

Aus dem Department für Nutztiere und öffentliches Gesundheitswesen in der
Veterinärmedizin

der Veterinärmedizinischen Universität Wien

Institut für Tierernährung und funktionelle Pflanzenstoffe

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

Untersuchungen zum Einfluss von Fumonisin auf die
Pansenfermentation und Gesundheitsparameter beim
Rind

Diplomarbeit

Veterinärmedizinische Universität Wien

vorgelegt von

Barbara Maria Theresa Angelmayr

Wien, im Dezember, 2022

Betreuer:

Dr.agr. Thomas Dietmar Said Hartinger

Institut für Tierernährung und funktionelle Pflanzenstoffe

Department für Nutztiere und öffentliches Gesundheitswesen in
der Veterinärmedizin

Veterinärmedizinische Universität Wien

Begutachter:

Ao.Univ.-Prof. Dr.med.vet. Peter Paulsen, Dipl.ECVPH

Abteilung für Technologie und Hygiene von Lebensmitteln

Veterinärmedizinische Universität Wien

INHALTSVERZEICHNIS

1.	EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG	1
2.	LITERATURÜBERSICHT	3
2.1.	MYKOTOXIKOSEN	3
2.1.1.	Rindergesundheit	4
2.2.	VORKOMMEN.....	7
2.2.1.	Analysemethoden.....	11
2.2.2.	Präventions- und Dekontaminationsstrategien	12
2.3.	FUSARIUM.....	14
2.3.1.	Taxonomische Einordnung.....	14
2.3.2.	Fusarientoxine	14
2.4.	FUMONISINE.....	20
2.4.1.	Toxizität von Fumonisin.....	21
2.4.2.	Effekte auf die Rindergesundheit	21
3.	TIERE, MATERIAL UND METHODIK.....	26
3.1.	PROJEKTAUFBAU, BEHANDLUNG UND FÜTTERUNG DER TIERE	26
3.2.	FUTTERMITTELANALYSEN.....	28
3.3.	KAUAKTIVITÄT, PANSEN-PH-WERT UND TIERGESUNDHEITSPARAMETER	30
3.4.	BLUTENTNAHME UND ANALYSE DER LEBERENZYME	31
3.5.	ANALYSEN VON KURZKETTIGEN FETTSÄUREN.....	31
3.6.	STATISTIK	32
4.	ERGEBNISSE	33
4.1.	Vitalparameter	33
4.2.	Pansengesundheit und Fermentation.....	35
4.3.	Leberenzyme	37
4.4.	Fressverhalten	37

4.5.	Mykotoxinbelastung in Trockenmasse	38
5.	DISKUSSION	40
5.1.	EFFEKTE VON FUMONISIN AUF DIE RINDERGESUNDHEIT.....	40
5.2.	EFFEKTE VON FUMONISIN AUF DIE PANSEN-FERMENTATION, BLUTWERTE	41
6.	ZUSAMMENFASSUNG	45
7.	SUMMARY	47
8.	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	49
9.	LITERATURVERZEICHNIS	51
10.	ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	56
11.	TABELLENVERZEICHNIS.....	57

Widmung

1. Einleitung und Fragestellung

Mykotoxine sind Sekundärmetabolite, die durch Schimmelpilze produziert werden (Whitlow et al. 2010). Laut FAO (Ernährungs- und Landwirtschaftsorganisation der Vereinten Nationen) sind pro Jahr rund 25 % des weltweit produzierten Getreides mit Mykotoxinen kontaminiert (Marin et al. 2013). So sind auch in Österreich flächendeckend Mykotoxinbelastungen nachweisbar. In einer kürzlich durchgeführten Studie wurde das gleichzeitige Auftreten von mehreren Mykotoxinen bei Milchkühen in Österreich beschrieben. Durchschnittlich wurden 31 verschiedene Metaboliten pro Futtermittelprobe detektiert, wobei *Fusarium*-Metaboliten, unter ihnen am stärksten Deoxynivalenol (DON), Zearalenon (ZEN) und Fumonisin B1 (FB1), am häufigsten vertreten waren. Es wurden vier Fumonisine nachgewiesen: FB1 (Prävalenz: 70,7 %), Fumonisin B2 (FB2) (35,4 %), Fumonisin B3 (FB3) (6,1 %) und Fumonisin B4 (FB4) (4,5 %). Die Summe von FB1 und FB2 schwankte zwischen 26,5 und 1370 µg/kg Trockenmasse (TM) (Penagos-Tabares et al. 2022). Fumonisin B1 und B2 traten in der Regel zusammen mit anderen Mykotoxinen auf, wie vor allem ZEN, DON und den neu auftretenden Mykotoxinen Ennitainen und Beauvericin. Die vorkommenden Konzentrationen überschritten die Richtwerte der Europäischen Kommission nicht (Penagos-Tabares et al. 2022). Die von der Europäischen Kommission empfohlenen Richtwerte für Milchviehfutter betragen 50.000 µg/kg FB1 und FB2 (Kommission 2006).

Diese Futtermittelkontaminationen mit Mykotoxinen können zu erheblichen wirtschaftlichen Verlusten sowie gesundheitlichen Problemen bei Mensch und Tier führen (Kemboi et al. 2020). Durch die Aufnahme von kontaminiertem Futter können sogenannte Mykotoxikosen entstehen. Dieses multifaktoriell verursachte Krankheitsbild ist zu Beginn meist durch subakute Symptome geprägt und wird deshalb häufig nicht erkannt (Gallo et al. 2015). Fumonisine (FUM), speziell das am häufigsten vorkommende FB1, werden hauptsächlich von *Fusarium*-Arten wie *F. verticillioides* und *F. proliferatum* produziert (Marin et al. 2013, Ogunade et al. 2018). Die IARC (Internationale Agentur für Krebsforschung) stufte FB1 als mögliches Karzinogen für den Menschen ein (IARC, 2012). Wiederkäuer sind im Vergleich zu Monogastriern wie Pferden und Schweinen relativ resistent gegen FUM (Gupta 2019, Mostrom und Jacobsen 2020). Die Mikrobiota des Pansens von gesunden Tieren können einige Mykotoxine, wie DON, in weniger toxische Metaboliten abbauen und werden daher als Barriere gegen den Einfluss von Mykotoxinen gesehen. Allerdings wurde gezeigt, dass FUM den Pansen weitgehend unverändert passiert (Caloni et al. 2000) und nach der Aufnahme

von *Fusarium*-Toxinen können auch bei Rindern negative Auswirkungen auf die Gesundheit und Leistung der Tiere beobachtet werden (Gallo et al. 2020).

In experimentellen Studien wurde bei Milchkühen, verursacht durch kontaminiertes Futter mit sehr hohen FUM-Konzentrationen, die natürlich nicht vorkommen und weit über den Richtwerten liegen, eine Verringerung der Futtermittelaufnahme und der Milchproduktion festgestellt (Diaz et al., 2000). Weiters konnten erhöhte Leberenzyme bei Mastkälbern festgestellt werden (Osweiler et al. 1993). Rückstände in Gewebe und Milch werden hingegen nicht als Problem angesehen (Fink-Gremmels und van der Merwe 2019). Jedoch können auch niedrigere FUM-Konzentrationen, besonders bei Co-Kontaminationen, negative Auswirkungen auf die Immunität, die Leistung und die Verdauung von Rindern haben (Fink-Gremmels 2008). Diese negativen Auswirkungen wurden jedoch bei Intoxikation über Zeiträume von mehreren Wochen beobachtet, da FUM Gesundheitsbeeinträchtigungen insbesondere bei chronischer Exposition zugeschrieben werden. Welche akuten Einflüsse FUM auf Rinder haben, ist hingegen ungewiss und bisher kaum erforscht. Da eine direkte Wirkung auf das Tier allerdings nicht ausgeschlossen werden kann, gilt es diese Wissenslücke durch Forschung zu schließen.

Die vorliegende Diplomarbeit beschäftigt sich mit den akuten Auswirkungen nach einer kurzfristigen oralen FUM-Exposition auf verschiedene Variablen der Kuhgesundheit und Pansenfermentation. Durch die erlangten Ergebnisse sollen die folgenden Hypothesen verifiziert werden: Die mikrobielle Population des Pansens wird durch Aufnahme von FUM beeinträchtigt. Dies führt zu geringeren Konzentrationen kurzkettiger Fettsäuren und einer Veränderung des ruminalen pH-Werts. Weiters wurde angenommen, dass eine Intoxikation mit FUM das Wohlbefinden und die Gesundheit der Kuh akut beeinträchtigt und folglich erhöhte Leberenzymwerte und veränderte Gesundheitsparameter feststellbar sind. Es wurden sechs trockenstehende Milchkühe, denen eine Totalmischration mit 40 % Kraftfutter auf TM-Basis gefüttert wurde, beprobt.

2. Literaturübersicht

2.1. Mykotoxikosen

Mykotoxine sind sekundäre Stoffwechselprodukte, die von Schlauchpilzen (*Ascomycota*) produziert werden (Alshannaq und Yu 2017). Besonders die von *Aspergillus*-, *Penicillium*- und *Fusarium*-Arten produzierten Mykotoxine sind von Bedeutung für die Tierhaltung (Kemboi et al. 2020). Eine Mykotoxinkontamination von Futtermitteln kann zu Problemen der Lebensmittelsicherheit sowie schwerwiegenden wirtschaftlichen Problemen führen, wie z.B. Handels- oder Einkommenseinbußen aufgrund der Zurückweisung kontaminierter Produkte, teurer Eindämmungsmaßnahmen oder höherer Behandlungskosten in der Tierproduktion (Kemboi et al. 2020).

Es können zwei Formen der Mykotoxikose unterschieden werden. Die akute Mykotoxikose, die nach dem Verzehr hoher Einzeldosen von Mykotoxinen auftritt, und die chronische Mykotoxikose, die meist durch eine geringe Exposition über einen längeren Zeitraum verursacht wird (Kemboi et al. 2020). Hierbei steigert sich die toxische Wirkung der Mykotoxine im Laufe der Aufnahmedauer und ist am Anfang kaum wahrnehmbar (Goncalves et al. 2015).

Der Verzehr von kontaminierten Futtermitteln, aber auch die Inhalation oder sogar der Hautkontakt mit Mykotoxinen kann bei Tieren zu einer Mykotoxikose führen (Marin et al. 2013). Diese Vergiftung ist durch Toxin-abhängige individuelle klinische Anzeichen gekennzeichnet und kann große Probleme für die Tiergesundheit verursachen (Kemboi et al. 2020). Einige mögliche klinische Symptome, die durch Mykotoxine verursacht werden, sind Leber- und Nierenschäden, Durchfall, Lungenödeme, Erbrechen, Blutungen und Tumore (Streit et al. 2012). Das Nervensystem kann ebenfalls angegriffen werden (Goncalves et al. 2015).

Es gibt einige diagnostische Anzeichen, bei denen eine Mykotoxikose in Betracht gezogen werden sollte: Es ist eine nicht übertragbare, saisonal auftretende Krankheit, die auf eine Behandlung mit Medikamenten und Antibiotika kaum bis nicht anspricht (Marin et al. 2013). Durch Futtermittelanalysen können Schimmelpilze als Auslöser der Symptome festgestellt werden (Marin et al. 2013).

Die Empfindlichkeit gegenüber Mykotoxinen variiert von Tierart zu Tierart. Zudem ist sie stark abhängig von der Konzentration der gebildeten Toxine und der davon aufgenommenen

Dosis, aber auch das Alter, die Fütterung und Haltung spielen eine entscheidende Rolle (Razzazi-Fazeli et al. 2003). Durch Mykotoxikosen werden, besonders bei Jungtieren, geringere Produktionsleistungen und höhere Sterblichkeitsraten verursacht (Kemboi et al. 2020).

Normalerweise führen die unter Feldbedingungen auftreten geringen Mykotoxinkonzentrationen zu keinen offensichtlichen klinischen Symptomen (Streit et al. 2012). Da durch Pansenmikroben gewisse Mykotoxine abgebaut werden können, sind Wiederkäuer vor Mykotoxikosen besser geschützt als Monogastrier (Razzazi-Fazeli et al. 2003).

2.1.1. Rindergesundheit

Fusarium-Mykotoxine können bei Rindern eine Reduktion der Leistung, unter anderem im Bereich der Reproduktion, Milchgewinnung und des Wachstums verursachen (Gallo et al. 2020). Besonders Hochleistungsmilchkühe (Goncalves et al. 2015), die mit einer komplexen Diät gefüttert werden, die verschiedene Futtermittel und Mykotoxine enthält, sind in der Übergangsphase, die durch eine vorangegangene negative Energiebilanz gekennzeichnet ist, empfindlich gegenüber Mykotoxinen (Fink-Gremmels 2008). Auch Tiere mit einem bereits beeinträchtigten Gesundheitszustand sind anfälliger für Mykotoxikosen (Goncalves et al. 2015). Darüber hinaus kann durch Mykotoxin-Intoxikationen die Gefahr einer Ketose oder Labmagenverlagerung gesteigert werden (Goncalves et al. 2015).

Das Vorkommen von Schimmel, ohne die Produktion von Toxinen, führt meist schon zu einem 10 %igen Rückgang der Leistung (Goncalves et al. 2015). Das Futter wird auf Grund des veränderten Geruchs und Geschmacks von den Tieren schlechter akzeptiert. So führt Schimmelgeruch, der durch so genannte mikrobielle flüchtige organische Verbindungen (MVOC) entsteht, bei Rindern zu einer verringerten Futteraufnahme und einer verlängerten Fresszeit (Fink-Gremmels 2008), was zu einem Rückgang der Trockenmasseaufnahme führt. Die Folgen sind eine geringere Milchleistung (Bani Ismail et al. 2020) und schlechtere Gewichtszunahmen (Goncalves et al. 2015).

Weiters kann bei Milchkühen eine verminderte Milchqualität festgestellt werden (Bani Ismail et al. 2020, Kemboi et al. 2020). Eine erhöhte Anzahl somatischer Zellen in der Milch wurde von Goncalves et al. (2015) berichtet.

Fruchtbarkeitsprobleme mit verringerter Reproduktion (Bani Ismail et al. 2020, Kemboi et al. 2020), sowie hepatotoxische und nephrotoxische Wirkungen werden beschrieben (Kemboi et al. 2020).

Die immunsuppressive Wirkung durch Mykotoxine kann zu Impfversagen führen und die Tiere zeigen eine höhere Anfälligkeit für Infektionskrankheiten (Kemboi et al. 2020) und Parasiten (Streit et al. 2012). Mittels *in vitro* Studien konnte im Vergleich mit Immunzellen von Schweinen und Geflügel eine höhere Sensitivität bei bovinen Immunzellen gegenüber *Fusarium*-Toxinen festgestellt werden (Duringer et al. 2020).

Durch die Aufnahme von *Fusarium* Toxinen, vor allem von DON und FB1, kann die Abwehrfunktion des Darms beeinträchtigt werden (Gallo et al. 2020). Die Zellproliferation und Mucusproduktion lassen nach, die Darmwand wird durchlässiger und es werden weniger Immunglobuline und Zytokine gebildet (Gallo et al. 2020). Laut Reisinger et al. (2019) hat das *Fusarium*-Toxin Nivalenol (NIV) die höchste Zytotoxizität auf die Darmzellen bei Rindern, gefolgt von DON, Enniatin B (ENNB) und FB1 in absteigender Reihenfolge.

Die Pansenmikroflora kann die chemische Struktur von Mykotoxinen, sowohl in stärker als auch schwächer toxisch wirkende Metaboliten, umwandeln (Kemboi et al. 2020) oder Mykotoxine sogar inaktivieren (Fink-Gremmels 2008). Mittels einfacher Hydrolyse durch bestimmte Pansenmikroben können gewisse Mykotoxine unschädlich gemacht werden (Loh et al. 2020). So wird etwa Ochratoxin A (OTA) mit Hilfe von Pansenprotozoen, *Bacillus licheniformis* und *Lactobacillus vitulinus* in nicht toxisch wirkendes Ochratoxin α und Phenylalanin hydrolysiert. Durch *Eubacterium* können NIV, DON und T-2 Toxin in deren ungiftigere Metaboliten umgebaut werden. Die verantwortlichen ruminalen Mikroorganismen und der genaue Abbauprozess für die Gruppe der Fumonisine konnten allerdings noch nicht identifiziert werden (Caloni et al. 2000, Loh et al. 2020). Diese Toxinresistenz kann durch Übertragung von Panseninhalt eines resistenten Wiederkäuers auf naive Tiere erreicht werden (Loh et al. 2020).

Die Entgiftungsmaßnahmen der Pansenmikroflora sind limitiert und können durch metabolische Imbalancen, wie ruminale Azidose vermindert werden (Fink-Gremmels 2008). Rinder in der Transitperiode sind besonders anfällig für Mykotoxine, da die Anwesenheit von Mykotoxinen die negative Energiebalance verschärfen kann. Im Allgemeinen ist die Protozoenpopulation des Pansens am bedeutendsten bei der Detoxifizierung von

aufgenommenen Mykotoxinen. Dies variiert jedoch von Mykotoxin zu Mykotoxin (Fink-Gremmels 2008, Goncalves et al. 2015).

Produktionsstress kann die Effekte von Mykotoxinen verstärken. Daher sind moderne Hochleistungsmilchkühe empfindlicher als Milchkühe, die eine geringere Leistung erzielen (Goncalves et al. 2015). Diese Tiere weisen eine besonders hohe Futteraufnahme und eine dadurch verursachte beschleunigte Futtermittelpassage durch den Pansen auf. Dies führt dazu, dass für die Detoxifizierungsvorgänge des Pansenmikrobioms weniger Zeit zur Verfügung steht (Biomin 2020).

