

***Fusarium* mycotoxins and their derivatives in forage maize and maize silage – analytics, occurrence and impact of the ensiling process**

M. Sc. Tolke Jensen

Berichterstatter: Professor Dr. J.-A. Verreet

Silomais (*Zea mays* L.), welcher üblicherweise vor der Verfütterung durch Silierung konserviert wird, ist weltweit ein wichtiger Bestandteil in Wiederkäuerrationen. Während der gesamten Vegetationszeit ist Silomais anfällig für Infektionen durch phytopathogene Pilze der Gattung *Fusarium* und kann daher mit schädlichen niedermolekularen Produkten des pilzlichen Sekundärstoffwechsels, den so genannten *Fusarium*-Mykotoxinen, kontaminiert sein. Die am häufigsten von *Fusarium* spp. in gemäßigten Regionen der Welt gebildeten Mykotoxine sind Deoxynivalenol (DON) und Zearalenon (ZEN), die hauptsächlich den Verdauungstrakt bzw. das weibliche Fortpflanzungssystem beeinträchtigen. Die Forschung der letzten Jahre hat allerdings gezeigt, dass infizierte Wirtspflanzen oder andere lebende Organismen (z. B. Pilze, Bakterien) die chemische Struktur von *Fusarium*-Mykotoxinen als Teil ihres Abwehrmechanismus verändern und so eine große Anzahl strukturell verwandter Verbindungen freisetzen können. Um das Vorkommen dieser Mykotoxinderivate überwachen zu können, sind zuverlässige und empfindliche Analysemethoden eine Grundvoraussetzung. Aus diesem Grund wurde eine einfache Methode zur gleichzeitigen Bestimmung von DON und ZEN einschließlich ihrer Hauptderivate 3-acetyl-DON (3-AcDON), 15-acetyl-DON (15-AcDON), DON-3-Glucosid (DON3G), deepoxy-DON (DOM-1), α -zearalenol (α -ZEL) und β -zearalenol (β -ZEL) in Silomais und Maissilage entwickelt. Die Probenvorbereitung bestand aus einer einfachen Flüssig/Fest-Extraktion gefolgt von einem Reinigungsschritt unter Verwendung einer nicht retentiven Festphasenextraktionskartusche. Die analytische Trennung und nachfolgende Detektion der *Fusarium*-Mykotoxine erfolgte mittels Flüssigkeitschromatographie gekoppelt mit OrbitrapTM-basierter hochauflösender Massenspektrometrie (Full MS/data dependent MS² Modus). Mit einem Auflösungsvermögen von 70.000 FWHM konnten Vorläufer- und Produktionen mit Massengenauigkeiten $< \pm 5$ ppm identifiziert werden. Die entwickelte Multi-Mykotoxin-Methode wurde gemäß den in der Entscheidung (EC) Nr. 2002/657 der Kommission festgelegten Leistungsmerkmale erfolgreich validiert und die Nachweisgrenzen für Silomais und Maissilage lagen in einem Bereich von 16 - 75 $\mu\text{g}/\text{kg}$ bzw. 11 - 88 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Die Zuverlässigkeit der entwickelten Methode wurde durch die Analyse von in Norddeutschland gesammelten natürlich kontaminierten Silomais- und Maissilageproben bestätigt. In jeder Probe wurden mindestens vier Mykotoxine detektiert, welches das simultane Auftreten von Mykotoxinen in Futtermitteln und somit die Bedeutung einer regelmäßigen Überwachung von nativen als auch modifizierten Mykotoxinen unterstreicht.

Silierung ist ein komplexes Verfahren zur Futterkonservierung, welches auf einer Milchsäuregärung unter anaeroben Bedingungen basiert. Um die Stabilität von *Fusarium*-Mykotoxinen während dieses Prozesses zu untersuchen, wurde künstlich kontaminierter Silomais in Laborsilos für 7, 14, 21, 28 und 90 Tage einsiliert. Die Menge an DON nahm während der Silierung kontinuierlich zu, während die Gehalte der Derivate DON3G und 3-/15-AcDON proportional abnahmen. Da die Summe aus DON, DON3G und 3-/15-AcDON ($\mu\text{mol}/\text{kg}$) während der 90-tägigen Konservierungsperiode konstant war, wurde der DON-Anstieg beim Silieren dem mikrobiellen Abbau von DON-Derivaten zu freiem DON zugeschrieben. Im Gegensatz dazu wurden die Gehalte von ZEN und seinen Derivaten α -ZEL und β -ZEL durch den Silierungsprozess nicht beeinflusst.

Das Vorhandensein mehrerer schädlicher *Fusarium*-Mykotoxine in Maissilage stellt ein ernstes Gesundheitsrisiko für Nutztiere dar. Daher stellt die Entwicklung von Strategien zur Remediation kontaminierter Silagen weltweit Gegenstand zahlreicher Studien dar. Ein vielversprechender Ansatz ist die Supplementierung von Mikroorganismen, die Mykotoxine durch Sequestrierung entfernen können. In dieser Arbeit wurden daher vier *Lactobacillus* (L.) -Stämme (*L. plantarum*, *L. paracasei*, *L. buchneri*, *L. diolivorans*) auf ihr Potenzial untersucht, *Fusarium*-Mykotoxine in wässrigen Medien oder in künstlich kontaminierten Maissilagen zu entfernen. Alle getesteten *Lactobacillus*-Stämme hatten die Fähigkeit, beträchtliche Mengen an *Fusarium*-Mykotoxinen *in vitro* zu sequestrieren, wobei die Effizienz stark vom Bakterienstamm abhängig war. Die Inokulation von künstlich kontaminiertem Silomais zum Zeitpunkt der Silierung mit den Bakterienstämmen beeinflusste den pH-Wert und die Menge der Fermentationsprodukte signifikant, jedoch wurde die Gesamtmenge an *Fusarium*-Mykotoxinen ($\mu\text{mol}/\text{kg}$) im Vergleich zur uninokulierten Kontrolle nicht verringert. In Maissilagen, welche mit *L. buchneri* inokuliert waren, konnte bemerkenswerterweise ein partieller Abbau von ZEN zu α -ZEL beobachtet werden.

(Professor Dr. J.-A. Verreet)