermentationsphase eine Begründung darstellen.

Tabelle 29: Korrelationen zwischen Mykotoxinkonzentrationen und Keimzahlen von Schimmelpilzen in Silagen

	Korrelationen zwischen	Keimgehalt [KBE/g]		
		<i>A. fumigatus</i>	<i>P. roqueforti</i>	<i>M. ruber</i>
Mykotoxingehalt [ng/g bzw. Peakfläche]	Gliotoxin	0.86		
	Trypacidin	0.20		
	Fumagillin	0.35		
	Verruculogen	0.03		
	Fumitremorgen B	0.08		
	Fumitremorgen C	0.21		
	TR-2 Toxin	0.14		
	Fumigaclavin C	0.42		
	Fumiquinazolin D	0.47		
	Pyripyropen A	0.43		
	Pseurotin A	0.17		
	Sphingofungin A	0.73		
	Sphingofungin D	0.77		
	Synerazol	0.38		
	Tryprostatin B	0.50		
	Tryptoquivalin F/J	0.26		
	Festuclavin	0.43	0.18	
	Fumiquinazolin A/B	0.81		
	Fumiquinazolin C	0.50		
	Fumiquinazolin E	0.30		
	Fumiquinazolin F/G	0.80		
	Helvolsäure	0.56		
	Mykophenolsäure	-0.01	0.17	
	Roquefortin	0.01	0.46	
	Monacolin K	-0.01	-0.03	0.45

Hervorzuheben ist, dass der Nachweis von Mykotoxinen artfremden Ursprungs nicht mit der Nachweisbarkeit von *A. fumigatus* korrelierte. Dies deutet darauf hin, dass das gleichzeitige Vorkommen von *Aspergillus fumigatus* und anderen Schimmelpilzspezies in als verpilzt eingestuften Bereichen nicht die Regel ist. Das Vorkommen von Roquefortin C korrelierte enger mit dem Nachweis von *P. roqueforti* als dies für Mykophenolsäure der Fall war ( $r = 0,46$  und  $0,17$ ). Auffällig ist darüber hinaus eine mögliche Korrelation der Nachweise von Festuclavin und *P. roqueforti*. Dies könnte bedeuten, dass *P. roqueforti*, für den das Bildungsvermögen von Festuclavin bereits beschrieben wurde (Moussa, 2003), einen wichtigen Produzenten der Verbindung in Silage darstellt.

*Monascus ruber* ist eine biologische Quelle von Monacolin K. Schneewis (2000) ermittelte die Korrelationskoeffizienten  $r = 0,16$  bzw.  $r = 0,25$  für den Nachweis von Mykophenolsäure und *P. roqueforti* bzw. Monacolin K und *M. ruber*. Auch in dieser Untersuchung korrelierten letztere nachweisbar ( $r = 0,45$ ).

Gründe, welche höheren Korrelationskoeffizienten entgegenstehen, sind einerseits im begrenzten mykologischen Nachweisverfahren zu sehen. Nicht mehr keimfähige Einheiten von Mikroorganismen können mittels kulturellem Nachweisverfahren nicht nachgewiesen werden, deren sekundäre Stoffwechselprodukte aber durchaus noch im Probenmaterial vorhanden sein. Andererseits produzieren nicht alle Stämme einer Schimmelpilzspezies im gleichen Maße Mykotoxine.

Zusammenfassend wird festgestellt, dass eine mykologische Untersuchung durchaus Anhaltspunkte für eine mögliche Kontamination von Gärfuttermitteln mit Mykotoxinen oder anderen unerwünschten sekundären Stoffwechselprodukten liefern kann. So wurden in Probenmaterialien, welche sehr hohe Schimmelpilzkeimgehalte aufwiesen, auch am häufigsten Schimmelpilzmetaboliten nachgewiesen. Die Aussage der Beratung, verschimmelte Silage zu entsorgen, kann somit bekräftigt werden. Allerdings wurden auch in unauffälligem und besonders in erwärmtem Probenmaterial teilweise hohe Mykotoxinkonzentrationen detektiert. Die Einschätzung der mykotoxikologischen Gefährdung kann daher nur auf Basis des direkten Nachweises der Verbindungen in Futtermitteln erfolgen.



## F Zusammenfassung

*Aspergillus fumigatus* gehört neben *Monascus ruber* und *Penicillium roqueforti* zu den am häufigsten nachweisbaren Schimmelpilzen in Silagen. Um genauere Kenntnis über die Bedeutung von *A. fumigatus* in Silagen zu erlangen, wurden 584 Gras- und Maissilageproben unterschiedlicher sensorischer Qualitäten einer mykologischen und mykotoxikologischen Analyse unterzogen. Mit Hilfe eines neu entwickelten HPLC-MS/MS-Nachweisverfahrens wurde das Probenmaterial auf das Vorkommen von 34 *A. fumigatus*-Stoffwechselprodukten untersucht; darüber hinaus auf die bekannten Silagetoxine Roquefortin C, Mykophenolsäure und Monacolin K. Da nur wenige Stoffwechselprodukte von *A. fumigatus* als Standardsubstanzen verfügbar waren, wurden zunächst sieben Verbindungen in für Quantifizierung und Standardisierung ausreichenden Mengen aus kulturellen Ansätzen isoliert. Der Nachweis von 23 weiteren Stoffwechselmetaboliten (Deacetyl-Fumigaclavin C, Demethoxy-FTC, Dihydroxy-FTC, Festuclavin, Fumigaclavin A, Fumiquinazolin A - C, Fumiquinazolin E - G, Helvolsäure, Pseurotin A, Sphingofungin A und D, Synerazol, Tryprostatin B, Tryptoquivalin D - G, I und N) erfolgte anhand massenspektrometrischer und chromatographischer Kriterien qualitativ.

Hierbei wurden folgende Resultate erzielt:

Die mykologische Untersuchung zeigte deutliche Unterschiede der Keimzahlen von sensorisch unauffälligem Probenmaterial verglichen mit erwärmten oder verpilzten Silagen.

*P. roqueforti* war die am häufigsten vorkommende Schimmelpilz-Spezies. Weitere dominante Schimmelpilze waren *A. fumigatus*, *M. ruber* sowie Vertreter der Familie der *Mucoraceae*. Eine Gefährdung der Gesundheit von Mensch und Tier durch die beobachteten hohen Keimbelastungen mit dem opportunistischen Pathogen *A. fumigatus* kann nicht ausgeschlossen werden.

Die Verbindungen Fumitremorgen B, TR-2 Toxin, Fumigaclavin C, Fumiquinazolin D, Pyripyropen A und Trypacidin traten im untersuchten Probenmaterial in teilweise hohen Konzentrationen auf (2080, 685, 18800, 9940, 3560 bzw. 13200 µg/kg FM). Außer Fumitremorgen A und Tryptoquivalin N konnten alle analysierten Stoffwechselmetaboliten im Probenmaterial detektiert werden.

*Aspergillus fumigatus*-Toxine und auch andere Mykotoxine wurden besonders häufig und in erhöhten Konzentrationen in erwärmten und verpilzten Gras-, vor allem aber in Maissilagen nachgewiesen. Dies deutet auf ein besonderes Gefährdungspotential bei der Verfütterung erwärmter und verpilzter Bereiche von Gärfuttermitteln hin.

Die erzielten Ergebnisse zeigen somit erneut, dass im Sinne des landwirtschaftlichen Unternehmens, des Tier- aber auch Verbraucherschutzes mit den zur Verfügung stehenden Mitteln eine hohe Silagequalität sichergestellt werden muss.

## G Summary

Beside *Monascus ruber* and *Penicillium roqueforti*, *Aspergillus fumigatus* belongs to the most prevalent moulds in silages. To get more information about the importance of *A. fumigatus* in silages, 584 grass and maize silage samples have been examined with mycological and mycotoxicological methods. The probes have been analysed for 34 *A. fumigatus*-metabolites by a novel developed HPLC-MS/MS method; moreover, for the common silage toxins roquefortine, mycophenolic acid and monacolin k. Since only few of the *A. fumigatus*-metabolites have been available as a reference substance, seven compounds have been isolated from cultures in a sufficient amount for quantification and standardisation. The detection of further 23 metabolites (deacetyl-fumigaclavine C, demethoxy-fumitremorgin C, dihydroxy-fumitremorgin C, festuclavine, fumigaclavine A, fumiquinazolines A - C, fumiquinazolines E - G, helvolic acid, pseurotin A, sphingofungins A und D, synerazol, tryprostatin B, tryptoquivalines D - G, I, N) was carried out by mass spectrometric and chromatographic criteria.

The following results have been obtained:

The mycological examination revealed significant differences between sensorically unremarkable and reheated or moulded probes, concerning the germ count. *P. roqueforti* has been the most common species. Further dominant species were *A. fumigatus*, *M. ruber* as well as members of the *Mucoraceae*-family. The regarded high germ counts of the opportunistic pathogen *A. fumigatus* could imply a thread for human and animal health.

Fumitremorgin B, TR-2 toxin, fumigaclavine C, fumiquinazoline D, pyripyropene A and trypacidin occurred partially in high concentrations (2080, 685, 18800, 9940, 3560, 13200 µg/kg fresh matter). Excepting fumitremorgin A and tryptoquivaline N all analysed compounds have been detected in the sample material.

In reheated and moulded grass and especially maize silages *A. fumigatus*- and other mycotoxins were found frequently and in heightened concentrations. These findings imply a special hazard for animal's health by feeding reheated and moulded silages.

Although the impact of the detected substances on the health of farm animals is widely unknown, the results show that a high quality of ensiling is essential also for a mycotoxicological immaculate staple diet.

