

Aus dem Departement für Nutztiere und öffentliches Gesundheitswesen in der
Veterinärmedizin

der Veterinärmedizinischen Universität Wien

Institut für Tierernährung und funktionelle Pflanzenstoffe

(Leiter: Univ.-Prof. Dr.sc.agr. Qendrim Zebeli)

**Untersuchungen zum Einfluss von Zearalenon auf die
Pansenfermentation und Gesundheitsparameter beim Rind**

Diplomarbeit

Veterinärmedizinische Universität Wien

Vorgelegt von

Lena Sophia Grabher

Wien, im Juli 2022

Betreuer:

Dr.agr. Hartinger Thomas Dietmar Said

Institut für Tierernährung und funktionelle Pflanzenstoffe

Departement für Nutztiere und öffentliches Gesundheitswesen in der
Veterinärmedizin

Gutachterin:

Lucke Annegret, Tzt. PhD.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Literaturübersicht	3
2.1	Mykotoxine in Futtermitteln	3
2.1.1	Vorkommen und bevorzugtes Wachstum	3
2.1.2	Bedeutendste Mykotoxine in der Wiederkäuerernährung.....	5
2.1.3	Mykotoxikosen	6
2.1.4	Ko-Korrelation	8
2.1.5	Detoxifizierungskapazität des Pansens	9
2.2	Prävention, Dekontaminations- und Detoxifikationsstrategien	10
2.2.1	Präventionsmaßnahmen	10
2.2.2	Dekontaminations- und Detoxifikationsstrategien	12
2.3	Zearalenon	14
2.3.1	Bildung und Struktur	14
2.3.2	Vorkommen.....	15
2.3.3	Toxikokinetik	16
2.3.4	Toxizität	19
2.4	Hypothesen und Ziele der Untersuchungen	23
3	Materialien und Methoden	25
3.1	Versuchsaufbau	25
3.2	Fütterung und Haltung der Tiere	26
3.3	Untersuchungen und Probennahme	28
3.4	Analytische Verfahren	29
3.5	Statistische Auswertung	30
4	Ergebnisse	31
4.1	Gesundheitsparameter	31
4.1.1	Puls	31
4.1.2	Atemfrequenz.....	31
4.1.3	Innere Körpertemperatur.....	32
4.1.4	Pansenmotorik	33
4.2	Futterraufnahme, Wiederkauaktivität, pH-Wert und SCFA-Konzentration	34

4.2.1	Futteraufnahme und Wiederkauaktivität	34
4.2.2	pH-Wert Pansen	35
4.2.3	SCFA-Konzentration	36
5	Diskussion	39
5.1	Futteraufnahme, Wiederkauaktivität, pH-Wert und SCFA-Konzentration.....	39
5.2	Gesundheitsparameter	41
5.3	Schlussfolgerung und Ausblick	43
6	Zusammenfassung.....	44
7	Abstract.....	46
8	Abkürzungsverzeichnis	48
9	Literaturverzeichnis.....	49
10	Abbildungsverzeichnis.....	58
11	Tabellenverzeichnis	59

1 Einleitung

Mykotoxinbelastungen in Futtermitteln sind weltweit ein bedeutendes Problem. Zearalenon (ZEN) gehört neben Aflatoxinen (AF), Trichothecenen, Ochratoxin A (OTA) und Fumonisinen (FUM) zu den landwirtschaftlich wichtigsten Mykotoxinen (Kemboi et al. 2020, Ogunade et al. 2018). Eine globale Langzeitstudie von Gruber-Dorninger et al. (2019) zeigt, dass 88 % aller weltweit untersuchten Futterproben mindestens ein Mykotoxin enthielten. Zu den Futtermitteln, die am häufigsten mit Mykotoxinen kontaminiert sind, zählen Silage, Weide, Heu, Luzerne, Mais und Weizen (Alonso et al. 2013, Gallo et al. 2015). Wiederkäuer sind Mykotoxinen somit über ihr Grund- und Kraffutter ausgesetzt.

Generell gelten Wiederkäuer als robuster und widerstandsfähiger gegenüber Mykotoxinen im Vergleich zu Monogastriern (Seeling und Dänicke 2005). Das Pansenmikrobiom ist in der Lage einige Mykotoxine vollständig zu inaktivieren und abzubauen und stellt somit eine natürliche Barriere dar (Hussein und Brasel 2001). Ein hoher Kraffutteranteil in der Ration verändert die Zusammensetzung der Pansenmikroorganismen und die Fermentationscharakteristik deutlich, wodurch die Barrierefunktion des Pansens gesenkt wird (Ramos et al. 2021). Verschiedene Mykotoxine können dem mikrobiellen Abbau im Pansen standhalten oder werden sogar in potentere Formen umgewandelt, wie beispielsweise ZEN.

Zearalenon und seine Metabolite besitzen eine östrogenähnliche chemische Struktur, die ihnen die Fähigkeit verleiht, wie das körpereigene steroidale Sexualhormon 17β -Östradiol (E2) zu wirken (European Food Safety Authority 2017, Fink-Gremmels und Malekinejad 2007, Zinedine et al. 2007). Zearalenon wird im Pansen in seine Hauptmetaboliten α -Zearalenol (α -ZEL) und β -Zearalenol (β -ZEL) umgebaut (Dänicke et al. 2005). Im Vergleich zum ursprünglichen ZEN weist α -ZEL eine 60-fach höhere Bindungsaffinität zu den Östrogenrezeptoren auf (European Food Safety Authority 2016). Beim Rind wird ZEN jedoch überwiegend zum weniger reaktiven β -ZEL umgewandelt (Malekinejad, Colenbrander, Fink-Gremmels 2006).

Mehrere Studien haben die Auswirkungen von ZEN und seinen Metaboliten auf die Gesundheit und Leistung von Wiederkäuern untersucht. Reproduktionsstörungen, morphologische und biologische Veränderungen in den Fortpflanzungsorganen sowie reduzierte Milchleistung sind häufig auftretende Reaktionen (Coppock et al. 1990, D'Mello et

al. 1999, Mirocha et al. 1968, Weaver et al. 1986b). Neben der Deregulierung von östrogenen Wirkungskreisen kann ZEN auch Einfluss auf das Pansenmikrobiom und das ruminale Fermentationsmuster nehmen (Dänicke et al. 2005, Petri et al. 2018). Im Gegensatz zu chronischen Folgen, ist über die kurzfristige Beeinflussung der Tiergesundheit nach ZEN-Aufnahme, insbesondere bei nicht adaptierter ruminaler Mikrobepopulation, bisher sehr wenig bekannt. Ziel dieser Arbeit ist es, die akute Wirkung von ZEN auf die Pansenfermentation und die Tiergesundheit anhand bestimmter Gesundheitsparameter bei kraftfutterreich gefütterten Milchkühen zu untersuchen.

2 Literaturübersicht

2.1 Mykotoxine in Futtermitteln

Mykotoxine sind niedermolekulare sekundäre Stoffwechselprodukte, die von filamentösen Pilzen produziert werden und toxische Eigenschaften haben (Bhat et al. 2010). Das Wort Mykotoxin setzt sich zusammen aus „mukes“ (gr. für „Pilze“) und „toxicum“ (lat. für „Gift“). Mykotoxine können sowohl bei Menschen als auch bei Tieren eine toxische Reaktion hervorrufen und einen negativen Einfluss auf Gesundheit und Leistung haben (Fink-Gremmels 2008, Zain 2011, Zinedine et al. 2007).

2.1.1 Vorkommen und bevorzugtes Wachstum

In der Natur kommen mehr als 400 verschiedene Mykotoxine vor (Ogunade et al. 2018). Zu den landwirtschaftlich bedeutendsten Mykotoxinen zählen AF, Trichothecene, OTA, FUM und ZEN, die von Pilzen der Gattungen *Aspergillus*, *Fusarium* und *Penicillium* gebildet werden (Kemboi et al. 2020, Ogunade et al. 2018). Das Auftreten von Pilzen und die Produktion von Mykotoxinen steht in engem Zusammenhang mit landwirtschaftlichen Praktiken und Umweltbedingungen (Medina et al. 2014). Pilze bevorzugen Umgebungen mit hoher Luftfeuchtigkeit, hoher Temperatur und ausreichend Sauerstoff während allen Phasen der Produktion und Lagerung von Futtermitteln (Ogunade et al. 2018). Sie wachsen unter verschiedenen Bedingungen; bei Temperaturen zwischen 10-40 °C und einem pH-Wert von 4-8 sowie bei einer Wasseraktivität über 0.7 (Bhat et al. 2010). Arten der Gattung *Aspergillus* wachsen hauptsächlich in heißem Klima, während *Fusarium*- und *Penicillium*-Pilze mildere Klimazonen bevorzugen (Goncalves et al. 2015).

Die Kontamination von Futtermitteln mit Mykotoxinen kann vor der Ernte, während der Lagerung oder auch erst bei der Fütterung erfolgen. Daraus geht eine Einteilung der Pilzgattungen in Feldpilze und Lagerpilze hervor: *Fusarium* Pilze befallen die Futterpflanzen bereits auf dem Feld und produzieren die Toxine noch vor der Ernte; demgegenüber zählen *Aspergillus* und *Penicillium* zu den Lagerpilzen, die Toxine erst nach der Ernte während der Lagerung produzieren (Bhat et al. 2010).

Den weltweit größten Anteil an Futtermitteln von Wiederkäuern macht Silage aus (Wambacq et al. 2016). Silage gehört neben Weide, Heu und Luzerne zu den Futtermitteln, die am häufigsten mit Mykotoxinen kontaminiert sind (Gallo et al. 2015), genauso wie auch Mais und

Weizen (Alonso et al. 2013). Wie bereits beschrieben, können Futterpflanzen schon vor der Silierung von verschiedensten Pilzen besiedelt sein, die bereits auf dem Feld Mykotoxine produzieren. Während der Ernte und der weiteren Verarbeitung können zusätzlich Pilzsporen aus dem Boden, der Luft oder der Umgebung auf die Futterpflanzen übergehen und Feldpilze (Dogi et al. 2013). Die größte Gefahr stellt jedoch das Eindringen von Sauerstoff in Teile der Silage während der Lagerung oder der Ausfütterung dar. Die Anwesenheit von Sauerstoff kann durch unzureichendes Versiegeln von Silos, beschädigte Silofolien oder -abdeckungen verursacht sein und verschafft den Pilzen ein wachstumsförderndes Klima (Gallo et al. 2015). Silagen werden meistens aus der jährlichen Ernte hergestellt, weshalb die Mykotoxinbelastung von Jahr zu Jahr variieren kann. Auch innerhalb eines kontaminierten Futtermittels sind Mykotoxine sehr ungleichmäßig verteilt und treten in sogenannten Hotspots auf (Alonso et al. 2013). Die wesentliche Bedeutung von Mykotoxinen in Silage wurde erst 2008 von Driehuis et al. beschrieben. Sie konnten ein dreimal häufigeres Vorkommen von Mykotoxinen in silierten Futtermitteln im Vergleich zu anderen Futterbestandteilen nachweisen, was inzwischen von unzähligen Autoren bestätigt wurde (Alonso et al. 2013, Cheli et al. 2013, Driehuis et al. 2018, Ogunade et al. 2018, Wambacq et al. 2016).

Durch die speziesspezifisch zusammengesetzte Ernährung (Silage, Heu, Grünfutter, Kraftfutter, Proteinergänzung) sind Wiederkäuer, verglichen mit Schweinen und Geflügel, einem größeren Risiko von Mykotoxinbelastungen ausgesetzt, da viele verschiedene Ursprungsquellen von Mykotoxinen vorhanden sind (Gallo et al. 2015).

Mykotoxinbelastung in Futtermitteln ist weltweit ein bedeutendes Problem. Im Rahmen einer globalen Studie wurden über 10 Jahre 74821 Futterproben gesammelt und auf AFB₁, FUM, ZEN, Deoxynivalenol (DON), OTA und T-2 Toxin (T-2) untersucht. Das Ergebnis der Studie legt vor, dass 88 % der Futterproben mindestens eines der getesteten Mykotoxine enthielt. Die *Fusarium* Mykotoxine DON, FUM und ZEN wurden in allen analysierten Proben am häufigsten nachgewiesen (64 %, 60 % bzw. 45 %) (Gruber-Dorninger et al. 2019). Müller (2020) analysierten von Januar bis Oktober 2020 Totalmischration (TMR)-Proben aus der Viehhaltung im zentraleuropäischen Raum. In 78 % der Proben wurde ZEN nachgewiesen (n=167), DON trat bei 91 % der Futterproben auf (n=169) und FUM wurde bei 68 % verzeichnet (n=163). Bei 88 % aller Proben war mehr als ein Toxin enthalten. Im gleichen Zeitraum wurde auch Maissilage untersucht mit folgenden Nachweisen: ZEN 63 % (n=207), DON 95 % (n=223), FUM 79 % (n=165). In der Maissilage waren deutlich höhere

Konzentrationen vorhanden (Mittelwerte ZEN 69 mg/kg, DON 571 mg/kg) als in der TMR (Mittelwerte ZEN 37 mg/kg, DON 272 mg/kg). Nicht alle Schimmelpilze produzieren Mykotoxine. Demnach deutet das Vorkommen von Schimmelpilzen in Futtermitteln nicht zwingend darauf hin, dass auch Mykotoxine vorhanden sind. Genauso wenig kann daraus abgeleitet werden, dass in Abwesenheit von Schimmelpilzen keine Mykotoxine vorhanden sind (Zain 2011).

2.1.2 Bedeutendste Mykotoxine in der Wiederkäuerernährung

Aflatoxine (AF) werden von den Arten *Aspergillus flavus* und *Aspergillus parasiticus* gebildet. Das bedeutendste AF ist AF B₁, daneben gibt es noch AF B₂, G₁ und G₂. Pilze der Gattung *Aspergillus* zählen zu den Lagerpilzen und bevorzugen heißes Klima und hohe Feuchtigkeit, weshalb sie in Europa weniger Probleme verursachen. Im Pansen wird AF B₁ abgebaut zu Aflatoxicol, das eine hohe Toxizität hat, und AF M₁, das in die Milch übergehen kann und somit eine Gefahr für den Menschen darstellt. AF haben eine krebserregende Wirkung und schädigen Leber und Immunsystem (Prandini et al. 2009).

Trichothecene werden von *Fusarium*-Pilzen gebildet, die zu den Feldpilzen gehören. Zu den wichtigsten Trichothecenen zählen DON und T-2, die überall auf der Welt zu finden sind. Sie haben einen negativen Effekt auf die Proteinsynthese, wodurch sie speziell sich schnell teilende Zellen schädigen und damit nachteilige Auswirkungen auf das Immunsystem und den Gastrointestinaltrakt haben (Eriksen und Pettersson 2004). Obwohl DON im Pansen zu 94-99 % in den nicht toxischen Metaboliten DOM-1 abgebaut wird, wird es als wichtigen Faktor bei Leistungsverminderung gesehen (Seeling et al. 2006a). Auch T-2-Toxin wird im Pansen schnell metabolisiert und in weniger toxische Bestandteile umgewandelt. Dennoch hat die Aufnahme des Toxins neben den bereits beschriebenen Auswirkungen auch einen negativen Einfluss auf die Pansen besiedelnden Protozoen (Müller 2020).

Zearalenon wird ebenfalls von der Pilzgattung *Fusarium* bereits auf dem Feld produziert. Zearalenon kommt in Europa sowie auch in anderen Teilen der Erde häufig vor, vielfach auch gemeinsam mit DON. Zearalenon weist eine strukturelle Ähnlichkeit zu Östrogen auf, wodurch es die Eigenschaft hat, an Östrogen-Rezeptoren zu binden. Das hat Störungen in allen Bereichen der Reproduktion zur Folge (Minervini und Dell'Aquila 2008). In Kapitel 2.3 wird vertiefend auf Vorkommen, Metabolismus und Wirkungsweise von ZEN eingegangen.

Fumonisine werden von Arten der Gattung *Fusarium* gebildet, hauptsächlich von *Fusarium proliferatum* und *Fusarium verticillioides*. Der bedeutendste Metabolit ist Fumonisin B₁ (FB₁). Andere Fumonisine wie FB₂ und FB₃ kommen meist nur in sehr geringem Ausmaß vor. Die Konzentration von Fumonisinen und auch DON und ZEN als weitere *Fusarium*-Toxine sinkt während des Silierprozesses (Boudra und Morgavi 2008). Im Gegensatz zu vielen anderen Mykotoxinen werden Fumonisine im Pansen nur sehr schlecht abgebaut. Sie können Leber- und Nierenschäden verursachen und cytotoxisch wirken (Gallo et al. 2015).

Ochratoxin A (OTA) ist ein sekundärer Metabolit von einigen Lagerpilzen der Gattungen *Aspergillus* und *Penicillium*. In gemäßigten Klimazonen wird OTA hauptsächlich von *Penicillium*-Arten gebildet. Es kommen mehrere Formen von Ochratoxin vor, die unterschiedliche Grade an Toxizität aufweisen. Ochratoxin A hat eine vorwiegend nephrotoxische Wirkung; es werden aber auch hepatotoxische, teratogene und kanzerogene Wirkungen diskutiert (Mobashar et al. 2010). Bei Schafen wurde beobachtet, dass die Pansenmikroben in der Lage sind eine Konzentration von 500 µg OTA/kg KG innerhalb von 0,63 h zu halbieren und innerhalb von 6 h komplett abzubauen (Xiao et al. 1991).

2.1.3 Mykotoxikosen

Krankheiten, ausgehend von Mykotoxinexposition, werden Mykotoxikosen genannt und betreffen neben Wiederkäuern auch noch andere Tierarten. Der Begriff Mykotoxikose leitet sich aus den Symptomen ab, die durch die orale Aufnahme, Hautkontakt oder Inhalation von Mykotoxinen hervorgerufen werden (Fink-Gremmels 2008). Unter Praxisbedingungen zeigen sich die Auswirkungen von Mykotoxinen meist erst chronisch. In frühen Phasen einer Intoxikation sind die Effekte oft sehr gering und es ist kaum ein Leistungsabfall zu sehen (Goncalves et al. 2015).

Mykotoxikosen wirken sich sowohl auf die Gesundheit als auch auf die Leistungsfähigkeit von Tieren aus und haben schwere wirtschaftliche Verluste zur Folge (Fink-Gremmels 2008). Es gibt zwei Formen von Mykotoxikosen: eine akute Form, die bei der Aufnahme einer hohen Einzeldosis auftritt, und eine chronische Form, die sich nach längerfristigem niedrigem Mykotoxinspiegel zeigt. Die Grenzwerte für eine akute Mykotoxikose liegen bei Milchkühen bei 100 µg/kg für AF, 5 µg/kg für DON, 100 µg/kg für T-2 Toxin, 30 µg/kg für FUM und 400 µg/kg für ZEN (Whitlow und Hagler 2008).

Hussein und Brasel (2001) geben einen guten Überblick über einige bedeutende Mykotoxine in Futtermitteln, deren Metabolismus und gesundheitliche Auswirkungen. Detaillierte Ausführungen zu den Wirkungsmechanismen und Effekten von Mykotoxinen auf Tiere und Menschen sind im Task Force Report No. 139 vom Council for Agricultural Science and Technology (2003) enthalten.

Mykotoxine können sehr unterschiedliche Effekte haben (Tab. 1). Nur ein sehr geringer Anteil davon zeigt sich in klassischen klinischen Symptomen. Der Großteil äußert sich subklinisch, mit verminderter Futteraufnahme, Veränderungen im Stoffwechsel und Wachstum (Fink-Gremmels und Malekinejad 2007, Zinedine et al. 2007), Immunmodulation und gestörter Fruchtbarkeit (Whitlow und Hagler 2005, Zain 2011) sowie vermehrtem Auftreten von Mastitiden und erhöhten Zellzahlen (Müller 2020). Chronische Aufnahme von Mykotoxinen verursacht eine veränderte Pansenfermentation, vermindert den Futterumsatz und wirkt toxisch auf Leber und Niere. Sie führt zu einer höheren Anfälligkeit für Krankheiten, verminderter Reproduktion und verringerter Milchleistung und Milchqualität (Council for Agricultural Science and Technology 2003).