Da manche Mykotoxine eine antimikrobielle, antifungale sowie antiprotozoische Aktivität aufweisen, können Langzeitexposition zu Veränderungen des Pansenmikrobioms führen (Custodio et al. 2020, Fink-Gremmels 2008). Eine reduzierte Pansenfüllung (Fink-Gremmels 2008) und Pansenmotorik (Gallo et al. 2015) sowie eine schlechte Futterverwertung und milder Durchfall können die Folge sein (Custodio et al. 2020, Fink-Gremmels 2008). Laut Düringer et al. (2020) konnte bei Bullen ein Sinken des ruminalen pH-Wertes nach 21-tägiger ad libitum Aufnahme einer mit DON und FUM kontaminierten TMR festgestellt werden. Die durchschnittlichen Konzentrationen lagen bei $1,7 \pm 0,2$ mg DON und $3,5 \pm 0,3$ mg FUM/ kg TMR. Zusätzlich konnten 242 µg NIV und 85 µg ZEN/kg als natürliche Kontamination detektiert werden (Düringer et al. 2020).

2.2. Vorkommen

Laut FAO sind pro Jahr rund 25 % des weltweit produzierten Getreides mit Mykotoxinen kontaminiert (Marin et al. 2013). Die Kontamination kann zu unterschiedlichen Zeitpunkten erfolgen, sei es während des Wachstums am Feld, während der Ernte oder bei anschließenden Verarbeitungsprozessen wie der Trocknung oder der Lagerung (Marin et al. 2013).

Während der Futtermittelproduktion sind die Pflanzen am Beginn der sogenannten „Feldflora“, die durch im Boden vorkommenden Pilzsporen gebildet wird, und dann der gut angepassten „Lagerflora“ ausgesetzt (Razzazi-Fazeli et al. 2003). Deshalb können Pilze, die Mykotoxine produzieren, in pflanzenpathogene "Feldpilze" und saprophytische "Lagerpilze" unterteilt werden (Placinta et al. 1999). Feldpilze, wie z. B. *Fusarium*-Arten, kontaminieren die Kulturpflanzen während des Wachstums und die Toxinproduktion findet auf dem Feld statt, während Lagerpilze, wie z. B. *Aspergillus*- und *Penicillium*-Arten, ihre Mykotoxine hauptsächlich nach der Ernte während der Lagerung produzieren (Kemboi et al. 2020).

Umweltbedingungen, Pflanzenstress, Schädigung der Körner durch Nagetiere und Schädlinge, wie der Maiszünsler (Ogunade et al. 2018, Razzazi-Fazeli et al. 2003), aber auch abiotische Faktoren wie pH-Wert und Feuchtigkeitsgehalt können die Mykotoxinbildung beeinflussen (Kemboi et al. 2020). Passende Umweltbedingungen sind feuchtes Klima, Temperaturen zwischen 10-40 °C und pH-Werte zwischen 4-8 (Goncalves et al. 2015). Besonders Perioden mit heißen und trockenen Wetterbedingungen, gefolgt von Feuchtigkeit während der Blütezeit begünstigen das Wachstum von *Fusarium*-Arten (Kemboi et al. 2020, Ogunade et al. 2018). Stickstoffdüngung kann ebenfalls einen Schimmelpilzbefall begünstigen (Razzazi-Fazeli et al. 2003). So kann je nach vorherrschenden Umweltbedingungen die Konzentration der vorkommenden Schimmelpilze und deren produzierte Mykotoxine von Jahr zu Jahr stark variieren (Goncalves et al. 2015). Aufgrund der steigenden Durchschnittstemperaturen verändert sich das Vorkommen von Mykotoxinen in Europa (Streit et al. 2012). So wurde beispielsweise die Art *F. verticillioides*, die in warmen und trockenen Regionen wie Italien oder Spanien vorkommt, auch in Maisproben aus Deutschland nachgewiesen (Streit et al. 2012). Auch in Österreich gibt es durch den Anstieg der Temperaturen ein verstärktes Vorkommen wärmeliebender *Fusarium*-Spezies (Razzazi-Fazeli et al. 2003). Durch den Wandel in der Landwirtschaft, sowohl im Bereich des Pflanzenbaus als auch in der Tierproduktion, wird der Schimmelpilzbefall von Futtermitteln in

Österreich ein zunehmendes Problem, zum Beispiel werden ertragreichere aber empfindlichere Pflanzensorten verwendet (Razzazi-Fazeli et al. 2003).

Die Gattung *Fusarium* kommt als Hauptkontaminant in Mais, Gras und Grassilage vor (Biomin 2020). Jedoch können fast alle Getreidesorten, hauptsächlich jedoch Mais, Weizen und Hafer, befallen sein (Razzazi-Fazeli et al. 2003). Bei der Kolonisation sind meist mehrere *Fusarium* Spezies beteiligt (Bertero et al. 2018). Zu den durch toxische *Fusarium*-Arten verursachten Pflanzenkrankheiten, sogenannte Fusariosen, gehören beispielsweise die Kraut- und Knollenfäule bei Gerste und Weizen sowie die Maisohrfäule (Bertero et al. 2018, Placinta et al. 1999). Eine veränderte Farbe der Körner, rötlich bis grau, deutet auf einen *Fusarien*-Befall hin. Dies kann meist schon durch visuelle Inspektion festgestellt werden (Razzazi-Fazeli et al. 2003).



Abbildung 1: Mit *Fusarium proliferatum* infizierter Maiskolben (Razzazi-Fazeli et al. 2003)



Abbildung 2: Mit *Fusarium graminearum* infizierter Maiskolben (Razzazi-Fazeli et al. 2003)

Meist sind Futtermittel mit mehreren verschiedenen Mykotoxinen kontaminiert. Die Produktion mehrerer Mykotoxine durch eine Spezies, die gleichzeitige Kontamination von Rohstoffen durch mehrere Pilze und die Verwendung verschiedener Rohstoffe in Fertigfutter sind Gründe für eine Co-Kontamination (Streit et al. 2012). Da durch Co-Kontaminationen synergetische, additive und antagonistische Effekte auftreten, können auch geringe Konzentrationen einzelner Mykotoxine zu toxischen Effekten führen (Kemboi et al. 2020). Zum Beispiel treten Aflatoxin B1 (AFB1) und FUM, die beide krebserregende Eigenschaften haben, häufig gemeinsam auf (Placinta et al. 1999). So werden die durch AFB1 ausgelösten Lebertumore durch FB1 synergistisch gefördert (Streit et al. 2012). Weiters begünstigt Moniliformin (MON) die Toxizität von FB1, sowie von DON und Aflatoxinen (Afla) und hat so eine additive Wirkung in Kombination mit diesen (Kemboi et al. 2020).

Laut dem BIOMIN World Mycotoxin Survey konnten im Jahr 2020 mittels Spektrum 380° Verfahrens im Durchschnitt über 30 verschiedene Mykotoxine und deren Metaboliten pro Probe festgestellt werden, wobei in fast jeder Probe mindestens 10 Mykotoxine nachgewiesen werden konnten. Weiters konnten in allen untersuchten Proben von *Fusarium* produzierte Toxine analysiert werden (Biomim 2020). Global kam im Jahr 2020 das Mykotoxin DON (65 %) am häufigsten vor, gefolgt von FUM (64 %) und ZEN (48 %) (Biomim 2020).

Ein großer Anteil der Mykotoxinbelastung von Milchkühen ist auf kontaminierte Maissilagen zurückzuführen (Reisinger et al. 2019). Laut Biomim (2020) wurden in Österreich im Jahr 2020 in 87 % der untersuchten Maissilageproben FUM, mit durchschnittlich 210 µg/kg, nachgewiesen, wobei 7 % Konzentrationen über dem festgelegten Grenzwert enthielten. Weiters waren in Österreich 89 % der Proben mit ZEN und 95 % der Proben mit DON kontaminiert. Bei der Analyse von Maiskörnern und Corn Cob Mix wurde FUM in etwa 40 %, mit durchschnittlich 635 µg/kg, festgestellt. Jede fünfte Probe (20 %) enthielt Konzentrationen über dem Grenzwert (Biomim 2020). Weiters waren 60 % der analysierten Fertigfuttermittel für Wiederkäuer im Jahr 2020 mit FUM, durchschnittlich mit 174 µg/kg, kontaminiert. Jedoch überschritten nur 2 % der Proben den Grenzwert. In 33 % des österreichischen Weizens war FUM als Kontaminant enthalten, jedoch stets unter dem Grenzwert. In Proben von Heu und Gras konnte im Jahr 2020 kein FUM detektiert werden (Biomim 2020).

Da die Mykotoxinbelastung von Nahrungs- und Futtermitteln ein globales Problem darstellt, überwachen zahlreiche Organisationen diese. Unter anderem wurden von FDA (US Food

and Drug Administration), WHO (World Health Organisation), FAO und EFSA (European Food Safety Authority) strenge Richtwerte für die wichtigsten Mykotoxinklassen, wie Aflatoxine, aber auch DON, ZEN und FUM festgelegt (Alshannaq und Yu 2017).

Für die Kontamination von Futtermitteln hat die Europäische Kommission (2006) Richtwerte für die fünf Mykotoxine Aflatoxine, DON, ZEN, OTA und FUM festgelegt (siehe Tabelle 1) (Streit et al. 2012).

Tabelle 1: Europäische Höchstwerte und Richtwerte für die wichtigsten Mykotoxine in Futtermitteln für Milchkühe (^aRichtlinie 2002/32/EC der Europäischen Kommission, ^bEmpfehlung 2006/576/EC der Europäischen Kommission, ^cEmpfehlung 2013/165/EU der Europäischen Kommission)

Mykotoxin	Höchstwerte ^a und Richtwerte ^{b,c} in µg/kg (ppb) bezogen auf Futtermittel mit einem Feuchtigkeitsgehalt von 12 %
Aflatoxin B1 ^a	5
Deoxynivalenol ^b	5.000
Fumonisin B1 und B2 ^b	50.000
Ochratoxin A ^b	250
Zearalenone ^b	500
T2 + HT2-Toxin ^c	250

2.2.1. Analysemethoden

Für die Detektion von Mykotoxinen stehen unterschiedliche Methoden zur Verfügung, wie Chromatography, immunochemische Methoden und Schnellverfahren (Alshannaq und Yu 2017). Die bevorzugten Methoden zur Analyse von *Fusarium*-Mykotoxinen sind Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie (HPLC= High performance liquid chromatography) und Gaschromatographie (GC= gas chromatography) mit Massenspektrometrie (MS), bzw. gekoppelt GC-MS oder LC-MS (Placinta et al. 1999). Die von Sulyok et al. (2006) entwickelte und ständig erweiterte LC-MS/MS-Methode kann inzwischen 340 Analyten, meist Mykotoxine, gleichzeitig nachweisen (Streit et al. 2012). Die Dünnschichtchromatographie (TLC=Thin layer chromatography) ist eine frühere Methode, die heute weitgehend ersetzt ist (Placinta et al. 1999, Wang et al. 2020). Eine weitere Analysemethoden ist UPLC = ultra performance liquid chromatography (Alshannaq und Yu 2017). Der Enzymimmunoassay (ELISA= enzyme-linked immunosorbent assay) ist ebenfalls eine gängige Analysemethoden (Placinta et al. 1999). Auch Schnelltests (rapid strip screening tests) sind zur Detektion verfügbar (Alshannaq und Yu 2017). Der erste Dipstick Schnelltest wurde für den Einzelnachweis von FB1 in Getreideprodukten entwickelt. Für den gleichzeitigen Nachweis der bekanntesten *Fusarium*-Toxine in Weizen, Hafer und Mais stehen Multiplex dipstick immunoassays zur Verfügung (Alshannaq und Yu 2017). Aufgrund der unzureichenden Sensitivität und der Kosten dieser Schnelltest finden sie jedoch selten praktische Anwendung am Feld (Alshannaq und Yu 2017).

Geringe Konzentrationen, aufwendige Extraktionsmethoden und die große Vielfalt der oft gleichzeitig vorkommenden Mykotoxine erschweren die Analyse (Alshannaq und Yu 2017). Zusammenfassend sind für den Einzelnachweis von Mykotoxinen die HPLC-FLD Methode und für den Nachweis multipler Toxine HPLC-MS/MS die geeignetsten Analysemethoden (Alshannaq und Yu 2017).

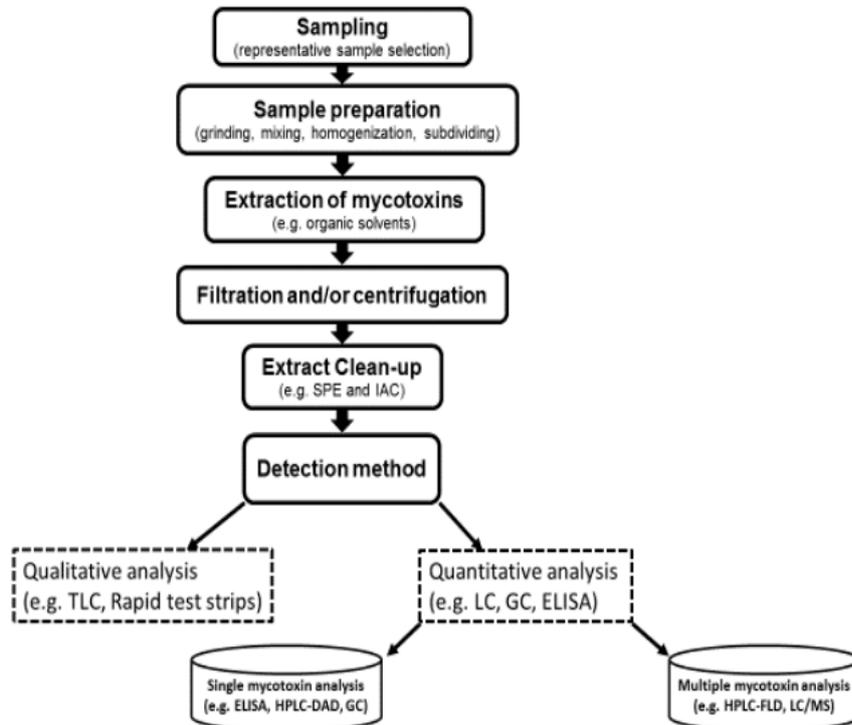


Abbildung 3: Schritte der Mykotoxinanalyse (Alshannaq und Yu 2017)

2.2.2. Präventions- und Dekontaminationsstrategien

Strategien zur Eindämmung von Mykotoxinen sind in der Milchwirtschaft sehr wichtig, um die negativen Auswirkungen auf Gesundheit und Wirtschaft zu minimieren (Kemboi et al. 2020). Es gibt Minderungsstrategien vor der Ernte, die das Wachstum von Pilzen auf dem Feld verhindern, und Strategien nach der Ernte, die während der Ernte, Verarbeitung und Lagerung angewandt werden (Kemboi et al. 2020). Die Vermeidung von Pilzkontaminationen ist die Methode der Wahl (Kemboi et al. 2020). Die schnelle Trocknung zur Verringerung des Feuchtigkeitsgehalts ist eine Strategie nach der Ernte. Um das Wachstum von Pilzen und deren Mykotoxinbildung zu stoppen, gilt ein Feuchtigkeitsgehalt von 10-13 % als sicher (Kemboi et al. 2020). Die Lagerung des Futters unter trockenen Bedingungen, bei niedriger Luftfeuchtigkeit, in Abwesenheit von Nagetieren und Schädlingen und bei ausreichender Belüftung hilft ebenfalls die Pilzkontamination zu minimieren (Kemboi et al. 2020). Im Gegensatz dazu begünstigt besonders tropisches Wetter die Mykotoxinbildung (Kemboi et al. 2020). Auch das Klima während der Anbausaison hat einen starken Einfluss auf das Kontaminationsniveau, was zu starken Schwankungen von Jahr zu Jahr führt (Streit et al.

2012). Die Wetterbedingungen haben den größten Einfluss auf die Mykotoxinkontamination. Es gibt jedoch auch andere Einflussfaktoren wie die Wahl der Sorte, die Fruchtfolge, die Bodenbearbeitung und den Zeitpunkt der Aussaat, wobei zum Beispiel eine frühere Aussaat von Mais bevorzugt wird (Streit et al. 2012).

Einige Fusarientoxinbildner sind nachweislich resistent gegen Fungizide. Aus diesem Grund bietet die Verwendung von Getreidepflanzen, die gegen *Fusarium*-Erreger resistent sind, eine praktikable und nachhaltige Präventionsstrategie (Placinta et al. 1999). Auch Goncalves et al. (2015) berichtet, dass passende landwirtschaftliche Verfahren in Kombination mit Lagerungskontrollen und dem Einsatz von Antimykotika und Gentechnik, wie resistente Getreidesorten, die Kontamination mit Schimmelpilzen vorbeugen können.