## Literaturverzeichnis

- Abedi, E.; Sismanis, A.; Choi, K.; Pastore, P.*, 1984: Twenty-five years' experience treating cerebro-rhino-orbital mucormycosis. *Laryngoscope*, 94 (8), 1060-1062
- Adler, A.*, 2002: Qualität von Futtermitteln und mikrobielle Kontamination. In: 8. Alpenländisches Expertenforum, Bundesanstalt für alpenländische Landwirtschaft, Gumpenstein
- Adler, A.*, 1993: Untersuchungen zur mikrobiellen Qualität von Silagen. Bundesanstalt für Alpenländische Landwirtschaft Gumpenstein, 45-53
- Allen, J.D. und Schinkel, A.H.*, 2002: Multidrug resistance and pharmacological protection mediated by the breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2). *Mol. Cancer Ther.*, 1 (6), 427-434
- Amend, R.*, 1990: Anhäufung der Mykotoxine Patulin, Penicillinsäure, PR-Toxin und Mycophenolsäure durch Penicillien auf Maissilage und auf halbsynthetischem Medium. Dissertation, Universität Stuttgart-Hohenheim
- Amend, R. und Müller, H.M.*, 1984: Anhäufung von PR-Toxin und Mycophenolsäure durch Penicillien im YES-Medium und in Grünmaissilage. *Landw. Forsch. Kongr. band*, 606-614
- Amitani, R.; Taylor, G.; Elezis, E.N.; Llewellyn-Jones, C.; Mitchell, J.; Kuze, F.; Cole, P.J.; Wilson, R.*, 1995: Purification and characterization of factors produced by *Aspergillus fumigatus* which affect human ciliated respiratory epithelium. *Infect Immun.*, 63 (9), 3266-3271
- Ando, O.; Satake, H.; Nakajima, M.; Sato, A.; Nakamura, T.; Kinoshita, T.; Furuya, K.; Haneishi, T.*, 1991: Synerazol, a new antifungal antibiotic. *J Antibiot. (Tokyo)*, 44 (4), 382-389
- Armbruster, G.*, 1994: Futtermittelhygienische Untersuchungen von Silagen: Nachweis und Vorkommen des Mykotoxins Roquefortin. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München
- Asami, Y.; Kakeya, H.; Onose, R.; Yoshida, A.; Matsuzaki, H.; Osada, H.*, 2002: Azaspirene: a novel angiogenesis inhibitor containing a 1-oxa-7-azaspiro[4.4]non-2-ene-4,6-dione skeleton produced by the fungus *Neosartorya* sp. *Org. Lett.*, 4 (17), 2845-2848
- Assil, H.I. und Sporns, P.*, 1991: ELISA and HPLC methods for analysis of Fumagillin and its decomposition products in honey. *J. Agric. Food. Chem.*, 39, 2206-2213
- Auerbach, H.*, 1996: Verfahrensgrundlagen zur Senkung des Risikos eines Befalls von Silagen mit *Penicillium roqueforti* und einer Kontamination mit Mykotoxinen dieses Schimmelpilzes. Dissertation, Universität Stuttgart-Hohenheim
- Auerbach, H.; Oldenburg, E.; Weissbach, F.*, 1998: Incidence of *Penicillium roqueforti* and roquefortin C in silages. *J. Sci. Food Agric.*, 76, 565-572
- Balan, K.; Ebringer, M.; Nemeč, O.*, 1964: Trypacidin a new antiprotozoal antibiotic. *Naturwissenschaften*, 51 (9), 227

- Bauer, J. und Meyer, K., 2006: Stoffwechselprodukte von Pilzen in Silagen: Einflüsse auf die Gesundheit von Nutztieren. Übers. Tierernährg., 34, 27-55
- Bauer, J., 2004: Mikrobiologie der Silierung. In: 20. Hülseberger Gespräche, H. Wilhelm Schaumann Stiftung, Lübeck, 65-72
- Bauer, J.; Gareis, M.; Bott, A.; Gedek, B., 1989: Isolation of a mycotoxin (gliotoxin) from a bovine udder infected with *Aspergillus fumigatus*. J Med. Vet. Mycol., 27 (1), 45-50
- Bauer, J.; Schneeweis, I.; Hörmansdorfer, S., 2000: Pilze in Futtermitteln und Fäkalien: Pilze und deren Stoffwechselprodukte in Futtermitteln. In: Potentielle Schadorganismen und Stoffe in Futtermitteln sowie in tierischen Fäkalien, Wiley-VCH, Weinheim, 165-205
- Baum, B.; Mohr, A.; Pfaffl, M.; Bauer, J.; Hewicker-Trautwein, M., 2005: Morphological findings in lymphatic tissues of sheep following oral application of the immunosuppressive mycotoxin mycophenolic acid. Mycopathologia, 160 (2), 167-175
- Beecham, A.F.; Fridrichsons, J.; Mathieson, A.M., 1966: The structure and absolute configuration of gliotoxin and the absolute configuration of sporidesmin. Tetrahedron Lett., 27, 3131-3138
- Beffa, T.; Selldorf, P.; Gumowski, P.; Lott Fischer, J.; Georgen, E.; Gandolla, M.; Aragno, M., 1994: Anwesenheit, Verteilung und medizinische Aspekte von Schimmelpilzen (im besonderen von *Aspergillus fumigatus*) in verschiedenen Kompostsystemen der Schweiz. In: Gesundheitsrisiken bei der Entsorgung kommunaler Abfälle - Beiträge zu einem interdisziplinären Symposium, Göttingen, 173
- Belofsky, G.N.; Anguera, M.; Jensen, P.R.; Fenical, W.; Kock, M., 2000: Oxepinamides A-C and fumiquinazolines H-I: bioactive metabolites from a marine isolate of a fungus of the genus *Acremonium*. Chemistry, 6 (8), 1355-1360
- Bernardo, P.H.; Brasch, N.; Chai, C.L.; Waring, P., 2003: A novel redox mechanism for the glutathione-dependent reversible uptake of a fungal toxin in cells. J Biol. Chem., 278 (47), 46549-46555
- Bernardo, P.H.; Chai, C.L.; Deeble, G.J.; Liu, X.M.; Waring, P., 2001: Evidence for gliotoxin-glutathione conjugate adducts. Bioorg. Med. Chem. Lett., 11 (4), 483-485
- Bleul, U.; Pospischil, A.; Gerber, F.; Braun, U., 2002: Bronchopneumonie und Mastitis durch *Aspergillus fumigatus* bei einer Kuh. Tierärztl. Umschau, 57, 354-359
- Bloch, P.; Tamm, C.; Bollinger, P.; Petcher, T.J.; Weber, H.P., 1976: Pseurotin, a new metabolite of *Pseudeurotium ovalis* Stolk having an unusual hetero-spirocyclic system. Helv. Chim. Acta, 59 (1), 133-137
- Bok, J.W.; Chung, D.; Balajee, S.A.; Marr, K.A.; Andes, D.; Nielsen, K.F.; Frisvad, J.C.; Kirby, K.A.; Keller, N.P., 2006: GliZ, a transcriptional regulator of gliotoxin biosynthesis, contributes to *Aspergillus fumigatus* virulence. Infect Immun., 74 (12), 6761-6768
- Boudra, H. und Morgavi, D.P., 2005: Mycotoxin risk evaluation in feeds contaminated by *Aspergillus fumigatus*. Animal Feed Science and Technology, 120, 113-123
- Brackett, J.M.; Arguello, M.D.; Schaar, J.C., 1988: Determination of fumagillin by high-performance liquid chromatography. J. Agric. Food. Chem., 36, 762-764

- Braithwaite, A.W.; Eichner, R.D.; Waring, P.; Mullbacher, A., 1987: The immunomodulating agent gliotoxin causes genomic DNA fragmentation. *Mol. Immunol.*, 24 (1), 47-55
- Breitner, W.; Bauer, J.; Laging, Cl., 1990: Aspergillose des Verdauungstraktes bei einem Kalb. *Tierärztl. Umschau*, 45, 178-183
- Brewer, D.; Hannah, D.E.; Rahman, R.; Taylor, A., 1967: The growth of *Bacillus subtilis* in media containing chetomin, sporidesmin, and gliotoxin. *Can. J Microbiol*, 13 (11), 1451-1460
- Büchi, G.; Luk, K.C.; Kobbe, B.; Townsend, J.M., 1977: Four new mycotoxins of *Aspergillus clavatus* related to tryptoquivaline. *J Org. Chem.*, 42 (2), 244-246
- Bünger, J.; Westphal, G.; Monnich, A.; Hinnendahl, B.; Hallier, E.; Müller, M., 2004: Cytotoxicity of occupationally and environmentally relevant mycotoxins. *Toxicology*, 202 (3), 199-211
- Burke, J.M.; Rorie, R.W.; Piper, E.L.; Jackson, W.G., 2001: Reproductive responses to grazing endophyte-infected tall fescue by postpartum beef cows. *Theriogenology*, 56 (2), 357-369
- Chain, E.; Florey, H.W.; Jennings, M.A.; Williams, T.I., 1943: Helvolic acid, an antibiotic produced by *Aspergillus fumigatus*, mut. *helvola* Yuill. *Br. J. Exp. Pathol.*, 24, 108-119
- Clardy, J.; Springer, J.P.; Büchi, G.; Matsuo, K.; Wightman, R., 1975: Tryptoquivaline and tryptoquivalone, two tremorgenic metabolites of *Aspergillus clavatus*. *J Am. Chem. Soc.*, 97 (3), 663-665
- Cole, R.J. und Cox, R.H., 1981: Handbook of toxic fungal metabolites. Academic Press, Inc., New York, 0-12-179760-0
- Cole, R.J.; Jarvis, B.B.; Schweikert, M.A., 2003: Handbook of secondary fungal metabolites. Academic Press, San Diego, 0-12-179463-6
- Cole, R.J. und Kirksey, J.W., 1973: The mycotoxin verruculogen: a 6-O-methylindole. *J Agric Food Chem.*, 21 (5), 927-929
- Cole, R.J.; Kirksey, J.W.; Cox, R.H.; Clardy, J., 1975: Structure of the tremor-producing indole, TR-2. *J Agric Food Chem.*, 23 (5), 1015-1018
- Cole, R.J.; Kirksey, J.W.; Dorner, J.W.; Wilson, D.M.; Johnson, J., Jr.; Bedell, D.; Springer, J.P.; Chexal, K.K.; Clardy, J.; Cox, R.H., 1977a: Mycotoxins produced by *Aspergillus fumigatus* isolated from silage. *Ann. Nutr Aliment.*, 31 (4-6), 685-691
- Cole, R.J.; Kirksey, J.W.; Dorner, J.W.; Wilson, D.M.; Johnson, J.C., Jr.; Johnson, A.N.; Bedell, D.M.; Springer, J.P.; Chexal, K.K.; Clardy, J.C.; Cox, R.H., 1977b: Mycotoxins produced by *Aspergillus fumigatus* species isolated from molded silage. *J Agric Food Chem.*, 25 (4), 826-830
- Cole, R.J.; Kirksey, J.W.; Moore, J.H.; Blankenship, B.R.; Diener, U.L.; Davis, N.D., 1972: Tremorgenic toxin from *Penicillium verruculosum*. *Appl Microbiol*, 24 (2), 248-250
- Cole, R.J. und Schweikert, M.A., 2003a: Handbook of secondary fungal metabolites. Academic Press, San Diego, California, 0-12-179462-8
- Cole, R.J. und Schweikert, M.A., 2003b: Handbook of secondary fungal metabolites. Academic Press, London, 0-12-179461-X