Insgesamt muss berücksichtigt werden, dass die Effekte von Mykotoxinen auf Rinder von unzähligen Faktoren abhängen: (a) vom Toxin (Art, Menge und Dauer des aufgenommenen Mykotoxins, Anzahl anderer Mykotoxine), (b) der Ernährung (Kontaminationsgrad, Futterzusammensetzung, Verdaulichkeit der Trockenmasse, Passagerate, usw.) (c) vom Tier selbst (Tierart, Geschlecht, Alter, Rasse, Gesundheitszustand, Immunstatus) und auch (d) von der Umgebung (Betriebsmanagement, Hygiene, Temperatur, usw.) (Jouany und Diaz 2005). Auch Leistungsstress spielt bei der Anfälligkeit auf Mykotoxine eine große Rolle: Hochleistungskühe reagieren sensibler auf von Mykotoxine als Kühe mit geringerer Leistung, genauso wie auch Tiere, die aufgrund anderer Faktoren wie Stress, Lahmheit oder falscher Fütterung zusätzlich belastet sind (Binder 2007, Goncalves et al. 2015).

Tab. 1. Zusammenfassung der Effekte der bedeutendsten Mykotoxine bei Wiederkäuern.

Toxin	Effekte	Literatur
AF	reduzierte Futtermittelaufnahme und Reproduktion, verminderte Gewichtszunahme, Immunsuppression, verringerte Milchleistung, Leberschäden, karzinogen, teratogen	(Vila-Donat et al. 2018, Whitlow und Hagler 2005)
T-2	reduzierte Futtermittelaufnahme, Hemmung der Proteinsynthese, Immunsuppression, Gastroenteritis, verringerte Milchleistung	(Marin et al. 2013)
DON	Futtermittelverweigerung, Erbrechen, Hemmung der Proteinsynthese, Immunmodulation, verringerte Milchleistung	(Pestka 2007, Rotter et al. 1996)
FUM	verminderte Futtermittelaufnahme, verringerte Milchleistung, Leber- und Nierenschäden	(Gallo et al. 2015, Mathur et al. 2001)
OTA	verminderte Futtermittelaufnahme, verringerte Milchleistung, Gastroenteritis, Nieren- und Leberschäden, teratogen, karzinogen, Bildung freier Radikale und tödliche Vergiftungen	(Loh et al. 2020, Mobashar et al. 2010, Ribelin et al. 1978)
ZEN	Verminderte Futtermittelaufnahme, verändertes Pansenmikrobiom, verringerte Milchleistung, Fruchtbarkeitsstörungen, Vulvaschwellung	(Mirocha et al. 1968, Petri et al. 2018, Zinedine et al. 2007)

2.1.4 Ko-Korrelation

Das gleichzeitige Auftreten von verschiedenen Mykotoxinen in Futtermitteln spielt eine wesentliche Rolle in der Nutztierernährung (Keller et al. 2013, Kosicki et al. 2016). Ein einziges Futtermittel kann von mehreren Pilzen befallen sein, die wiederum meistens mehrere Mykotoxine produzieren können. Zudem ist die Nahrung von Wiederkäuern aus mehreren potenziell kontaminierten Futterkomponenten zusammengesetzt (Alassane-Kpembé et al. 2017). Rodrigues und Naehrer (2012) zeigten in einer dreijährigen Studie, dass in 48 % von 7049 Futterproben weltweit mindestens zwei der folgenden Mykotoxine nachgewiesen werden konnte: DON, AF, ZEN, FUM und OTA. Einige Studien verzeichnen, dass die Kontamination von Futtermitteln mit DON ein Hinweis für die Präsenz weiterer Mykotoxine, vor allem *Fusarium*-Toxine, sein kann (Driehuis et al. 2008a, Sliková et al. 2013). Kosicki et al. (2016) beschreibt DON und ZEN mit 81 % (in 143 beprobten Maissilagen in Polen) als häufigste Mykotoxin-Kombination und Driehuis et al. (2008a) wies in 44 % der untersuchten

Milchviehrationen das gleichzeitige Auftreten von DON und ZEN nach, wobei die beiden Toxine am häufigsten gemeinsam in Maissilage zu finden waren.

Beim gleichzeitigen Auftreten von mehreren Mykotoxinen kann es zu additiven, synergistischen oder antagonistischen Effekten auf den betroffenen Organismus kommen (Speijers und Speijers 2004), wobei additive Effekte den größten Anteil ausmachen (78 %), gefolgt von synergistischen (19 %) und zuletzt antagonistischen Effekten (3 %) (Council for Agricultural Science and Technology 2003). Die Wirkungsweise verschiedener Mykotoxin-Korrelationen wurden von Alassane-Kpembé et al. (2017) im Detail beschrieben. Speziell in Bezug auf Wiederkäuer kam eine *in vitro*-Studie zu den Effekten von DON und ZEN auf die Vermehrung von bovinen Granulosazellen und der Steroidogenese zum Ergebnis, dass die E₂-Produktion durch die Mykotoxinkombination stärker zurück ging (52 %) als bei der alleinigen Exposition von DON oder ZEN (36 % bzw. 22 %). Auch die Zellproliferation wurde durch die Kombination von DON und ZEN negativ beeinflusst. In einer anderen Studie an Ferkeln wurde eine niedrigere Gewichtszunahme festgestellt, nachdem ihnen mit DON, NIV und ZEN belastetes Futter gefüttert wurde. Die Aufnahme von multi-kontaminiertem Futter über einen längeren Zeitraum (28 Tage) führte zu histologischen Veränderungen in Darm, Leber und Lymphorganen der Ferkel (Gerez et al. 2015).

2.1.5 Detoxifizierungskapazität des Pansens

Wiederkäuer sind im Vergleich zu Monogastriern weniger anfällig für bestimmte Mykotoxine, da der Pansen mit seiner mikrobiellen Aktivität in der Lage ist die chemische Struktur von Mykotoxinen zu verändern. Pansenmikroben können manche Toxine erfolgreich abbauen, inaktivieren und binden und so das Tier schützen (Fink-Gremmels 2008, Kemboi et al. 2020, Wambacq et al. 2016). Der Pansen ist besiedelt mit Pilzen, Bakterien, Archaeen und Protozoen, wobei letztere in der Entgiftung von Mykotoxinen die größte Rolle spielen (Goncalves et al. 2015).

Allerdings ist diese Entgiftungseigenschaft begrenzt. Die Detoxifizierungskapazität korreliert mit der Zusammensetzung des Pansenmikrobioms und hängt von Tierart, Rasse, Alter, Geschlecht und zu einem wesentlichen Teil vom Futter und dem Gesundheitszustand des Tieres ab (Kemboi et al. 2020, Kiessling et al. 1984, Upadhaya et al. 2010). Dabei spielt die Zusammensetzung des Futters und vor allem der Anteil an Krafffutter eine zentrale Rolle. Ein hoher Krafffutteranteil (50-60 %) verändert das Pansenmikrobiom deutlich (Klevenhusen et al.

2017, Ramos et al. 2021) und zwar dahingehend, dass die Konzentration an Propionat und Acetat im Pansen zunehmen (Zhang et al. 2017). Ein plötzlicher Umstieg auf eine kraftfutterreiche Ration führt zu einem erhöhten Risiko von metabolischen Erkrankungen, wie einer subakuten ruminalen Azidose (SARA, subclinical acute rumen acidosis), die wiederum chronische Entzündungen, Lahmheit, Mastitis und Hufrehe mit sich bringen kann (Zebeli und Metzler-Zebeli 2012). Eine *in vitro* Studie zeigt, dass Pansenmikroben DON bei physiologischem pH-Wert innerhalb von 24 Stunden vollständig in die detoxifizierte Form DOM-1 abgebaut haben. Hingegen unter SARA Bedingungen sind nach 24 Stunden noch mehr als 80 % DON im Pansen vorhanden (Debevere et al. 2020).

2.2 Prävention, Dekontaminations- und Detoxifikationsstrategien

Es wurden zahlreiche Strategien entwickelt, um die Exposition von Tieren gegenüber Mykotoxinen zu verhindern. Wie bereits beschrieben, können Mykotoxine auf dem Feld, während der Ernte oder der Lagerungsperiode entstehen. Daraus erfolgt die Gliederung der Präventionsstrategien in Maßnahmen vor, während und nach der Ernte. Die Anwendung von idealen landwirtschaftlichen Methoden (good agricultural practices, GAP) ist eine der wichtigsten Maßnahmen für die Vermeidung von Mykotoxinbildung (Kabak et al. 2006). Allerdings kann auch das beste landwirtschaftliche Management eine Mykotoxinkontamination nicht gänzlich verhindern, da bestimmte Mykotoxin-begünstigende Faktoren außerhalb der Kontrollmöglichkeiten des Menschen liegen, z.B. die Wetterbedingungen oder der Bodentyp (Jouany 2007). Sobald Getreide mit Mykotoxinen kontaminiert ist, sind die Strategien zur Begrenzung der negativen Auswirkungen auf die Tiere limitiert, weswegen vorbeugende Konzepte als entscheidend gegen die Bildung von Mykotoxinen in Futtermitteln gelten. (Awad et al. 2010).

2.2.1 Präventionsmaßnahmen

Vor der Ernte. Gewissenhaftes Feldmanagement und geeigneter Pflanzenanbau können die Umgebung der Pflanzen dahingehend beeinflussen, dass das Wachstum und die Vermehrung von Pilzen erschwert sind (Kabak et al. 2006). Zu den GAP vor der Ernte zählen eine günstige Fruchtfolge, Bodenbearbeitung und -düngung, die Wahl weniger anfälligerer Sorten sowie korrekte Bewässerung und Einsatz von Insektiziden und Fungiziden (Edwards 2004, Gallo et al. 2015, Jard et al. 2011, Jouany 2007, Kabak et al. 2006, Whitlow und Hagler 2005). Auch die Entfernung von infizierten Pflanzenresten auf dem Feld vermindert die Pilzbelastung für

die Folgeernte (Maiorano et al. 2008). Die Bewässerung kann abhängig vom Wachstumsstadium der Pflanzen sowohl hemmend als auch fördernd auf Pilzbefall wirken: Während der Wachstumsphase kann eine ausgiebige Bewässerung den Pflanzen viel Stress nehmen und somit eine Pilzinfektion verhindern. Hingegen während der Blüte und der Reifung begünstigt übermäßige Bewässerung eine Kontamination mit *Fusarium*-Pilzen (Kabak et al. 2006). Beim Verwenden von biologischen oder chemischen Fungiziden ist der Zeitpunkt des Einsatzes und die Dosis des Fungizids ausschlaggebend für den Wirkungsgrad (Wambacq et al. 2016). Als weitere Strategie können auf dem Feld nicht-toxigene Pilze als Antagonisten eingesetzt werden, die sich dann kompetitiv in derselben ökologischen Nische niederlassen wie toxigene Pilze. So kann die Kontamination mit toxigenen Pilzen auf dem Feld reduziert werden. In den USA ist der Einsatz von zwei nicht-toxigenen Stämmen von *Aspergillus flavus* für die Verdrängung von Aflatoxin weit verbreitet (Ogunade et al. 2018). Auch antagonistische Bakterien und Hefen könnten zu einer Reduzierung der Mykotoxinkonzentration vor der Ernte verhelfen (Kabak et al. 2006). Wie bereits beschrieben, haben auch Wetterbedingungen einen bedeutenden Einfluss auf die Entwicklung von Pilzen auf dem Feld. Feuchtes Klima während der Blütezeit steigert die *Fusarium*-Infektion an den Ähren. Auch durch Dürre geschädigte Pflanzen sind anfälliger (Kabak et al. 2006). Das Wachstum von *Fusarium*-Pilzen jedoch wird vom Feldmanagement stärker beeinflusst als vom Klima (Wambacq et al. 2016).

Ernte. Auch Faktoren in Zusammenhang mit der Ernte der Futterpflanze sind ausschlaggebend für die spätere Mykotoxinbelastung. Der Fokus liegt beim Wachstumsstadium, dem Erntezeitpunkt, der Schnitthöhe und auch Bodenverunreinigungen müssen berücksichtigt werden (Jard et al. 2011, Kabak et al. 2006, Maiorano et al. 2008, Teller et al. 2012). Um das Risiko eines Mykotoxinbefalls weiter zu verringern, ist eine sofortige Lagerung der geernteten Futterpflanzen notwendig. Verzögert sich die Lagerung, könnten Temperatur und Feuchtigkeit die Bedingungen für Pilzwachstum begünstigen (Jouany 2007).

Nach der Ernte. Korrektes Silomanagement und die GAP nach der Ernte beinhalten einen korrekten Trockenmasse (TM)-Gehalt während der Lagerung, richtige Partikelgröße, die Verwendung von Additiven, an die Herde angepasste Silogröße, schnelles Befüllen der Silos, optimale Massenkompensation, vollständiges Versiegeln der Silos, schneller Abfall des pH-Wertes und die Aufrechterhaltung der anaeroben Bedingungen (Dunière et al. 2013, Jouany 2007). Auch die Lagertemperatur spielt eine bedeutende Rolle, so kann der Temperaturanstieg von 2-3 °C des gelagerten Getreides ein Hinweis auf Schimmel- oder

Insektenbefall sein (Kabak et al. 2006). Viele biologische oder chemische Zusatzstoffe, die für eine Steigerung der Fermentation und das Senken des pH-Wertes verwendet werden, wirken auch einem potentiellen Pilzwachstum entgegen (Jouany 2007). Die Verwendung von Silageadditiven und antagonistischen Bakterien, Pilzen und Hefepilzen wirkt sich negativ auf die Ausbreitung von Schimmel und die Bildung von Mykotoxinen aus. Antagonistische Hefepilze und auch Milchsäurebakterien, mit ihren antimykotischen Metaboliten, sind ein wirksames Mittel gegen Schimmelwachstum und Mykotoxine. Der Rückgang der Mykotoxinproduktion während der Lagerung durch biologische oder chemische Zusatzstoffe ist auf mikrobielle Konkurrenz, Nährstoffausschöpfung und einen niedrigen pH-Wert zurückzuführen (Kabak et al. 2006).

2.2.2 Dekontaminations- und Detoxifikationsstrategien

Es ist nicht immer möglich eine Mykotoxinkontamination zu verhindern, sodass auch Strategien zur Dekontamination und Detoxifikation gegeben sein müssen (Bata und Lásztity 1999). Es gibt unterschiedliche Möglichkeiten Mykotoxin-kontaminierte Futtermittel zu dekontaminieren oder die Exposition gegenüber Mykotoxinen zu reduzieren. Eine Detoxifizierungsstrategie gilt als wirksam, wenn sie in der Lage ist Mykotoxine zu entfernen oder zu inaktivieren, ohne toxische Rückstände zu produzieren und ohne Eigenschaften, Nährwert und Schmackhaftigkeit des Produktes zu beeinträchtigen (Bata und Lásztity 1999, Čolović et al. 2019). Detaillierte Ausführungen der verschiedenen Methoden zur Dekontamination und Detoxifikation wurden von mehreren Autoren zusammengetragen (Čolović et al. 2019, Jard et al. 2011, Jouany 2007, Kabak et al. 2006). Die nachfolgenden Methoden sind in der Europäischen Union zugelassen.

Ganz grundlegend wird unterschieden zwischen der Bearbeitung des Rohproduktes und der Hinzugabe von Zusatzstoffen zum Futtermittel. Die Bearbeitung des Rohproduktes beinhaltet neben dem Aussortieren von beschädigten Pflanzenteilen auch das Waschen, Schälen und Mahlen des kontaminierten Getreides (Jard et al. 2011). Da sich Mykotoxine in Getreide vor allem in der Schale der Getreidekörner befinden, wird der Mykotoxingehalt durch den Schälvorgang deutlich vermindern (Jouany 2007). Auch die Kombination von Sortierverfahren kann die Mykotoxinkonzentration verringern. In einer Studie konnte der DON-Gehalt in Weizen durch diese Methode um 70-90 % reduziert werden (Vasanthi und Bhat 1998). Weiters können zur Inaktivierung der vorhandenen Mykotoxine physikalische Methoden, wie Wärmebehandlung und Bestrahlung des Getreides (mit γ -Strahlen) und chemische

Behandlungen (mit Säuren, Basen, Oxidations- und Reduktionsmittel usw.) wirksam sein (Jouany 2007). Viele physikalische und chemische Prozesse haben jedoch nur eine begrenzte Wirksamkeit, gehen mit möglichen Verlusten im Nährstoffgehalt einher und sind wirtschaftlich nicht tragbar (Bata und Lásztity 1999). Aufgrund dessen hat die biologische Behandlung von Mykotoxinen an Bedeutung gewonnen.

Die Verwendung von Mykotoxin-Detoxifizierungsmitteln als Futterzusatzstoffe ist in der Europäischen Union seit 2009 zur Vermeidung von Mykotoxikosen bei Nutztieren zugelassen. Die Verordnung definiert die genehmigten Substanzen wie folgt: „Stoffe, die die Aufnahme von Mykotoxinen unterdrücken oder verringern, ihre Ausscheidung fördern oder ihre Wirkungsweise verändern können.“ (Europäische Kommission 13.5.2009). Es werden zwei Wirkungsgruppen unterschieden: adsorbierende Mittel (Mykotoxin-Bindemittel) und Biotransformationsmittel (Mykotoxin-Modifikatoren). Bindemittel heften Mykotoxine an ihre Oberfläche an, um die Absorption der Toxine im Intestinaltrakt zu verhindern, während Mykotoxin-Modifikatoren Mykotoxine in nicht oder weniger toxische Metaboliten umwandeln (Boudergue et al. 2009).

Adsorptionsmittel können anorganisch sein (z.B. Bentonite) oder organisch und aus Zellwandbestandteilen von Mikroorganismen bestehen (z.B. Hefepilze, Milchsäurebakterien). Eine Kombination aus organischen und anorganischen Bindemitteln zeigt eine deutlich höhere Komplexbildung zwischen den Adsorptionsmitteln und den Mykotoxinen als die alleinige Anwendung von nur organischen oder anorganischen Bindemitteln (Zhu et al. 2016). Die verschiedenen Adsorptionsmittel wurden von Vila-Donat et al. (2018) ausführlich beschrieben. Für manche Mykotoxine, wie beispielsweise DON, gibt es kaum effektive Adsorptionsmittel und die Detoxifikation durch Biotransformation und biologischen Abbau wird zur wichtigsten Entgiftungsstrategie (Čolović et al. 2019).

Biotransformation oder Biodegradation kann durch den Einsatz bestimmter Enzyme oder Enzym-produzierender Mikroorganismen erreicht werden, die das Potenzial haben, Mykotoxine durch Metabolisierung in nicht oder weniger toxische Komponenten umzuwandeln oder abzubauen (Awad et al. 2010). Die Wirksamkeit von mikrobiellem oder enzymatischem Abbau hängt sowohl vom jeweiligen Enzym/Mikroorganismus als auch von externen Faktoren ab, z.B. pH-Wert, Temperatur und Anwesenheit von Sauerstoff, die das Wachstum, das Detoxifizierungspotenzial, die Stabilität und die Sicherheit der Entgiftungs-Metaboliten der

eingesetzten Mikroben beeinflussen (Jard et al. 2011, Zhu et al. 2016). Eine Bandbreite an Mikroorganismen aus der Gruppe der Bakterien, Schimmelpilze und Hefen haben Eigenschaften zur Biotransformation von Mykotoxinen. Allerdings sind nur wenige von ihnen charakterisiert und sowohl in *in vitro* als auch in *in vivo* Studien in ihrer Fähigkeit zum Abbau von Mykotoxinen bestätigt. Eine Herausforderung im Zusammenhang mit der Verwendung von Mykotoxin abbauenden Enzymen ist die Ko-Korrelation von Mykotoxinen. Die Kombination verschiedener Abbaustrategien, wie beispielsweise Mischungen von Adsorptionsmitteln, Mikroorganismen und Enzymen, könnte zu einer höheren Wirksamkeit führen (Loi et al. 2017).