Nach der Kontamination von Futtermitteln kann eine Dekontamination bereits gebildete Mykotoxine beseitigen oder ihre Bioverfügbarkeit verringern. Auch eine Inaktivierung ist möglich (Goncalves et al. 2015). Es gibt chemische, physikalische und biologische Methoden zur Dekontamination (Goncalves et al. 2015, Kemboi et al. 2020). Thermische Inaktivierung, Behandlungen mit ultraviolettem Licht und ionisierende Strahlung oder Lösungsmittel zur Extraktion sind eingesetzte physikalische Methoden (Goncalves et al. 2015). Zu den chemischen Methoden zählen der Einsatz von Mitteln zur Hydrolyse, Oxidation oder Chlorierung von Mykotoxinen (Goncalves et al. 2015). Organoleptische Mängel, Verlust von Nährstoffen, die unvollständige Eliminierung und oft der höhere Preis dieser physikalischen und chemischen Methoden sind wichtige Nachteile (Goncalves et al. 2015). Biologische Methoden basieren auf den Einsatz von Mikroorganismen, wie Algen, Schimmelpilze, Protozoen, Bakterien und Hefen und stellt eine attraktive und umweltschonendere Alternative dar (Goncalves et al. 2015). Detoxifizierungsmittel werden in Bindemittel und Modifikatoren unterteilt. Die Aufnahme von Mykotoxinen wird durch Bindemittel wie Tonmineralien oder Hefeprodukte verhindert. Mikroorganismen und Enzyme hingegen gehören zur Gruppe der Modifikatoren, die Mykotoxine im Darm in weniger toxische Formen umwandeln (Kemboi et al. 2020). Die biologische Dekontamination von FUM-kontaminierten Futtermitteln ist durch Carboxylesterase und Amino-Transferase möglich. Das Enzym Fumonisin-Esterase ist in der Lage, FB1 in seinen weniger toxischen Metaboliten HFB1 (hydrolysiertes FB1) umzuwandeln. Diese Wirkung ist bei Schweinen und Geflügel nachgewiesen, für Milchvieh gibt es jedoch keine Belege (Kemboi et al. 2020).

Einige Mikroorganismen des Pansens sind in der Lage, Mykotoxine in dessen Sekundär-Metaboliten abzubauen. Dieser Mechanismus wurde genutzt, um präventiv wirkende

Probiotika für Wiederkäuer herzustellen (Loh et al. 2020). Die Verwendung von Probiotika, hergestellt aus Panseninhalt, wird als sichere und kostengünstige Alternative zu chemischen Detoxifizierungsprozessen und Weidemanagement von (Loh et al. 2020) betont.

2.3. Fusarium

2.3.1. Taxonomische Einordnung

Reich: *Fungi*

Abteilung: *Ascomycota*

Klasse: *Sordariomycetes*

Ordnung: *Hypocreales*

Familie: *Nectriaceae*

Gattung: *Fusarium*

Es gibt eine Vielzahl von taxonomischen Systemen, die bisher für Fusarien entwickelt wurden. Die Standardreferenz wurde von Wollenweber und Reinking entwickelt, die *Fusarium* in 16 Gruppen einteilten: *Eupionnotes*, *Macroconia*, *Spicarioides*, *Submicrocera*, *Pseudomicrocera*, *Arachnites*, *Sporotrichiella*, *Roseum*, *Arthrosporiella*, *Gibbosum*, *Discolor*, *Lateritium*, *Liseola*, *Elegans*, *Martiella*, *Ventricosum*. Das andere bekannte System wurde von Snyder und Hansen veröffentlicht, die nur neun Sektionen klassifizieren (Nelson et al. 1994).

2.3.2. Fusarientoxine

Die bekanntesten *Fusarium* Toxine sind FUM, ZEN, Trichothecene, und eine Gruppe makrozyklischer Mykotoxine, wie Beauvericin, Enniatin und MON (Placinta et al. 1999). Die für die Tiergesundheit wichtigsten *Fusarien*-Arten sind die Trichothecene Typ A und Typ B, ZEN, MON und die FUM (D'Mello et al. 1999).

Beauvericin kommt häufig als Co-Kontaminant vor, da es von vielen verschiedenen *Fusarium* Spezies, wie *F. avenaceum*, *F. sambucinum*, *F. poae*, *F. langsethiae*, *F. verticillioides*, *F. sporotrichioides*, *F. proliferatum* und *F. subglutinans*, produziert werden kann (Bertero et al. 2018). Es hat cytotoxisches Potential und zeigt krebshemmende, antimikrobielle, nematozide und insektizide Eigenschaften (Bertero et al. 2018). Bei

Schweinen und Rindern konnte eine reduzierte Ovarienfunktion nachgewiesen werden (Bertero et al. 2018).

Enniatin B, das von mehreren *Fusarium* Spezies, wie *F. avenaceum*, *F. tricinctum*, *F. poae*, *F. sporotrichioides* und *F. langsethiae*, hergestellt werden kann, wird eine unter anderem cytotoxische, antibakterielle, insektizide, antihelminthische, antifungale, sowie krebshemmende Wirkung zugesprochen (Bertero et al. 2018). Eine akute Mykotoxikose, ausgelöst durch eine Exposition von Beauvericin und Enniatin ist sowohl für Nutz- als auch Heimtiere sehr unwahrscheinlich (Bertero et al. 2018).

Moniliformin wird von den Spezies *F. avenaceum*, *F. tricinctum*, *F. proliferatum*, *F. subglutinans*, *F. verticillioides* produziert (Marin et al. 2013). Moniliformin verursacht vor allem Myokardschäden bei Geflügel (Razzazi-Fazeli et al. 2003).

2.3.2.1. Trichothecene

Es können rund 170 verschiedene Trichothecene, die aufgrund ihrer unterschiedlichen Seitengruppen in vier Gruppen A-D eingeteilt sind, identifiziert werden (Marin et al. 2013). *Fusarium* Arten, die diese Toxingruppen produzieren können, gehören zu den Feldpilzen und sind wichtige Pflanzenpathogene, die die Getreidekörner am Feld befallen (Marin et al. 2013). Trichothecene haben eine antibakterielle und antifungale, zytostatische und insektizide Wirkung (Razzazi-Fazeli et al. 2003). Eine höhere Anfälligkeit gegenüber Infektionskrankheiten kann durch eine von diesen Mykotoxinen verursachte Immunsuppression erfolgen (Razzazi-Fazeli et al. 2003). Trichothecene werden durch die Abspaltung der Epoxygruppe im Pansen zu Derivaten mit geringerer Toxizität umgewandelt (Razzazi-Fazeli et al. 2003).

Zu Typ A zählen T2-Toxin, das die höchste Toxizität aufweist (Razzazi-Fazeli et al. 2003) und HT-2-Toxin (Placinta et al. 1999). HT-2 Toxin kann natürlich oder als Metabolit von T-2 vorkommen (Bertero et al. 2018, Kemboi et al. 2020). Diese werden hauptsächlich von den Spezies *F. sporotrichioides* und *F. poae* produziert (Placinta et al. 1999), aber auch von *F. langsethiae* und *F. acuminatum* (Bertero et al. 2018, Marin et al. 2013, Placinta et al. 1999). A-Trichothecene können nicht mittels HPLC im UV-Bereich detektiert werden (Razzazi-Fazeli et al. 2003). Sie sind deutlich toxischer als die Vertreter der B-Trichothecene (Razzazi-Fazeli et al. 2003).

Wiederkäuer sind dank der Detoxifizierungsfähigkeit des Pansen widerstandsfähiger gegenüber der toxischen Wirkung von T-2 Toxin (Bertero et al. 2018). Eine Konzentration

von über 100 µg/kg T2-Toxin bei Rindern sollte vermieden werden (Gallo et al. 2015). T-2-Toxin wird in HT-2 umgewandelt (Bertero et al. 2018, Kemboi et al. 2020). Die Reproduktionsrate kann durch dieses Mykotoxin beeinträchtigt werden (Bertero et al. 2018). Durch hohe Kontaminationen können Symptome, wie blutiger Durchfall und Ulzera im Abomasum und Pansen auftreten (Bertero et al. 2018). Der Tod von sieben Rindern konnte im Jahr 1972, die an massiven Blutungen im Gastrointestinaltrakt (GIT) verstorben sind, mit einer T-2 Toxin Intoxikation in Verbindung gebracht werden (Bertero et al. 2018). Marin et al. (2013) stellten Gastroenteritis, eine reduzierte Milchproduktion und eine Verweigerung der Futteraufnahme bei Milchkühen fest. Laut Gallo et al. (2015) traten nach 3 wöchigem Konsum von 640 µg/kg T-2-Toxin unter anderem Symptome wie blutiger Durchfall, Pansen Ulcera, Enteritis und Anöstrus auf. Durch Biotransformation ist ein Übertritt in die Milch möglich (Bani Ismail et al. 2020). Während der Trächtigkeit kann die Plazenta passiert werden (Mostrom und Jacobsen 2020).

Zu Typ B zählen DON, auch als Vomitoxin bekannt (Bertero et al. 2018), sowie NIV (Placinta et al. 1999). Trichothecene vom Typ B werden von *F. culmorum* und *F. graminearum*, *F. cerealis* sowie *F. pseudograminearum* synthetisiert (Bertero et al. 2018, Placinta et al. 1999). Das wichtigste Typ B Toxin ist DON (Marin et al. 2013). Dieses Mykotoxin ist ein häufiger Kontaminant von Weizen und Mais und daraus erzeugten Produkten. Besonders FHB (*Fusarium* Head Blight) führt zu einer Akkumulation von DON (Bertero et al. 2018).

Akute Intoxikationen gehen mit Erbrechen, Durchfall und Anorexie einher. Chronische Vergiftungen, die ebenfalls zu Anorexie, Gewichtsverlust und Läsionen bis Nekrosen der Haut und Schleimhaut von Magen, Nieren, Lunge und Intestinum führen, sowie eine Vergrößerung der Leber (Marin et al. 2013), sind nach chronischer Aufnahme von DON möglich (Bertero et al. 2018).

Wiederkäuern bietet ein intaktes Pansenepithel eine wirksame Barriere. Sie weisen, dank der Metabolisierung durch die Pansenmikroben, eine höhere Toleranz gegenüber DON auf (Bertero et al. 2018). Im Gegensatz zu Wiederkäuern, sind Schweine nur zu einem geringen Teil fähig DON zu metabolisieren (Bertero et al. 2018). Die Pansenmikroflora metabolisiert DON fast vollständig zu De-Epoxy-DON (DOM-1), das eine geringere Toxizität aufweist (Bertero et al. 2018, Seeling et al. 2006). 94-99 % Biotransformation von DON zu DOM1 werden von Seeling et al. (2006) berichtet. Tiere mit beeinträchtigter Pansenfunktion, wie Jungtiere oder Tiere mit Azidose, können anfälliger auf dieses Mykotoxin reagieren (Bertero et al. 2018). Eine Beeinträchtigung des DON-Abbaus wurde durch einen niedrigen Pansen-

pH-Wert ($\leq 5,8$) festgestellt, der beispielsweise bei subakuter Pansenazidose bei Rindern auftritt (Kemboi et al. 2020). Die Absorptionsrate ist sehr gering und liegt bei $<1\%$ (Bertero et al. 2018). Ein Nachweis von DON im Serum nach systemischer Aufnahme ist möglich. Die Ausscheidung erfolgt über die Nieren (Bertero et al. 2018).

Mögliche Auswirkungen von DON sind beim Wiederkäuer: Durchfall, Atemwegserkrankungen, eine reduzierte Milchproduktion, verringerter Milchfettgehalt und Effekte auf das Pansenmikrobiom, die zu einer verminderten Stickstoffverfügbarkeit im Pansen führen (Biomim 2020). DON hat eine immunsuppressive Wirkung. Milchkühe in Nordeuropa, die einer stark kontaminierten Grassilage mit DON ausgesetzt waren, zeigten vermehrte Entzündungsreaktionen wie Mastitis und Laminitis und in vitro Studien stellten eine negative Auswirkung auf das Reproduktionssystem der Rinder fest (Bertero et al. 2018).

Es wurde kein negativer Einfluss auf die Leistung von Milchkühen, bei im Futter vorkommenden Konzentrationen von unter 4 mg/kg DON, festgestellt (Razzazi-Fazeli et al. 2003). Nach täglicher Aufnahme von bis zu 104 mg DON fand kein Übertritt in die Milch statt (Razzazi-Fazeli et al. 2003).

Festgelegte Richtwerte in Futtermitteln für Wiederkäuer (Ogunade et al. 2018):

US FDA	10 mg/kg TM für Wiederkäuer und Mastrinder älter als 4 Monate
	5 mg/kg TM für Milchkühe älter als 4 Monate
EU	5 mg/kg TM für Wiederkäuer

2.3.2.2. Zearalenone

Zearalenon wird von mehreren Spezies gebildet, hauptsächlich von *F. graminearum* und kommt überwiegend als Kontaminant in Mais und daraus hergestellten Produkten vor (Bertero et al. 2018). Weiters produzieren *F. culmorum*, *F. cerealis*, *F. equiseti*, *F. verticillioides* und *F. incarnatum* dieses Toxin (Marin et al. 2013).

Ein Befall des Getreides geschieht meistens am Feld. Zearalenon-Produktion wird unter kühlen und feuchten Bedingungen während der Blütezeit begünstigt (Alshannaq und Yu 2017, Marin et al. 2013). In Österreich wurden vor allem in regenreichen Jahren ZEN-Kontaminationen in Körnermais, Silagen und in Corn-Cob-Mix nachgewiesen (Razzazi-Fazeli et al. 2003). Zearalenon kommt oft gemeinsam mit DON oder Afla vor und wird erst unter hohen Temperaturen abgebaut (Alshannaq und Yu 2017).

Vorkommende Metaboliten sind α -zearalenol, β -zearalenol, α -zearalanol, β -zearalanol, zearalanone, sowie konjugierte Formen mit Sulfaten und Glukose zum Beispiel (Bertero et al. 2018). Dieses Mykotoxin und dessen umgewandelte Formen, weisen eine hohe Absorbtiionsrate auf. Die Exkretion erfolgt über die Galle (Bertero et al. 2018).

Weiters hat ZEN eine starke Östrogenwirkung, da es in der Lage ist an Östrogenrezeptoren zu binden (Bertero et al. 2018). Es konnte eine variierende Östrogenwirkung zwischen ZEN und dessen Metaboliten festgestellt werden. In absteigender Reihenfolge: α -zearalenol, α -zearalanol, ZEN, zearalanone, β -zearalenol und β -zearalanol (Bertero et al. 2018).

Hyperöstrogenismus, der mit einer ödematisierten Vulva und Milchdrüse, sowie Ovarialzysten und Vulvo-vaginitis einhergehen kann, ist ein bekanntes durch ZEN ausgelöstes Syndrom (Bertero et al. 2018). Weiters können Anöstrus, eine Atrophie der Ovarien und Veränderungen des Endometriums nach einer Intoxikation mit ZEN auftreten (Bertero et al. 2018). Eine reduzierte Milchproduktion und Rektumprolaps können ebenfalls beobachtet werden. Dieses Mykotoxin wirkt sich auch negativ auf die Gewichtszunahme der Föten während der Trächtigkeit aus. Bei männlichen Tieren, konnte eine verminderte Libido und geringere Testosteronwerte und Hodengewicht festgestellt werden (Marin et al. 2013). Dieses Mykotoxin zeigt eine hepatotoxische, immunotoxische, hämatotoxische und genotoxische Wirkung (Bertero et al. 2018).

Wiederkäuer reagieren nicht so empfindlich wie Monogastrier auf ZEN. Sie metabolisieren ZEN vorrangig durch hepatische Biotransformation zu β -zearalenol (Bertero et al. 2018, Kemboi et al. 2020), außerdem wird es durch die im Pansen angesiedelten Protozoen in die giftigeren Hydroxy-Metaboliten β -zearalenol und α -zearalenol umgewandelt (Bertero et al. 2018, Loh et al. 2020). Ein Einfluss dieser beiden Metaboliten auf die Proliferation boviner Granulosazellen und die Steroidogenese konnte nachgewiesen werden (Bertero et al. 2018).

Klinische Symptome, ausgelöst durch ZEN-Intoxikation, kommen bei Kühen nur sehr selten vor. Dafür sind sehr starke Dauerkontamination notwendig (Bertero et al. 2018). Kälber und Färsen, deren Pansenfunktion noch nicht voll funktionsfähig ist, reagieren sensibler (Bertero et al. 2018). Zu den Auswirkungen bei Rindern gehören Unfruchtbarkeit, eine verminderte Milchproduktion und Hyperöstrogenismus (Placinta et al. 1999). Mostrom und Jacobsen (2020) berichten von Komplikationen wie Abort, Vaginal- und Rektal-Prolaps nach Intoxikationen mit ZEN.

Zearalenon und dessen Metaboliten lassen sich im Urin, der Galle und im Kot nachweisen, ein Übergang in die Milch ist ebenfalls möglich, wobei vor allem β -Zearalenol detektiert wurde (Mostrom und Jacobsen 2020).