- Cramer, R.A., Jr.; Gamcsik, M.P.; Brooking, R.M.; Najvar, L.K.; Kirkpatrick, W.R.; Patterson, T.F.; Balibar, C.J.; Graybill, J.R.; Perfect, J.R.; Abraham, S.N.; Steinbach, W.J., 2006: Disruption of a nonribosomal peptide synthetase in *Aspergillus fumigatus* eliminates gliotoxin production. *Eukaryot. Cell*, 5 (6), 972-980
- Cui, C.B.; Kakeya, H.; Okada, G.; Onose, R.; Osada, H., 1996a: Novel mammalian cell cycle inhibitors, tryprostatins A, B and other diketopiperazines produced by *Aspergillus fumigatus*. I. Taxonomy, fermentation, isolation and biological properties. *J Antibiot. (Tokyo)*, 49 (6), 527-533
- Cui, C.B.; Kakeya, H.; Okada, G.; Onose, R.; Ubukata, M.; Takahashi, I.; Isono, K.; Osada, H., 1995: Tryprostatins A and B, novel mammalian cell cycle inhibitors produced by *Aspergillus fumigatus*. *J Antibiot. (Tokyo)*, 48 (11), 1382-1384
- Cui, C.B.; Kakeya, H.; Osada, H., 1996b: Novel mammalian cell cycle inhibitors, tryprostatins A, B and other diketopiperazines produced by *Aspergillus fumigatus*. II. Physico-chemical properties and structures. *J Antibiot. (Tokyo)*, 49 (6), 534-540
- Cui, C.B.; Kakeya, H.; Osada, H., 1996c: Spirotryprostatin B, a novel mammalian cell cycle inhibitor produced by *Aspergillus fumigatus*. *J Antibiot. (Tokyo)*, 49 (8), 832-835
- Cui, C.B.; Kakeya, H.; Osada, H., 1997: Novel mammalian cell cycle inhibitors, cyclotryprostatins A-D, produced by *Aspergillus fumigatus*, which inhibit mammalian cell cycle at G2/M phase. *Tetrahedron Letters*, 53 (1), 59-72
- D'yankonov, A.L. und Telezhenetskaya, M. V., 1997: Quinazoline alkaloids in nature. *Chem. Nat. Comp.*, 33 (3), 221-267
- Das, A.; Davis, M.A.; Tomoda, H.; Omura, S.; Rudel, L.L., 2008: Identification of the interaction site within acyl-CoA:cholesterol acyltransferase 2 for the isoform-specific inhibitor pyripyropene A. *J Biol. Chem.*, 283 (16), 10453-10460
- de Clercq, E.; Billiau, A.; Ottenheijm, H.C.; Herscheid, J.D., 1978: Antireverse transcriptase activity of gliotoxin analogs. *Biochem. Pharmacol.*, 27 (5), 635-639
- Diepolder, M., 2007: Auswirkungen des Klimawandels und Strategien für die bayerische Grünlandwirtschaft.
- DLG, 2006: Grobfutterbewertung Teil B - DLG-Schlüssel zur Bewertung der Gärqualität von Grünfuttersilagen auf Basis der chemischen Untersuchung.
- Domsch, K.H.; Gams, W.; Anderson, T.-H., 1993: Compendium of soil fungi. IHW-Verlag, Eching, 3-9803083-8-3
- Dorner, J.W.; Cole, R.J.; Hill, R.A., 1984: Tremorgenic mycotoxins produced by *Aspergillus fumigatus* and *Penicillium crustosum* isolated from molded corn implicated in a natural intoxication of cattle. *J. Agric. Food. Chem.*, 32 (2), 411-413
- dos Santos, V.; Dorner, J.W.; Carreira, F., 2003: Isolation and toxigenicity of *Aspergillus fumigatus* from moldy silage. *Mycopathologia*, 156 (2), 133-138
- Driehuis, F.; Spanjer, M.C.; Scholten, J.M.; te Giffel, M.C., 2008: Occurrence of mycotoxins in feedstuffs of dairy cows and estimation of total dietary intakes. *J Dairy Sci.*, 91 (11), 4261-4271

- Dupuy, J.; Lespine, A.; Sutra, J.F.; Alvinerie, M., 2006a: Fumagillin, a new P-glycoprotein-interfering agent able to modulate moxidectin efflux in rat hepatocytes. *J Vet.Pharmacol.Ther.*, 29 (6), 489-494
- Dupuy, J.; Lespine, A.; Sutra, J.F.; Alvinerie, M., 2006b: The interaction between moxidectin and MDR transporters in primary cultures of rat hepatocytes. *J Vet.Pharmacol.Ther.*, 29 (2), 107-111
- Dutkiewicz, J.; Olenchock, S.A.; Sorenson, W.G.; Gerencser, V.F.; May, J.J.; Pratt, D.S.; Robinson, V.A., 1989: Levels of bacteria, fungi, and endotoxin in bulk and aerosolized corn silage. *Appl Environ Microbiol*, 55 (5), 1093-1099
- Dzidic, A.; Mohr, A.; Meyer, K.; Bauer, J.; Meyer, H.H.; Pfaffl, M.W., 2004: Effects of mycophenolic acid (MPA) treatment on expression of Fc receptor (FcRn) and polymeric immunoglobulin receptor (plgR) mRNA in adult sheep tissues. *Croat.Med.J*, 45 (2), 130-135
- Dzidic, A.; Prgomet, C.; Mohr, A.; Meyer, K.; Bauer, J.; Meyer, H.H.; Pfaffl, M.W., 2006: Effects of mycophenolic acid on inosine monophosphate dehydrogenase I and II mRNA expression in white blood cells and various tissues in sheep. *J Vet.Med.A Physiol Pathol.Clin.Med.*, 53 (4), 163-169
- Eble, T. und Garrett, E., 1954: Studies on the stability of fumagillin. II. Photolytic degradation of crystalline fumagillin. *J Am.Pharm.Assoc.*, 43, 536-538
- Eble, T. und Hanson, F., 1951: Fumagillin, an antibiotic from *Aspergillus fumigatus* H-3. *Antibiot.Chemother.*, 1, 54-58
- Eggimann, P.; Chevrolet, J.C.; Starobinski, M.; Majno, P.; Totsch, M.; Chapuis, B.; Pittet, D., 2006: Primary invasive aspergillosis of the digestive tract: report of two cases and review of the literature. *Infection*, 34 (6), 333-338
- Eichner, R.D.; Al, S.M.; Wood, P.R.; Mullbacher, A., 1986: The effect of gliotoxin upon macrophage function. *Int.J Immunopharmacol.*, 8 (7), 789-797
- El-Shanawany, A.A.; Mostafa, M.E.; Barakat, A., 2005: Fungal populations and mycotoxins in silage in Assiut and Sohag governorates in Egypt, with a special reference to characteristic *Aspergilli* toxins. *Mycopathologia*, 159 (2), 281-289
- Endo, A., 1980: Monacolin K, a new hypocholesterolemic agent that specifically inhibits 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. *J Antibiot.(Tokyo)*, 33 (3), 334-336
- Escoula, L.; Le Bars, J.; Larrieu, G., 1972: Etudes sur la mycoflore des ensilages mycoflore des front de coupe d'ensilages de graminees fourrageres. *Ann.Rech.Veter.*, 3, 469-481
- Fayos, J.; Lokensgard, D.; Clardy, J.; Cole, R.J.; Kirksey, J.W., 1974: Structure of verruculogen, a tremor producing peroxide from *Penicillium verruculosum*. *J Am.Chem.Soc.*, 96 (21), 6785-6787
- Ferry, A.P. und Abedi, S., 1983: Diagnosis and management of rhino-orbitocerebral mucormycosis (phycomycosis). A report of 16 personally observed cases. *Ophthalmology*, 90 (9), 1096-1104
- Fischer, G.; Müller, T.; Ostrowski, R.; Dott, W., 1999: Mycotoxins of *Aspergillus fumigatus* in pure culture and in native bioaerosols from compost facilities. *Chemosphere*, 38 (8), 1745-1755