Für die Detoxifikation von ZEN deuten neuere Studien darauf hin, dass die kombinierte Verwendung von Probiotika wie *Bacillus spp.*, *Lactobacillus spp.* und Hefe zusammen mit ZEN-abbauenden Enzymen eine neue Strategie zur Entgiftung und zum biologischen Abbau von ZEN sein könnte (Chen et al. 2019, Wang et al. 2019).

2.3 Zearalenon

2.3.1 Bildung und Struktur

Zearalenon ist ein nichtsteroidales östrogenes Mykotoxin, das von vielen *Fusarium*-Pilzen gebildet wird. *Fusarium graminearum* (*Gibberella zeae*), *F. culmorum*, *F. crookwellense*, *F. semitectum* und *F. equiseti* sind die Hauptproduzenten von ZEN und kontaminieren Getreidekulturen weltweit. In gemäßigten und warmen Ländern gehören sie zu den üblichen Bodenpilzen (Bennett und Klich 2003). Zearalenon wurde erstmals 1962 von Strob et al. von *Fusarium*-kontaminiertem Mais isoliert. Die chemische Struktur wurde von Urry et al. (1996) enthüllt (Abb. 1), der auch die Namensgebung prägte. Das *Fusarium*-Toxin erhielt den Trivialnamen Zearalenon als Kombination aus *Gibberella zeae*, chemischen Eigenschaften wie "ral" für das Resorcyssäurelacton, "en" für die olefinische Doppelbindung und "one" für die Ketogruppe. Zearalenon ist ein Resorcyssäurelacton mit der chemischen Formel $C_{18}H_{22}O_5$ (Urry et al. 1996). Es hat einen Schmelzpunkt von 164-165 °C und ist während der Lagerung, des Mahlens, der Verarbeitung und des Kochens stabil (European Food Safety Authority 2017). Metzler (2011) führt eine Empfehlung für die Abkürzung von ZEN und seinen Metaboliten an, die in dieser Arbeit berücksichtigt werden. In ihrer Gesamtheit werden ZEN und seine Metaboliten als resorcylic acid lactones (RALs) bezeichnet.

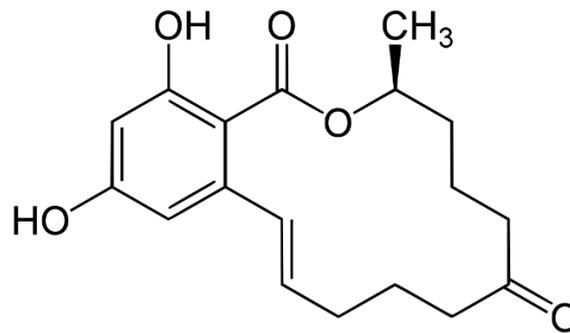


Abb. 1. Chemische Strukturformel von Zearalenon (nach Vorlage von Minervini und Dell'Aquila (2008)).

2.3.2 Vorkommen

Mais und Weizen gehören zu den Getreidearten, die am häufigsten mit ZEN und seinen Metaboliten kontaminiert sind. Aber auch Reis, Gerste und Hafer können betroffen sein (Zinedine et al. 2007). Als Feld-Toxin wird ZEN hauptsächlich vor der Ernte gebildet, allerdings können schlechte Lagerbedingungen eine weitere Synthese fördern. In Jahren mit ungünstigen klimatischen Bedingungen ist eine höhere Mykotoxinbelastung zu sehen (Seeling und Dänicke 2005). *Fusarium*-Pilze bevorzugen eine Temperatur von 24-26 °C, einen pH-Wert zwischen 2.4 und 3.0 und eine Wasseraktivität von 0.9 (Sweeney und Dobson 1998). Unter diesen Umweltbedingungen können sie wachsen und Mykotoxine produzieren. Zur Bestimmung von Mykotoxinen in Futtermitteln wird die Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS) als nützliche Methode angesehen (Tanaka et al. 2000).

Das Vorkommen von ZEN in Getreidekulturen und Lebensmitteln wurde in vielen Regionen der Welt nachgewiesen. Gruber-Dorninger et al. (2019) analysierten im Zeitraum zwischen 2008 und 2017 weltweit 74821 Futterproben (Mais, Weizen, Gerste, Sojabohnen und Einzelfuttermittel) aus 100 Ländern, von denen 61413 Proben auf das Vorkommen von ZEN untersucht wurden. Zearalenon wurde in 45 % der Futterproben (n = 27559) detektiert, wobei der Median der nachgewiesenen Konzentrationen 55 µg/kg betrug. Dies stimmt mit dem Ergebnis einer früheren Langzeitstudie überein, bei der ebenfalls 45 % von weltweit 5402 Futterproben positiv auf ZEN getestet wurden. Allerdings lag die durchschnittliche Konzentration mit 233 µg/kg damals deutlich höher (Rodrigues und Naehrer 2012). Die Europäische Kommission hat einen Richtwert von 500 µg/kg für Ergänzungs- und

Einzel Futtermittel für Kälber, Milchkühe und Schafe festgelegt (Europäische Kommission 2006).

Die in Europa verfügbaren Daten deuten darauf hin, dass Mais die am stärksten gefährdete Getreideart mit hoher Inzidenz und hohem Kontaminationsgrad mit ZEN ist. In Deutschland konnte ZEN in 85 % der Mais-Proben (mean 48 µg/kg), 63 % der Weizen-Proben (mean 15 µg/kg), 43 % der Heu-Proben (mean 24 µg/kg) und 24 % der Hafer-Proben (mean 21 µg/kg) nachgewiesen werden (Schollenberger et al. 2006). Driehuis et al. (2008b) berichteten über ZEN-Kontaminationen in 70 von 140 Maissilage-Proben (50 %) und 16 von 120 Grassilage- (13 %) aus den Niederlanden mit durchschnittlichen Konzentrationen von 146 bzw. 180 µg/kg. Eine weit höheres Vorkommen konnten Kosicki et al. (2016) in einer 4-jährigen Studie in Polen feststellen: Zearalenon war in 96 % (n = 1329) aller analysierten Futterproben (Mais, Maissilage, Getreidekörner und Einzel Futtermittel von Schweinen, Geflügel und Kühen) vorhanden. Die am häufigsten vorkommende Mykotoxin-Kombination DON + ZEN war in allen Proben zu 81 % bis 99 % zu finden. Goertz et al. (2010) berichteten, dass 27 % von 44 Maisproben aus Deutschland im Jahr 2006 und 93 % von 40 Maisproben im Jahr 2007 mit ZEN kontaminiert waren (mittlere Konzentrationen von 70 µg/kg bzw. 480 µg/kg). Gallo et al. (2015) errechnete aus den Ergebnissen mehrerer Studien zum Vorkommen von ZEN in Maissilage eine durchschnittliche Kontamination von 52 % der analysierten Proben mit einer durchschnittlichen Belastung von unter 500 µg/kg. Whitlow und Hagler (2005) analysierten 461 Maissilage-Proben aus den Vereinigten Staaten, von denen 30 % mit ZEN belastet waren. Die durchschnittliche Konzentration betrug 525 µg/kg und überschritt damit den europäischen Richtwert.

2.3.3 Toxikokinetik

Die Toxikokinetik von ZEN umfasst den Weg und die Geschwindigkeit in der ZEN in den Körper gelangt, einschließlich seiner Absorption, Verteilung, den Metabolismus im Körper und schließlich die Ausscheidung. Zearalenon wird über kontaminierte Futtermittel aufgenommen, schnell absorbiert, in verschiedene Organe verteilt und vor allem über den Weg der Galle rasch wieder ausgeschieden. Die Verstoffwechslung von ZEN findet hauptsächlich im Gastrointestinaltrakt und in der Leber statt und führt zu reduzierten und konjugierten Formen (Metaboliten) (Rai et al. 2020). Die 5 bekannten Metaboliten von ZEN sind α -Zearalenol (α -ZEL), β -Zearalenol (β -ZEL), α -Zearalanol (α -ZAL), β -Zearalanol (β -ZAL) und Zearalanon

(ZAN). Zearalenon, α - und β -ZEL unterscheiden sich in ihrer östrogenen Potenz. Um die Unterschiede in der Wirkungskraft einzustufen, hat das CONTAM Panel der EFSA (European Food Safety Authority 2016) die ZEN-Metaboliten in Potenzfaktoren (relative potency factors, RPF) in Bezug auf ZEN eingeordnet. Mit einem RPF von 1.0 für ZEN als jeweiligen Bezugswert wurden α -ZEL und β -ZEL mit einem RPF von 60.0 und 0.2 eingestuft, sodass α -ZEL damit eine 60-fach höhere Bindungsaffinität zu den Östrogenrezeptoren aufweist als ZEN. Im Unterschied dazu hat β -ZEL eine geringere Wirkungskraft als das parentale ZEN. Folglich wird die Umwandlung von ZEN in α -ZEL als Bioaktivierungsreaktion angesehen, während die Umwandlung in β -ZEL eher als Inaktivierungsreaktion betrachtet werden kann (Malekinejad, Maas-Bakker, Fink-Gremmels 2006).

Nach Kiessling und Pettersson (1978) werden für ZEN zwei Hauptwege der Biotransformation bei Tieren angenommen:

- 1) Reduktionsreaktion: ZEN wird – katalysiert durch 3α - und 3β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase (HSD) – zu α - und β -ZEL und in geringen Mengen zu α - und β -ZAL reduziert.
- 2) Konjugationsreaktion: ZEN und seinen reduzierten Metaboliten werden mit Glucuronsäure konjugiert, katalysiert durch UDP-Glucuronosyltransferase (UDPGT).

Im Phase-I-Metabolismus in der Leber wird die Ketogruppe reduziert und führt zur Bildung von α -ZEL und/oder seinem stereoisomeren Verwandten β -ZEL. Wird stattdessen die olefinische Doppelbindung reduziert, wird ZAN gebildet. Findet sowohl die Reduktion der Ketogruppe als auch der Doppelbindung statt, kommt es zur Bildung von α -ZAL und β -ZAL (European Food Safety Authority 2017). Beim Phase-II-Metabolismus können ZEN oder die Phase-I-Metaboliten mit Glucuronsäure oder Sulfaten konjugieren. Dabei entstehen modifizierte Formen von ZEN. Beim Rind wird ZEN im Pansen überwiegend zu β -Zearalenol (β -ZEL) und weniger häufig zu α -ZEL umgewandelt (European Food Safety Authority 2017, Malekinejad, Colenbrander, Fink-Gremmels 2006).

Mit kontaminiertem Futter oral aufgenommenes ZEN kann auf der prä-absorptiven (ingestiven) Ebene, auf der absorptiven (mukosalen) und post-absorptiven (metabolischen) Ebene strukturelle Veränderungen erfahren. Da Mikroorganismen die Hauptakteure bei der Modifikation der aufgenommenen RALs auf der präabsorptiven Ebene sind, muss generell zwischen monogastrischen und polygastrischen Nutztieren unterschieden werden (Dänicke

und Winkler 2015). Pansenmikroorganismen sind in der Lage ZEN umzuwandeln, wobei Protozoen die wichtigste Fraktion darstellen und Bakterien in Anwesenheit von ZEN im Pansen hinsichtlich der Detoxifikation nahezu inaktiv bleiben (Kiessling et al. 1984).

Mehrere *in vitro*-Studien mit Pansensaft von Rindern zeigen, dass ZEN im Pansensaft hauptsächlich zu den Metaboliten α -ZEL und β -ZEL abgebaut wird (Kiessling et al. 1984) und ein Redox-Gleichgewicht zwischen diesen Substanzen besteht (Valenta und Vemmer 1996). Die anderen Metaboliten ZAN, α -ZAL und β -ZAL waren entweder nicht nachweisbar oder in viel niedrigeren Konzentrationen vorhanden. Da die Hauptmetaboliten α - und β -ZEL weiterhin östrogene Wirkung haben, kann dieser Vorgang nicht als Entgiftung angesehen werden. In einer *in vivo*-Studie mit Rindern wurden 89 % des aufgenommenen ZENs (0.1 mg ZEN/kg) im proximalen Duodenum als ZEN (30 %), α -ZEL (30 %) und β -ZEL (40 %) wiedergefunden. Damit wurde das relative östrogene Potential erhöht, wohingegen α -ZAL, β -ZAL und ZAN nicht nachweisbar waren (Dänicke et al. 2005).

Es ist bekannt, dass die Höhe der Futtermenge und folglich die Verweildauer des Futters im Pansen den Nährstoffumsatz beeinflussen kann. In einer darauf abzielenden *in vivo*-Studie wurde bestätigt, dass auch der Metabolismus von ZEN zu α -ZEL und β -ZEL im Pansen mit zunehmender Futtermenge und ZEN-Aufnahme und damit einer verkürzten Passagerate limitiert ist (Seeling et al. 2005).

Die hepatische Reduktion von ZEN wurde durch Inkubation von Leberhomogenaten nachgewiesen mit dem Ergebnis, dass Rinder ZEN vorwiegend zu β -ZEL umwandeln (Malekinejad, Maas-Bakker, Fink-Gremmels 2006). In der Galle von Wiederkäuern machte β -ZEL mit 68 % den größten Anteil der insgesamt nachgewiesenen Metaboliten aus. ZEN war zu 24 % und α -ZEL zu 8 % in der Galle vorhanden (Dänicke et al. 2002). Die Konzentrationen von ZEN und seinen Metaboliten in Leber und Galle steigen mit der verabreichten Dosis an (Döll et al. 2003). In Übereinstimmung damit, ist der vorherrschende Metabolit in Urin und Kot von Wiederkäuern β -ZEL. Dies bestätigte Mirocha et al. (1981), indem sie in Harn- und Fäkalausscheidungen von Kühen 29 bzw. 25 % ZEN, 20 bzw. 12 % α -ZEL sowie 51 bzw. 58 % β -ZEL der aufgenommenen ZEN-Konzentration fand. Die größten Mengen aller Metaboliten im Urin lagen in konjugierter Form vor. In einer anderen *in vivo*-Studie mit Färsen wurden 80 % des aufgenommenen ZEN (2.74 mg ZEN/Tier und Tag über 84 Tage) im Urin als α -ZEL und β -ZEL im Verhältnis 1:8 ausgeschieden (Kleinova et al. 2002). Im Gegensatz dazu konnten

Seeling et al. (2005) im Urin weder ZEN noch seine Metaboliten nachweisen (75–1125 mg ZEN/Kuh/Tag).

Nach der Verfütterung von höheren Dosen an laktierende Kühe können ZEN, α -ZEL und β -ZEL auch über die Milch ausgeschieden werden. Die höchsten Konzentrationen in Milch wurden von Prelusky et al. (1990) gefunden (6.1 mg/l ZEN, 4 mg/l α -ZEL und 6.6 mg/l β -ZEL), nachdem einer Kuh eine orale Einzeldosis von 6000 mg ZEN verabreicht wurde. Mirocha et al. (1981) fütterten eine Kuh 7 Tage lang mit einem Futter, das eine ZEN-Konzentration von 25 mg/kg enthielt und fanden Gesamtückstände (ZEN, α -ZEL und β -ZEL) von 1.3 mg/l in der Milch, welche 0.7 % des aufgenommenen ZEN entsprechen. Hingegen konnte bei drei laktierenden Kühen, die für 21 Tage mit 50 oder 165 mg ZEN gefüttert wurden, weder ZEN noch seine Metaboliten in der Milch nachgewiesen werden (< 0.5 mg/l) (Prelusky et al. 1990). Auch Seeling et al. (2006) konnten weder ZEN noch seine Metaboliten in den Milchproben nachweisen (75 – 1125 mg ZEN/Kuh/Tag). In einer Studie von Dänicke et al. (2002) lagen die Konzentrationen von ZEN und seine Metaboliten in Muskeln, Leber, Niere, Fett aus der Nierenhöhle und Rücken Fett unterhalb der Nachweisgrenze.

Im Allgemeinen wird das Übergehen von ZEN in tierische Produkte als vernachlässigbar gesehen. Die geringe Übertragungsrate in Milch und Gewebe bestätigt, dass die Exposition des Menschen über Lebensmittel tierischen Ursprungs viel geringer ist als die direkte Exposition über kontaminiertes Getreide (Fink-Gremmels und Malekinejad 2007, Flores-Flores et al. 2015).

2.3.4 Toxizität

Zearalenon und seine Metaboliten besitzen eine östrogenähnliche chemische Struktur. Diese strukturelle Ähnlichkeit verleiht ihm die Fähigkeit, wie das körpereigene steroidale Sexualhormon 17β -Östradiol (E2) zu wirken. Zearalenon und seine Metaboliten konkurrieren um die Bindungsstellen der Östrogenrezeptoren (estrogen receptor, ER), wodurch es zu Reproduktionsstörungen mit morphologischen und biologischen Veränderungen in den Fortpflanzungsorganen kommt (European Food Safety Authority 2017, Fink-Gremmels und Malekinejad 2007, Zinedine et al. 2007), wie beispielsweise verlängerte Östrusdauer, verminderte Konzeptionsraten, Hyperöstrogenismus mit vergrößerten Milchdrüsen und Vulvaschwellung sowie Unfruchtbarkeit.

Die Interaktion mit Östrogenrezeptoren ist die deutlichste und bedeutendste Wirkungsweise von RALs. Wie bereits beschrieben, sind α -ZEL und α -ZAL durch eine höhere Rezeptoraffinität gekennzeichnet als ZEN oder andere RALs (Dänicke und Winkler 2015). Es wird vermutet, dass ZEN im Vergleich zu anderen nicht-steroidalen östrogenen Strukturen eine stärkere östrogene Wirkungskraft hat (Bennett und Klich 2003). Aufgrund dessen wird ZEN der Gruppe der endokrinen Disruptoren zugeordnet (European Food Safety Authority 2017, Kowalska et al. 2016). Zearalenon aktiviert mit der Bindung an ERs verschiedene Signalmoleküle und ER-abhängige Signalwege. Der Wirkungsgrad von ZEN und seinen Metaboliten hängt dabei von der Ausprägung der Östrogenrezeptoren ab, die je nach Gewebe und Reproduktionsstatus (präpubertär, zyklisch oder trächtig) unterschiedlich ist (Kuiper et al. 1998). In den Eierstöcken verschiedener Tierspezies wurde ER α -Expression im Keimepithel, in den interstitiellen Zellen und in den Thekazellen nachgewiesen, während ER β -Expression in den Granulosa- und Cumuluszellen nachgewiesen wurde (Fink-Gremmels und Malekinejad 2007). Zearalenon kann als vollständiger Agonist für ER α und als gemischter Agonist oder Antagonist für ER β wirken (Kuiper et al. 1998). Neben der Affinität zu ERs umfasst die endokrine Wirkung von ZEN auch die kompetitive Bindung an die Enzyme 3 α -HSD (Hydroxysteroid-Dehydrogenase) und 3 β -HSD, die an der Synthese von Steroiden beteiligt sind (Fink-Gremmels und Malekinejad 2007). Darüber hinaus hat sich ZEN auch als hepatotoxisch, hämatotoxisch, immunotoxisch und genotoxisch erwiesen. In *vitro*-Kulturen verursachte ZEN DNA-Schäden an bovinen Lymphozyten (Lioi et al. 2004).

In Bezug auf Fertilitäts- und Reproduktionsstörungen als wesentliche Merkmale für die östrogene und endokrine Wirkung von ZEN, erwiesen sich Schweine als die empfindlichste Spezies. Für Rinder liegen keine geeigneten Daten zur Ableitung von NOAEL (no observed adverse effect levels) oder LOAEL (lowest observed adverse effect level) vor. Generell sind sie – übereinstimmend mit der überwiegenden Biotransformation zu dem weniger östrogenen Metaboliten β -ZEL – resistenter gegenüber den unerwünschten Wirkungen von ZEN als andere Nutztiere (European Food Safety Authority 2017).

α -Zearalanol wurde in einer synthetischen kommerziellen Form unter dem Namen Ralgro® erfolgreich für den Einsatz als Anabolikum für Mastrinder und Lämmer vermarktet. Im Jahr 1989 wurde dies von der Europäischen Union verboten, in anderen Teilen der Welt wird es noch immer eingesetzt (Apple et al. 1991, Zinedine et al. 2007).