Festgelegte Richtwerte in Futtermitteln für Wiederkäuer (Ogunade et al. 2018):

EU 2006 0,5 mg/kg TM für Wiederkäuer

2.4. Fumonisine

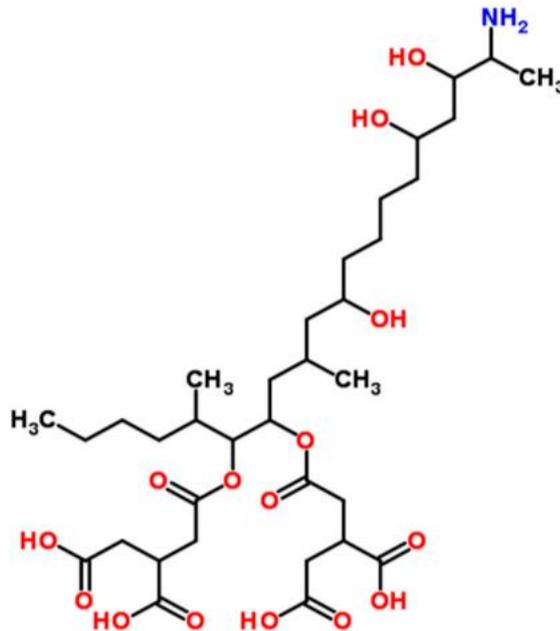


Abbildung 4: Strukturformel von Fumonisin B1 (Marin et al. 2013)

Fusarium-Arten wie *F. verticillioides*, *F. proliferatum*, *F. anthophilum* und *F. nygamai*, aber auch *F. napiforme* und *F. dlamini* sind in der Lage, Fumonisine zu produzieren (Marin et al. 2013, Ogunade et al. 2018). Fumonisin B1, das am weitesten verbreitete Fumonisin, wird hauptsächlich von den Arten *F. verticillioides* und *F. proliferatum* synthetisiert, die *Fusarium*-Ährenfäule, eine der häufigsten Maiskrankheiten, verursachen (Ogunade et al. 2018). Fumonisine sind die wichtigsten Kontaminanten in Mais und werden vor allem vor der Ernte produziert (Marin et al. 2013). Des Weiteren wurde die Produktion von FUM durch schwarze Aspergille, bekannt als *A. niger*, beobachtet. Insbesondere wurde über Kontaminationen von getrockneten Weintrauben berichtet (Streit et al. 2012). Die Gruppe der Fumonisine wurde im Jahr 1988 entdeckt (Alshannaq und Yu 2017). Zurzeit sind etwa 28 verschiedene Fumonisine bekannt (Alshannaq und Yu 2017). Sie werden in eine A-, B-, C- und P-Reihe unterteilt, wobei den Gruppen A und B die größte Bedeutung in der Literatur zugeschrieben wird (Loh et al. 2020, Ogunade et al. 2018). Es handelt sich um nicht-fluoreszierende, hydrophile Mykotoxine (Alshannaq und Yu 2017). Sie können mittels organischer Lösungsmittel vollständig aufgelöst werden (Alshannaq und

Yu 2017). Fumonisin ist sehr hitzestabil und dessen Toxinwirkung wird erst bei einer Erhitzung über 150 °C reduziert (Marin et al. 2013). Fumonisine haben eine ähnliche Strukturformel wie Sphingosine (So) und Sphinganine (Sa), Bestandteile von Sphingolipiden (Loh et al. 2020, Ogunade et al. 2018). Aufgrund dieser strukturellen Ähnlichkeit sind diese Mykotoxine in der Lage, die Sphingolipid-Biosynthese (Ogunade et al. 2018) und den Transport von Sphingolipiden zu beeinträchtigen (Loh et al. 2020). Fumonisin B1 inhibiert die Synthese des Enzyms Ceramide (CER), das intrazellulär zu einem erhöhten Gehalt von Sa und anderen Sphingoidbasen führt (Marin et al. 2013). Diese sind stark zytotoxisch und hauptverantwortlich für die Toxizität der Fumonisine (Marin et al. 2013). Das veränderte Verhältnis von Sa zu So, das in Gewebe, Blut und Urin auftritt, kann als Biomarker für eine FUM-Belastung herangezogen werden (Marin et al. 2013).

2.4.1. Toxizität von Fumonisin

Die Toxizität von FUM ist tierartsspezifisch und hängt vom Geschlecht und der aufgenommenen Dosis ab (Loh et al. 2020). Fumonisine der B-Serie, besonders FB1, haben die stärkste Toxizität (Ogunade et al. 2018). FB1 und FB2 (Rodriguez-Blanco et al. 2021) wurden in Gruppe 2B der IARC, 2002, als möglicherweise krebserregend für den Menschen aufgeführt (Streit et al. 2012). Mehrere Autoren haben FB1 bereits mit der Karzinogenese beim Menschen in Verbindung gebracht (Placinta et al. 1999). Die WHO legte als erlaubte Tagesaufnahme eine Menge von 2 µg/kg Körpergewicht fest (Alshannaq und Yu 2017).

Festgelegte Richtwerte für Fumonisine in Wiederkäuerfuttermitteln (Ogunade et al. 2018):

US FDA	30 mg/kg TM für Zucht-Wiederkäuer, 15 mg/kg TM für laktierende Milchkühe, 60 mg/kg TM für Kälber über 3 Monate (FDA, 2011; Tabelle 3)
EU	50 mg/kg TM für erwachsene Wiederkäuer über 4 Monate (Europäische Kommission, 2006)

2.4.2. Effekte auf die Rindergesundheit

Wiederkäuer sind weniger sensitiv gegenüber der Toxizität von FUM als andere Tierarten wie Pferde, Schweine (Kemboi et al. 2020) und Nager (Marin et al. 2013). Laut Literatur sind die wichtigsten Effektorgane Leber, Niere, aber auch der Darmtrakt, die durch die Toxinwirkung von FUM geschädigt werden (Marin et al. 2013).

So können Leberschäden, wie milde Leberläsionen bis pathologische Veränderungen des Gewebes, bei Rindern durch eine FUM-Kontamination hervorgerufen werden (Düringer et al. 2020, Gallo et al. 2020, Loh et al. 2020, Mostrom und Jacobsen 2020). Konzentrationen über 150 mg/kg FB1 bewirkten wahrnehmbare Läsionen der Leber (Custodio et al. 2020). Milde histologische Veränderungen des Lebergewebes, wie Veränderungen der hepatozellulären Morphologie und des Gallengangepithels konnten in Studien, in denen Rinder oral mit einer FUM-Konzentration von 3,5 mg/kg über 32 Wochen belastet wurden, festgestellt werden. Auch ein erhöhtes Sa/So-Verhältnis wurde durch eine FUM-Belastung nachgewiesen (Düringer et al. 2020, Kemboi et al. 2020). Bei Mastbullen konnte dieses durch Konzentrationen von 417 mg/kg FB1 und FB2 im Futter ebenfalls hervorgerufen werden (Mostrom und Jacobsen 2020).

Weiters konnten erhöhte Leberenzymwerte von Aspartat-Aminotransferase (AST) und Gamma-Glutamyl-Transferase (GGT), unter anderem bei Holstein Stieren nach einer Langzeitexposition von 253 Tagen mit täglich 94 mg/kg FB1, nachgewiesen werden (Gallo et al. 2020, Mostrom und Jacobsen 2020). Nicht alle Studien konnten allerdings einen Effekt auf die Leberenzyme nachweisen, so zeigten sich etwa in der Studie von Custodio et al. (2020) keine Veränderungen dieser Leberenzyme nach der Verfütterung einer belasteten Ration, die mit Aflatoxin, Trichothecenen A und B, FUM und Fusarinsäure kontaminiert war.

Schädigungen der Niere können durch die nephrotoxische Wirkung der Fumonisine verursacht werden. Futtermittel, die mit 1.000 µg FUM/kg KG (Körpergewicht) kontaminiert waren, erwiesen sich für Kälber als nephrotoxisch (Loh et al. 2020).

Weiters zeigten sich bei Mastkälbern, die Konzentrationen von 15-148 mg/kg FUM ausgesetzt waren, Veränderungen der Milz, sowie vergrößerte Mesenteriallymphknoten (Düringer et al. 2020). Fumonisine kann ein immunotoxischer Effekt zugeschrieben werden (Rodriguez-Blanco et al. 2021). Eine reduzierte Immunantwort sowie eine Veränderung der Lymphozyten-Blastogenese ist nach FUM-Exposition möglich (Gallo et al. 2020, Loh et al. 2020).

Eine Intoxikation mit FB1 hat einen Rückgang der Aktivität von den antioxidativen Enzymen SOD und CAT zur Folge (Wang et al. 2020). Weiters treten, durch chronische FB1 Belastung, mitochondriale Apoptose spezieller Zelltypen, oxidativer Stress (Wang et al. 2020) und Lipid Peroxidation auf (Loh et al. 2020).

Fumonisine können zu Futterverweigerung führen (Mostrom und Jacobsen 2020). Eine reduzierte Trockenmasseaufnahme und eine damit verbundene reduzierte Wiederkauzeit bei Rindern konnten nach Mykotoxinbelastung mit DON und FUM festgestellt werden (Gallo et al. 2020). Ein Rückgang der Gewichtszunahme kann nach Aufnahme einer mit FUM kontaminierten Ration beobachtet werden (Custodio et al. 2020, Durringer et al. 2020). Bei Milchkühen konnte eine reduzierte Futteraufnahme und Milchproduktion festgestellt werden, nachdem die Tiere mit einer mit 100 mg/kg FUM kontaminierten Ration, im Zeitraum von 7 Tagen präpartal bis 70 Tagen postpartal, gefüttert wurden (Mostrom und Jacobsen 2020, Ogunade et al. 2018).

Es wird angenommen, dass FUM eine Veränderung der Pansenpopulation verursacht, da eine Abnahme von verzweigten Fettsäuren und der Ammoniakkonzentration festgestellt werden konnte (Loh et al. 2020). Bei Milchkühen wird beobachtet, dass nach Aufnahme von FUM der Anteil von Propionat im Pansen sinkt (Du et al. 2017). Laut Caloni et al. (2000) hat FB1 jedoch keinen toxischen Effekt auf die Mikroflora des Pansens. In dieser Studie wurden 1 µg FB1 /ml Pansensaft für 72 h inkubiert. Es konnte weder eine veränderte SCFA (kurzkettige Fettsäuren) Produktion noch ein Effekt auf den pH-Wert des Pansensaftes festgestellt werden (Caloni et al. 2000). Am Beginn der Exposition kann Durchfall als Anzeichen einer FUM-Intoxikation beobachtet werden (Gallo et al. 2020).

Feldausbrüche, durch natürlich vorkommende Kontaminationen der Futtermittel, werden bei Milchkühen nicht berichtet (Kemboi et al. 2020). Die Aufnahme von FB1 in Höhe von 75 mg/kg über 14 Tage, 94 mg/kg über 253 Tage und 105 mg/kg über 31 Tage führte zu einer verminderten Milchproduktion, reduzierter Futteraufnahme, Hepatotoxizität, Nephrotoxizität und Problemen bei der Reproduktion. Daher wird angenommen, dass die orale Verabreichung von FB1 in Mengen über 75 mg/kg eine toxische Wirkung bei Rindern hat (Goncalves et al. 2015, Kemboi et al. 2020).

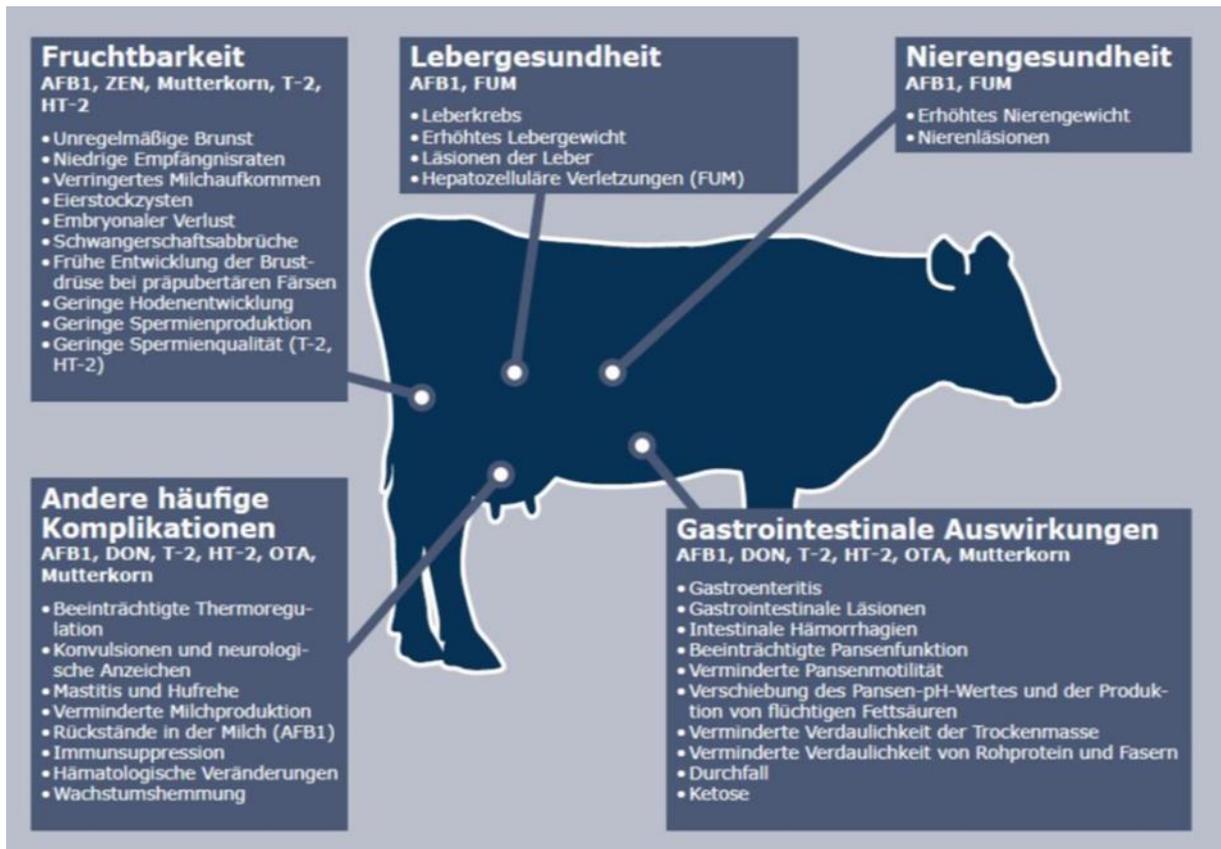


Abbildung 5: Effekte der Mykotoxine auf die Rindergesundheit (Biomim 2020)

Aufgrund der hydrophilen Eigenschaft von FUM, findet kein carry-over in die Milch, und fast keine Ansammlung im Gewebe statt (Alshannaq und Yu 2017). Fumonisin B1 konnte in Lebergewebe, nach Verabreichung sehr hoher, aber in der Natur nicht natürlich vorkommender Konzentrationen über 30 Tage, detektiert werden (Razzazi-Fazeli et al. 2003). Laut Loh et al. (2020) kommt es nach Aufnahme von FUM zu einer Akkumulation von Sa und So im Gewebe der Leber und Niere. Reisinger et al. (2019) konnte eine Veränderung des Sphingolipidmetabolismus durch FB1, anhand eines signifikanten Anstiegs von Sphinganinen und Sa/So Verhältnisses in den belasteten Zellen, feststellen. Sphingosine waren nach der Behandlung mit 25 μM FB1 nicht erhöht (Reisinger et al. 2019). Die Detektion von FB1 und dessen Metaboliten, sowie Aminopolyols und Aminopentol, ist im Kot und Pansensaft bei Rindern nach Verabreichung kontaminierten Futters möglich, konnte jedoch nicht von allen Studien bestätigt werden (Caloni et al. 2000, Loh et al. 2020, Pantaya et al. 2016).

Fumonisin hat eine geringe Bioverfügbarkeit nach oraler Aufnahme und passiert den Pansen weitgehend unbeeinflusst (Caloni et al. 2000, Gallo et al. 2020). Mehrere Studien berichten jedoch von einer ruminalen Degradationsrate von 10-18 % der Fumonisine durch die Pansenmikroflora (Caloni et al. 2000, Loh et al. 2020, Ogunade et al. 2018, Reisinger et al. 2019). Eine In-vitro-Studie mit 100 mg/kg FB1/kg Kontamination zeigte einen minimalen Abbau von 10 % FB1 zu seinem hydroxylierten Metaboliten HFB1 durch die Pansenmikroflora (Caloni et al. 2000, Loh et al. 2020, Ogunade et al. 2018, Reisinger et al. 2019). Durch Fumonisin-Esterase steigt der Anteil an hydrolysierten Metaboliten im Pansensaft und Kot erheblich (Gallo et al. 2020). Diese geringe ruminalen Degradationrate hat zur Folge, dass der Dünndarm einer höheren Mykotoxinkonzentration ausgesetzt wird, was die Darmgesundheit der Rinder negativ beeinflusst (Reisinger et al. 2019). Die Exkretion von FUM erfolgt vor allem über den Kot und zu einem geringeren Anteil über den Urin (Gallo et al. 2020).

3. Tiere, Material und Methodik

Der Umgang und die Behandlungen der Tiere sowie alle damit verbundenen Verfahren wurden von der institutionellen Ethik- und Tierschutzkommission (ETK) der Veterinärmedizinischen Universität Wien und der nationalen Behörde gemäß §26 des Tierversuchsgesetzes 2012-TVG (GZ: 2020-0.547.387) genehmigt.

3.1. Projektaufbau, Behandlung und Fütterung der Tiere

Tabelle 2: Daten der untersuchten Tiere

Kuhname (Ohrmarkennummer)	Körpermasse zu Beginn in kg	Uhrzeit der Anfütterung
Bergrose (3893)	942	08:00
Nelda (3927)	1030	08:10
Ricky (3852)	918	08:20
Elfi (4044)	918	08:30
Newada (7613)	838	09:30
Banane (6996)	847	09:45

Für den Versuch wurden sechs Pansen-fistulierte Holstein Milchkühe (KG 916 ± 70 kg) eingesetzt (Tabelle 2). Die Tiere wurden in einem Laufstall mit 12 Tiefstreuboxen (2,6 m × 1,25 m, Stroheinstreu) gehalten. Wasser wurde ad libitum angeboten und ein Salzleckstein stand dauerhaft zur Verfügung. Die Fütterung wurde täglich um 0800 Uhr durchgeführt. Die gefütterte Totalmischung (TMR) bestand zu 60 % aus Grundfutter und zu 40 % aus Kraftfutter auf TM-Basis (Tabelle 3) und stand den Versuchstieren täglich von 0800 bis 2400 Uhr zur Verfügung. Die Zubereitung erfolgte mit einem automatischen Fütterungssystem (Trioliet Triomatic T15, Niederlande). Vor der morgendlichen Fütterung wurden die Tröge geleert und gereinigt. Die Tröge waren mit computergesteuerten Zugangstüren und einer integrierten elektronischen Waage (Insentec B.V., Niederlande), von der täglich die genaue Futteraufnahme abgelesen wurde, ausgestattet. So konnte eine kontinuierliche Aufzeichnung der individuellen Futteraufnahme erfolgen.