- Fischer, G.; Schwalbe, R.; Ostrowski, R.; Dott, W., 1998: Airborne fungi and their secondary metabolites in working places in a compost facility. *Mycoses*, 41 (9-10), 383-388
- Frevel, H.-J.; Engel, G.; Teuber, M., 1985: Schimmelpilze in Silage und Rohmilch. *Milchwissenschaften*, 40 (3), 129-132
- Frisvad, J.C.; Rank, C.; Nielsen, K.F.; Larsen, T.O., 2008: Metabolomics of *Aspergillus fumigatus*. *Med.Mycol.*, 1-19
- Frisvad, J.C.; Smedsgaard, J.; Samson, R.A.; Larsen, T.O.; Thrane, U., 2007: Fumonisin B2 production by *Aspergillus niger*. *J Agric Food Chem.*, 55 (23), 9727-9732
- Fulton, B. und Markham, A., 1996: Mycophenolate mofetil. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and clinical efficacy in renal transplantation. *Drugs*, 51 (2), 278-298
- Gallagher, R.T.; Keogh, R.G.; Latch, G.C.M.; Reid, C.S.W., 1977: The role of fungal tremorgens in ryegrass staggers. *N.Z.J.Agric.Res.*, 20, 431-440
- Gallagher, R.T. und Latch, G.C., 1977: Production of the tremorgenic mycotoxins verruculogen and fumitremorgin B by *Penicillium piscarium* Westling. *Appl Environ Microbiol*, 33 (3), 730-731
- Gant, D.B.; Cole, R.J.; Valdes, J.J.; Eldefrawi, M.E.; Eldefrawi, A.T., 1987: Action of tremorgenic mycotoxins on GABAA receptor. *Life Sci.*, 41 (19), 2207-2214
- Gardiner, D.M.; Waring, P.; Howlett, B.J., 2005: The epipolythiodioxopiperazine (ETP) class of fungal toxins: distribution, mode of action, functions and biosynthesis. *Microbiology*, 151 (Pt 4), 1021-1032
- Garon, D.; Richard, E.; Sage, L.; Bouchart, V.; Pottier, D.; Lebailly, P., 2006: Mycoflora and multimycotoxin detection in corn silage: experimental study. *J Agric Food Chem.*, 54 (9), 3479-3484
- Garrett, E., 1954: Studies on the stability of fumagillin. III. Thermal degradation in the presence and absence of air. *J Am.Pharm.Assoc.*, 43, 539-543
- Garrett, E. und Eble, T., 1954: Studies on the stability of fumagillin. I. Photolytic degradation in alcohol solution. *J Am.Pharm.Assoc.*, 43, 385-390
- Gedek, B., 1974: Möglichkeiten und Grenzen der mykologischen Futtermittelkontrolle. *Wien.Tierärztl.Wschr.*, 81, 37-40
- Gedek, B., 1980: Kompendium der medizinischen Mykologie. Parey, Berlin/Hamburg, 3-489-62816-0
- Gedek, B.; Bauer, J.; Schreiber, H., 1981: Zur Mykotoxinbildung Silage-verderbender Schimmelpilze. *Wien.Tierärztl.Mschr.*, 68 (8/9), 299-301
- Glatt, H.; Pertz, H.; Kasper, R.; Eich, E., 1992: Clavine alkaloids and derivatives as mutagens detected in the Ames test. *Anti-Cancer-Drugs*, 3 (6), 609-614
- Glinsukon, T.; Yuan, S.-S.; Wightman, R.; Kitaura, G.; Büchi, G.; Shank, R.C.; Wogan, G.N.; Christensen, C.M., 1974: Isolation and purification of cytochalasin E and two tremorgens from *Aspergillus clavatus*. *Plant Foods for Man*, 1, 113-119



- González Pereyra, M.L.; Alonso, V.A.; Sager, R.; Morlaco, M.B.; Magnoli, C.E.; Astoreca, A.L.; Rosa, C.A.; Chiacchiera, S.M.; Dalcero, A.M.; Cavaglieri, L.R., 2007: Fungi and selected mycotoxins from pre- and postfermented corn silage. *J Appl. Microbiol.*, 1364-5072
- Göttlich, E.; Engesser, K.H.; Bradtke, D., 1994: Emission von Pilzsporen in Müllverarbeitungsanlagen. 64-77
- Gottschalk, C.; Barthel, J.; Engelhardt, G.; Bauer, J.; Meyer, K., 2007: Occurrence of type A trichothecenes in conventionally and organically produced oats and oat products. *Mol. Nutr Food Res.*, 51 (12), 1547-1553
- Gottschalk, C.; Bauer, J.; Meyer, K., 2008: Detection of satratoxin g and h in indoor air from a water-damaged building. *Mycopathologia*, 166 (2), 103-107
- Griffith, E.C.; Su, Z.; Niwayama, S.; Ramsay, C.A.; Chang, Y.H.; Liu, J.O., 1998: Molecular recognition of angiogenesis inhibitors fumagillin and ovalicin by methionine aminopeptidase 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 95 (26), 15183-15188
- Griffith, E.C.; Su, Z.; Turk, B.E.; Chen, S.; Chang, Y.H.; Wu, Z.; Biemann, K.; Liu, J.O., 1997: Methionine aminopeptidase (type 2) is the common target for angiogenesis inhibitors AGM-1470 and ovalicin. *Chem. Biol.*, 4 (6), 461-471
- Groß, F. und Riebe, K., 1974: Gärfutter. Ulmer, Stuttgart, 3-8001-4321-6
- Gutteridge, W.E.; Knowler, J.; Coombes, J.D., 1969: Growth of *Trypanosoma cruzi* in human heart tissue cells and effects of aminonucleoside of puromycin, trypanidin and aminopterin. *J Protozool.*, 16 (3), 521-525
- Guyonnet, J.; Richard, M.; Hellings, P., 1995: Determination of fumagillin in muscle tissue of rainbow trout using automated ion-pairing liquid chromatography. *J Chromatogr. B Biomed. Appl.*, 666 (2), 354-359
- Hanson, F. und Eble, T., 1949: An antiphage agent isolated from *Aspergillus* sp. *J Bacteriol.*, 58, 527-529
- Hayashi, A.; Fujioka, S.; Nukina, M.; Kawano, T.; Shimada, A.; Kimura, Y., 2007: Fumiquinones A and B, nematocidal quinones produced by *Aspergillus fumigatus*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 71 (7), 1697-1702
- Heller, D. und Potthast, V., 1997: Erfolgreiche Milchviehfütterung. 3, DLG-Verlags-GmbH, Frankfurt (Main), 3-7690-0538-4
- Igarashi, Y.; Yabuta, Y.; Sekine, A.; Fujii, K.; Harada, K.; Oikawa, T.; Sato, M.; Furumai, T.; Oki, T., 2004: Directed biosynthesis of fluorinated pseurotin A, synerazol and gliotoxin. *J Antibiot. (Tokyo)*, 57 (11), 748-754
- Ingber, D.; Fujita, T.; Kishimoto, S.; Sudo, K.; Kanamaru, T.; Brem, H.; Folkman, J., 1990: Synthetic analogues of fumagillin that inhibit angiogenesis and suppress tumour growth. *Nature*, 348 (6301), 555-557
- Janardhanan, K.K.; Sattar, A.; Husain, A., 1984: Production of fumigaclavine A by *Aspergillus tamarii* Kita. *Can. J Microbiol.*, 30 (2), 247-250
- Johnson, J.R.; Bruce, W.F.; Dutcher, J.D., 1943: Gliotoxin, the antibiotic principle of *Gliocladium fimbriatum*; I. Production; physical and biological properties. *J. Am. Chem. Soc.*, 65, 2005-2009