Bei Wiederkäuern wird ZEN mit östrogenen Reaktionen wie Unfruchtbarkeit, reduzierter Milchleistung und Hyperöstrogenismus in Verbindung gebracht (D'Mello et al. 1999). Eine Fallstudie berichtet von 150 Milchkühen, deren Besamungsindex von 1.2 auf 4 anstieg, als ihnen qualitativ schlechtes Heu gefüttert wurde. Die Analyse einer Heuprobe ergab eine ZEN-Konzentration von 14 mg/kg. Mit dem Austausch des Heus kehrte der Besamungsindex auf den ursprünglichen Wert zurück (Mirocha et al. 1968). Bei Verabreichung von 250 mg reinem ZEN an Färsen über einen Zeitraum von 66 Tagen wurde ein Rückgang der Konzeptionsrate von 87 % in der Kontrollgruppe auf 62 % in der behandelten Gruppe festgestellt (Weaver et al. 1986b). In einer Feldstudie mit einer Herde von Kühen und Färsen wurden nach *Fusarium*-Belastung Auffälligkeiten im Sexualverhalten, vergrößerte Milchdrüsen bei Färsen, Zunahme von Infektionen des Reproduktionstraktes und Unfruchtbarkeit beobachtet (Coppock et al. 1990). Reproduktionsstörungen, geringere Geburtsraten und Unfruchtbarkeit im Zusammenhang mit der Exposition gegenüber ZEN wurden auch bei Mutterschafen berichtet. Das erste klinische Anzeichen war eine Verringerung der Ovulationsrate, die nach einer Dosis von 0.03 mg/kg Körpergewicht, verabreicht über 10 Tage, auftrat. Bei höherer Dosis wurde eine verlängerte Östrusdauer und ein erhöhtes Uterus- und Ovargewicht beobachtet (Smith et al. 1990).

Da meist nur Fall- oder Feldberichte sowie Studien mit einer begrenzten Anzahl von Tieren und eher kurzen Versuchszeiträumen vorliegen, stimmen die beschriebenen Effekte von ZEN auf Wiederkäuer zwischen den verschiedenen Studien nicht immer überein. So zeigte im Gegensatz dazu ein anderer Versuch von Weaver et al. (1986a) mit trockenstehenden Milchkühen keine nachteiligen Auswirkungen auf den Progesteronspiegel und keine Veränderungen im Genitaltrakt. Der Zyklus und das Sexualverhalten waren ebenso wenig beeinträchtigt. Die tägliche orale Dosis pro Kuh lag zwischen 31.25 und 500 mg ZEN über einen Beobachtungszeitraum von zwei Brunstzyklen. In der Dissertation von Möser (2001) wurden Färsen mit natürlich kontaminiertem Haferschrot (1.3 mg ZEN/kg) gefüttert. Auch in dieser Studie wurden weder eine Störung des Brunstzyklus noch pathologische oder histologische Veränderungen an den Fortpflanzungsorganen durch den Einfluss von ZEN beobachtet. Ebenso ergaben Studien an Milchkühen mit natürlich kontaminiertem Getreide als ZEN-Träger keine Anzeichen von Hyperöstrogenismus oder Reproduktionsstörungen (Seeling et al. 2005, Seeling und Dänicke 2005).

Takagi et al. (2008) befassten sich in einer *in vitro*-Studie mit den Auswirkungen von ZEN auf bovine Oozyten. Eine hohe ZEN-Konzentration (1000 µg/l) kann sich negativ auf die meiotische Kompetenz auswirken, die Befruchtungs- und Entwicklungsraten werden jedoch nicht beeinträchtigt. In einer früheren *in vitro*-Studie wurde festgestellt, dass ZEN und seine Metabolite dosisabhängig die Reifung von Oozyten hemmen und die Anzahl an Oozyten erhöhen, die Anomalien aufweisen (Minervini et al. 2001). Ergebnisse von *in vitro*-Untersuchungen mit Zellkulturen des Reproduktionstraktes zeigen nur teilweise eine Übereinstimmung mit denen von *in vivo*-Untersuchungen. Grund dafür ist eine Vielzahl von Wechselwirkungen, die bei einer Mykotoxin-Exposition im ganzen Organismus auftreten (Minervini und Dell'Aquila 2008).

Neben der Deregulierung von östrogenen Wirkungskreisen kann ZEN auch Einfluss auf die Pansenfermentation nehmen. In einer *in vitro*-Studie wurde in Bezug auf die Pansenfermentation eine Erhöhung des Abbaus der Trockenmasse, der organischen Substanz, der neutralen Detergentienfaser und des Proteins gezeigt. In Hinblick auf die Zusammensetzung der Pansenflüssigkeit konnte eine erhöhte Ammoniakkonzentration sowie ein signifikanter Anstieg der Butyrat-, Isobutyrat- und Isovalerat-Produktion festgestellt werden. Acetat, Propionat, Valerat und die Gesamtkonzentration an SCFA waren unverändert (Seeling et al. 2006). Petri et al. (2018) bestätigten in einer *in vivo*-Kurzzeitstudie an 4 Kühen, dass sich das Pansenmikrobiom und die dazugehörigen Fermentationsprofile nach einer Impulsdosis von 10 mg ZEN/kg Kraftfutter veränderten. Im Vergleich zur Baseline wurden auch in dieser Studie gesteigerte Mengen an flüchtigen Fettsäuren (volatile fatty acids, VFA) im Pansen nachgewiesen, konkret waren die Konzentrationen von Butyrat, Valerat und Caproat erhöht. Die gesteigerte Bildung von Butyrat nach ZEN-Aufnahme induziert mikrobielle Veränderungen im Pansen. Bereits Kurzeiteffekte von ZEN und seinen Metaboliten auf die Mikroben und Fermentation im Pansen könnten Auswirkungen auf die Leistung und Gesundheit von Kühen haben (Petri et al. 2018). Bei der Fütterung von *Fusarium*-Toxin-kontaminiertem Weizen im Vergleich zum Kontrollweizen wurde bei erhöhter OM-Aufnahme eine erhöhte Menge an abgebautem Rohprotein und ein geringerer molarer Anteil an Propionat in der Pansenflüssigkeit beobachtet (Seeling et al. 2006b). Die molaren Anteile von Acetat und Isobutyrat sowie die Gesamtkonzentration an SCFA hingegen nahmen mit höherer OM-Aufnahme tendenziell zu. Die Tendenz zu einem veränderten SCFA-Profil nach der Aufnahme von *Fusarium*-Toxinen deutet auf einen Wechsel in der Zusammensetzung des Mikrobioms hin (Seeling et al. 2006b). Im Kontrast dazu berichteten Dänicke et al. (2005) keine

Auswirkungen von ZEN-kontaminiertem Weizen auf die Konzentration der flüchtigen Fettsäuren und des pH-Wertes im Pansensaft. Der einzige Effekt zeigte sich in einer höheren Ammoniakkonzentration. Außerdem waren gleichzeitig der Fluss des mikrobiellen und des verwertbaren Proteins im Duodenum um 21 % und 20 % reduziert. Aus einer Studie an Hammeln geht hervor, dass der Pansen-pH-Wert und die Konzentrationen von Ammoniak und SCFA durch die Kontamination des Weizens nicht beeinflusst wurden (4.6 mg DON und 0.34 mg ZEN/kg DM) (Dänicke 2002). Korosteleva et al. (2009) untersuchte über einen Zeitraum von 63 Tagen 12 Kühe, denen *Fusarium*-kontaminiertes Futter verfüttert wurde. Weder die Trockenmasseaufnahme noch das Körpergewicht, die Milchproduktion oder Milchezusammensetzung wurden durch das kontaminierte Futter beeinflusst. Auch die Konzentration an Ammoniak im Pansen wurde durch das Futter nicht beeinflusst.

Die Variabilität in den Ergebnissen von Studien zur Toxizität von ZEN könnte auf verschiedene Faktoren zurückzuführen sein. Beispielsweise Unterschiede in den getesteten Materialien (reines Toxin oder natürlich kontaminiertes Material, selbst bei ähnlicher Konzentration), Unterschiede in der Rasse und dem Alter der Tiere sowie Unterschiede in den angewandten Fütterungsregimen (Fink-Gremmels und Malekinejad 2007). Dazu kommt, dass mit Ausnahme der Ergebnisse von Petri et al. (2018) zu SCFA-Veränderungen keine Ergebnisse zu akuten Effekten von ZEN auf die Tiergesundheit vorliegen.

2.4 Hypothesen und Ziele der Untersuchungen

Zearalenon spielt eine wesentliche Rolle in der Nutztierernährung und kann schwerwiegende Folgen für die Gesundheit und Leistung der Tiere sowie hohe wirtschaftliche Verluste mit sich bringen. Die Folgen einer chronischen Belastung mit ZEN wurde bereits in mehreren Studien untersucht. Über die kurzfristige Beeinflussung der Tiergesundheit nach ZEN-Aufnahme, insbesondere bei nicht adaptierter ruminaler Mikrobepopulation, ist bisher sehr wenig bekannt. Die vorliegende Diplomarbeit findet im Rahmen des Projekts ZENZYME (Geldgeber BIOMIN Holding GmbH) statt und hat das Ziel, die Wirkung einer kurzzeitigen ZEN-Exposition auf das Fermentationsmuster im Pansen und Parameter der Tiergesundheit (Puls, Atmefrequenz, innere Körpertemperatur, Pansenmotorik) bei sechs trockenstehenden, kraftfutterreich gefütterten Milchkühen zu untersuchen. Diese Erkenntnisse sollen das Wissen über rasch eintretende Symptome einer ZEN-Intoxikation erweitern und die Rolle von Mykotoxinen in Futtermitteln beim Rind verdeutlichen. Eine frühzeitige Erkennung einer

Mykotoxikose kann gesundheitliche und wirtschaftliche Folgen für Tier und Landwirt deutlich verringern, daher sollten Mykotoxikosen im Rahmen der tierärztlichen Versorgung stets als Differentialdiagnose berücksichtigt werden.

Ganz grundlegend wurde erwartet, dass die Auswirkungen von ZEN im Pansen, als erstes Effektorgan nach oraler Aufnahme, schneller eintreten als in den untersuchten Gesundheitsparametern. Daher wurde eine rasche Änderung des ruminalen Fermentationsmusters nach der ZEN-Aufnahme angenommen. Die Gesundheitsparameter betreffend wurde davon ausgegangen, dass bei steigender ZEN-Belastung des Tieres Effekte zu sehen sind, die sich durch erhöhte Vitalwerte (Puls, Atemfrequenz, innere Körpertemperatur, Pansenmotorik) äußern könnten.

3 Materialien und Methoden

3.1 Versuchsaufbau

Das Experiment wurde nach österreichischem Recht und unter Beachtung der Europäischen Richtlinien zum Schutz der für wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere durchgeführt (Europäische Kommission 2010). Die Genehmigung für den Versuch wurde von der Ethikkommission der Veterinärmedizinischen Universität Wien und vom österreichischen Bundesministerium für Bildung, Wissenschaft und Forschung erteilt (GZ 2020-0.547.387). Die Daten für diese Diplomarbeit stammen dabei aus der ersten Versuchshälfte.

Der Versuch wurde mit sechs pansenfistulierten trockenstehenden Milchkühen (Holstein Friesian, weiblich, gute gesundheitliche Verfassung, Identifikation über Ohrmarke) über 30 Tage an der VetFarm der Veterinärmedizinischen Universität Wien in Kremesberg durchgeführt.

Der Versuchsaufbau wird in **Abb. 2** veranschaulicht. Die ersten sechs Tage dienten der Adaptation der Kühe an die Grundration. In den darauffolgenden drei Tagen (Tag 7 bis 9) wurde den Kühen 200 g Maisschrot gefüttert, das an Tag 7 unbehandelt (Kontrolle, CON) und an den Tagen 8 und 9 (Behandlung, ZEN) mit 5 mg Zearalenon versetzt war. Die gewohnte Grundration stand den Kühen an allen Tagen nach der Anfütterung bis Mitternacht zur freien Verfügung. An den Tagen 10 und 11 fand die Washout-Phase statt, in der die Grundration und 200 g Kraftfutter ohne ZEN gefüttert wurde. Während der Washout-Phase haben keine Untersuchungen und Probennahmen stattgefunden.

An den Versuchstagen 7 bis 9 wurden folgende Gesundheitsparameter untersucht: Puls, Atemfrequenz, innere Körpertemperatur und Pansenmotorik. Die Messungen wurden jeweils zum Zeitpunkt 0 Stunden (d.h. vor Futterzugang), sowie 3 und 10 Stunden nach Futterzugang durchgeführt. Zusätzlich wurden an Tag 7 und 9 zum Zeitpunkt 0, 3, 7 und 10 h Pansensaftproben für die Bestimmung der flüchtigen Fettsäuren (0, 10h) entnommen. Der pH-Wert wurde über den gesamten Versuchszeitraum über pH-Logger gemessen.

Abb. 2. Versuchsaufbau.

	Tag 1 - 6	Tag 7				Tag 8				Tag 9				Tag 10 - 11
Stunden vor bzw. nach Anfütterung		0 h	3 h	7 h	10 h	0 h	3 h	7 h	10 h	0 h	3 h	7 h	10 h	
Gesundheitsparameter¹	Adaption	x	x		x	x	x		x	x	x		x	Washout
Pansensaftproben		x	x	x	x					x	x	x	x	

	Grundration
	Grundration + 200 g reines Kraftfutter
	Grundration + 200 g Kraftfutter mit 5 mg ZEN

¹ Puls, Atemfrequenz, Innere Körpertemperatur, Pansenmotorik

3.2 Fütterung und Haltung der Tiere

Die Tiere wurden in einem Liegeboxenlaufstall gehalten. Die Futtration stand den Kühen ad libitum in computer-gesteuerten Einzelfutterstrecken (Hokofarm Group, Marknesse, Niederlande) zur Verfügung. Das Futter beinhaltete auf TM-Basis 30 % Maissilage, 20 % Grassilage, 10 % Heu und 40 % Kraftfutter (davon 80 % mineralisierte Getreidemischung und 20 % Rindastar Kraftfutterpellets von H. Wilhelm Schaumann GmbH & Co KG, Brunn am Gebirge, Österreich). Die Kühe hatten während der gesamten Versuchsdauer freien Zugang zur Tränke. Tierärztliche Versorgung war zu jedem Zeitpunkt des Versuchs gewährleistet.

Tab. 2. Futterzusammensetzung der TMR.

Futterbestandteile in % TM	
Maissilage	30
Grassilage	20
Heu	10
Proteinkrafftutter ¹	6
Krafftutter ²	34

¹Rindastar 39 XP, Schaumann GmbH & Co KG, Pinneberg, Deutschland

²auf TM Basis: 50 % Mais, 21 % Gerste, 21 % Weizen, 3 % Futterkalk, 5 % Mineralfuttermischung (Rindavit TMR 11 ASS-Co+ATG, Schaumann GmbH & Co KG, Pinneberg, Deutschland)

Tab. 3. Analysierte Nährstoffzusammensetzung und Partikelgrößenverteilung der TMR mit 60 % Grundfutter und 40 % Krafftutter (n = 3).

Nährstoffzusammensetzung in % TM	
TM, % von Frischmasse	46.2 ± 5.09
Organische Masse	92.5 ± 0.19
Rohprotein	12.2 ± 0.27
Ether Extrakt	1.9 ± 0.12
aNDFom ¹	44.9 ± 1.94
ADFom ²	26.7 ± 0.86
Stärke	26.4 ± 3.07
Verteilung der Partikelgröße in %	
> 19 mm	9.0 ± 4.24
8.0 – 19.0 mm	37.9 ± 4.15
1.18 – 8.0 mm	41.9 ± 3.32
Auffangschale	11.2 ± 3.40
peNDF ³ > 8, % von TM	21.1 ± 1.84

¹Neutrale Detergenzienfasern (NDF), die mit einer hitzestabilen α -Amylase geprüft und ohne Restasche angegeben werden.

²Saure Detergentienfaser, ausgedrückt ohne Rückstände von Asche.

³peNDF, physikalisch wirksame NDF der Partikel größer als 8 mm.

Damit genug Zeit für die Untersuchungen und Beprobungen der einzelnen Tiere vorhanden war, wurden die Kühe beginnend um 08:00 Uhr gestaffelt in einem Zeitfenster von 1,5 Stunden angefüttert (**Tab. 4**).

Tab. 4. Daten der Versuchstiere.

	Kuh		Körpermasse zu Beginn in kg	Uhrzeit der Anfütterung
	Name	Ohrmarken- nummer		
1	Bergrose	3893	942	08:00
2	Nelda	3927	1030	08:10
3	Ricky	3852	918	08:20
4	Elfi	4044	918	08:30
5	Newada	7613	838	09:30
6	Banane	6996	847	09:45

3.3 Untersuchungen und Probennahme

Die Reihenfolge der Untersuchung und Beprobung der Tiere wurde vor Versuchsbeginn randomisiert angeordnet. Die obengenannten Gesundheitsparameter wurden an Tag 7, 8 und 9 jeweils vor (0 h), 3 und 10 h nach der Anfütterung wie folgt untersucht:

- Der **Puls** wurde 15 Sekunden lang beidhändig an der *A. facialis* (alternativ an der *A. coccygea mediana*) gezählt, mit dem Faktor 4 multipliziert und als F/min angegeben (Baumgartner und Wittek 2018). Die Pulsqualität wurde nicht berücksichtigt.
- Die **Atemfrequenz** wurde von rechts schräg hinter dem Tier stehend 30 Sekunden lang gezählt, mit dem Faktor 2 multipliziert und als F/min angegeben (Baumgartner und Wittek 2018). Der Atemtypus wurde nicht berücksichtigt.
- Die **innere Körpertemperatur** wurde mit einem digitalen Thermometer (microlife Vet-Temp Thermometer, VT1831) rektal gemessen und in Grad Celsius angegeben.
- Die **Pansenmotorik** wurde mittels Auskultation des Pansens untersucht. Dies erfolgte mit einem Stethoskop (3M™ Littmann® Classic III™ Stethoskop) in der linken Hungergrube bzw. kranioventral der Pansenfistel am Rippenbogen für 5 Minuten und wurde in F/5min angegeben (Baumgartner und Wittek 2018).

Die **Futteraufnahme** wurde automatisch täglich von den Futtertrögen mit integrierter Wiegefunktion (Triotronic, Trioliet, Oldenzaal, Niederlande) erfasst und abgelesen. Die **Fress- und Kauaktivität** wurde mit Hilfe von RumiWatch-Halftern (ITIN+HOCH GmbH, Liestal, Schweiz) registriert. Die Validierung dieser Halfter erfolgte durch Kröger et al. (2016). **Pansensaft** wurde mit einer Saugspritze über die Pansenfistel aus dem ventralen Pansensack entnommen. Die Proben wurden direkt nach der Entnahme in 8 ml Plastikbehälter aliquotiert, auf Eis gelegt und nach maximal einer Stunde bei -20 °C bis zur Analytik eingefroren. Die Pansenproben wurden für die Bestimmung der flüchtigen Fettsäuren verwendet. Der **pH-Wert** im Pansen wurde per Logger (LRCpH, Dascor Inc., USA), die mit pH-Sensoren (S655CD-HT, Sensorex Inc., USA) ausgestattet waren und mittels Gewichten am Pansenboden gehalten wurden, über die gesamte Versuchsdauer in 15 Minuten Intervallen aufgezeichnet.

3.4 Analytische Verfahren

Die Konzentrationsbestimmung der kurzkettigen Fettsäuren erfolgte mittels Gaschromatographie und wurde am Institut für Tierernährung und funktionelle Pflanzenstoffe an der Veterinärmedizinischen Universität Wien wie von Kumar et al. (2016) ausführlich beschrieben durchgeführt. Die Mykotoxinkonzentrationen in Heu, Grassilage und Kraftfutter wurden von Romer Labs GmbH (Tulln, Österreich) mittels HPLC-MS/MS untersucht. Die untersuchten Mykotoxine (AF, ZEN, Trichothecene, FUM, OTA) waren in sehr geringen Mengen in der TMR vorhanden oder lagen sogar unterhalb der Bestimmungsgrenze (**Tab. 5**).

Tab. 5. Zusammenfassung der wichtigsten Mykotoxin-Gehalte in der TMR.