Der Versuch wurde an der VetFarm, der Forschungs- und Ausbildungseinrichtung der Veterinärmedizinischen Universität Wien in Pottenstein, durchgeführt. Die Gesamtdauer des

Versuches betrug 30 Tage. Die für diese Diplomarbeit verwendeten Proben wurden an Tag 22, für die Erhebung der Basiswerte und an Tag 24, für die Daten der FUM-Belastung, gewonnen. Zu Beginn des Versuchs fand eine sechstägige Adaptionsphase statt, während dieser nur TMR gefüttert wurde. Am 22. Tag vor der Morgenfütterung bekamen die Tiere 200 g Weizenschrot, damit eine Probennahme der Basiswerte ohne FUM-Gabe durchgeführt werden konnte. Die 2 Tage dauernden Fumonisin-Belastung (FUM) begann an Tag 23. Am 23. und 24. Tag erhielten die Kühe die TMR und zusätzlich vor jeder Morgenfütterung 200 g Weizenschrot, das mit 20 mg FUM kontaminiert war. Die Probenentnahme für die verwendeten FUM-Daten wurde am Tag 24, dem zweiten Tag dieser Mykotoxin-Intoxikation, durchgeführt.

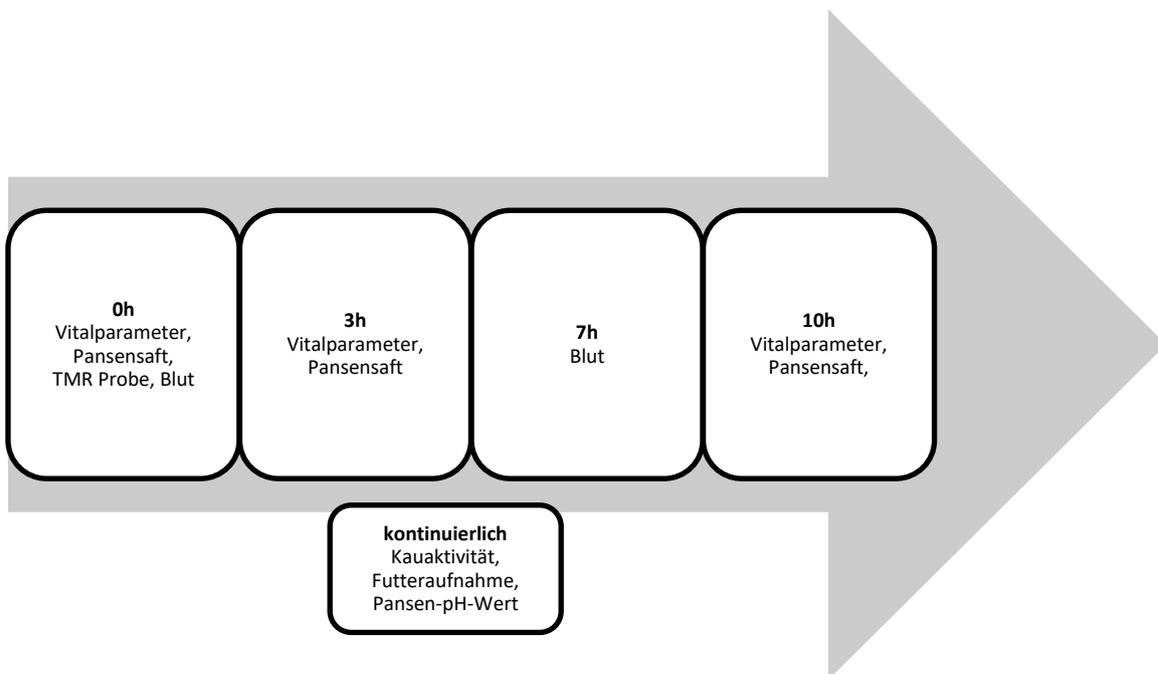


Abbildung 6: Zeitpunkte der Probenentnahme (Baseline Tag 22, FUM-Challenge Tag 24)

Die Pansensaftproben wurden aus dem ventralen Pansensack mit einer Saugspritze zu drei fixen Zeitpunkten entnommen: 0 Stunden= vor der Intoxikation, 3 Stunden nach der Morgenfütterung, 10 Stunden nach der Morgenfütterung. Der Zugang erfolgte durch die Fistel an der seitlichen Bauchwand. Die Proben wurden nach der Gewinnung in 2 ml Eppendorf Reaktionsgefäße überführt und anschließend bei -20 °C gelagert. Weiters wurden Proben für die Analyse der SCFA gewonnen. An Tag 23 wurde direkt nach der Vorbereitung

eine repräsentative Futtermittelprobe aus der vorgelegten TMR entnommen und bei -20 °C bis zur weiteren Verwertung, gelagert. Tabelle 3 zeigt die genaue Zusammensetzung der TMR.

3.2. Futtermittelanalysen

Die TMR wurde am ersten Tag des Versuchs und jeweils vor den Mykotoxinbelastungen an Tag 8 und 23 beprobt. Die Proben wurden zur Vorbereitung für die Nährstoffanalysen, die gemäß des Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten (VDLUFA 2012) erfolgten, 48 Stunden lang bei 65 °C im Umluftofen getrocknet und durch ein 1 mm-Sieb (Ultra-Zentrifugalmühle ZM 200, Retsch, Deutschland) gemahlen. Die Bestimmung der Trockensubstanz (TS) erfolgte nach 4-stündigem Trocknen der TMR-Proben bei 103 °C. Die Asche wurde in einem Muffelofen über Nacht bei 580 °C verbrannt und analysiert. Darüber hinaus wurde das Rohprotein (Kjeldahl-Methode) und der Ether-Extrakt (Soxhlet-Extraktionssystem) bestimmt. Die neutrale Detergentienfaser (aNDFom), unter Verwendung hitzestabiler α -Amylase, und die saure Detergentienfaser (ADFom) wurden mittels Natriumsulfit und ohne Restasche mit dem Fiber Therm FT 12 (Gerhardt GmbH & Co. KG, Deutschland) bestimmt. Zur Analyse des Gesamtstärkegehalts wurde ein handelsüblicher Kit (Megazyme, Irland) verwendet. Dafür wurde die Probe zuvor auf 0,2 mm gemahlen. Für die Partikelgrößenanalyse wurde ein Penn State Partikelseparator mit drei Sieben (Modell C24682N, Nasco, USA) verwendet. Die Proben wurden in vier Fraktionen aufgeteilt: lange (>19 mm), mittlere (8-19 mm), kurze (1,18-8 mm) und feine (<1,18 mm) Partikel. Zusätzlich wurde eine quantitative Mykotoxin-Analyse mit einer HPLC-MS/MS-basierten Multi-Mykotoxin-Methode durchgeführt. Hierfür wurde ein 1290 Infinity II HPLC (Agilent, USA) mit einem AB SCIEX QTRAP® 5500 LC/MS/MS System (Applied Biosystems, USA) gekoppelt.

Tabelle 3: Zusammensetzung der gefütterten Totalmischung

Inhaltstoffe (in % der Trockenmasse)	
Maissilage	30.0
Grassilage	20.0
Heu	10.0
Pelletiertes Eiweißkonzentrat ¹	6.0
Mais (gemahlen)	17.0
Gerste (gemahlen)	7.1
Weizen (gemahlen)	7.1
Kalkstein	1.0
Mineral-vitamin premix ²	1.7
Nährstoffzusammensetzung (\pm Standardabweichung (SD))	
Trockenmasse (% der Frischmasse)	46.2 \pm 5.09
Organisches Masse	92.5 \pm 0.19
Rohprotein	12.2 \pm 0.27
Ether-Extrakt	1.9 \pm 0.12
aNDFom ³	44.9 \pm 1.94
ADFom ⁴	26.7 \pm 0.86
Stärke	26.4 \pm 3.07
Verteilung der Partikelgröße (\pm SD)	
>19.0 mm	9.0 \pm 4.24

8.0–19.0 mm	37.9 ± 4.15
1.18–8.0 mm	41.9 ± 3.32
<1.18 mm	11.2 ± 3.40
peNDF ⁵ >8 mm	21.1 ± 1.84

¹Rindastar 39 XP, Schaumann GmbH & Co KG, Germany; ²Rindavit TMR 11 ASS-Co+ATG (Schaumann GmbH & Co KG, Germany), enthält per kg: 150 g Na; 60 g Mg; 60 g Ca; 40 g P; 6.8 g Zn; 4.2 g Mn; 1.6 g Cu; 0.29 g I; 50 mg Se; 40 mg Co; 20 × 10¹⁰ cfu *Saccharomyces cerevisiae*; 750,000 IU Vitamin A; 150,000 IU Vitamin D3; 4 g Vitamin E; 24 g Niacin; ³Neutrale Detergenzienfasern, bestimmt mit hitzestabiler α -Amylase und angegeben ohne Restasche; ⁴Saure Detergentienfasern, angegeben ohne Restasche; ⁵Physikalisch effektive neutrale Detergentienfaser.

3.3. Kauaktivität, Pansen-pH-Wert und Tiergesundheitsparameter

Eine kontinuierliche Aufzeichnung der Kauaktivität der einzelnen Kühe fand mittels Wiederkauhalftern (RumiWatch System, ITIN + Hoch GmbH, Schweiz) statt. Der Pansen-pH-Wert wurde während des gesamten Versuchs in 15-minütigen Abständen im ventralen Pansensack mit Datenloggern (LRCpH, DASCOR Inc., USA) gemessen, die mit pH-Sensoren (S655CD-HT, Sensorex Inc., USA) ausgestattet waren. Die Kalibration der Sensoren erfolgte vor dem Einsatz mittels Zwei-Punkt-Kalibration.

An Tag 22, an dem kein FUM verabreicht wurde, wurden zu drei festgelegten Zeitpunkten: 0 Stunden = vor der Fütterung; 3 Stunden nach der Fütterung; 10 Stunden nach der Fütterung, die Ausgangswerte der Gesundheitsparameter der Tiere ermittelt. Für die FUM-Daten wurden diese Parameter zu denselben drei festen Zeitpunkten am Tag 24, nach zweitägiger Intoxikation, überprüft und aufgezeichnet. Die Atemfrequenz (Atemzüge pro Minute) wurde durch Inspektion des rechten Flankenbereichs gezählt, wobei man schräg hinter dem Tier stand. Sowohl die Herzfrequenz (Herzschläge/15 Sek. x 4) als auch die Pansenmotilität (Frequenz/5 Min., kräftig und auslaufend) wurden durch Auskultation mittels Stethoskops (Littmann Classic III, 3M, Deutschland) erfasst. Die rektale Körpertemperatur wurde mit einem Thermometer (VT 1831, microLife, Schweiz) gemessen.

3.4. Blutentnahme und Analyse der Leberenzyme

Am 23. Versuchstag, dem ersten Tag der FUM-Intoxikation, wurden direkt vor der morgendlichen Fütterung (Zeitpunkt 0 h) und 7 h nach der FUM-Intoxikation Blutproben aus der *Vena jugularis* mit Hilfe von Vakuumserumröhrchen (9 mL, Vacuette, Greiner Bio-One, Österreich) entnommen. Nach der Entnahme konnte das Blut im Röhrchen 1,5 Stunden lang bei Raumtemperatur gerinnen und wurde anschließend 15 Minuten lang bei $2.000 \times g$ und $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ zentrifugiert (Zentrifuge 5804 R, Eppendorf, Deutschland). Die Lagerung der Seren bis zur weiteren Analyse erfolgte in 2-mL-Röhrchen (Eppendorf) bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Mittels vollautomatischem Analysegerät für klinische Chemie (Cobas 6000/c501; Roche Diagnostics GmbH, Wien, Österreich) wurden die Konzentrationen von Aspartat-Aminotransferase (AST), alkalischer Phosphatase (AP), Gamma-Glutamyl-Transferase (GGT) und Glutamat-Dehydrogenase (GLDH) in den Serumproben bestimmt. Die Intraassay-Variation für alle blutchemischen Assays betrug $\leq 5\%$. Die Proben wurden jeweils in zweifacher Ausfertigung analysiert.

3.5. Analysen von kurzkettigen Fettsäuren

Die Analyse der SCFA-Konzentrationen, wie Acetat, Propionat, n-Butyrat, Isobutyrat, n-Valerat, Isovalerat und Caproat, erfolgte nach dem Auftauen der Proben bei Raumtemperatur und einer 25-minütigen Zentrifugation der Pansenflüssigkeit bei $20.000 \times g$ und $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. In einem neuen Röhrchen wurden 0,6 mL gewonnener Überstand mit 0,2 mL des internen Standards (4-Methylvaleriansäure, Sigma-Aldrich Co. LLC., USA) und 0,2 mL HCl ($1,8\text{ mol/L}$) vermischt und weitere 25 Minuten bei $20\ 000 \times g$ und $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ zentrifugiert. Der entstandene klare Überstand wurde verwendet, um die SCFA-Konzentration im Gaschromatographen (GC Modell 8060 MS 172 DPFC, Nr.: 950713, Fisons, Italien) zu bestimmen. Das Analysegerät war mit einer $30\text{ m} \times 0,53\text{ mm ID} \times 0,53\text{ }\mu\text{m df}$ Kapillarsäule (Trace TR Wax, Thermo Fisher Scientific, Österreich) und einem Flammenionisationsdetektor ausgestattet. Die Injektortemperatur lag bei $170\text{ }^{\circ}\text{C}$ und die Detektortemperatur bei $190\text{ }^{\circ}\text{C}$. Die Durchflussrate des Trägergases Helium betrug 6 mL/min .

3.6. Statistik

Mit Hilfe des Programms SAS 9.4 (SAS Institute Inc., USA) wurden die Daten ausgewertet. Nach Überprüfung der Normalverteilung der Residuen mit Hilfe des Shapiro-Wilk-Tests von proc univariate wurde eine Varianzanalyse (ANOVA) mit proc mixed und dem folgenden Modell durchgeführt:

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

wobei μ der Mittelwert, B_i der feste Effekt der Behandlung, Z_j der feste Effekt des Zeitpunkts, A_k der zufällige Effekt des einzelnen Tieres und e_{ijk} der Restfehler ist.

Messungen, die zu verschiedenen Zeitpunkten an demselben Tier durchgeführt wurden, wurden als wiederholte Messungen betrachtet. Das Signifikanzniveau wurde auf $p < 0,05$ festgelegt und Trends wurden für alle statistischen Analysen auf $0,05 < P < 0,10$ definiert.

4. Ergebnisse

4.1. Vitalparameter

Die Herzfrequenz der Tiere wurde durch die FUM-Exposition beeinflusst. Sie erhöhte sich während der Belastung mit FUM. So zeigte sich beim Vergleich der beiden Phasen Baseline und FUM eine höhere Herzfrequenz während FUM ($P=0,02$).

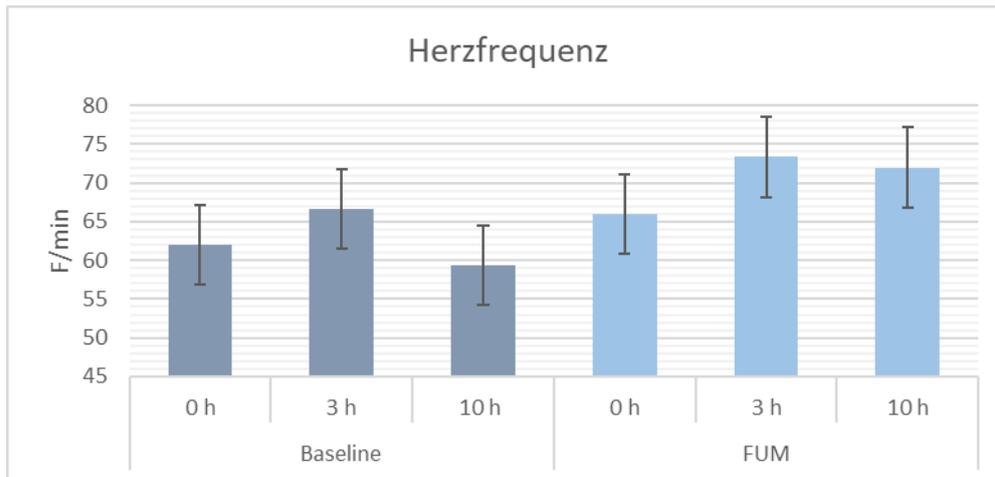


Abbildung 7: Herzfrequenz im Phasenvergleich

Weiters wurde während der Baseline eine höhere Atemfrequenz aufgezeichnet. So wurde die Atemfrequenz, beim Vergleich der beiden Phasen Baseline und FUM, durch die Belastung von FUM verkürzt ($P<0,01$).