- Kalzendorf, C., 2006: Siliermittelarten und ihre Wirksamkeiten. In: Praxishandbuch Futterkonservierung, DLG-Verlag, Frankfurt am Main, 7, 155-162, 3-7690-0677
- Khoufache, K.; Puel, O.; Loiseau, N.; Delaforge, M.; Rivollet, D.; Coste, A.; Cordonnier, C.; Escudier, E.; Botterel, F.; Bretagne, S., 2007: Verruculogen associated with *Aspergillus fumigatus* hyphae and conidia modifies the electrophysiological properties of human nasal epithelial cells. BMC.Microbiol, 7, 5
- Kim, Y.K.; Tomoda, H.; Nishida, H.; Sunazuka, T.; Obata, R.; Omura, S., 1994: Pyripyropenes, novel inhibitors of acyl-CoA:cholesterol acyltransferase produced by *Aspergillus fumigatus*. II. Structure elucidation of pyripyropenes A, B, C and D. J Antibiot.(Tokyo), 47 (2), 154-162
- Kochansky, J. und Nasr, M., 2004: Laboratory studies on the photostability of fumagillin, the active ingredient of Fumidil B<sup>1</sup>. Apidologie, 35 (3), 301-310
- Komagata, D.; Fujita, S.; Yamashita, N.; Saito, S.; Morino, T., 1996: Novel neuritogenic activities of pseurotin A and penicillic acid. J Antibiot.(Tokyo), 49 (9), 958-959
- Korbel, R.; Bauer, J.; Gedek, B., 1993: Pathologico-anatomic and mycotoxicologic studies of aspergillosis in birds. Tierarztl.Prax., 21 (2), 134-139
- Kupfahl, C.; Heinekamp, T.; Geginat, G.; Ruppert, T.; Hartl, A.; Hof, H.; Brakhage, A.A., 2006: Deletion of the gliP gene of *Aspergillus fumigatus* results in loss of gliotoxin production but has no effect on virulence of the fungus in a low-dose mouse infection model. Mol.Microbiol, 62 (1), 292-302
- Lacey, J. und Crook, B., 1988: Fungal and actinomycete spores as pollutants of the workplace and occupational allergens. Ann.Occup.Hyg., 32 (4), 515-533
- Lada, A.T.; Davis, M.; Kent, C.; Chapman, J.; Tomoda, H.; Omura, S.; Rudel, L.L., 2004a: Identification of ACAT1- and ACAT2-specific inhibitors using a novel, cell-based fluorescence assay. J Lipid Res., 45 (2), 378-386
- Lada, A.T.; Davis, M.; Kent, C.; Chapman, J.; Tomoda, H.; Omura, S.; Rudel, L.L., 2004b: Identification of ACAT1- and ACAT2-specific inhibitors using a novel, cell-based fluorescence assay. J Lipid Res., 45 (2), 378-386
- Lalithkumar, P.G.; Sengupta, J.; Dhawan, L.; Sharma, D.N.; Lasley, B.L.; Overstreet, J.W.; Ghosh, D., 2000: Anti-nidatory effect of vaginally administered fumagillin in the rhesus monkey. Contraception, 62 (3), 155-159
- Land, C.J.; Lundstrom, H.; Werner, S., 1993: Production of tremorgenic mycotoxins by isolates of *Aspergillus fumigatus* from sawmills in Sweden. Mycopathologia, 124 (2), 87-93
- Larin, N.M.; Copping, M.P.; Herbst-Laier, R.H.; Roberts, B.; Wenham, R.B., 1965: Antiviral activity of gliotoxin. Chemotherapy, 10 (1), 12-23
- Larsen, T.O.; Smedsgaard, J.; Nielsen, K.F.; Hansen, M.A.; Samson, R.A.; Frisvad, J.C., 2007: Production of mycotoxins by *Aspergillus lentulus* and other medically important and closely related species in section *Fumigati*. Med.Mycol., 45 (3), 225-232
- Latgé, J.P., 2001: The pathobiology of *Aspergillus fumigatus*. Trends Microbiol, 9 (8), 382-389
- Latgé, J.P., 1999: *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. Clin.Microbiol Rev., 12 (2), 310-350

- Lewis, R.E.; Wiederhold, N.P.; Chi, J.; Han, X.Y.; Komanduri, K.V.; Kontoyiannis, D.P.; Prince, R.A., 2005a: Detection of gliotoxin in experimental and human aspergillosis. *Infect Immun.*, 73 (1), 635-637
- Lewis, R.E.; Wiederhold, N.P.; Lionakis, M.S.; Prince, R.A.; Kontoyiannis, D.P., 2005b: Frequency and species distribution of gliotoxin-producing *Aspergillus* isolates recovered from patients at a tertiary-care cancer center. *J Clin. Microbiol.*, 43 (12), 6120-6122
- Li, X.; Kim, S.K.; Nam, K.W.; Kang, J.S.; Choi, H.D.; Son, B.W., 2006: A new antibacterial dioxopiperazine alkaloid related to gliotoxin from a marine isolate of the fungus *Pseudallescheria*. *J Antibiot. (Tokyo)*, 59 (4), 248-250
- Liu, S.; Widom, J.; Kemp, C.W.; Crews, C.M.; Clardy, J., 1998: Structure of human methionine aminopeptidase-2 complexed with fumagillin. *Science*, 282 (5392), 1324-1327
- Ma, H.Y.; Song, Y.C.; Mao, Y.Y.; Jiang, J.H.; Tan, R.X.; Luo, L., 2006: Endophytic fungal metabolite fumigaclavine C causes relaxation of isolated rat aortic rings. *Planta Med.*, 72 (5), 387-392
- Maiya, S.; Grundmann, A.; Li, S.M.; Turner, G., 2006: The fumitremorgin gene cluster of *Aspergillus fumigatus*: identification of a gene encoding brevianamide F synthetase. *Chembiochem.*, 7 (7), 1062-1069
- Mansfield, M.A.; Jones, A.D.; Kuldau, G.A., 2008: Contamination of fresh and ensiled maize by multiple penicillium mycotoxins. *Phytopathology*, 98 (3), 330-336
- Mantle, P.G. und Penny, R.H.C., 1981: Tremorgenic mycotoxins and neurological disorders - a review. *Vet. Annu.*, 21, 51-62
- Menzel, A.E.O.; Wintersteiner, O.; Hoogerheide, J.C., 1944: Isolation of gliotoxin and fumigacin from culture filtrates of *Aspergillus fumigatus*. *J. Bio. Chem.*, 152, 419-429
- Mohr, A.I.; Lorenz, I.; Baum, B.; Hewicker-Trautwein, M.; Pfaffl, M.; Dzidic, A.; Meyer, H.H.; Bauer, J.; Meyer, K., 2007: Influence of oral application of mycophenolic acid on the clinical health status of sheep. *J Vet. Med. A Physiol Pathol. Clin. Med.*, 54 (2), 76-81
- Mohr, P. und Tamm, Ch., 1981: Biosynthesis of pseurotin A. *Tetrahedron*, 37 (Suppl. 1), 201-212
- Mor, S. und Singh, K., 2000: Incidence of toxigenic molds in dairy foods and animal feeds. *Ind. J Anim. Sci.*, 70 (7), 766-768
- Morgavi, D.P.; Boudra, H.; Jouany, J.P.; Michalet-Doreau, B., 2004: Effect and stability of gliotoxin, an *Aspergillus fumigatus* toxin, on in vitro rumen fermentation. *Food Addit. Contam.*, 21 (9), 871-878
- Moussa, L.A.A., 2003: Effect of some factors including irradiation on the ergot alkaloids production by members of *Penicillium*. *OnLine Journal of Biological Sciences*, 3 (1), 65-81, 1608-4217
- Müllbacher, A. und Eichner, R.D., 1984: Immunosuppression in vitro by a metabolite of a human pathogenic fungus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 81 (12), 3835-3837
- Müllbacher, A.; Waring, P.; Eichner, R.D., 1985: Identification of an agent in cultures of *Aspergillus fumigatus* displaying anti-phagocytic and immunomodulating activity in vitro. *J Gen. Microbiol.*, 131 (5), 1251-1258

- Müllbacher, A.; Waring, P.; Tiwari-Palni, U.; Eichner, R.D., 1986: Structural relationship of epipolythiodioxopiperazines and their immunomodulating activity. *Mol.Immunol.*, 23 (2), 231-235
- Müller, H.M. und Amend, R., 1997: Formation and disappearance of mycophenolic acid, patulin, penicillic acid and PR toxin in maize silage inoculated with *Penicillium roqueforti*. *Arch.Tierernahr.*, 50 (3), 213-225
- Müller, J. und Bauer, R., 2006: Futterkonservierung. In: Pflanzliche Erzeugung, BLV Buchverlag, München, 12, 20, 865-933, 3-405-16860-0
- Nahari, D.; Satchi-Fainaro, R.; Chen, M.; Mitchell, I.; Task, L.B.; Liu, Z.; Kihneman, J.; Carroll, A.B.; Terada, L.S.; Nwariaku, F.E., 2007: Tumor cytotoxicity and endothelial Rac inhibition induced by TNP-470 in anaplastic thyroid cancer. *Mol.Cancer Ther.*, 6 (4), 1329-1337
- Nielsen, P.V.; Beuchat, L.R.; Frisvad, J.C., 1988: Growth of and fumitremorgin production by *Neosartorya fischeri* as affected by temperature, light, and water activity. *Appl Environ Microbiol.*, 54 (6), 1504-1510
- Nierman, W.C.; May, G.; Kim, H.S.; Anderson, M.J.; Chen, D.; Denning, D.W., 2005a: What the *Aspergillus* genomes have told us. *Med.Mycol.*, 43 Suppl 1, 3-5
- Nierman, W.C.; Pain, A.; Anderson, M.J.; Wortman, J.R.; Kim, H.S.; Arroyo, J.; Berriman, M.; Abe, K.; Archer, D.B.; Bermejo, C.; Bennett, J.; Bowyer, P.; Chen, D.; Collins, M.; Coulsen, R.; Davies, R.; Dyer, P.S.; Farman, M.; Fedorova, N.; Fedorova, N.; Feldblyum, T.V.; Fischer, R.; Fosker, N.; Fraser, A.; Garcia, J.L.; Garcia, M.J.; Goble, A.; Goldman, G.H.; Gomi, K.; Griffith-Jones, S.; Gwilliam, R.; Haas, B.; Haas, H.; Harris, D.; Horiuchi, H.; Huang, J.; Humphray, S.; Jimenez, J.; Keller, N.; Khouri, H.; Kitamoto, K.; Kobayashi, T.; Konzack, S.; Kulkarni, R.; Kumagai, T.; Lafon, A.; Latge, J.P.; Li, W.; Lord, A.; Lu, C.; Majoros, W.H.; May, G.S.; Miller, B.L.; Mohamoud, Y.; Molina, M.; Monod, M.; Mouyna, I.; Mulligan, S.; Murphy, L.; O'Neil, S.; Paulsen, I.; Penalva, M.A.; Perteu, M.; Price, C.; Pritchard, B.L.; Quail, M.A.; Rabinowitsch, E.; Rawlins, N.; Rajandream, M.A.; Reichard, U.; Renaud, H.; Robson, G.D.; Rodriguez de, C.S.; Rodriguez-Pena, J.M.; Ronning, C.M.; Rutter, S.; Salzberg, S.L.; Sanchez, M.; Sanchez-Ferrero, J.C.; Saunders, D.; Seeger, K.; Squares, R.; Squares, S.; Takeuchi, M.; Tekai, F.; Turner, G.; Vazquez de Aldana, C.R.; Weidman, J.; White, O.; Woodward, J.; Yu, J.H.; Fraser, C.; Galagan, J.E.; Asai, K.; Machida, M.; Hall, N.; Barrell, B.; Denning, D.W., 2005b: Genomic sequence of the pathogenic and allergenic filamentous fungus *Aspergillus fumigatus*. *Nature*, 438 (7071), 1151-1156
- Niide, O.; Suzuki, Y.; Yoshimaru, T.; Inoue, T.; Takayama, T.; Ra, C., 2006: Fungal metabolite gliotoxin blocks mast cell activation by a calcium- and superoxide-dependent mechanism: implications for immunosuppressive activities. *Clin.Immunol.*, 118 (1), 108-116
- Nishiyama, M. und Kuga, T., 1986: Pharmacological effects of the tremorgenic mycotoxin fumitremorgin A. *Jpn.J Pharmacol.*, 40 (4), 481-489
- Nishiyama, M. und Kuga, T., 1989: Central effects of the neurotropic mycotoxin fumitremorgin A in the rabbit (I). Effects on the spinal cord. *Jpn.J Pharmacol.*, 50 (2), 167-173
- Nishiyama, M. und Kuga, T., 1990: Central effects of the neurotropic mycotoxin fumitremorgin A in the rabbit. (II). Effects on the brain stem. *Jpn.J Pharmacol.*, 52 (2), 201-208
- Notebaert, S.; Duchateau, L.; Meyer, E., 2005: NF-kappaB inhibition accelerates apoptosis of bovine neutrophils. *Vet.Res.*, 36 (2), 229-240