Mykotoxin	Gehalt in µg/kg
Aflatoxin B1	nicht detektierbar
Zearalenon	3.16
Deoxynivalenol	180.74
T-2 Toxin	nicht detektierbar
Fumonisin B1	195.46
Ochratoxin A	nicht detektierbar

Nachweisgrenze für Aflatoxin B1, T-2 Toxin und Ochratoxin A = 20 µg/kg

3.5 Statistische Auswertung

Die Wiederkaudaten wurden mit Hilfe des RumiWatch Converters v0.7.3.2 (ITIN+HOCH GmbH, Liestal, Schweiz) ausgewertet. Alle erhobenen Daten wurden mittels deskriptiver Statistik übersichtlich dargestellt. Für die statistische Auswertung wurde SAS 9.4 (SAS Institute Corp., Cary, USA) genutzt. In weiterer Folge wurden die Residuen auf Normalverteilung mittels Shapiro-Wilk-Test (Proc Univariate) geprüft und es erfolgte eine Varianzanalyse im gemischten Modell (Proc mixed). Es wurde das folgende Modell verwendet:

$$Y_{ijk} = \mu + B_i + Z_j + (B \times Z)_{ij} + T_k + e_{ijkl}$$

bei dem Y_{ijk} die Beobachtung, μ der Gesamtmittelwert, B_i der fixe Effekt der Behandlung (CON, ZEN), Z_j der fixe Effekt des Beprobungszeitpunkts (0, 3, 7, 10 h), T_k der zufällige Effekt des Tiers und e_{ijkl} der Restfehler ist. Messungen, die am selben Tier und Tag zu verschiedenen Zeiten durchgeführt wurden, wurden als wiederholte Messungen berücksichtigt. Das Signifikanzniveau wurde auf $\alpha = 0.05$ festgelegt und die Ergebnisse als Least Square-Mittelwerte dargestellt werden.

4 Ergebnisse

4.1 Gesundheitsparameter

4.1.1 Puls

Die Behandlung mit ZEN hatte Einfluss auf die Pulsfrequenz ($p = 0.028$). Während sich der Puls in der Kontrollphase kaum verändert, konnte in der ZEN-Phase eine signifikante Steigerung der Pulsfrequenz festgestellt werden (**Abb. 3**). Zum Zeitpunkt ZEN 0 h konnten 54 Pulswellen/min ± 2 gezählt werden, bei ZEN 10 h hingegen lag der Puls bei 69/min ± 2 ($p = 0.002$).

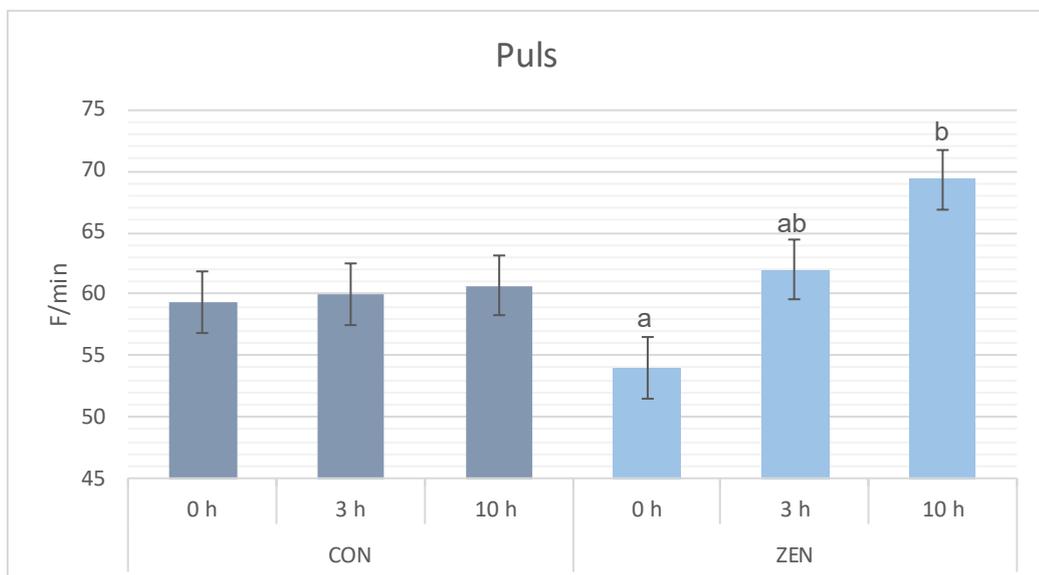


Abb. 3. Pulsfrequenz im Phasenvergleich. Verglichen mit ZEN 0 h (a) stieg der Puls 10 h nach Aufnahme von ZEN (b) signifikant an.

4.1.2 Atemfrequenz

In Bezug auf die Atemfrequenz waren weder in der Kontrollphase noch während der Aufnahme von ZEN (signifikante) Abweichungen zu erkennen ($p = 0.778$). Die Frequenz betrug während der gesamten Messperiode zwischen 22/min ± 3 (CON 0 h) und 25/min ± 3 (ZEN 3 h bzw. ZEN 10 h).

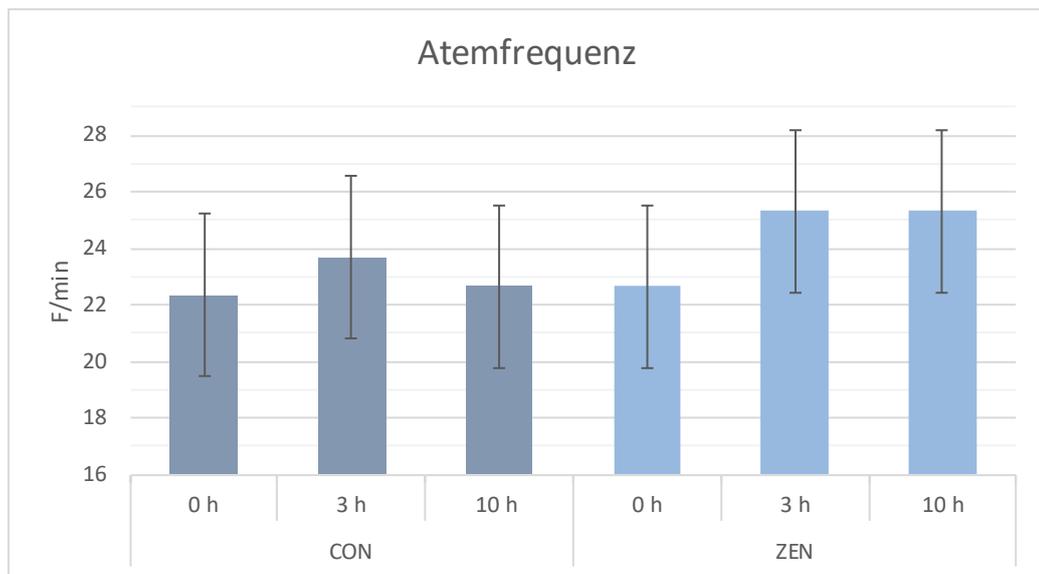


Abb. 4. Atemfrequenz im Phasenvergleich zeigte keine (signifikanten) Abweichungen.

4.1.3 Innere Körpertemperatur

Die innere Körpertemperatur (IKT) erhöhte sich im Mittel von $38.2\text{ °C} \pm 0.1$ während CON auf 38.4 °C während ZEN ($p = 0.021$). In der Gegenüberstellung der Phasen zum Zeitpunkt 10 h nach Anfütterung konnte ein signifikanter Anstieg ($p = 0.036$) von $38.4\text{ °C} \pm 0.1$ (CON 10 h) auf $38.8\text{ °C} \pm 0.1$ (ZEN 10 h) festgestellt werden. Die Unterschiede innerhalb der Phasen wurden in **Abb. 5** dargestellt. Die IKT bei CON 10 h ist mit $38.4\text{ °C} \pm 0.1$ signifikant höher als bei CON 0 h mit $38.0\text{ °C} \pm 0.1$ ($p = 0.018$). Auch während der Behandlung mit ZEN ist die Temperatur mit $38.8\text{ °C} \pm 0.1$ zum Zeitpunkt ZEN 10 h signifikant höher als zu den Vergleichszeitpunkten ZEN 0 h mit $38.2\text{ °C} \pm 0.1$ ($p = <.0001$) und ZEN 3 h mit $38.3\text{ °C} \pm 0.1$ ($p = 0.001$).

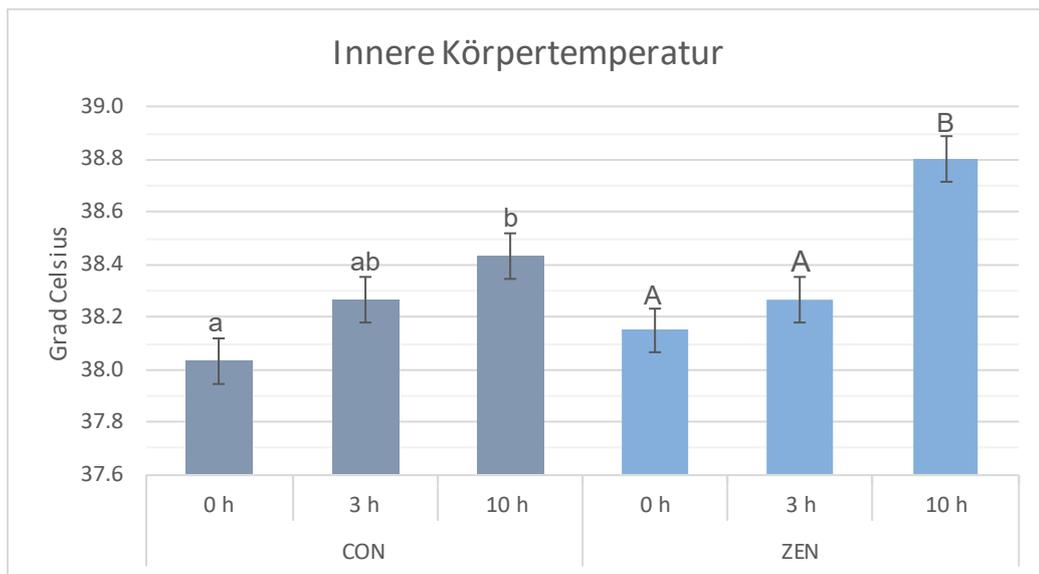


Abb. 5. Innere Körpertemperatur im Phasenvergleich. Die signifikante Erhöhung wurde mit (a) bzw. (b) während der Kontrollphase und mit (A) bzw. (B) während der ZEN-Phase gekennzeichnet.

4.1.4 Pansenmotorik

Die Untersuchungen der Pansenmotorik ergaben keine (signifikante) Änderung der Frequenz durch die Aufnahme von ZEN. Der Mittelwert beider Phasen liegt bei einer Frequenz von 7/5min. Allerdings zeichnete sich ein Trend in der ZEN-Periode ab, der zeigt, dass die Pansenmotorik mit einer Frequenz von 9/5min \pm 1 zum Messzeitpunkt ZEN 3 h tendenziell ($p = 0.078$) höher lag als zum Zeitpunkt ZEN 0 h mit einer Frequenz von 5/5min \pm 1.

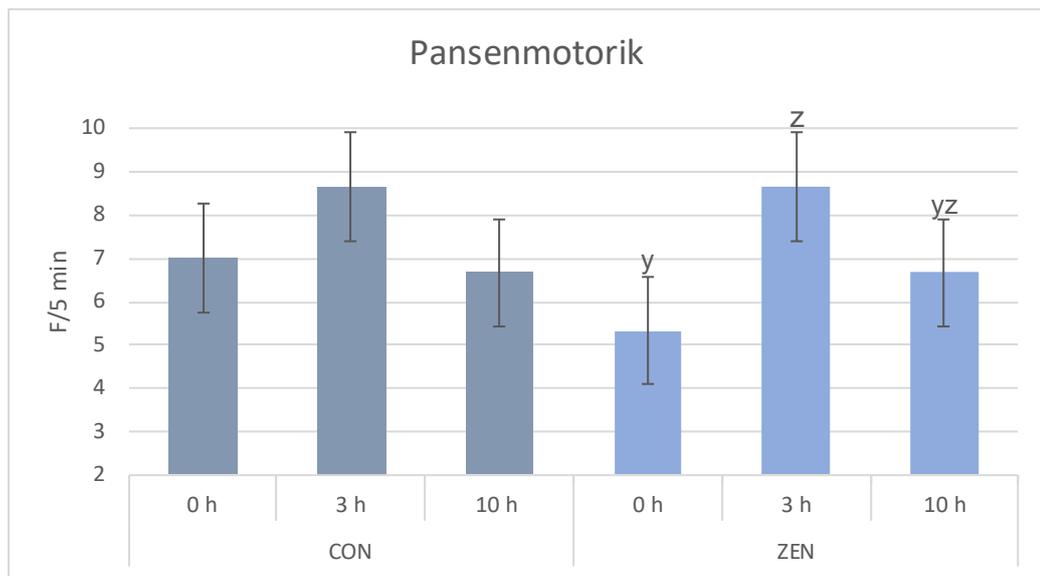


Abb. 6. Pansenmotorik im Phasenvergleich. Der Trend während der ZEN-Phase wird mit (y) für ZEN 0 h und (z) für ZEN 3 h dargestellt.

4.2 Futteraufnahme, Wiederkauaktivität, pH-Wert und SCFA-Konzentration

4.2.1 Futteraufnahme und Wiederkauaktivität

Die Futteraufnahme und auch die Wiederkauaktivität wurden durch die Behandlung mit ZEN signifikant beeinflusst. Die Futteraufnahme stieg dabei von $9.6 \text{ kg} \pm 0.46$ während der Kontrollperiode auf $11.3 \text{ kg} \pm 0.46$ nach Aufnahme von ZEN ($p = 0.029$; *Futteraufnahme (li) und Wiederkauaktivität (re) im Phasenvergleich (CON, ZEN)*). Sowohl die Aufnahme von TM als auch die Zeit des Wiederkauens erhöhte sich nach der Behandlung mit ZEN (b) im Vergleich zu CON (a). links). Trotz der verzeichneten Zunahme der Futteraufnahme wurde die Gesamtfresszeit nicht (signifikant) beeinflusst ($155 \text{ min} \pm 22$ CON; $192 \text{ min} \pm 22$ ZEN; $p = 0.180$). Betreffend der Wiederkauaktivität konnte korrelierend mit der Futteraufnahme ein signifikanter Anstieg ($p = 0.006$) von $350 \text{ min} \pm 38$ (CON) auf $424 \text{ min} \pm 38$ (ZEN) festgestellt werden (*Futteraufnahme (li) und Wiederkauaktivität (re) im Phasenvergleich (CON, ZEN)*). Sowohl die Aufnahme von TM als auch die Zeit des Wiederkauens erhöhte sich nach der Behandlung mit ZEN (b) im Vergleich zu CON (a). rechts).

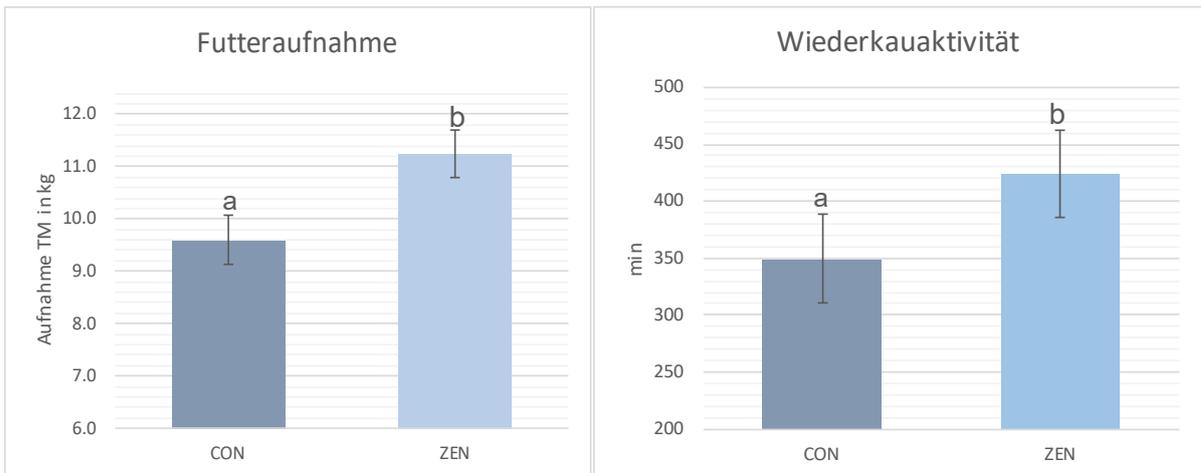


Abb. 7. Futteraufnahme (li) und Wiederkauaktivität (re) im Phasenvergleich (CON, ZEN). Sowohl die Aufnahme von TM als auch die Zeit des Wiederkauens erhöhte sich nach der Behandlung mit ZEN (b) im Vergleich zu CON (a).

4.2.2 pH-Wert Pansen

Es konnten keine (signifikanten) Veränderungen des ruminalen pH-Wertes durch die Aufnahme von ZEN-kontaminiertem Futter festgestellt werden. Der mittlere pH-Wert betrug während CON 6.3 ± 0.11 und während ZEN 6.4 ± 0.11 ($p = 0.105$). Der maximal erreichte ruminale pH-Wert war mit 6.9 ± 0.098 in der ZEN-Phase tendenziell ($p = 0.063$) höher als in der CON-Phase ($pH_{max} = 6.8 \pm 0.098$, **Abb. 8**).

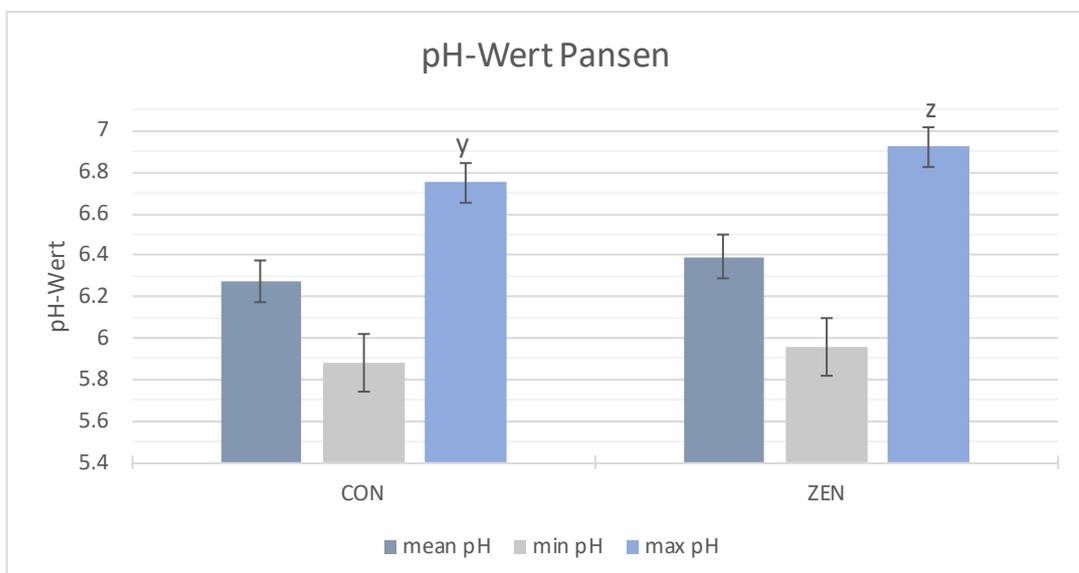


Abb. 8. Pansen pH-Werte (mean, min, max) im Phasenvergleich (CON, ZEN). Der maximale ruminale pH-Wert wird mit (y) während CON und mit (z) während der ZEN-Phase gekennzeichnet.

Der Tagesverlauf des pH-Wertes ist in **Abb. 9** dargestellt. Nach der Anfütterung zu Stunde 0 sinkt der pH-Wert kontinuierlich ab. Stunde 14 entspricht zeitlich dem letzten Zugang zum Futtertrog, womit der pH-Wert wieder ansteigt. Zu den Stunden 5 und 6 nach Futterzugang sind Tendenzen ($p = 0.072$ bzw. $p = 0.058$) von höheren pH-Werten (6.5 ± 0.10 bzw. 6.5 ± 0.12) in der ZEN-Phase im Vergleich zur CON-Phase (6.4 ± 0.10 bzw. 6.3 ± 0.12) zu verzeichnen.