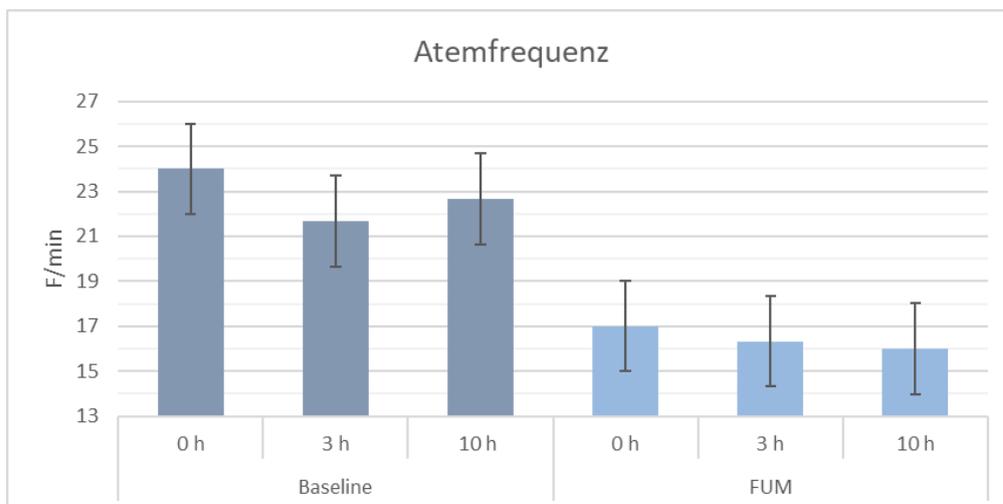


Abbildung 8: Atemfrequenz im Phasenvergleich

Der Zeitpunkt der Messung beeinflusste die IKT der Tiere, der Zeiteffekt ergab einen P-Wert von 0,01, im Tagesverlauf erhöhte sich die Temperatur, im physiologischen Bereich von 38,3 °C bis 38,8 °C (Baumgartner und Wittek 2018), zwischen den Messzeitpunkten FUM 0 h und FUM 3 h ($P=0,01$) bzw. FUM 10 h ($P=0,04$) während der FUM-Intoxikation.

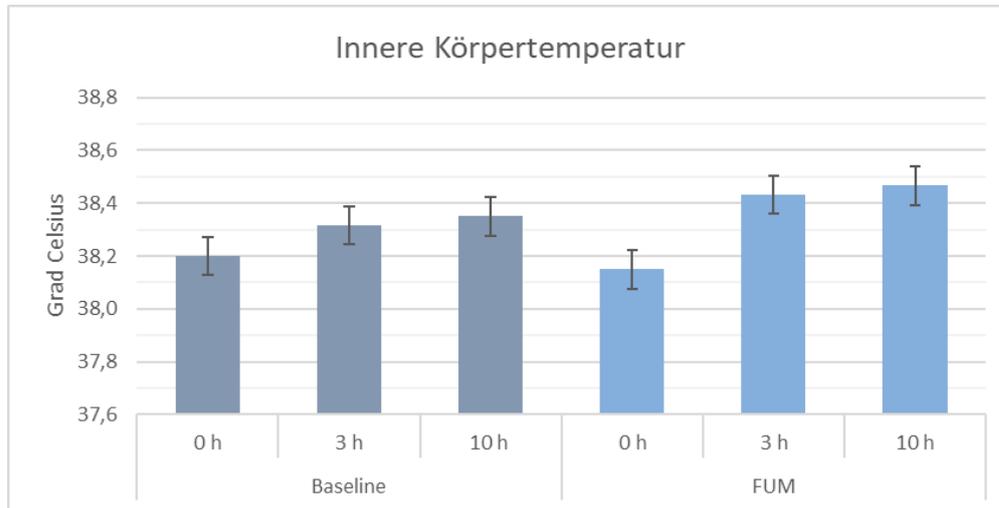


Abbildung 9: Innere Körpertemperatur im Phasenvergleich

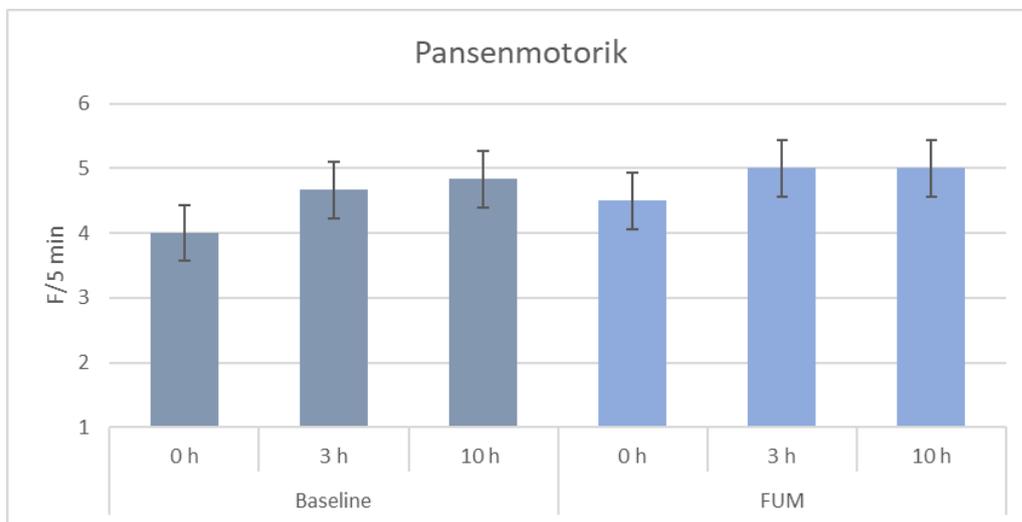


Abbildung 10: Pansenmotorik im Phasenvergleich

4.2. Pansengesundheit und Fermentation

Während der FUM-Belastung konnte ein Abfall des ruminalen pH-Wertes festgestellt werden. Der pH-Wert 3 h nach der FUM-Exposition war deutlich niedriger verglichen mit den Daten der Baseline zu demselben Messzeitpunkt ($P=0,02$). Der Abfall des pH-Wertes zeigte sich auch als Trend zu den Messzeitpunkten 4 h ($P=0,06$) und 13 h ($P=0,09$) nach der Intoxikation. Die Daten der Pansenmotorik lagen stets im physiologischen Bereich (1-2/5 min) (Baumgartner und Wittek 2018) und wiesen keine Veränderungen auf, es war kein Trend oder Effekt feststellbar.

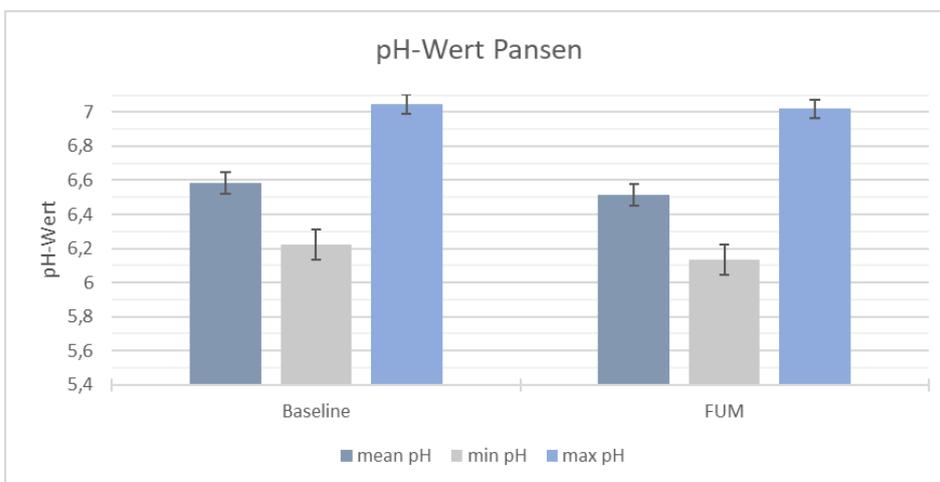


Abbildung 11: mittlerer; minimum; maximum pH im Phasenvergleich

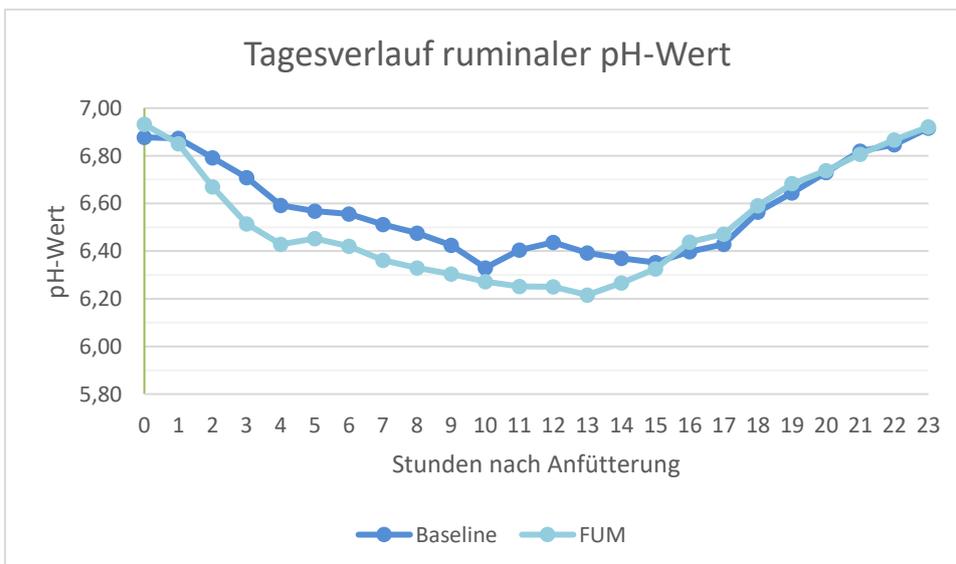


Abbildung 12: Pansen pH-Wert im Tagesverlauf

Die Gesamtkonzentration an SCFA war höher während der Baseline als während der FUM-Exposition. So lag der Wert zum Messzeitpunkt Baseline 0h bei 85,5 mmol/L und FUM 0 h 77,7 mmol/L. Weiters zeigte Baseline 3 h (107,1) einen höheren Wert als FUM 3 h (95,0). Die FUM-Gabe veränderte die Acetat-Konzentration zum Zeitpunkt 0 h, Acetat war geringer in Baseline (63,5) als bei FUM (67,5) ($p=0,02$). Die Acetat-Konzentration (67,5/64,3/63,0) sank im Tagesverlauf (0 h/3 h/10 h) während der FUM-Exposition. Der Zeitpunkt der Probenahme hatte einen Einfluss auf die Isobutyrat-Konzentration, mit höheren Werten zum Zeitpunkt 0 h als zu den anderen beiden Messungen 3 h und 10 h an beiden Tagen der Beprobung Baseline und FUM. Der Anteil an n-Butyrat, Caproat und Isovalerat war nicht betroffen.

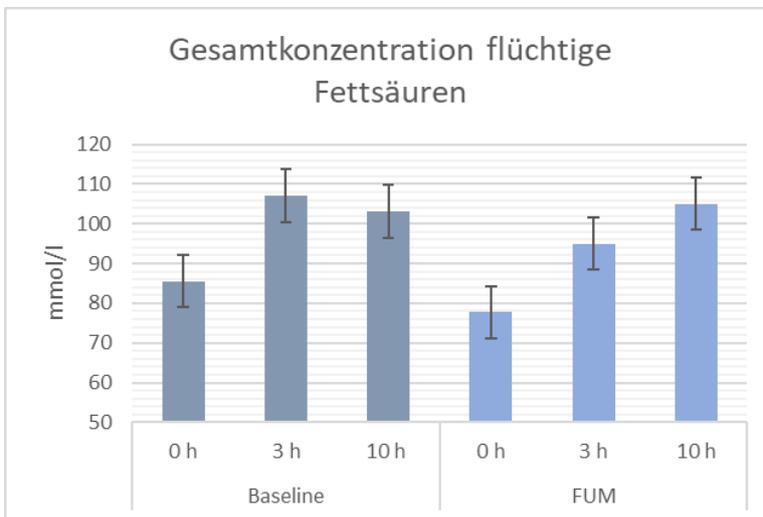


Abbildung 13: Gesamtkonzentration der flüchtigen Fettsäuren im zeitlichen Verlauf

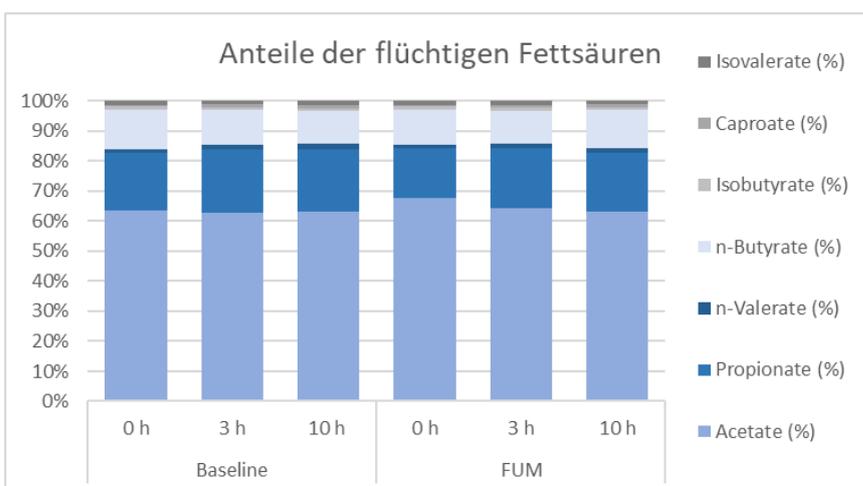


Abbildung 14: Anteil der flüchtigen Fettsäuren in Prozent vor und nach der FUM-Exposition

4.3. Leberenzyme

Die Daten der Blutproben zeigten, dass die Leberenzyme durch die FUM-Exposition erhöht wurden. Zum Messzeitpunkt 7 h nach der FUM-Exposition, verglichen mit den Daten direkt vor der Intoxikation 0 h, wurde eine höhere Konzentration des Leberenzym AST gemessen ($P=0,02$). Die Werte von AST stiegen von 68,17 auf 77,83. Weiters wurde nach der Intoxikation eine höhere GGT Konzentration gemessen, es war ein Trend ($P=0,06$) nach 7 h FUM-Belastung nachweisbar. Die Konzentrationen der Leberenzyme AP und GLDH in den Serumproben vor und nach der Intoxikation zeigten keine Unterschiede und waren somit nicht erhöht.

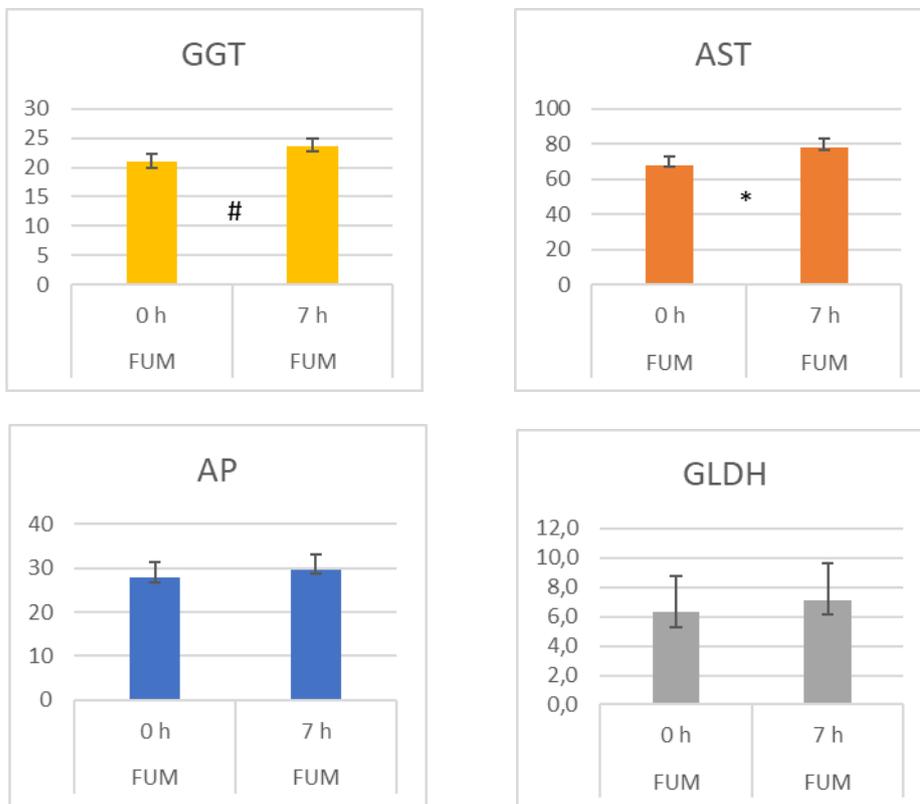


Abbildung 15: Leberenzyme im Vergleich direkt vor der FUM-Exposition und zum Messzeitpunkt 7h nach der Intoxikation (Trends mit $P < 0,1$ werden mit # gekennzeichnet, Effekte mit $P < 0,05$ werden mit * gekennzeichnet)

4.4. Fressverhalten

Die Fressperioden verlängerten sich unter der Belastung von FUM. So konnte sowohl eine erhöhte Fresszeit während der Intoxikation von FUM ($P=0,0025$), als auch eine deutlich

erhöhte Wiederkauzeit ($P=0,0029$) verzeichnet werden. Weiters stiegen die Wiederkauschläge pro Bolus durch die FUM-Belastung signifikant ($P=0,0162$) an. Die aufgenommene Futtermenge und das Trinkverhalten der Tiere unterschieden sich jedoch nicht, im Vergleich FUM-Exposition mit Baseline. Der Kauindex wies ebenfalls keinen Unterschied auf.