- Nout, M.J.R.; Bouwmeester, H.M.; Haaksma, J.; Van Dijk, H., 1993: Fungal growth in silages of sugarbeet press pulp and maize. *J Agric.Sc. Cambridge*, 121, 323-326
- Numata, A.; Takahashi, C.; Matsushita, T.; Miyamoto, T.; Kawai, K.; Yoshihide, U.; Matsomura, E.; Inoue, M.; Ohishi, H.; Shingu, T., 1992: Fumiquinazolines, novel metabolites of a fungus isolated from a saltfish. *Tetrahedron Letters*, 33 (12), 1621-1624
- O'Brien, M.; Nielsen, K.F.; O'Kiely, P.; Forristal, P.D.; Fuller, H.T.; Frisvad, J.C., 2006: Mycotoxins and other secondary metabolites produced in vitro by *Penicillium paneum* Frisvad and *Penicillium roqueforti* Thom isolated from baled grass silage in Ireland. *J Agric Food Chem.*, 54 (24), 9268-9276
- O'Brien, M.; O'Kiely, P.; Forristal, P.D.; Fuller, H.T., 2005: Fungi isolated from contaminated baled grass silage on farms in the Irish Midlands. *FEMS Microbiol Lett.*, 247 (2), 131-135
- O'Malley, G.J. und Cava, M.P., 1987: Tremorgenic mycotoxins: synthesis of 6-demethoxyfumitremorgin C. *Tetrahedron Letters*, 28 (11), 1131-1134
- Ohmomo, S.; Kaneko, M.; Atthasampunna, P., 1989: Production of fumigaclavine B by a thermophilic strain of *Aspergillus fumigatus*. *MIRCEN Journal*, 5, 5-13
- Okuda, S.; Nakayama, Y.; Tsuda, K., 1966: Studies on microbial products. I. Helvolic acid and related compounds. I. 7-desacetoxyhelvolic acid and helvolinic acid. *Chem.Pharm.Bull.(Tokyo)*, 14 (4), 436-441
- Omura, S.; Tomoda, H.; Kim, Y.K.; Nishida, H., 1993: Pyripyropenes, highly potent inhibitors of acyl-CoA:cholesterol acyltransferase produced by *Aspergillus fumigatus*. *J Antibiot.(Tokyo)*, 46 (7), 1168-1169
- Orpin, C.G. und Joblin, K.N., 1997: The rumen anaerobic fungi. In: *The rumen microbial ecosystem*, 140-195
- Osada, H., 1998: Bioprobes for investigating mammalian cell cycle control. *J Antibiot.(Tokyo)*, 51 (11), 973-982
- Osada, H.; Cui, C.B.; Onose, R.; Hanaoka, F., 1997: Screening of cell cycle inhibitors from microbial metabolites by a bioassay using a mouse cdc2 mutant cell line, tsFT210. *Bioorg.Med.Chem.*, 5 (1), 193-203
- Pahlow, G., 1991: Role of microflora in forage conservation. In: *Proceedings on a conference on forage conservation towards 2000*, Landbauforschung Völkenrode, Sonderheft 123
- Pahlow, G., 2006: Gärungsbiologische Grundlagen und biochemische Prozesse der Silagebereitung. In: *Praxishandbuch Futterkonservierung*, DLG-Verlag, Frankfurt am Main, 7, 1.2, 11-20, 3-7690-0677
- Pala, I.; Srinivasan, A.; Vig, P.J.S.; Desai, D., 1999: Modulation of calmodulin and protein kinase C activities by *Penicillium* mycotoxins. *Int.J.Toxicol.*, 18 (2), 91-96
- Palmgren, M.S. und Lee, L.S., 1986: Separation of mycotoxin-containing sources in grain dust and determination of their mycotoxin potential. *Environ Health Perspect.*, 66, 105-108

- Panaccione, D.G. und Coyle, C.M., 2005: Abundant respirable ergot alkaloids from the common airborne fungus *Aspergillus fumigatus*. *Appl Environ Microbiol*, 71 (6), 3106-3111
- Pardo, J.; Urban, C.; Galvez, E.M.; Ekert, P.G.; Müller, U.; Kwon-Chung, J.; Lobigs, M.; Müllbacher, A.; Wallich, R.; Borner, C.; Simon, M.M., 2006: The mitochondrial protein Bak is pivotal for gliotoxin-induced apoptosis and a critical host factor of *Aspergillus fumigatus* virulence in mice. *J Cell Biol.*, 174 (4), 509-519
- Parker, G.F. und Jenner, P.C., 1968: Distribution of tryptacidin in cultures of *Aspergillus fumigatus*. *Appl Microbiol*, 16 (8), 1251-1252
- Patterson, D.S.; Shreeve, B.J.; Roberts, B.A.; MacDonald, S.M., 1981: Verruculogen produced by soil fungi in England and Wales. *Appl Environ Microbiol*, 42 (5), 916-917
- Pelhate, J., 1977: Maize silage: incidence of moulds during conservation. *Folia veterinaria Latina*, 7, 1-16
- Perera, K.P.; Day, J.B.; Mantle, P.G.; Rodrigues, L., 1982a: Metabolism of verruculogen in rats. *Appl Environ Microbiol*, 43 (3), 503-508
- Perera, K.P.; Mantle, P.G.; Penny, R.H., 1982b: Metabolism and excretion of [<sup>14</sup>C] verruculogen in a sheep. *Res. Vet. Sci.*, 32 (3), 347-350
- Piva, T.J., 1994: Gliotoxin induces apoptosis in mouse L929 fibroblast cells. *Biochem. Mol. Biol. Int.*, 33 (3), 411-419
- Podstatzky, L.; Winter, P.; Schlicher, F.; Buchbacher, M., 1999: Mastitis durch *Aspergillus fumigatus* bei einem Rind. *Wien. Tierärztl. Mschr.*, 86, 274-279
- Rabindran, S.K.; He, H.; Singh, M.; Brown, E.; Collins, K.I.; Annable, T.; Greenberger, L.M., 1998: Reversal of a novel multidrug resistance mechanism in human colon carcinoma cells by fumitremorgin C. *Cancer Res.*, 58 (24), 5850-5858
- Rabindran, S.K.; Ross, D.D.; Doyle, L.A.; Yang, W.; Greenberger, L.M., 2000: Fumitremorgin C reverses multidrug resistance in cells transfected with the breast cancer resistance protein. *Cancer Res.*, 60 (1), 47-50
- Reeves, E.P.; Messina, C.G.; Doyle, S.; Kavanagh, K., 2004: Correlation between gliotoxin production and virulence of *Aspergillus fumigatus* in *Galleria mellonella*. *Mycopathologia*, 158 (1), 73-79
- Rementeria, A.; Lopez-Molina, N.; Ludwig, A.; Vivanco, A.B.; Bikandi, J.; Ponton, J.; Garaizar, J., 2005: Genes and molecules involved in *Aspergillus fumigatus* virulence. *Rev. Iberoam. Micol.*, 22 (1), 1-23
- Richard, E.; Heutte, N.; Sage, L.; Pottier, D.; Bouchart, V.; Lebailly, P.; Garon, D., 2007: Toxicogenic fungi and mycotoxins in mature corn silage. *Food Chem. Toxicol.*
- Richard, J.L. und Debey, M.C., 1995: Production of gliotoxin during the pathogenic state in turkey poults by *Aspergillus fumigatus* Fresenius. *Mycopathologia*, 129 (2), 111-115
- Richard, J.L.; Dvorak, T.J.; Ross, P.F., 1996: Natural occurrence of gliotoxin in turkeys infected with *Aspergillus fumigatus* Fresenius. *Mycopathologia*, 134 (3), 167-170
- Richard, J.L.; Peden, W.M.; Williams, P.P., 1994: Gliotoxin inhibits transformation and its cytotoxic to turkey peripheral blood lymphocytes. *Mycopathologia*, 126 (2), 109-114