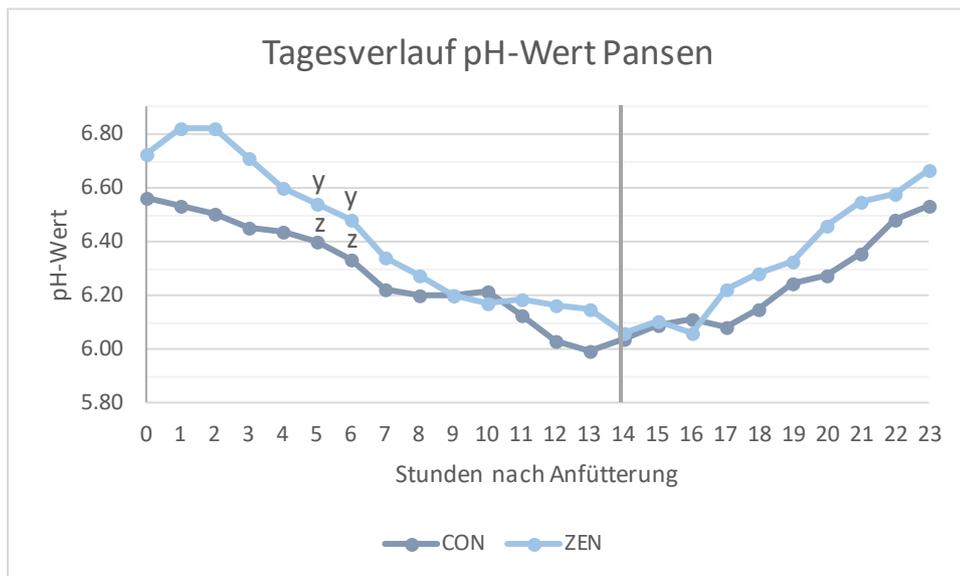


Abb. 9. Tagesverlauf des Pansen pH-Wertes im Phasenvergleich (CON, ZEN). Die vertikale Linie auf Stunde 14 kennzeichnet den letzten Zugang zum Futtertrog.

4.2.3 SCFA-Konzentration

Die Gesamtkonzentration der flüchtigen Fettsäuren im Pansen unterlag signifikanten Veränderungen (**Abb. 10**). Während beider Phasen erhöhte sich die Konzentration im Verlauf der Messperiode, wobei sich die Konzentration von CON und ZEN zum Zeitpunkt 3 h nach Futteraufnahme signifikant unterscheiden. Die Gesamtkonzentration der flüchtigen Fettsäuren bei CON 3 h war mit $107 \text{ mmol/l} \pm 7$ signifikant höher ($p = 0.002$) als zum Vergleichszeitpunkt ZEN 3 h mit nur $73 \text{ mmol/l} \pm 7$. Innerhalb der ZEN-Periode liegen signifikante Unterschiede zum Zeitpunkt 0 bzw. 3 h nach Futteraufnahme ($69 \text{ mmol/l} \pm 7$ bzw. $73 \text{ mmol/l} \pm 7$) im Vergleich zum Messzeitpunkt 10 h ($105 \text{ mmol/l} \pm 7$) vor ($p = 0.001$ bzw. $p = 0.005$).

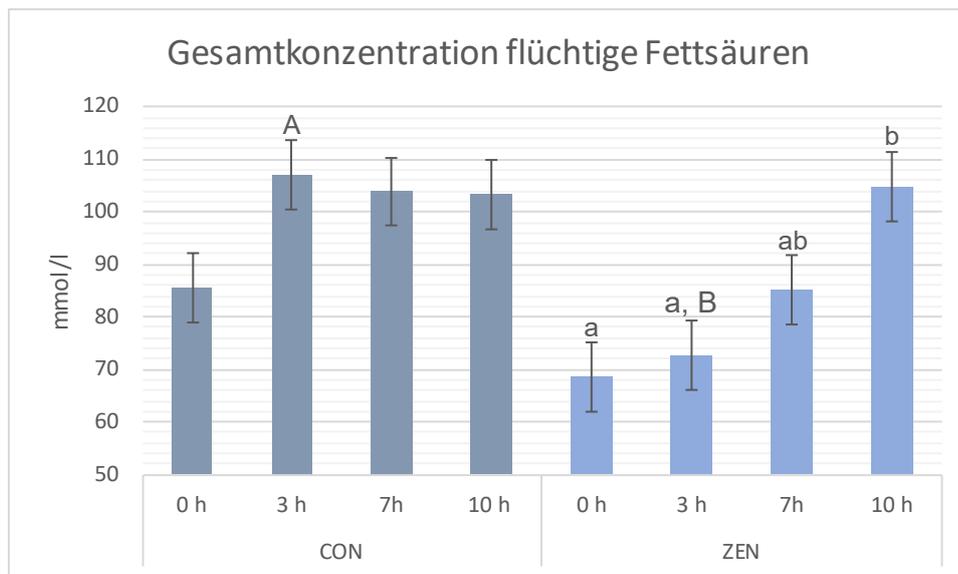


Abb. 10. Gesamtkonzentration der flüchtigen Fettsäuren sowohl im Vergleich der Messzeitpunkte als auch der Phasen. Die Gegenüberstellung von CON 3 h und ZEN 3 h wurde mit A bzw. B gekennzeichnet. Die signifikanten Unterschiede innerhalb von ZEN wurden mit (a) für ZEN 0 bzw. ZEN 3 und (b) für ZEN 10 h beschrieben.

Die prozentuellen Anteile der flüchtigen Fettsäuren blieben größtenteils konstant (**Abb. 11**). Lediglich der Anteil an Acetat betrug während der Behandlung mit ZEN zum Zeitpunkt 0 h $66.76\% \pm 1.18$ und sank bis zum Vergleichszeitpunkt ZEN 10 h auf $61.43\% \pm 1.18$ signifikant ab ($p = 0.016$). Der prozentuelle Anteil an Isobutyrat veränderte sich in beiden Phasen im Laufe der Messperiode, wobei er zum Zeitpunkt CON 0 h $1.14\% \pm 0.05$ ausmachte und sich auf 0.91% (CON 7 h) bzw. $0.87\% \pm 0.05$ (CON 10 h) verringerte ($p = 0.014$ bzw. $p = 0.002$). Ein ähnlicher Rückgang von Isobutyrat konnte auch nach der Aufnahme von ZEN beobachtet werden. Hierbei unterscheiden sich sowohl ZEN 0 h ($1.24\% \pm 0.05$) als auch ZEN 3 h ($1.08\% \pm 0.05$) signifikant von ZEN 7 h ($0.87\% \pm 0.05$) und ZEN 10 h ($0.85\% \pm 0.05$). Das Signifikanzniveau für den Vergleich ZEN 0 h gegen ZEN 7 h bzw. 10 h entspricht $p = <.0001$. Bei ZEN 3 h gegen ZEN 7 h bzw. ZEN 3 h gegen 10 h liegt das Signifikanzniveau bei $p = 0.040$ bzw. $p = 0.022$.

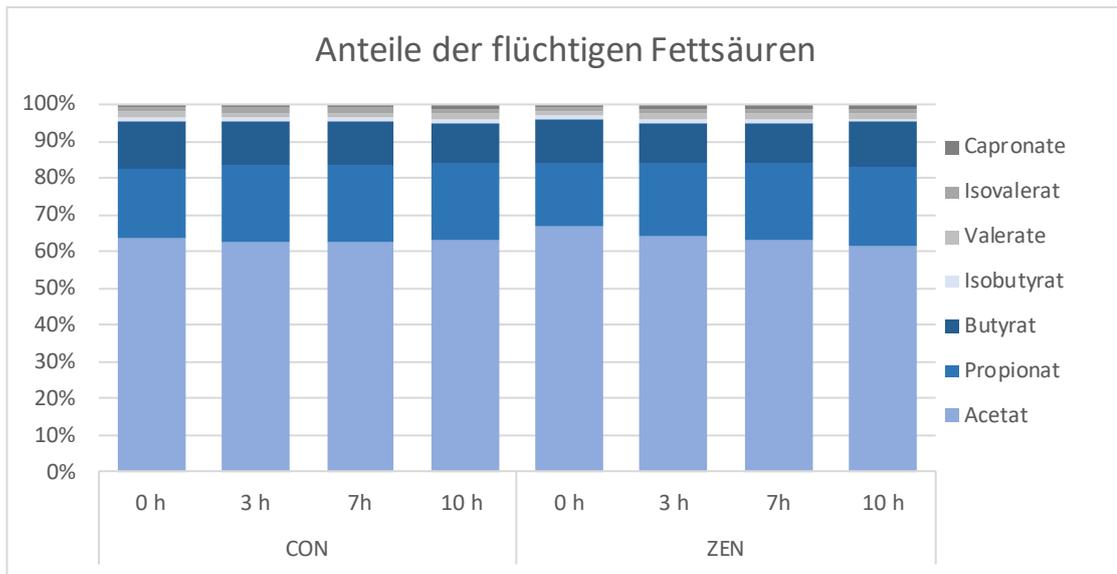


Abb. 11. Prozentuelle Anteile der flüchtigen Fettsäuren vor (CON) und nach der Behandlung mit ZEN (ZEN) zu den Messzeitpunkten 0, 3, 7 und 10 h nach Futteraufnahme.

5 Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Auswirkungen von ZEN auf die Pansenfermentation und bestimmte Gesundheitsparameter von trockenstehenden, kraftfutterreich gefütterten Milchkühen *in vivo* zu untersuchen. Zu den akuten Effekten von ZEN auf die Pansenfermentation gibt es bereits vereinzelte Studien, in Bezug auf die Gesundheit der Kühe liegen jedoch bisher noch keine Daten vor. Es wurde erwartet, dass Veränderungen im ruminalen Fermentationsmuster zu sehen sind, die sich dann in weiterer Folge negativ auf die Tiergesundheit auswirken. Nachdem die TMR nur sehr geringe Konzentrationen an Mykotoxinen enthielt, können alle beobachteten Effekte direkt auf die Mykotoxinbelastung zurückgeführt werden.

Grundlegend ist bekannt, dass Wiederkäuer im Vergleich zu Monogastriern weniger empfindlich auf Mykotoxine reagieren, da der Pansen eine gewisse Detoxifikationskapazität hat. Bereits in früheren Studien wurden jedoch auch an Kühen negative Effekte nach ZEN-Exposition beobachtet, die die Limitierung der Entgiftungseigenschaften des Pansens bestätigen (Goncalves et al. 2015, Korosteleva et al. 2009, Seeling et al. 2005). Die Zusammensetzung des Pansenmikrobioms ist der Schlüsselfaktor für die Detoxifikation und hängt wiederum größtenteils mit der Zusammensetzung des Futters und dem Anteil an Kraftfutter zusammen (Kemboi et al. 2020, Kleverhusen et al. 2017). Der Fokus bisheriger Studien lag einerseits auf der östrogenen Wirkung des Mykotoxins und Reproduktionsstörungen (Coppock et al. 1990, D'Mello et al. 1999, Weaver et al. 1986a, 1986b) und andererseits auf Veränderungen im Pansenmikrobiom und damit veränderten Fermentationsmustern (Dänicke et al. 2005, Petri et al. 2018, Seeling et al. 2006b, Seeling et al. 2006). Die Studien unterscheiden sich hinsichtlich Mykotoxinkonzentration, Expositionsdauer und Mykotoxin-Kombinationen.

5.1 Futteraufnahme, Wiederkauaktivität, pH-Wert und SCFA-Konzentration

Der aktuelle Versuch zeigte einen Anstieg der Futteraufnahme und der Wiederkauaktivität, Tendenzen eines erhöhten ruminalen pH-Wertes und ein verändertes SCFA-Profil nach ZEN-Exposition. Bei gleichbleibender Gesamtfresszeit hat sich die Futteraufnahme von 9.6 kg (CON) auf 11.3 kg (ZEN) gesteigert und die absolute Wiederkauaktivität von 350 min auf 424 min pro Tag verlängert. Die relative Wiederkauaktivität blieb unverändert und wurde somit nicht von ZEN beeinflusst. In Bezug auf die Futteraufnahme kamen zwei frühere Studien zum

Ergebnis, dass sich ZEN nicht auf die Futteraufnahme auswirkt (Korosteleva et al. 2009, Winkler et al. 2014). Als mögliche Ursache für die unterschiedlichen Ergebnisse sollte an dieser Stelle erwähnt werden, dass die Versuchstiere vor der 7-tägigen Adaptionsphase auf der Weide gehalten wurden. Die plötzliche Umstellung von reiner Weidehaltung auf eine TMR mit 40 % Kraftfutter kann zu einer SARA und infolgedessen zu einer verminderten Futteraufnahme führen (Enemark 2008). Durch die relativ kurze Adaptionsphase haben sich die Tiere möglicherweise hinsichtlich ihrer Futteraufnahme noch nicht vollständig von der abrupten Futterumstellung erholt. Dies würde die verminderte Futteraufnahme während CON im Vergleich zu ZEN erklären und auch mit dem niedrigeren pH-Wert im Pansen während CON übereinstimmen.

In Bezug auf den pH-Wert im Pansen zeigt der vorliegende Versuch die Tendenz einer pH-Steigerung nach der Aufnahme von ZEN, die sich im maximalen pH-Wert und im Tagesverlauf des ruminalen pH-Wertes abzeichnet. Sowohl Dänicke et al. (2005) als auch Dänicke (2002) berichten von keinen beobachteten Auswirkungen von DON + ZEN auf den pH-Wert im Pansen, wobei die Tiere im Vergleich zur aktuellen Studie nur mit Grundfutter gefüttert wurden. Der Anteil an Kraftfutter mit seinem Einfluss auf das Pansenmikrobiom könnte ein modulierender Faktor für die Effekte von ZEN sein. Seeling et al. (2006b) hingegen beobachteten trotz kraftfutterreicher Diät (60 %) keinen Veränderungen von DON + ZEN auf den pH-Wert im Pansen.

Wie erwartet und auch schon von anderen Autoren berichtet (Petri et al. 2018, Seeling et al. 2006), hat sich die Mykotoxinbelastung auf das Fermentationsmuster des Pansens ausgewirkt. Im aktuellen Versuch verringerte sich die SCFA-Gesamtkonzentration nach der Aufnahme von ZEN trotz gesteigerter Futteraufnahme von 107 mmol/l (CON 3 h) auf 73 mmol/l (ZEN 3 h). Im Unterschied dazu konnten mehrere frühere Studien keine Veränderungen in der Gesamtkonzentration der SCFA nach ZEN (Dänicke et al. 2005) bzw. DON + ZEN-Exposition (Dänicke 2002, Seeling et al. 2006) feststellen. Seeling et al. (2006b) untersuchten das SCFA-Profil von 14 Kühen und beobachteten sogar eine Steigerung der SCFA-Gesamtkonzentration, wobei auch hier berücksichtigt werden muss, dass in ihrem Versuch eine Ko-Kontamination mit DON und ZEN vorlag. Die konkreten Veränderungen im SCFA-Profil zeichnen sich im aktuellen Versuch durch eine Verringerung von Acetat und Isobutyrat ab, während in anderen Studien die Anteile an Acetat bzw. Isobutyrat zunahmen

(Seeling et al. 2006b, Seeling et al. 2006) und auch Butyrat, Valerat und Caproat erhöht waren (Petri et al. 2018). Die verringerte Konzentration von Acetat könnte ein Hinweis auf einen schlechteren Faserabbau sein, der bei einem hohen Krafffutteranteil in der Ration ganz grundlegend reduziert ist, da faserabbauende Mikroben unter diesen Bedingungen in ihrer Aktivität gehemmt und Quantität reduziert sind.

Manche der in der vorliegenden Studie beobachteten Effekte unterscheiden sich von den Beobachtungen aus früheren Studien, was auf unterschiedliche Kontaminationsquellen, Konzentrationen, Kombinationen und Interaktionen von Mykotoxinen zurückzuführen sein könnte. Die Auswirkungen von Mykotoxinen hängen unter anderem von der Dosis, der Dauer der Belastung und der Empfindlichkeit des Tieres ab. Zudem muss berücksichtigt werden, ob es sich um Feldstudien mit natürlich kontaminierten Futtermitteln oder experimentelle Versuche mit reinen Mykotoxinen handelt und welche Fütterungstechniken angewandt werden (Fink-Gremmels und Malekinejad 2007). Alternativ zu dem im vorliegenden Versuch gewählten Versuchsaufbau könnte beispielsweise die gesamte TMR mit dem Mykotoxin kontaminiert und damit die Aufnahme des Mykotoxins auf mehrere Zeitpunkte verteilt werden.

5.2 Gesundheitsparameter

Unter den gegebenen experimentellen Bedingungen waren nur wenige Effekte von ZEN auf die Gesundheit der Kühe zu sehen. Der Puls, die IKT und die Pansenmotorik wurden innerhalb des physiologischen Rahmens vom aufgenommenen ZEN beeinflusst, auf die Atemfrequenz hatte ZEN keinen Einfluss.

Die Pulsfrequenz erhöhte sich signifikant von 54/min (ZEN 0 h) auf 69/min (ZEN 10 h), wobei die Werte nur gering vom physiologischen Bereich abweichen (60-80/min, (Baumgartner und Wittek 2018)). Als beeinflussende Faktoren für eine Veränderung der Pulsfrequenz müssen Lage/Bewegung, Stress, Messzeitpunkt vor/nach Probennahme usw. berücksichtigt werden. Die physiologischen Richtwerte für die IKT liegen zwischen 38.3 °C und 38.8 °C (Baumgartner und Wittek 2018) und wurden sowohl am Kontrolltag als auch am ZEN-Tag in den ersten Stunden leicht unterschritten. Nach Aufnahme von ZEN wurde der Schwellenwert zu leichtem Fieber erreicht, jedoch zu keinem Messzeitpunkt überschritten. Signifikante Änderungen der IKT wurden an beiden Tagen zwischen 0 h und 10 h verzeichnet: am Kontrolltag stieg die IKT von 38.0 °C auf 38.4 °C, am ZEN-Tag sogar von 38.2 °C auf 38.8 °C. Dies deutet auf eine

beginnende ZEN-bedingte Toxämie hin, da ein Anstieg der Körpertemperatur häufig zu den ersten erkennbaren Symptomen von Gesundheitsstörungen bei Nutztieren gehört. Es scheint also, dass eine Zearalenon-Intoxikation, bevor sie sich in spezifischen Fruchtbarkeitsstörungen manifestiert, zunächst eine diffuse Immunreaktion des Tieres hervorruft, die bisher noch nicht berücksichtigt wurde und weiterer Untersuchungen bedarf, um die zugrunde liegenden Mechanismen besser zu verstehen. Es ist auch bekannt, dass die IKT natürlichen Schwankungen unterliegt: Im Tagesverlauf ist die IKT am Vormittag am niedrigsten und erhöht sich langsam bis zum höchsten Wert, der am späten Nachmittag gemessen werden kann. Dieser Aspekt sollte bei der Interpretation der Ergebnisse der IKT berücksichtigt werden, sodass ein Teil des IKT-Anstiegs unter Umständen nicht alleinig auf die Mykotoxinwirkung zurückgeführt werden kann.

In Bezug auf die Pansenmotorik liegen alle gemessenen Werte im physiologischen Rahmen (1-2/5min, (Baumgartner und Wittek 2018)). Die Frequenz stieg von 5/5min bei ZEN 0 h auf 9/5min bei ZEN 3 h tendenziell an. Damit übereinstimmend haben die Kühe am ZEN-Tag mehr Futter aufgenommen als am Kontrolltag, was der Grund für die gesteigerte Pansenmotorik nach Futterzugang sein könnte. Dementgegen spiegelt sich das SCFA-Profil nicht in der angepassten Pansenmotorik wider.

Die Atemfrequenz lag während der gesamten Versuchsdauer zwischen 22/min und 25/min und somit innerhalb der physiologischen Grenzwerte (10-30/min, (Baumgartner und Wittek 2018)). Sie wurde wie bereits erwähnt durch die Aufnahme von ZEN nicht beeinflusst.