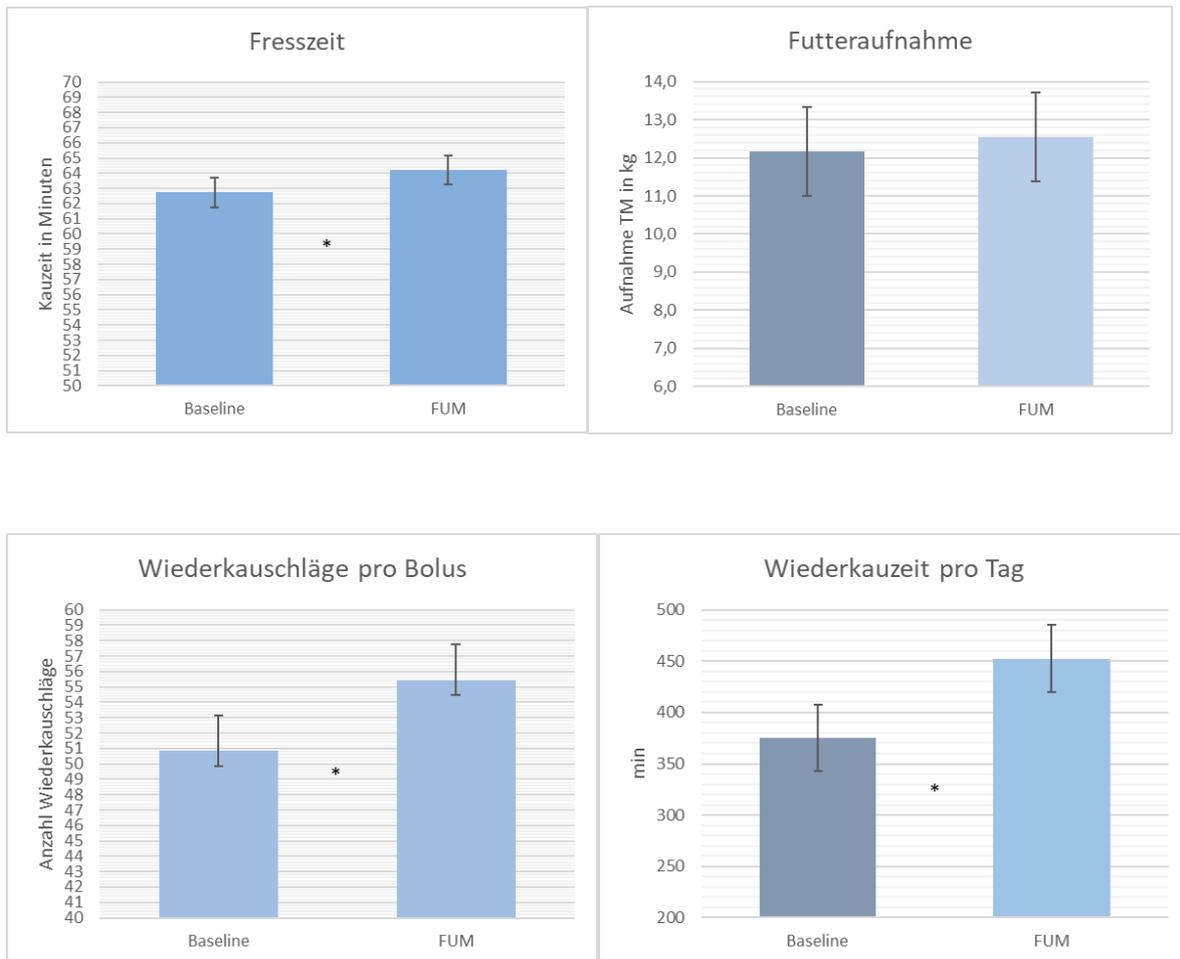


Abbildung 16: Futteraufnahme, Fresszeit pro Tag, Wiederkauzeit pro Tag, Wiederkauschläge pro Bolus im Phasenvergleich (Effekte mit $P < 0,05$ werden mit * gekennzeichnet)

4.5. Mykotoxinbelastung in Trockenmasse

Die Analyse der TMR stellte eine Gesamtzahl an 48 verschiedenen Mykotoxinen in der untersuchten Probe fest. Die Hauptmykotoxine und dessen Konzentrationen sind in Tabelle 4 aufgelistet. Es konnte eine gesamte Fumonisinbelastung von 309,23 $\mu\text{g}/\text{kg}$ festgestellt

werden. Innerhalb der Gruppe der Fumonisine wurden die Metaboliten FB1, FB2, FB3, FB4 festgestellt.

Tabelle 4: Hauptmykotoxine in Totalmischung (Nachweisgrenze von 20 µg/kg für Aflatoxin A, T-2 Toxin und Ochratoxin A):

Analyt	Konzentration
Aflatoxin B1	nicht detektierbar
Zearalenone	3,16 µg/kg
Deoxynivalenol	180,74 µg/kg
T-2 Toxin	nicht detektierbar
HT-2 Toxin	9,79 µg/kg
Fumonisin B1	195,46 µg/kg
Fumonisin B2	48,80 µg/kg
Fumonisin B3	30,99 µg/kg
Fumonisin B4	33,98 µg/kg
Ochratoxin A	nicht detektierbar
Ergot Alkaloide	3,53 µg/kg

5. Diskussion

Im Rahmen dieses Experiments wurden die akuten Effekte einer kontrollierten zweitägigen oralen FUM-Intoxikation, mit einer täglich aufgenommenen Menge von 20 mg, auf die Kuhgesundheit und Pansen-Fermentation untersucht. Verschiedene Gesundheitsparameter, wie Wiederkauzeit und Vitalparameter wurden aufgezeichnet, um das Wohlbefinden der Tiere, sowie deren Gesundheitszustand während dieser Behandlung beurteilen zu können. Folgende Hypothesen wurden mittels erlangter Ergebnisse überprüft: Die mikrobielle Population des Pansens wird durch Aufnahme von FUM beeinträchtigt. Dies führt zu geringeren Konzentrationen kurzkettiger Fettsäuren und einer Veränderung des ruminalen pH-Werts. Weiters wurde angenommen, dass eine Intoxikation mit FUM das Wohlbefinden und die Gesundheit der Kuh akut beeinträchtigt und folglich erhöhte Leberenzymwerte und veränderte Gesundheitsparameter feststellbar sind. Es wurden sechs trockenstehende Milchkühe, denen eine Totalmischration mit 40 % Kraftfutter auf TM-Basis, gefüttert wurde, beprobt. Die gefütterte TMR enthielt eine zu vernachlässigende Mykotoxinkontamination von 309,23 µg/kg FUM, die stets unter den festgelegten Richtwerten von 50.000 µg/kg lag. Andere Mykotoxine waren ebenso nur in sehr geringen Konzentrationen vorhanden bzw. unter der Nachweisgrenze. Somit kann angenommen werden, dass jegliche beobachteten Effekte durch die oral verabreichte FUM-Exposition hervorgerufen wurden.

5.1. Effekte von Fumonisin auf die Rindergesundheit

Im Rahmen dieses Experimentes konnten bei den Versuchstieren nur wenige gesundheitliche Effekte durch die Intoxikation mit FUM beobachtet werden. Alle aufgezeichneten Vitalparameter der Tiere bewegten sich an beiden Versuchstagen in ihrem jeweiligen physiologischen Bereich (Baumgartner und Wittek 2018).

Jedoch erhöhte sich die Herzfrequenz der Versuchstiere nach der Belastung mit FUM. So erhöhten sich die Werte, im physiologischen Bereich 60-80/min (Baumgartner und Wittek 2018), vom Messzeitpunkt Baseline 10 h zum Messzeitpunkt FUM 10 h von 59 Schläge pro Minute auf 72 Schläge pro Minute. Die Atemfrequenz, mit physiologischen Werten von 10-30/min (Baumgartner und Wittek 2018), wurde ebenfalls beeinflusst und sank unter der FUM-Belastung. Diese Erhöhung der Herzfrequenz, die bei den Tieren beobachtet werden konnte, kann als Belastungsanzeichen durch das verabreichte Mykotoxin gedeutet werden. Stress verursacht durch die Manipulation bei der klinischen Untersuchung sollte ebenfalls als

Grund für eine gesteigerte Herzfrequenz berücksichtigt werden. Die Vitalparameter und mögliche Veränderungen dieser durch eine FUM-Intoxikation wurden in bisherigen Studien noch nicht explizit untersucht und sollten daher in zukünftigen Studien einbezogen werden.

5.2. Effekte von Fumonisin auf die Kauaktivität-, Pansenfermentation und Blutwerte

Während der FUM-Exposition zeigten die Kühe eine allgemein verlängerte Fresszeit sowie eine gesteigerte Wiederkauaktivität. Auch die Wiederkauschläge pro Bolus erhöhten sich. Diese verstärkten Maßnahmen zur mechanischen Zerkleinerung der Futterpartikel können als Kompensation für eine Beeinträchtigung der Fermentationsaktivität im Pansen aufgefasst werden. Weiters weist die reduzierte SCFA-Gesamtkonzentration auf eine niedrigere Fermentation hin. Eine verlängerte Fresszeit wurde auch von Fink-Gremmels (2008) nachgewiesen. In der Studie von Gallo et al. (2020) wurde eine verringerte Wiederkauzeit aufgrund einer verringerten Trockenmasseaufnahme, die mit einer verminderten Pansenfüllung einherging, aufgezeigt. Die verringerte Futteraufnahme, die von mehreren Studien nachgewiesen wurde (Fink-Gremmels 2008, Mostrom und Jacobsen 2020), konnte in diesem Versuch nicht belegt werden, es zeigte sich kein Unterschied in der Trockenmasseaufnahme. Auch aufgrund des schimmigen Geruchs von kontaminierten Rationen konnte Futterverweigerung und eine dadurch reduzierte Futteraufnahme bei den Tieren nachgewiesen werden (Fink-Gremmels 2008, Mostrom und Jacobsen 2020). In diesem Versuch wurde jedoch nicht die gesamte TMR mit dem Mykotoxin kontaminiert, sondern nur eine separat verabreichte Portion Krafffutter, weshalb dieser Effekt nicht beobachtbar war, zudem war die TMR nachweislich weitgehend mykotoxinunbelastet.

Die Gesamtkonzentration der SCFA sank, während der FUM-Exposition und bestärkt die Vermutung, dass die Pansenfermentation durch die Mykotoxinbelastung beeinträchtigt wird. Eine Abnahme der kurzkettigen flüchtigen Fettsäuren im Pansen stellte auch die Studie Loh et al. (2020) fest. Der durchschnittliche Pansen pH-Wert reduzierte sich während der Intoxikation. Dieser tiefere ruminale pH-Wert passt nicht dazu, sondern wäre bei einer Akkumulation von SCFA zu erwarten. Der deutlichste pH-Wert Abfall zeigte sich zum Messzeitpunkt 3 h nach der FUM-Intoxikation. Da der Wert jedoch stets über pH 5,8 lag, zeigten die Kühe keine Anzeichen einer subakuten Pansenazidose. Durringer et al. (2020) stellte bei Maststieren ebenfalls einen Abfall des pH-Wertes fest, dieser Wert erholte sich jedoch nach Beendigung der Intoxikation. Die Studien von Caloni et al. (2000) und Fink-

Gremmels (2008) stellten keine Veränderungen dieser beiden Parameter fest. Du et al. (2017) verzeichneten in ihrer Studie einen verringerten Anteil an Propionat durch FUM. Im vorliegenden Versuch konnte dies nicht nachgewiesen werden. Durch Mykotoxine kann eine Veränderung der Pansenmikrobiota hervorgerufen werden, die sich auf das Fermentationsmuster des Pansens auswirkt und eine gestörte Pansenfunktion, mit einem beeinträchtigten Kohlenhydratmetabolismus, zur Folge haben kann (Fink-Gremmels 2008). Eine adäquate Pansenflora und eine stabile Pansenfermentation sind besonders wichtig, um die optimale Detoxifizierungsfähigkeit des Pansens gewährleisten zu können. Eine Imbalance dieser Mikroflora kann die Deaktivierung von Mykotoxinen vermindern und somit die Widerstandsfähigkeit der Tiere (Mostrom und Jacobsen 2020). Deshalb sind präruminierende Tiere wie Kälber sowie Monogastrier anfälliger für Mykotoxikosen. Der Kraftfutteranteil einer Ration hat ebenfalls Einfluss auf das Pansenmikrobiom und kann deshalb ausschlaggebend für die Effekte von Mykotoxinen sein (Kemboi et al. 2020). Hochleistungsmilchkühe werden aufgrund ihrer starken Milchleistung oft mit einer energie- bzw. kraftfutterreichen Diät gefüttert und sind deshalb anfälliger für Stoffwechselstörungen wie der subakuten oder akuten ruminalen Azidose, die wiederum negative Auswirkungen auf die Pansenaktivität hat. Weiters enthalten diese Rationen oft hohe Maisanteile als Energiequelle, die besonders häufig mit Mykotoxinen kontaminiert ist (Kemboi et al. 2020). So ergibt sich bei Hochleistungsmilchkühen eine hohe Sensitivität gegenüber Mykotoxinen und es sollte besonders auf diese Gruppe ein Augenmerk gelegt werden. Bei den Versuchstieren dieses Experimentes handelte es sich um trockenstehende Kühe, die einigen dieser Stressoren nicht ausgesetzt waren, weshalb die Gefahr einer Azidose nicht zu erwarten war. Die Verwendung von laktierenden Hochleistungsmilchkühen mit höherer Stoffwechselbelastung hätte möglicherweise zu Effekten von FUM auf die Tiergesundheit geführt. Weiters wäre dabei die Möglichkeit der Milchleistungsdatenerfassung in zukünftigen Untersuchungen ebenfalls sinnvoll, da die Milchleistung nachweislich durch FUM-Belastung reduziert werden kann (Mostrom und Jacobsen 2020).

Erhöhte Serumkonzentrationen der Leberenzyme AST und GGT, die man bei akuten und chronischen Hepatopathien und besonders deutlich bei Leberzellnekrosen vorfindet (Baumgartner und Wittek 2018), zeigten sich in diesem Experiment nach 7 h nach der Intoxikation, wobei bei AST eine signifikante Erhöhung auf 77,83 U/l, jedoch im physiologischen Bereich (bis 80 U/l) (Baumgartner und Wittek 2018), festgestellt werden konnte. Dies deutet auf eine Belastung der Leber hin und bestätigt den hepatotoxischen

Effekt von FUM (Fink-Gremmels 2008). Eine mögliche Belastung der Leber wurde auch in der Studie von Gallo et al. (2020) nach oraler FUM-Aufnahme berichtet. Es zeigten sich erhöhte AST und GGT Konzentrationen nach einer 253-tägigen Langzeitexposition von täglich 94 mg/kg FB1 bei Rindern. Auch Mostrom und Jacobsen (2020) wiesen erhöhte Werte dieser Leberenzyme nach. Um weiteren Aufschluss über die mögliche leberschädigende Wirkung dieser akuten FUM-Belastung zu erlangen, hätte das Sa/So-Verhältnis, das als Biomarker für eine FUM-Intoxikation verwendet werden kann (Marin et al. 2013), sowie eine pathohistologische Untersuchung des Lebergewebes zusätzlich überprüft werden können.

Die Dosis, Aufnahmedauer und die Empfindlichkeit der verschiedenen Tiere haben einen starken Einfluss auf die Auswirkungen der Mykotoxine. Durch Co-Kontaminationen und somit die Aufnahme unterschiedlicher Mykotoxin-Kombinationen können die negativen Effekte der einzelnen Mykotoxine verstärkt werden, weshalb auch geringe Konzentrationen unter den erlaubten Richtwerten, ein Risiko darstellen können (Fink-Gremmels 2008, Gallo et al. 2020). Co-Kontaminationen kommen häufig unter Feldbedingungen und in angefertigten Futtermischrationen vor (Fink-Gremmels 2008). Kemboi et al. (2020) berichten, dass die untersuchten Rationen bis zu 116 verschiedene Mykotoxine enthielten, in 100 % der Milchkuhrationen konnte FUM (52,4-2171,3 µg/kg) detektiert werden. Regulierte Mykotoxine konnten in 96 % der Rationen nachgewiesen werden. Die Wichtigkeit von Mykotoxikosen in der Landwirtschaft wird durch diese Omnipräsenz untermauert. Futtermittelanalysen als präventive Maßnahme sollten priorisiert werden, um Kontaminationen frühzeitig zu erkennen, die Exposition zu verringern und dieser gegebenenfalls entgegenwirken zu können.

Die Resultate dieses Experimentes sollten jedoch mit gewisser Vorsicht und nicht überinterpretiert werden, da nur eine kleine Anzahl an Kühen mit einer geringen FumonisinKonzentration über eine sehr kurze Zeit belastet wurden. Deutlichere Veränderungen des Gesundheitsstatus, wie Leberschäden, wurden bei chronischer FUM-Belastung und höheren Konzentrationen erreicht (Düringer et al. 2020, Gallo et al. 2020). Die Steigerung der Mykotoxinwirkung im Laufe der Aufnahmedauer wurde auch von Goncalves et al. (2015) berichtet. Die toxisch wirkende Dosis bei oral verabreichtem FB1 wurde auf >75 mg/kg Körpergewicht festgelegt (Goncalves et al. 2015). Die in diesem Versuch gefütterte FUM-Menge von 20 mg lag somit deutlich unter diesem Wert.