- Ronning, C.M.; Fedorova, N.D.; Bowyer, P.; Coulson, R.; Goldman, G.; Kim, H.S.; Turner, G.; Wortman, J.R.; Yu, J.; Anderson, M.J.; Denning, D.W.; Nierman, W.C., 2005: Genomics of *Aspergillus fumigatus*. Rev.Iberoam.Micol., 22 (4), 223-228
- Rundberget, T. und Wilkins, A.L., 2002: Determination of *Penicillium* mycotoxins in foods and feeds using liquid chromatography-mass spectrometry. J Chromatogr.A, 964 (1-2), 189-197
- Ryckeboer, J.; Mergaert, J.; Coosemans, J.; Deprins, K.; Swings, J., 2003: Microbiological aspects of biowaste during composting in a monitored compost bin. J Appl Microbiol, 94 (1), 127-137
- Schneweis, I., 2000: Futtermittelhygienische Untersuchungen von Silagen: Nachweis und Vorkommen von Monacolinen, Citrinin und Mycophenolsäure. Dissertation, Technische Universität München
- Schneweis, I.; Meyer, K.; Hormansdorfer, S.; Bauer, J., 2000: Mycophenolic acid in silage. Appl Environ Microbiol, 66 (8), 3639-3641
- Schneweis, I.; Meyer, K.; Hormansdorfer, S.; Bauer, J., 2001: Metabolites of *Monascus ruber* in silages. J Anim Physiol Anim Nutr (Berl), 85 (1-2), 38-44
- Schroeder, H.W.; Cole, R.J.; Hein, H., Jr.; Kirksey, J.W., 1975: Tremorgenic mycotoxins from *Aspergillus caespitosus*. Appl Microbiol, 29 (6), 857-858
- Scudamore, K.A., 2005: Principles and applications of mycotoxin analysis. In: The mycotoxin blue book, University Press, Nottingham, 157-182
- Scudamore, K.A.; Nawaz, S.; Hetmanski, M.T., 1998: Mycotoxins in ingredients of animal feeding stuffs: II. Determination of mycotoxins in maize and maize products. Food Addit.Contam, 15 (1), 30-55
- Shigenobu, O.; Sigeo, I.; Kyosuke, T.; Yoshimoto, S.; Toju, H.; Shun-ichi, U.; Yuya, N.; Hiroshi, Y., 1964: The structure of helvolic acid. Chem.Pharm.Bull.(Tokyo), 12 (1), 121-124
- Shreeve, B.J.; Patterson, D.S.; Roberts, B.A.; MacDonald, S.M., 1983: Tremorgenic fungal toxins. Vet.Res.Comm., 7 (1-4), 155-160
- Sievers, T.M.; Rossi, S.J.; Ghobrial, R.M.; Arriola, E.; Nishimura, P.; Kawano, M.; Holt, C.D., 1997: Mycophenolate mofetil. Pharmacotherapy, 17 (6), 1178-1197
- Sin, N.; Meng, L.; Wang, M.Q.; Wen, J.J.; Bornmann, W.G.; Crews, C.M., 1997: The anti-angiogenic agent fumagillin covalently binds and inhibits the methionine aminopeptidase, MetAP-2. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A, 94 (12), 6099-6103
- Smith, D.F. und Lynch, G.P., 1973: *Aspergillus fumigatus* in samples of moldy silage. J.Dairy Sci., 56 (6), 828-829
- Snider, B.B. und Zeng, H., 2003: Total synthesis of (-)-fumiquinazolines A, B, C, E, H, and I. Approaches to the synthesis of fiscalin A. J Org.Chem., 68 (2), 545-563
- Solomon, W.R. und Burge, H.A., 1984: Allergens and pathogens. In: Indoor air quality, CRC Press, Boca Raton, Florida, 10, 173-188 , 0-8493-5015-8
- Spiekers, H., 2002: Maßnahmen zur Vermeidung von Nacherwärmung, Futterkonservierung - Siliermittel, Dosiergeräte, Silofolien. Weiß & Partner, Oldenburg, 12-16

- Spiekers, H., 2006: Einleitung und Zielgrößen. In: Praxishandbuch Futterkonservierung, DLG-Verlags-GmbH, Frankfurt am Main, 7-10, 3769006771
- Spikes, S.; Xu, R.; Nguyen, C.K.; Chamilos, G.; Kontoyiannis, D.P.; Jacobson, R.H.; Ejzykowicz, D.E.; Chiang, L.Y.; Filler, S.G.; May, G.S., 2008: Gliotoxin production in *Aspergillus fumigatus* contributes to host-specific differences in virulence. *J Infect Dis.*, 197 (3), 479-486
- Spillsbury, J.F. und Wilkinson, S., 1961: The isolation of festuclavine and two new clavine alkaloids from *Aspergillus fumigatus* Fres. *J.Chem.Soc.*, 2085-2091
- Springer, J.P., 1979: The absolute configuration of nortryptoquivaline. *Tetrahedron Letters*, 20 (4), 339-342
- Stanzani, M.; Orciuolo, E.; Lewis, R.; Kontoyiannis, D.P.; Martins, S.L.; St John, L.S.; Komanduri, K.V., 2005: *Aspergillus fumigatus* suppresses the human cellular immune response via gliotoxin-mediated apoptosis of monocytes. *Blood*, 105 (6), 2258-2265
- Steinwigger, A. und Wurm, K., 2005: Milchviehfütterung - tier- und leistungsgerecht. Leopold Stocker Verlag, Graz, 3-7020-1101-3
- Steyn, P.S. und Vleggaar, R., 1985: Tremorgenic mycotoxins. *Fortschr.Chem.Org.Naturst.*, 48, 1-80
- Storm, I.D.; Sørensen, J.L.; Rasmussen, R.R.; Nielsen, K.F.; Thrane, U., 2008: Mycotoxins in silage. *Steward Prosthharvest Review*, 4 (6), 1-12
- Sugui, J.A.; Pardo, J.; Chang, Y.C.; Zarembek, K.A.; Nardone, G.; Galvez, E.M.; Müllbacher, A.; Gallin, J.I.; Simon, M.M.; Kwon-Chung, K.J., 2007: Gliotoxin is a virulence factor of *Aspergillus fumigatus*: gliP deletion attenuates virulence in mice immunosuppressed with hydrocortisone. *Eukaryot.Cell*, 6 (9), 1562-1569
- Sutton, P.; Newcombe, N.R.; Waring, P.; Mullbacher, A., 1994: In vivo immunosuppressive activity of gliotoxin, a metabolite produced by human pathogenic fungi. *Infect Immun.*, 62 (4), 1192-1198
- Sutton, P.; Waring, P.; Mullbacher, A., 1996: Exacerbation of invasive aspergillosis by the immunosuppressive fungal metabolite, gliotoxin. *Immunol.Cell Biol.*, 74 (4), 318-322
- Takahashi, C.; Matsushita, T.; Doi, M.; Minoura, K.; Shingu, T.; Kumeda, Y.; Numata, A., 1995: Fumiquinazolines A-G, novel metabolites of a fungus separated from a *Pseudolabrus* marine fish. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*, 24 (18), 2345-2353
- Tapia, M.O.; Stern, M.D.; Soraci, A.L.; Meronuck, R.; Olson, W.; Gold, S.; Koski-Hulbert, H.L.; Murphy, M.J., 2005: Patulin-producing molds in corn silage and high moisture corn and effects of patulin on fermentation by ruminal microbes in continuous culture. *Animal Feed Science and Technology*, 119 (3), 247-258
- Tekaia, F. und Latgé, J.P., 2005: *Aspergillus fumigatus*: saprophyte or pathogen? *Curr.Opin.Microbiol.*, 8 (4), 385-392
- Tomoda, H.; Kim, Y.K.; Nishida, H.; Masuma, R.; Omura, S., 1994: Pyripyropenes, novel inhibitors of acyl-CoA: cholesterol acyltransferase produced by *Aspergillus fumigatus*. I. Production, isolation, and biological properties. *J Antibiot.(Tokyo)*, 47 (2), 148-153