Wie erwartet, waren die Auswirkungen von ZEN auf die Gesundheitsparameter geringer als auf die Pansenfermentation, da der Pansen der erster Wirkungsort für das oral aufgenommene ZEN darstellt. Den Ergebnissen der vorliegenden Studie nach, ist der Pansen zwar in seiner Entgiftungsfunktion reduziert, kann sie aber so weit aufrechterhalten, dass nur sehr geringe Effekte von ZEN auf die Tiergesundheit zu sehen sind. Weitere Gründe für die schwachen Abweichungen der Gesundheitsmesswerte nach ZEN-Belastung könnten die sehr kurze Expositionsdauer und die geringe Menge an aufgenommenem Mykotoxin für Kühe als sehr robuste Tierart sein.

5.3 Schlussfolgerung und Ausblick

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass Kühe trotz nicht adaptiertem Mikrobiom gut mit einer kurzfristigen, geringen ZEN-Exposition zurechtkommen. Jedoch muss beachtet werden, dass sich die Bedingungen des vorliegenden Versuchs in vielen Aspekten von tatsächlichen Praxisbedingungen unterscheiden. Im Gegensatz zur Verfütterung von experimentell, mit nur einem Mykotoxin in gewünschter Konzentration kontaminierten Futter können natürlich kontaminierte Futtermittel in der Praxis eine Vielzahl an verschiedenen Mykotoxinen enthalten (Gruber-Dorninger et al. 2019, Kosicki et al. 2016, Müller 2020, Rodrigues und Naehrer 2012). Das Zusammenspiel verschiedener Mykotoxine bei Ko-Kontaminationen führt zu Wechselwirkungen, die sich in additiven, synergistischen oder antagonistischen Effekten äußern können (Alassane-Kpembi et al. 2017, Speijers und Speijers 2004) und somit auch in geringer Konzentration die Tiergesundheit negativ beeinflussen. Hinzu kommt, dass die ersten Effekte einer Intoxikation meistens sehr gering ausgeprägt sind, sich noch nicht in einem Leistungsabfall äußern und deswegen unbemerkt bleiben. Unter Praxisbedingungen zeigen sich Intoxikationen meist erst nach chronischer Mykotoxinbelastung, womit auch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit übereinstimmen. Unter Berücksichtigung dieser Aspekte könnten eine Kombination mehrerer Mykotoxine in der Futtermittelration, höhere Konzentrationen und eine längere Expositionsdauer zu reduzierter Leistung und verschlechtertem Gesundheitszustand von Kühen führen.

In der Praxis spielen Mykotoxine für Alm- oder Heumilchbetriebe eine eher untergeordnetere Rolle. In Hochleistungsbetrieben mit silagebetonter Fütterung hingegen, sind Mykotoxine von größerer Bedeutung, da in Silage mehr Mykotoxine zu finden sind. Für weiterführende Studien wäre es von großem Interesse praxisnähere Bedingungen zu schaffen und damit wie oben beschrieben beispielsweise die Kontamination von Futtermitteln mit mehreren Mykotoxinen zu berücksichtigen. Auch auf die Auswirkungen bei höherer Kraffuttermittelgabe und generell bei Hochleistungskühen, deren Stoffwechsel durch die Laktation stärker belastet ist und dadurch grundlegend eine höhere Anfälligkeit vorliegt, sollten Kern weiterführender Untersuchungen sein.

6 Zusammenfassung

Mykotoxinbelastung in Futtermitteln ist weltweit ein ernstes Problem, bei dem auch ZEN eine bedeutende Rolle spielt. Zu den Futtermitteln, die am häufigsten mit Mykotoxinen kontaminiert sind, zählen Silage, Mais und Weizen. Wiederkäuer sind Mykotoxinen somit über ihr Grund- und Kraffutter ausgesetzt, wobei sie grundsätzlich aufgrund des Detoxifikationspotenzials des Pansens robuster gegenüber Mykotoxinen sind als Monogastrier.

Bisher liegen nur wenige Studien an Wiederkäuern zur kurzfristigen Wirkung von ZEN vor, von denen die meisten die östrogene Wirkung von ZEN und vereinzelt auch Veränderungen im Pansenmikrobiom behandeln. Die folgende Studie befasst sich mit den akuten Auswirkungen von ZEN auf die Pansenfermentation und die Gesundheit von Kühen mit der Hypothese, dass ZEN sowohl das Fermentationsmuster beeinflusst als auch nachteilige Effekte auf den Gesundheitszustand von Kühen hat.

Um dieser Hypothese nachzugehen, wurden sechs pansenfistulierten Kühe an eine Grundration mit 40% Kraftfutteranteil adaptiert und an zwei aufeinanderfolgenden Tagen mit ZEN-kontaminiertem Kraffutter (200 g KF + 5 mg ZEN) gefüttert. Es wurden pH-Logger zur pH-Wert-Erfassung im Pansen eingesetzt, Pansensaftproben zur Bestimmung der SCFA-Konzentration genommen sowie der Gesundheitszustand anhand verschiedener Parameter (Puls, Atemfrequenz, innere Körpertemperatur, Pansenmotorik) beobachtet. Die Messungen und Probenentnahmen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten (0 h, 3 h, 10 h nach Futterzugang) sowohl am Tag vor Mykotoxin-Verabreichung (CON) als auch am zweiten Tag der ZEN-Behandlung (ZEN) durchgeführt.

Der Versuch zeigte einen Anstieg der Futteraufnahme und der absoluten, jedoch nicht relativen Wiederkauaktivität, sowie Tendenzen eines erhöhten ruminalen pH-Wertes und, wie erwartet, ein verändertes SCFA-Profil nach ZEN-Exposition. Unter den gegebenen experimentellen Bedingungen waren nur geringe Effekte von ZEN auf die Gesundheit der Kühe zu erkennen. Der Puls, die IKT und die Pansenmotorik wurden innerhalb des physiologischen Rahmens vom aufgenommenen ZEN beeinflusst, auf die Atemfrequenz hatte ZEN keinen Einfluss.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Kühe trotz eines höheren Kraffutteranteils in der Ration und eines nicht an das Mykotoxin adaptierten Mikrobioms sehr gut mit der ZEN-Exposition zurechtkamen. Jedoch sind weitere Versuche notwendig, um die Wirkung von ZEN unter praxisnäheren Bedingungen, wie der Kontamination von Futtermitteln mit mehreren Mykotoxinen, zu berücksichtigen und um Einflüsse von ZEN auf Hochleistungstiere mit einzubeziehen.

7 Abstract

Mycotoxin contamination in feeds is a serious, worldwide problem in which ZEN plays a significant role. Silage, pasture, hay, alfalfa, corn, and wheat are among the feeds that are most commonly contaminated with mycotoxins. Thus, ruminants are exposed to mycotoxins via both roughages and concentrate. Due to the detoxification potential of the rumen, ruminants are generally less sensitive to mycotoxins than monogastric species.

Only a limited number of studies investigating the effects of ZEN on ruminants is available, which mostly deal with the estrogenic potency of ZEN, and occasionally with changes in the ruminal microbiome. The present study focused on the acute effects of ZEN on rumen fermentation and the health conditions of cows exposed to ZEN. The hypothesis was that ZEN affects the ruminal fermentation pattern and has adverse effects on the health conditions of cows.

To investigate this hypothesis, six rumen-cannulated cows were adapted to a basal diet with 40% concentrate and fed with ZEN-contaminated concentrate (200 g concentrate + 5 mg ZEN) for two days. pH-loggers were used to continuously analyze rumen pH, rumen fluid samples were taken to determine SCFA concentration, and health status was monitored by determining various health parameters (heart rate, respiratory rate, core temperature, ruminal activity). Measurements and samplings were carried out at three time points (0 h, 3 h, 10 h after feeding) both on the day before mycotoxin administration (CON) and on the second day of ZEN treatment (ZEN).

The experiment showed an increase in feed intake and rumen activity, trends of increased ruminal pH and, as expected, an altered SCFA profile after ZEN exposure. Under the present experimental conditions, only a few effects of ZEN on the health status were seen. Heart rate, core temperature and ruminal activity were affected but maintained within the physiological range, whereas the respiratory rate was not influenced by ZEN.

These results indicate that cows fed a moderate grain diet cope very well with acute ZEN exposure, despite having a ruminal microbiome that is not adapted to the mycotoxin. However, further experiments need to evaluate the impact of ZEN under more practical conditions, such

as co-contamination of feed with multiple mycotoxins, and the influence of ZEN on high-performing lactating cows.

8 Abkürzungsverzeichnis

AF	Aflatoxin
DON	Deoxynivalenol
ER	Östrogenrezeptor
FUM	Fumonisin
GAP	Vorbildliche landwirtschaftliche Methoden (good agricultural practices)
HSD	Hydroxysteroid-Dehydrogenase
IKT	Innere Körpertemperatur
LOAEL	lowest observed adverse effect level
NOAEL	no observed adverse effect level
OTA	Ochratoxin A
RAL	Resorcyclisches Säurelacton (resorcyclic acid lactone)
RPF	Relative potency factor
SCFA	Kurzkettige Fettsäuren (short chain fatty acids)
SE	Standardfehler (standard error)
TM	Trockenmasse
TMR	Totalmischung
T-2	T-2-Toxin
VFA	Flüchtige Fettsäuren (volatile fatty acids)
ZAN	Zearalanon
ZEN	Zearalenon
α -ZAL	α -Zearalanol
α -ZEL	α -Zearalenol
β -ZAL	β -Zearalanol
β -ZEL	β -Zearalenol

9 Literaturverzeichnis

- Alassane-Kpembé I, Schatzmayr G, Taranu I, Marin D, Puel O, Oswald IP. 2017. Mycotoxins co-contamination: Methodological aspects and biological relevance of combined toxicity studies. *Critical reviews in food science and nutrition*, 57(16):3489–3507.
- Alonso VA, Pereyra CM, Keller LAM, Dalcerro AM, Rosa CAR, Chiacchiera SM, Cavaglieri LR. 2013. Fungi and mycotoxins in silage: an overview. *Journal of applied microbiology*, 115(3):637–643.
- Apple JK, Dikeman ME, Simms DD, Kuhl G. 1991. Effects of synthetic hormone implants, singularly or in combinations, on performance, carcass traits, and longissimus muscle palatability of Holstein steers. *Journal of animal science*, 69(11):4437–4448.
- Awad WA, Ghareeb K, Bohm J, Zentek J. 2010. Decontamination and detoxification strategies for the *Fusarium* mycotoxin deoxynivalenol in animal feed and the effectiveness of microbial biodegradation. *Food additives & contaminants. Part A, Chemistry, analysis, control, exposure & risk assessment*, 27(4):510–520.
- Bata Á, Lásztity R. 1999. Detoxification of mycotoxin-contaminated food and feed by microorganisms. *Trends in Food Science & Technology*, 10(6-7):223–228.
- Baumgartner W, Wittek T. 2018. *Klinische Propädeutik der Haus- und Heimtiere*. Neunte Auflage. Stuttgart: Enke Verlag.
- Bennett JW, Klich M. 2003. Mycotoxins. *Clinical microbiology reviews*, 16(3):497–516.
- Bhat R, Rai RV, Karim AA. 2010. Mycotoxins in Food and Feed: Present Status and Future Concerns. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9:57–81.
- Binder EM. 2007. Managing the risk of mycotoxins in modern feed production. *Animal Feed Science and Technology*, 133(1-2):149–166.
- Boudergue C, Burel C, Dragacci S, Favrot M-C, Fremy J-M, Massimi C, Prigent P, Debongnie P, Pussemier L, Boudra H, Morgavi D, Oswald I, Perez A, Avantaggiato G. 2009. Review of mycotoxin-detoxifying agents used as feed additives: mode of action, efficacy and feed/food safety. *EFSA Supporting Publications*, 6(9).
- Boudra H, Morgavi DP. 2008. Reduction in fusarium toxin levels in corn silage with low dry matter and storage time. *Journal of agricultural and food chemistry*, 56(12):4523–4528.
- Cheli F, Campagnoli A, Dell'Orto V. 2013. Fungal populations and mycotoxins in silages: From occurrence to analysis. *Animal Feed Science and Technology*, 183(1-2):1–16.
- Chen S-W, Wang H-T, Shih W-Y, Ciou Y-A, Chang Y-Y, Ananda L, Wang S-Y, Hsu J-T. 2019. Application of Zearalenone (ZEN)-Detoxifying *Bacillus* in Animal Feed Decontamination through Fermentation. *toxins*, 11(6).
- Čolović R, Puvača N, Cheli F, Avantaggiato G, Greco D, Đuragić O, Kos J, Pinotti L. 2019. Decontamination of Mycotoxin-Contaminated Feedstuffs and Compound Feed. *toxins*, 11(11).

- Coppock RW, Mostrom MS, Sparling CG, Jacobsen B, Ross SC. 1990. Apparent zearalenone intoxication in a dairy herd from feeding spoiled acid-treated corn. *Veterinary and Human Toxicology*, 32(3):246–248.
- Council for Agricultural Science and Technology. 2003. *Mycotoxins. Risks in plant, animal, and human systems*. Ames, Iowa: Council for Agricultural Science and Technology.
- Dänicke S. 2002. Effects of Fusarium toxin contaminated wheat grain and of a detoxifying agent on rumen physiological parameters and in sacco dry matter degradation of wheat straw and lucerne hay in wethers. *Journal of Animal and Feed Sciences*, 11:437–451.
- Dänicke S, Gädeken D, Ueberschär KH, Meyer U, Scholz H. 2002. Effects of Fusarium toxin contaminated wheat and of a detoxifying agent on performance of growing bulls, on nutrient digestibility in wethers and on the carry over of zearalenone. *Archives of animal nutrition*, 56(4):245–261.
- Dänicke S, Matthäus K, Lebzien P, Valenta H, Stemme K, Ueberschär K-H, Razzazi-Fazeli E, Böhm J, Flachowsky G. 2005. Effects of Fusarium toxin-contaminated wheat grain on nutrient turnover, microbial protein synthesis and metabolism of deoxynivalenol and zearalenone in the rumen of dairy cows. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 89(9-10):303–315.
- Dänicke S, Winkler J. 2015. Invited review: Diagnosis of zearalenone (ZEN) exposure of farm animals and transfer of its residues into edible tissues (carry over). *Food and chemical toxicology*, 84:225–249.
- Debevere S, an Cools, Baere S de, Haesaert G, Rychlik M, Croubels S, Fievez V. 2020. In Vitro Rumen Simulations Show a Reduced Disappearance of Deoxynivalenol, Nivalenol and Enniatin B at Conditions of Rumen Acidosis and Lower Microbial Activity. *toxins*, 12(2).
- D'Mello FJ, Placinta CM, Macdonald AM. 1999. Fusarium mycotoxins: a review of global implications for animal health, welfare and productivity. *Animal Feed Science and Technology*, 80(3-4):183–205.
- Dogi CA, Fochesato A, Armando R, Pribull B, Souza MMS de, Da Silva Coelho I, Araújo de Melo D, Dalcero A, Cavaglieri L. 2013. Selection of lactic acid bacteria to promote an efficient silage fermentation capable of inhibiting the activity of *Aspergillus parasiticus* and *Fusarium graminearum* and mycotoxin production. *Journal of applied microbiology*, 114(6):1650–1660.
- Döll S, Dänicke S, Schnurrbusch U. 2003. The Effect of Increasing Concentrations of Fusarium Toxins in the Diets for Piglets on Histological Parameters of the Uterus. *Mycotoxin research*, 19:73–76.
- Driehuis F, Spanjer MC, Scholten JM, te Giffel MC. 2008a. Occurrence of mycotoxins in feedstuffs of dairy cows and estimation of total dietary intakes. *Journal of dairy science*, 91(11):4261–4271.
- Driehuis F, Spanjer MC, Scholten JM, te Giffel MC. 2008b. Occurrence of mycotoxins in maize, grass and wheat silage for dairy cattle in the Netherlands. *Food additives & contaminants. Part B, Surveillance*, 1(1):41–50.

- Driehuis F, Wilkinson JM, Jiang Y, Ogunade I, Adesogan AT. 2018. Silage review: Animal and human health risks from silage. *Journal of dairy science*, 101(5):4093–4110.
- Dunière L, Sindou J, Chaucheyras-Durand F, Chevallier I, Thévenot-Sergentet D. 2013. Silage processing and strategies to prevent persistence of undesirable microorganisms. *Animal Feed Science and Technology*, 182(1-4):1–15.
- Edwards SG. 2004. Influence of agricultural practices on fusarium infection of cereals and subsequent contamination of grain by trichothecene mycotoxins. *Toxicology letters*, 153(1):29–35.
- Enemark JMD. 2008. The monitoring, prevention and treatment of sub-acute ruminal acidosis (SARA): a review. *Veterinary journal (London, England : 1997)*, 176(1):32–43.
- Eriksen GS, Pettersson H. 2004. Toxicological evaluation of trichothecenes in animal feed. *Animal Feed Science and Technology*, 114(1-4):205–239.
- Europäische Kommission. 2006. Empfehlung der Kommission vom 17. August 2006 betreffend das Vorhandensein von Deoxynivalenol, Zearalenon, Ochratoxin A, T-2 und HT-2-Toxin sowie von Fumonisin in zur Verfütterung an Tiere bestimmten Erzeugnissen. *Amtsblatt der Europäischen Union*. L 229:7-9.
- Europäische Kommission. 13.5.2009. Verordnung (EG) Nr. 386/2009 der Kommission vom 12. Mai 2009 zur Änderung der Verordnung (EG) Nr. 1831/2003 des Europäischen Parlaments und des Rates hinsichtlich der Festlegung einer neuen Funktionsgruppe für Futtermittelzusatzstoffe. *Amtsblatt der Europäischen Union*. L188:166.
- Europäische Kommission. 2010. Richtlinie 2010/63/EU des Europäischen Parlaments und des Rates vom 22. September 2010 zum Schutz der für wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere.
- European Food Safety Authority. 2016. Appropriateness to set a group health-based guidance value for zearalenone and its modified forms. *EFSA Journal*, 46.
- European Food Safety Authority. 2017. Risks for animal health related to the presence of zearalenone and its modified forms in feed. *EFSA Journal*, 123.
- Fink-Gremmels J. 2008. The role of mycotoxins in the health and performance of dairy cows. *The Veterinary Journal*, 176(1):84–92.
- Fink-Gremmels J, Malekinejad H. 2007. Clinical effects and biochemical mechanisms associated with exposure to the mycoestrogen zearalenone. *Animal Feed Science and Technology*, 137(3-4):326–341.
- Flores-Flores ME, Lizarraga E, López de Cerain A, González-Peñas E. 2015. Presence of mycotoxins in animal milk: A review. *Food Control*, 53:163–176.
- Gallo A, Giuberti G, Frisvad JC, Bertuzzi T, Nielsen KF. 2015. Review on Mycotoxin Issues in Ruminants: Occurrence in Forages, Effects of Mycotoxin Ingestion on Health Status and Animal Performance and Practical Strategies to Counteract Their Negative Effects. *toxins*, 7(8):3057–3111.

- Gerez JR, Pinton P, Callu P, Grosjean F, Oswald IP, Bracarense APFL. 2015. Deoxynivalenol alone or in combination with nivalenol and zearalenone induce systemic histological changes in pigs. *Experimental and toxicologic pathology : official journal of the Gesellschaft fur Toxikologische Pathologie*, 67(2):89–98.
- Goertz A, Zuehlke S, Spitteller M, Steiner U, Dehne HW, Waalwijk C, Vries I de, Oerke EC. 2010. *Fusarium* species and mycotoxin profiles on commercial maize hybrids in Germany. *European Journal of Plant Pathology*, 128(1):101–111.
- Goncalves BL, Corassin CH, Oliveira C. 2015. Mycotoxicoses in Dairy Cattle: A Review. *Asian J. of Animal and Veterinary Advances*, 10(11):752–760.
- Gruber-Dorninger C, Jenkins T, Schatzmayr G. 2019. Global Mycotoxin Occurrence in Feed: A Ten-Year Survey. *toxins*, 11(7).
- Hussein HS, Brasel JM. 2001. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. *Toxicology*, 167(2):101–134.
- Jard G, Liboz T, Mathieu F, Guyonvarc'h A, Lebrihi A. 2011. Review of mycotoxin reduction in food and feed: from prevention in the field to detoxification by adsorption or transformation. *Food additives & contaminants. Part A, Chemistry, analysis, control, exposure & risk assessment*, 28(11):1590–1609.
- Jouany JP. 2007. Methods for preventing, decontaminating and minimizing the toxicity of mycotoxins in feeds. *Animal Feed Science and Technology*, 137(3-4):342–362.
- Jouany JP, Diaz DE, Hrsg. 2005. *The Mycotoxin Blue Book. Effects of mycotoxins in ruminants.* Nottingham, UK: Nottingham University Press. 295-321.
- Kabak B, Dobson ADW, Var I. 2006. Strategies to prevent mycotoxin contamination of food and animal feed: a review. *Critical reviews in food science and nutrition*, 46(8):593–619.
- Keller L, González Pereyra ML, Keller KM, Alonso VA, Oliveira AA, Almeida TX, Barbosa TS, Nunes L, Cavaglieri LR, Rosa C. 2013. Fungal and mycotoxins contamination in corn silage: Monitoring risk before and after fermentation. *Journal of Stored Products Research*, 52:42–47.
- Kemboi DC, Antonissen G, Ochieng PE, Croubels S, Okoth S, Kangethe EK, Faas J, Lindahl JF, Gathumbi JK. 2020. A Review of the Impact of Mycotoxins on Dairy Cattle Health: Challenges for Food Safety and Dairy Production in Sub-Saharan Africa. *toxins*, 12(4):222.
- Kiessling K-H, Pettersson H. 1978. Metabolism of Zearalenone in Rat Liver. *Acta Pharmacologica et Toxicologica*, 43(4).
- Kiessling K-H, Pettersson H, Sandholm K, Olsen M. 1984. Metabolism of Aflatoxin, Ochratoxin, Zearalenone, and Three Trichothecenes by Intact Rumen Fluid, Rumen Protozoa, and Rumen Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 47(5):1070–1073.
- Kleinova M, Zöllner P, Kahlbacher H, Hochsteiner W, Lindner W. 2002. Metabolic profiles of the mycotoxin zearalenone and of the growth promoter zeranol in urine, liver, and muscle of heifers. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50(17):4769–4776.

- Klevenhusen F, Petri RM, Kleefisch M-T, Khiaosa-Ard R, Metzler-Zebeli BU, Zebeli Q. 2017. Changes in fibre-adherent and fluid-associated microbial communities and fermentation profiles in the rumen of cattle fed diets differing in hay quality and concentrate amount. *FEMS microbiology ecology*, 93(9).
- Korosteleva SN, Smith TK, Boermans HJ. 2009. Effects of feed naturally contaminated with *Fusarium* mycotoxins on metabolism and immunity of dairy cows. *Journal of dairy science*, 92(4):1585–1593.
- Kosicki R, Błajet-Kosicka A, Grajewski J, Twarużek M. 2016. Multiannual mycotoxin survey in feed materials and feedingstuffs. *Animal Feed Science and Technology*, 215:165–180.
- Kowalska K, Habrowska-Górczyńska DE, Piastowska-Ciesielska AW. 2016. Zearalenone as an endocrine disruptor in humans. *Environmental toxicology and pharmacology*, 48:141–149.
- Kröger I, Humer E, Neubauer V, Kraft N, Ertl P, Zebeli Q. 2016. Validation of a noseband sensor system for monitoring ruminating activity in cows under different feeding regimens. *Livestock Science*, 193:118–122.
- Kuiper GG, Lemmen JG, Carlsson B, Corton C, Safe SH, Van der Saag PT, Van der Burg B, Gustafsson J. 1998. Interaction of Estrogenic Chemicals and Phytoestrogens with Estrogen Receptor beta. *Endocrinology*, 139(10):4252–4263.
- Lioi MB, Santoro A, Barbieri R, Salzano S, Ursini MV. 2004. Ochratoxin A and zearalenone: a comparative study on genotoxic effects and cell death induced in bovine lymphocytes. *Mutation research*, 557(1):19–27.
- Loh ZH, Ouwerkerk D, Klieve AV, Hungerford NL, Fletcher MT. 2020. Toxin Degradation by Rumen Microorganisms: A Review. *toxins*, 12(10).
- Loi M, Fanelli F, Liuzzi VC, Logrieco AF, Mulè G. 2017. Mycotoxin Biotransformation by Native and Commercial Enzymes: Present and Future Perspectives. *toxins*, 9(4).
- Maiorano A, Blandino M, Reyneri A, Vanara F. 2008. Effects of maize residues on the *Fusarium* spp. infection and deoxynivalenol (DON) contamination of wheat grain. *Crop Protection*, 27(2):182–188.
- Malekinejad H, Colenbrander B, Fink-Gremmels J. 2006. Hydroxysteroid Dehydrogenases in Bovine and Porcine Granulosa Cells Convert Zearalenone into its Hydroxylated Metabolites α -Zearalenol and β -Zearalenol. *Veterinary Research Communications*, 30:445–453.
- Malekinejad H, Maas-Bakker R, Fink-Gremmels J. 2006. Species differences in the hepatic biotransformation of zearalenone. *Veterinary journal*, 172(1):96–102.
- Marin S, Ramos AJ, Cano-Sancho G, Sanchis V. 2013. Mycotoxins: occurrence, toxicology, and exposure assessment. *Food and chemical toxicology*, 60:218–237.
- Mathur S, Constable PD, Eppley RM, Waggoner AL, Tumbleson ME, Haschek WM. 2001. Fumonisin B1 is hepatotoxic and nephrotoxic in milk-fed calves. *Toxicological Sciences*, 60:385–396.

- Medina A, Rodriguez A, Magan N. 2014. Effect of climate change on *Aspergillus flavus* and aflatoxin B1 production. *Frontiers in microbiology*, 5:348.
- Metzler M. 2011. Proposal for a uniform designation of zearalenone and its metabolites. *Mycotoxin research*, 27(1):1–3.
- Minervini F, Dell'Aquila ME. 2008. Zearalenone and reproductive function in farm animals. *International journal of molecular sciences*, 9(12):2570–2584.
- Minervini F, Dell'Aquila ME, Maritato F, Minoia P, Visconti A. 2001. Toxic effects of the mycotoxin zearalenone and its derivatives on in vitro maturation of bovine oocytes and 17 β -estradiol levels in mural granulosa cell cultures. *Toxicology in Vitro*, 15:489–495.
- Mirocha CJ, Harrison J, Nichols AA, McClintock M. 1968. Detection of a Fungal Estrogen (F-2) in Hay Associated with Infertility in Dairy Cattle. *Applied Microbiology*, 16(5):797–798.
- Mirocha CJ, Pathre SV, Robison TS. 1981. Comparative metabolism of zearalenone and transmission into bovine milk. *Food and Cosmetics Toxicology*, 19:25–30.
- Mobashar M, Hummel J, Blank R, Südekum K-H. 2010. Ochratoxin A in ruminants—A review on its degradation by gut microbes and effects on animals. *toxins*, 2(4):809–839.
- Möser S. 2001. Einfluss von Zearalenon und Zeranol bei Kalbinnen [Dissertation]. Wien: Veterinärmedizinische Universität.
- Müller A. 2020. Der Einfluss von Mykotoxinen auf die Gesundheit von Milchkühen. *Biomin Webinar*.
- Ogunade IM, Martinez-Tupia C, Queiroz OCM, Jiang Y, Drouin P, Wu F, Vyas D, Adesogan AT. 2018. Silage review: Mycotoxins in silage: Occurrence, effects, prevention, and mitigation. *Journal of dairy science*, 101(5):4034–4059.
- Pestka JJ. 2007. Deoxynivalenol: Toxicity, mechanisms and animal health risks. *Animal Feed Science and Technology*, 137(3-4):283–298.
- Petri RM, Kröger I, Schatzmayr D, Zebeli Q. 2018. Impact of zearalenone feeding on the rumen microbiome and rumen fermentation.
- Prandini A, Tansini G, Sigolo S, Filippi L, Laporta M, Piva G. 2009. On the occurrence of aflatoxin M1 in milk and dairy products. *Food and chemical toxicology*, 47(5):984–991.
- Prelusky DB, Scott PM, Trenholm HL, Lawrence GA. 1990. Minimal transmission of zearalenone to milk of dairy cows. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 25(1):87–103.
- Qumar M, Khiaosa-Ard R, Pourazad P, Wetzels SU, Klevenhusen F, Kandler W, Aschenbach JR, Zebeli Q. 2016. Evidence of In Vivo Absorption of Lactate and Modulation of Short Chain Fatty Acid Absorption from the Reticulorumen of Non-Lactating Cattle Fed High Concentrate Diets. *PloS one*, 11(10):e0164192.
- Rai A, Das M, Tripathi A. 2020. Occurrence and toxicity of a fusarium mycotoxin, zearalenone. *Critical reviews in food science and nutrition*, 60(16):2710–2729.

- Ramos SC, Jeong CD, Mamuad LL, Kim SH, Kang SH, Kim ET, Cho YI, Lee SS, Lee SS. 2021. Diet Transition from High-Forage to High-Concentrate Alters Rumen Bacterial Community Composition, Epithelial Transcriptomes and Ruminal Fermentation Parameters in Dairy Cows. *Animals*, 11(3).
- Ribelin WE, Fukushima K, Still PE. 1978. The Toxicity of Ochratoxin to Ruminants. *Canadian Journal of Comparative Medicine*, 42(2):172–176.
- Rodrigues I, Naehrer K. 2012. A three-year survey on the worldwide occurrence of mycotoxins in feedstuffs and feed. *toxins*, 4(9):663–675.
- Rotter BA, Prelusky DB, Pestka JJ. 1996. Toxicology of deoxynivalenol (vomitoxin). *Journal of toxicology and environmental health*, 48(1):1–34.
- Schollenberger M, Müller H-M, Rühle M, Suchy S, Plank S, Drochner W. 2006. Natural occurrence of 16 fusarium toxins in grains and feedstuffs of plant origin from Germany. *Mycopathologia*, 161(1):43–52.
- Seeling K, Boguhn J, Strobel E, Dänicke S, Valenta H, Ueberschär KH, Rodehutschord M. 2006. On the effects of Fusarium toxin contaminated wheat and wheat chaff on nutrient utilisation and turnover of deoxynivalenol and zearalenone in vitro (Rusitec). *Toxicology in Vitro*, 20(5):703–711.
- Seeling K, Dänicke S. 2005. Relevance of the Fusarium toxins deoxynivalenol and zearalenone in ruminant nutrition. A review. *Journal of Animal and Feed Sciences*, 14(1):3–40.
- Seeling K, Dänicke S, Ueberschär KH, Lebzien P, Flachowsky G. 2005. On the effects of Fusarium toxin-contaminated wheat and the feed intake level on the metabolism and carry over of zearalenone in dairy cows. *Food additives and contaminants*, 22(9):847–855.
- Seeling K, Dänicke S, Valenta H, van Egmond HP, Schothorst RC, Jekel AA, Lebzien P, Schollenberger M, Razzazi-Fazeli E, Flachowsky G. 2006a. Effects of Fusarium toxin-contaminated wheat and feed intake level on the biotransformation and carry-over of deoxynivalenol in dairy cows. *Food additives and contaminants*, 23(10):1008–1020.
- Seeling K, Lebzien P, Dänicke S, Spilke J, Südekum K-H, Flachowsky G. 2006b. Effects of level of feed intake and Fusarium toxin-contaminated wheat on rumen fermentation as well as on blood and milk parameters in cows. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 90(3-4):103–115.
- Sliková S, Gavurníková S, Sudyová V, Gregová E. 2013. Occurrence of deoxynivalenol in wheat in Slovakia during 2010 and 2011. *toxins*, 5(8):1353–1361.
- Smith JF, Di Menna ME, McGowan LT. 1990. Reproductive performance of Coopworth ewes following oral doses of zearalenone before and after mating. *J. Reprod. Fert.*, 89:99–106.
- Speijers GJA, Speijers MHM. 2004. Combined toxic effects of mycotoxins. *Toxicology letters*, 153(1):91–98.
- Strob M, Baldwin RS, Tuite J, Andrews FN, Gillette KG. 1962. Isolation of an Anabolic, Uterotrophic Compound from Corn infected with *Gibberella zeae*. *Nature*, 196:1318.

- Sweeney MJ, Dobson AD. 1998. Mycotoxin production by *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* species. *International Journal of Food Microbiology*, 43:141–158.
- Takagi M, Mukai S, Kuriyagawa T, Takagaki K, Uno S, Kokushi E, Otoi T, Budiyanto A, Shirasuna K, Miyamoto A, Kawamura O, Okamoto K, Deguchi E. 2008. Detection of zearalenone and its metabolites in naturally contaminated follicular fluids by using LC/MS/MS and in vitro effects of zearalenone on oocyte maturation in cattle. *Reproductive toxicology*, 26(2):164–169.
- Tanaka T, Yoneda A, Inoue S, Sugiura Y, Ueno Y. 2000. Simultaneous determination of trichothecene mycotoxins and zearalenone in cereals by gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 882:23–28.
- Teller RS, Schmidt RJ, Whitlow LW, Kung L. 2012. Effect of physical damage to ears of corn before harvest and treatment with various additives on the concentration of mycotoxins, silage fermentation, and aerobic stability of corn silage. *Journal of dairy science*, 95(3):1428–1436.
- Upadhaya SD, Park MA, Ha JK. 2010. Mycotoxins and Their Biotransformation in the Rumen: A Review. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.*, 23(9):1250–1260.
- Urry WH, Wehrmeister HL, Hodge EB, Hidy PH. 1996. The Structure of Zearalenone. *Tetrahedron Letters*, 7(27):3109–3114.
- Valenta H, Vemmer H. 1996. In vitro-Untersuchungen zum Metabolismus von Zearalenon bei Inkubation mit Pansensaft. *Mycotoxin research*.
- Vasanthi S, Bhat RV. 1998. Mykotoxins in food - Occurrence, health & economic significance & food control measures. *Indian J Med Res*, 108:212–224.
- Vila-Donat P, Marín S, Sanchis V, Ramos AJ. 2018. A review of the mycotoxin adsorbing agents, with an emphasis on their multi-binding capacity, for animal feed decontamination. *Food and chemical toxicology*, 114:246–259.
- Wambacq E, Vanhoutte I, Audenaert K, Gelder L de, Haesaert G. 2016. Occurrence, prevention and remediation of toxigenic fungi and mycotoxins in silage: a review. *Journal of the science of food and agriculture*, 96(7):2284–2302.
- Wang N, Wu W, Pan J, Long M. 2019. Detoxification Strategies for Zearalenone Using Microorganisms: A Review. *Microorganisms*, 7(7).
- Weaver GA, Kurtz HJ, Behrens JC, Robison TS, Seguin BE, Bates FY, Mirocha CJ. 1986a. Effect of zearalenone on dairy cows. *American Journal of Veterinary Research*, 47(8):1826–1828.
- Weaver GA, Kurtz HJ, Behrens JC, Robison TS, Seguin BE, Bates FY, Mirocha CJ. 1986b. Effect of zearalenone on the fertility of virgin dairy heifers. *American Journal of Veterinary Research*, 47(6):1395–1397.
- Whitlow L, Hagler W. 2008. Mold and Mycotoxin Issues in Dairy Cattle: Effects, Prevention and Treatment. *Adv. Dairy Technol.*, 20:195–209.

- Whitlow LW, Hagler WM. 2005. Mycotoxins in Dairy Cattle: Occurrence, Toxicity, Prevention and Treatment. Proc. Southwest Nutrition Conference. 124-138.
- Winkler J, Kersten S, Meyer U, Engelhardt U, Dänicke S. 2014. Residues of zearalenone (ZEN), deoxynivalenol (DON) and their metabolites in plasma of dairy cows fed Fusarium contaminated maize and their relationships to performance parameters. Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association, 65:196–204.
- Xiao H, Marquardt RR, Frohlich AA, Phillips GD, Vitti TG. 1991. Effect of a hay and a grain diet on the bioavailability of ochratoxin A in the rumen of sheep. Journal of animal science, 69(9):3715–3723.
- Zain ME. 2011. Impact of mycotoxins on humans and animals. Journal of Saudi Chemical Society, 15(2):129–144.
- Zebeli Q, Metzler-Zebeli BU. 2012. Interplay between rumen digestive disorders and diet-induced inflammation in dairy cattle. Research in Veterinary Science, 93(3):1099–1108.
- Zhang J, Shi H, Wang Y, Li S, Cao Z, Ji S, He Y, Zhang H. 2017. Effect of Dietary Forage to Concentrate Ratios on Dynamic Profile Changes and Interactions of Ruminal Microbiota and Metabolites in Holstein Heifers. Frontiers in microbiology, 8:2206.
- Zhu Y, Hassan YI, Watts C, Zhou T. 2016. Innovative technologies for the mitigation of mycotoxins in animal feed and ingredients—A review of recent patents. Animal Feed Science and Technology, 216:19–29.
- Zinedine A, Soriano JM, Moltó JC, Mañes J. 2007. Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of zearalenone: an oestrogenic mycotoxin. Food and chemical toxicology, 45(1):1–18.

10 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1. Chemische Strukturformel von Zearalenon (nach Vorlage von Minervini und Dell'Aquila (2008)).	15
Abb. 2. Versuchsaufbau.	26
Abb. 3. Pulsfrequenz im Phasenvergleich. Verglichen mit ZEN 0 h (a) stieg der Puls 10 h nach Aufnahme von ZEN (b) signifikant an.	31
Abb. 4. Atemfrequenz im Phasenvergleich zeigte keine (signifikanten) Abweichungen.	32
Abb. 5. Innere Körpertemperatur im Phasenvergleich. Die signifikante Erhöhung wurde mit (a) bzw. (b) während der Kontrollphase und mit (A) bzw. (B) während der ZEN-Phase gekennzeichnet.	33
Abb. 6. Pansenmotorik im Phasenvergleich. Der Trend während der ZEN-Phase wird mit (y) für ZEN 0 h und (z) für ZEN 3 h dargestellt.	34
Abb. 7. Futteraufnahme (li) und Wiederkauaktivität (re) im Phasenvergleich (CON, ZEN). Sowohl die Aufnahme von TM als auch die Zeit des Wiederkauens erhöhte sich nach der Behandlung mit ZEN (b) im Vergleich zu CON (a).	35
Abb. 8. Pansen pH-Werte (mean, min, max) im Phasenvergleich (CON, ZEN). Der maximale ruminale pH-Wert wird mit (y) während CON und mit (z) während der ZEN-Phase gekennzeichnet.	35
Abb. 9. Tagesverlauf des Pansen pH-Wertes im Phasenvergleich (CON, ZEN). Die vertikale Linie auf Stunde 14 kennzeichnet den letzten Zugang zum Futtertrog.	36
Abb. 10. Gesamtkonzentration der flüchtigen Fettsäuren sowohl im Vergleich der Messzeitpunkte als auch der Phasen. Die Gegenüberstellung von CON 3 h und ZEN 3 h wurde mit A bzw. B gekennzeichnet. Die signifikanten Unterschiede innerhalb von ZEN wurden mit (a) für ZEN 0 bzw. ZEN 3 und (b) für ZEN 10 h beschrieben.	37
Abb. 11. Prozentuelle Anteile der flüchtigen Fettsäuren vor (CON) und nach der Behandlung mit ZEN (ZEN) zu den Messzeitpunkten 0, 3, 7 und 10 h nach Futteraufnahme.	38

11 Tabellenverzeichnis

Tab. 1. Zusammenfassung der Effekte der bedeutendsten Mykotoxine bei Wiederkäuern. ...	8
Tab. 2. Futterzusammensetzung der TMR.....	27
Tab. 3. Analysierte Nährstoffzusammensetzung und Partikelgrößenverteilung der TMR mit 60 % Grundfutter und 40 % Kraftfutter (n = 3).....	27
Tab. 4. Daten der Versuchstiere.	28
Tab. 5. Zusammenfassung der wichtigsten Mykotoxin-Gehalte in der TMR.....	29