- Tomoda, H.; Tabata, N.; Yang, D.J.; Namatame, I.; Tanaka, H.; Omura, S.; Kaneko, T., 1996: Pyripyropenes, novel ACAT inhibitors produced by *Aspergillus fumigatus*. IV. Structure elucidation of pyripyropenes M to R. J Antibiot.(Tokyo), 49 (3), 292-298
- Tomoda, H.; Tabata, N.; Yang, D.J.; Takayanagi, H.; Nishida, H.; Omura, S.; Kaneko, T., 1995: Pyripyropenes, novel ACAT inhibitors produced by *Aspergillus fumigatus*. III. Structure elucidation of pyripyropenes E to L. J Antibiot.(Tokyo), 48 (6), 495-503
- Tüller, G., 1994: Bildung von *Aspergillus fumigatus*-Toxinen bei Lagerung von Maissilage. Dissertation, Technische Universität München
- Tüller, G.; Armbruster, G.; Wiedenmann, S.; Hänichen, T.; Schams, D.; Bauer, J., 1998: Occurrence of roquefortine in silage - toxicological relevance to sheep. J.Anim.Physiol.a.Anim.Nutr., 80, 246-249
- Turner, W.B., 1965: The production of tryptacidin and monomethylsulochrin by *Aspergillus fumigatus*. J Chem.Soc., 6658-6659
- Unsöld, I.A. und Li, S.M., 2006: Reverse prenyltransferase in the biosynthesis of fumigaclavine C in *Aspergillus fumigatus*: gene expression, purification, and characterization of fumigaclavine C synthase FGAPT1. ChemBioChem, 7, 158-164
- Upperman, J.S.; Potoka, D.A.; Zhang, X.R.; Wong, K.; Zamora, R.; Ford, H.R., 2003: Mechanism of intestinal-derived fungal sepsis by gliotoxin, a fungal metabolite. J Pediatr.Surg., 38 (6), 966-970
- van Loevezijn, A.; Allen, J.D.; Schinkel, A.H.; Koomen, G.J., 2001: Inhibition of BCRP-mediated drug efflux by fumitremorgin-type indolyl diketopiperazines. Bioorg.Med.Chem.Lett., 11 (1), 29-32
- VanMiddlesworth, F.; Giacobbe, R.A.; Lopez, M.; Garrity, G.; Bland, J.A.; Bartizal, K.; Fromtling, R.A.; Polishook, J.; Zweerink, M.; Edison, A.M.; ., 1992: Sphingofungins A, B, C, and D; a new family of antifungal agents. I. Fermentation, isolation, and biological activity. J Antibiot.(Tokyo), 45 (6), 861-867
- Waring, P.; Eichner, R.D.; Mullbacher, A.; Sjaarda, A., 1988: Gliotoxin induces apoptosis in macrophages unrelated to its antiphagocytic properties. J Biol.Chem., 263 (34), 18493-18499
- Weindling, R. und Emerson, O.H., 1936: The isolation of a toxic substance from the culture filtrate of *Trichoderma*. Phytopathology, 26, 1068-1070
- Weiser, M., 1990: Ethologische und neurobiologische Untersuchungen zur Wirkungsweise der Mykotoxine Penitrem A, Verruculogen und Fumitremorgen B. Dissertation, Univ. Bayreuth
- Weißbach, F., 1993: Grünfutter und Grünfutterkonservate. In: Futtermittelkunde, Gustav Fischer Verlag Jena, Jena, Stuttgart, 4., 74-154 , 3-334-00384-1
- Wenehed, V.; Solyakov, A.; Thylin, I.; Haggblom, P.; Forsby, A., 2003: Cytotoxic response of *Aspergillus fumigatus*-produced mycotoxins on growth medium, maize and commercial animal feed substrates. Food Chem.Toxicol., 41 (3), 395-403
- White, E.P.; Smith, G.S.; di Menna, M.E.; Mortimer, P.H., 1980: Absorption and translocation of *Penicillium tremorgens* by ryegrass plants. N.Z.Vet.J., 28, 123-124

- Wichmann, G.; Herbarth, O.; Lehmann, I., 2002: The mycotoxins citrinin, gliotoxin, and patulin affect interferon-gamma rather than interleukin-4 production in human blood cells. *Environ Toxicol.*, 17 (3), 211-218
- Williams, T.I., 1952: Some chemical properties of helvolic acid. *Biochem.J.*, 51 (4), 538-542
- Willingale, J.; Perera, K.P.; Mantle, P.G., 1983: An intermediary role for the tremorgenic mycotoxin TR-2 in the biosynthesis of verruculogen. *Biochem.J.*, 214 (3), 991-993
- Wu, X.F.; Fei, M.J.; Shu, R.G.; Tan, R.X.; Xu, Q., 2005: Fumigaclavine C, an fungal metabolite, improves experimental colitis in mice via downregulating Th1 cytokine production and matrix metalloproteinase activity. *Int.Immunopharmacol.*, 5 (10), 1543-1553
- Yamada, A.; Kataoka, T.; Nagai, K., 2000: The fungal metabolite gliotoxin: immunosuppressive activity on CTL-mediated cytotoxicity. *Immunol.Lett.*, 71 (1), 27-32
- Yamazaki, M. und Fujimoto, H., 1975: Crystal structure and absolute configuration of fumitremorgin B, a tremorgenic toxin from *Aspergillus fumigatus* Fres. *Tetrahedron Letters*, 1 (1), 27-28
- Yamazaki, M.; Fujimoto, H.; Okuyama, E., 1977: Structure of tryptoquivaline C (FTC) and D (FTD). Novel fungal metabolites from *Aspergillus fumigatus*. *Chem.Pharm.Bull.(Tokyo)*, 25 (10), 2554-2560
- Yamazaki, M.; Fujimoto, H.; Okuyama, E., 1978: Structure determination of six fungal metabolites, tryptoquivaline E, F, G, H, I and J from *Aspergillus fumigatus*. *Chem.Pharm.Bull.(Tokyo)*, 26 (1), 111-117
- Yamazaki, M.; Okuyama, E.; Maebayashi, Y., 1979a: Isolation of some new tryptoquivaline-related metabolites from *Aspergillus fumigatus*. *Chem.Pharm.Bull.(Tokyo)*, 27 (7), 1611-1617
- Yamazaki, M.; Sasago, K.; Miyaki, K., 1974: The structure of fumitremorgin B (FTB), a tremorgenic toxin from *Aspergillus fumigatus* Fres. *J.C.S.Chem.Comm.*, 408-409
- Yamazaki, M.; Shigetoshi, S.; Ken-Ichi, K., 1979b: Neurological studies on fumitremorgin A, a tremorgenic mycotoxin, on mice. *J Pharm.Dyn.*, 2, 119-125
- Yamazaki, M.; Suzuki, S.; Miyaki, K., 1971: Tremorgenic toxins from *Aspergillus fumigatus* Fres. *Chem.Pharm.Bull.(Tokyo)*, 19 (8), 1739-1740
- Yang, W.; Kim, W.S.; Fang, A.; Demain, A.L., 2003: Carbon and nitrogen source nutrition of fumagillin biosynthesis by *Aspergillus fumigatus*. *Curr.Microbiol.*, 46 (4), 275-279
- Yoshizawa, T.; Morooka, N.; Sawada, Y.; Udagawa, S.I., 1976: Tremorgenic mycotoxin from *Penicillium paraherquei*. *Appl Environ Microbiol.*, 32 (3), 441-442
- Zhang, Y.; Griffith, E.C.; Sage, J.; Jacks, T.; Liu, J.O., 2000: Cell cycle inhibition by the anti-angiogenic agent TNP-470 is mediated by p53 and p21WAF1/CIP1. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 97 (12), 6427-6432
- Zhao, Y.; Liu, J.; Wang, J.; Wang, L.; Yin, H.; Tan, R.; Xu, Q., 2004: Fumigaclavine C improves concanavalin A-induced liver injury in mice mainly via inhibiting TNF-alpha production and lymphocyte adhesion to extracellular matrices. *J Pharm.Pharmacol.*, 56 (6), 775-782

---

*Zhou, X.; Zhao, A.; Goping, G.; Hirszel, P.*, 2000: Gliotoxin-induced cytotoxicity proceeds via apoptosis and is mediated by caspases and reactive oxygen species in LLC-PK1 cells. *Toxicol.Sci.*, 54 (1), 194-202

*Zweerink, M.M.; Edison, A.M.; Wells, G.B.; Pinto, W.; Lester, R.L.*, 1992: Characterization of a novel, potent, and specific inhibitor of serine palmitoyltransferase. *J Biol.Chem.*, 267 (35), 25032-25038

## Danksagung

Die Arbeit wurde gefördert vom Bayerischen Staatsministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten.

Mein herzlicher Dank gilt allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Bei Herrn Professor Dr. Dr. Johann Bauer bedanke ich mich für die Überlassung des sehr interessanten Themas, für das in mich gesetzte Vertrauen und die immer faire und angenehme Zusammenarbeit. Sie werden mir immer ein Vorbild sein.

Danken möchte ich auch Herrn Professor Dr. Dr. Heinrich H. D. Meyer für die Übernahme des Koreferats und Herrn Professor Dr. Ruedi Fries für den Prüfungsvorsitz.

Für die konstruktive Zusammenarbeit und das Sammeln des Probenmaterials danke ich ganz herzlich Herrn Dr. Spiekers, Herrn Dr. Richter und allen Mitarbeitern des Instituts für Tierernährung (ITE) der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft sowie den unterstützenden Personen an den Ämtern für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten.

Ich möchte mich herzlich bei Dr. Karsten Meyer für die kreative Zusammenarbeit und die angenehme Arbeitsatmosphäre bedanken.

An alle Kolleginnen und Kollegen am Lehrstuhl für Tierhygiene richte ich ein großes Dankeschön und die Aufforderung, mich mal wieder auf das Oktoberfest mitzunehmen. Im Gegenzug werde ich mich bemühen, hin und wieder einen Kuchen vorbeizubringen.

Liebe Mama, lieber Papa. Danke, dass Ihr mir das ermöglicht habt.

Meine liebe Maya, ich danke Dir für Deine Unterstützung und die Geduld.

Weihenstephan, im November 2009

*Johannes Ostertag*

## Lebenslauf

Name: Johannes Ostertag, geb. Lipovsky  
geboren: 18.01.1981 in Memmingen  
Eltern: Roman Lipovsky  
Edeltraud Lipovsky, geb. Thoma  
wohnhaft in: 85354 Freising  
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung:  
1991 - 2000: Simpert-Kraemer-Gymnasium Krumbach  
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Studium:  
2001 - 2006: Studium der Agrarwissenschaften, Technische Universität  
München  
Studienschwerpunkt: Tierwissenschaften  
Abschluss: Dipl.-Ing. agr. (Univ.)

Berufliche Tätigkeiten:  
03/2006 - 06/2008: Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Lehrstuhl für  
Tierhygiene, Professor Dr. Dr. Johann Bauer, Freising  
seit Juni 2008: Vorbereitungsdienst für den höheren  
Staatsdienst/Referendariat