Die Aufnahme von Mykotoxinen verursacht oft nur subakute Symptome, die häufig nicht erkannt werden (Gallo et al. 2015). Um in der Praxis wahrnehmbare Effekte zu erzielen, sind

eine deutlich höhere FUM-Konzentration und eine längere Expositionsdauer notwendig. Deshalb werden in der Praxis Mykotoxin-Intoxikationen oft erst nach chronischer Belastung der Tiere festgestellt. Jedoch werden Feldausbrüche, durch natürlich kontaminiertes Futter, bei Milchkühen kaum beschrieben (Fink-Gremmels 2008, Kemboi et al. 2020), da die Konzentrationen zu gering und Rinder im Vergleich zu Monogastriern widerstandsfähiger sind.

Schlussfolgernd scheinen Kühe im Rahmen dieses Versuchs mit einer alleinigen und kurzfristigen FUM-Belastung in so geringer Konzentration gut zurechtzukommen, auch wenn die Leberenzyme teilweise leicht erhöht waren. Änderungen im Kauverhalten und der Pansenfermentation deuten allerdings durchaus auf negative Effekte durch FUM auf den Pansen hin und sollten weiter untersucht werden. Unter Praxisbedingungen stellen Mykotoxikosen ein multifaktoriell verursachtes Krankheitsbild dar, das sich unter anderem aus einem Zusammenspiel von dem betroffenen Tier, der Diät, den vorherrschenden Umweltfaktoren, der Mykotoxinkonzentration, der Expositionsdauer und der vorliegenden Co-Kontaminanten ergibt (Gallo et al. 2015).

6. Zusammenfassung

Durch die Omnipräsenz von Mykotoxinen als Kontaminanten in Futtermitteln, vor allem in Silage und Mais, stellen diese ein ernstzunehmendes Problem in der Landwirtschaft und Nutztiermedizin dar. Rinder gelten aufgrund der Detoxifizierungsfähigkeit des Pansens als robuster gegenüber Mykotoxinen als Monogastrier. Diese nachweislich geringere Sensitivität, als auch die anfänglich subakute Symptomatik von Mykotoxikosen, sollte nicht dazu führen, dass die Bedeutung dieses multifaktoriell verursachten Krankheitsbildes geschmälert oder sogar vergessen wird. Besonders Co-Kontaminationen stellen eine gesundheitliche Herausforderung für Rinder dar. Bei der Analyse von Futterrationen in österreichischen Rinder-Betrieben, konnte in einem Großteil (70,7 %) der Rationen das in dieser Arbeit untersuchte *Fusarium*-Toxin FUM nachgewiesen werden.

Die akuten Einflüsse von FUM auf Rinder sind bisher kaum erforscht. Die vorliegende Diplomarbeit beschäftigt sich mit den akuten Auswirkungen nach einer kurzfristigen oralen FUM-Exposition auf die Variablen der Kuhgesundheit und Pansenfermentation. Es wurde angenommen, dass durch die Aufnahme von FUM die mikrobielle Population des Pansens beeinträchtigt wird und negative Auswirkungen auf das Wohlbefinden und die Gesundheit, mit einem Anstieg der Leberenzymwerte und veränderten Gesundheitsparametern, feststellbar sind.

Im Rahmen des Versuchs wurden sechs Pansen-fistulierte, trockenstehende Holstein Milchkühe, die mit einer TMR mit 40 % Kraftfutteranteil (TM-Basis) gefüttert wurden, einer zweitägigen FUM-Exposition ausgesetzt. Hierzu wurde den Tieren morgens 200 g Kraftfutter, kontaminiert mit 20 g FUM, gefüttert. Die Datenerhebung erfolgte zu den Zeitpunkten 0 h, 3 h, 10 h nach der Morgenfütterung, sowohl am Tag vor der FUM-Gabe, zur Erhebung der Basiswerte (Baseline), als auch am Tag 2 der FUM-Exposition, zur Erhebung der Daten der FUM-Belastung (FUM). Mittels klinischer Untersuchung wurden die Gesundheitsparameter Puls, Atmung, innere Körpertemperatur und Pansenmotorik erfasst. Weiters fand eine kontinuierliche Aufzeichnung der Futteraufnahme, Kauaktivität und des ruminalen pH-Wertes mittels Datenlogger statt. Es wurden Pansensaftproben zur Analyse der SCFA-Konzentration (0 h, 3 h, 10 h nach Morgenfütterung) und Blutproben zur Bestimmung der Leberenzymwerte (0 h und 7 h nach Morgenfütterung) gewonnen. Mittels Futtermittelanalyse wurde eine zu vernachlässigende Mykotoxinkontamination der gefütterten TMR festgestellt.

Unter den gegebenen Versuchsbedingungen konnten nur geringe gesundheitliche Effekte beobachtet werden. Alle Vitalparameter, sowie der ruminale pH-Wert bewegten sich stets im physiologischen Bereich. Nach der FUM-Intoxikation konnte eine erhöhte Herzfrequenz wahrgenommen werden, was als Belastungsanzeichen gedeutet werden kann. Eine verlängerte Fresszeit und eine gesteigerte Wiederkauaktivität, als mögliche Kompensation einer reduzierten Pansenfermentation, die sich in einer reduzierten SCFA-Konzentration im Pansen äußerte, wurden erfasst. Der Hinweis auf eine Belastung der Leber wurde durch einen Anstieg der Leberenzymwerte AST und GGT im Blut gegeben.

Aus den Ergebnissen dieses Versuchs lässt sich schließen, dass die Kühe mit dieser kurzfristigen FUM-Belastung gut zurechtkamen. Weitere Experimente sind notwendig, um die akute Wirkung von FUM unter praxisnäheren Bedingungen, wie der Verwendung von vulnerableren, laktierenden Hochleistungsmilchkühen und der Berücksichtigung von häufig vorliegenden Co-Kontaminationen, zu erfassen.

7. Summary

Due to the omnipresence of mycotoxins as contaminants in animal feed, especially in silage and maize, they represent a serious problem in agriculture and farm animal medicine. Ruminants are considered less sensitive to mycotoxins compared to monogastric animals due to the detoxification activity of the rumen. This lower sensitivity, as well as the subacute symptoms of mycotoxicoses, should, however, not lead to the significance of this multifactorially caused clinical picture being diminished or even forgotten. Especially co-contaminations pose a health challenge for cattle. Analysis of feed rations in cattle farms in Austria detected the *Fusarium* toxin FUM, which was investigated in this study, in a large proportion (70.7 %) of the rations.

The acute effects of FUM on cattle have hardly been investigated so far. The present thesis deals with the acute effects after short-term oral FUM-exposure on cow health variables and rumen fermentation. It was hypothesized that FUM-ingestion would affect the rumen microbial population and has negative effects on welfare and health, with an increase in liver enzyme levels and altered health parameters.

As part of the experiment, six rumen-fistulated, dry Holstein dairy cows fed a TMR containing 40 % concentrated feed (DM basis) were exposed to FUM for two days. For this purpose, the animals were fed 200 g concentrated feed contaminated with 20 g FUM in the morning. Data collection was done at the time points 0 h, 3 h, 10 h after morning feeding, both on the day before FUM administration, to collect baseline values (Baseline), and on day 2 of FUM-exposure, to collect FUM-exposure data (FUM). By means of clinical examination, the health parameters pulse, respiratory rate, internal body temperature and rumen motor function were recorded. Furthermore, continuous recording of feed intake, chewing activity and ruminal pH, was carried out by means of data loggers. Ruminal fluid samples were taken to determine SCFA concentration (0 h, 3 h, 10 h after morning feeding) and blood samples were taken to determine liver enzyme levels (0 h and 7 h after morning feeding). Feed analysis showed a negligible mycotoxin contamination of the fed TMR.

Under the given experimental conditions, only minor health effects could be observed. All vital parameters as well as the ruminal pH were always within the physiological range. After FUM-intoxication, an increased heart rate was obtained, which can be interpreted as a sign of stress. A prolonged feeding time and an increased rumination activity, as possible compensation of an impaired rumen fermentation as reflected in reduced ruminal SCFA

concentrations, were recorded. Indication of hepatic stress was given by an increase of the liver enzyme concentrations of AST and GGT in blood serum.

Regarding these results, it can be concluded that cows coped well with this short-term FUM-exposure. Further experiments are needed to assess the acute effects of FUM under more practical conditions, such as the use of more vulnerable lactating high-yielding dairy cows and the consideration of frequently present co-contaminations.

8. Abkürzungsverzeichnis

ADF	saure Detergentienfaser
AFB1	Aflatoxin B1
Afla	Aflatoxine
ALVA	Arbeitsgemeinschaft Landwirtschaftlicher Versuchsanstalten
aNDF	neutrale Detergentienfaser
AP	alkalischer Phosphatase
AST	Aspartat-Aminotransferase
CER	Ceramide
DOM-1	De-Epoxy-Deoxynivalenol
DON	Deoxynivalenol
EFSA	European Food Safety Authority
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
ENNB	Enniatin B
ETK	Ethik und Tierschutzkommission
FAO	Ernährungs- und Landwirtschaftsorganisation der Vereinten Nationen/The Food and Agriculture Organization of the United Nation
FB1	Fumonisin B1
FB2	Fumonisin B2
FB3	Fumonisin B3
FB4	Fumonisin B4
FHB	Fusarium Head Blight
FUM	Fumonisine
GC	gas chromatography
GGT	Gamma-Glutamyl-Transferase
GIT	Gastrointestinaltrakt

GLDH	Glutamat-Dehydrogenase
HFB1	hydrolysiertes FB1
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IARC	International Agency for Research on Cancer
KG	Körpergewicht
MON	Moniliformin
MS	Massenspektrometrie
MVOC	mikrobielle flüchtige organische Verbindungen
NIV	Nivalenol
OTA	Ochratoxin A
peNDF	physikalisch aktive Detergentienfaser
Sa	Sphinganine
SARA	subakute ruminale Azidose
SCFA	kurzkettige Fettsäuren (short chain fatty acids)
SD	Standardabweichung
So	Sphingosine
TLC	Thin layer chromatography
TM	Trockenmasse
TMR	Totalmischung
TS	Trockensubstanz
UPLC	ultra performance liquid chromatography
US FDA	US Food and Drug Administration
VDLUFA	Association of German Agricultural Analytic and Research Institutes
WHO	World Health Organisation
ZEN	Zearalenon

9. Literaturverzeichnis

- Alshannaq A, Yu J-H. 2017. Occurrence, Toxicity, and Analysis of Major Mycotoxins in Food. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 14 (6).
- Bani Ismail Z, Al-Nabulsi F, Abu-Basha E, Hananeh W. 2020. Occurrence of on-farm risk factors and health effects of mycotoxins in dairy farms in Jordan. *Tropical Animal Health and Production*, 52 (5): 2371–2377.
- Baumgartner W, Wittek T. 2018. *Klinische Propädeutik der Haus- und Heimtiere*. Neunte Auflage. Stuttgart: Enke Verlag.
- Bertero A, Moretti A, Spicer LJ, Caloni F. 2018. Fusarium Molds and Mycotoxins: Potential Species-Specific Effects. *Toxins*, 10 (6).
- Biomin. 2020. Biomin Mykotoxin Survey. <https://www.biomin.net/science-hub/biomin-mycotoxin-survey-q2-2020-results/#:~:text=BIOMIN%20Mycotoxin%20Survey%20Q2%20January%20to%20June%202020,analyses%20conducted%20between%20January%20and%20June%202020.%2005.08.2020> (Zugriff 02.02.2022).
- Caloni F, Spotti M, Auerbach H, Op den Camp H, Fink Gremmels J, Pompa G. 2000. In vitro metabolism of fumonisin B1 by ruminal microflora. *Veterinary Research Communications*, 24 (6): 379–387.
- Custodio L, Prados LF, Figueira DN, Yiannikouris A, Gloria EM, Holder VB, Pettigrew JE, Santin E, Resende FD, Siqueira GR. 2020. Mycotoxin-contaminated diets and an adsorbent affect the performance of Nelore bulls finished in feedlots. *Animal: An International Journal of Animal Bioscience*, 14 (10): 2074–2082.
- Diaz D, Hopkins B, Leonard L, Hagler Jr. W, Whitlow L, 2000. Effect of fumonisin on lactating dairy cattle. *Journal of Dairy Science* 83.
- D'Mello J, Placinta CM, Macdonald A. 1999. Fusarium mycotoxins: A review of global implications for animal health, welfare and productivity. *Animal Feed Science and Technology*, 80 (3-4): 183–205.
- Du K, Wang C, Liu P, Li Y, Ma X. 2017. Effects of dietary mycotoxins on gut microbiome. *Protein and Peptide Letters*, 24 (5): 397–405.

Duringer JM, Roberts HL, Doupovec B, Faas J, Estill CT, Jiang D, Schatzmayr D. 2020. Effects of deoxynivalenol and fumonisins fed in combination on beef cattle: health and performance indices. *World Mycotoxin Journal*, 13 (4): 533–543.

EFSA (European Food Safety Authority). 2018. Risks for animal health related to the presence of fumonisins, their modified forms and hidden forms in feed. *EFSA J* 16, e05242.

Europäische Kommission. 2002. Directive 2002/32/EC of the European Parliament and of the Council of 7 May 2002 on undesirable substances in animal feed. Luxembourg: OJEU 91, 12–15.

Europäische Kommission. 2006. Commission Recommendation of 17 August 2006 on the presence of deoxynivalenol, zearalenone, ochratoxin A, T-2 and HT-2 and fumonisins in products intended for animal feeding (2006/576/EC). *OJEU* 229, 7-9.

Europäische Kommission. 2006. Commission Regulation (EC) No. 401/2006 of 23 February 2006 laying down the methods of sampling and analysis for the official control of the levels of mycotoxins in foodstuffs. *OJEU* L70:12–34.

Europäische Kommission. 2013. Commission Recommendation of 27 March 2013 on the presence of T-2 and HT-2 toxin in cereals and cereal products (2013/165/EU). *OJEU* L 91, 12- 15.

Fink-Gremmels J, van der Merwe D. 2019. Mycotoxins in the food chain: contamination of foods of animal origin. In: Smulders FJ, Rietjens IM, Rose M, Hrsg. *Chemical hazards in foods of animal origin*. The Netherlands: Wageningen Academic Publishers, 241–261.

Fink-Gremmels J. 2008. The role of mycotoxins in the health and performance of dairy cows. *Veterinary Journal* (London, England: 1997), 176 (1): 84–92.

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.

Gallo A, Minuti A, Bani P, Bertuzzi T, Cappelli FP, Doupovec B, Faas J, Schatzmayr D, Trevisi E. 2020. A mycotoxin-deactivating feed additive counteracts the adverse effects of regular levels of *Fusarium* mycotoxins in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 103 (12): 11314–11331.

- Goncalves BL, Corassin CH, Oliveira C. 2015. Mycotoxicoses in Dairy Cattle: A Review. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances*, 10 (11): 752–760.
- Gupta PK. 2019. Mycotoxicoses. In: Gupta PK, Hrsg. *Concepts and Applications in Veterinary Toxicology*. Cham: Springer International Publishing, 203–225.
- Gupta, P., 2019b. Mycotoxicoses, In: *Concepts and Applications in Veterinary Toxicology*. Springer, pp. 203-225.
- Gupta, P., 2019b. Mycotoxicoses, In: *Concepts and Applications in Veterinary Toxicology*. Springer, pp. 203-225.
- IARC (International Agency for Research on Cancer). 2012. Agents classified by the IARC Monographs, 446, 1-106. <http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/index.php>. (Zugriff 02.02.2022).
- Kemboi, D. C., Ochieng, P. E., Antonissen, G., Croubels, S., Scippo, M.-L., Okoth, S., Kangethe, E. K., Faas, J., Doupovec, B., Lindahl, J. F., Gathumbi, J. K. 2020. Multi-Mycotoxin Occurrence in Dairy Cattle and Poultry Feeds and Feed Ingredients from Machakos Town, Kenya. *Toxins*, 12 (12).
- Kemboi, David Chebutia, Antonissen, Gunther, Ochieng, Phillis E., Croubels, Siska, Okoth, Sheila, Kangethe, Erastus K., Faas, Johannes, Lindahl, Johanna F., Gathumbi, James K. 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).
- Loh ZH, Ouwerkerk D, Klieve AV, Hungerford NL, Fletcher MT. 2020. Toxin Degradation by Rumen Microorganisms: A Review. *Toxins*, 12 (10).
- Marin S, Ramos AJ, Cano-Sancho G, Sanchis V. 2013. Mycotoxins: occurrence, toxicology, and exposure assessment. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 60: 218–237.
- Mostrom MS, Jacobsen BJ. 2020. Ruminant Mycotoxicosis: An Update. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice*, 36 (3): 745–774.
- Nelson PE, Dignani MC, Anaissie EJ. 1994. Taxonomy, biology, and clinical aspects of *Fusarium* species. *Clinical Microbiology Reviews*, 7 (4): 479–504.

- 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.
- Osweiler GD, Kehrl ME, Stabel JR, Thurston JR, Ross PF, Wilson TM. 1993. Effects of fumonisin-contaminated corn screenings on growth and health of feeder calves. *Journal of Animal Science*, 71 (2): 459–466.
- Pantaya D, Morgavi DP, Silberberg M, Chaucheyras-Durand F, Martin C, Suryahadi, Wiryawan KG, Boudra H. 2016. Bioavailability of aflatoxin B1 and ochratoxin A, but not fumonisin B1 or deoxynivalenol, is increased in starch-induced low ruminal pH in nonlactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 99 (12): 9759–9767.
- Penagos-Tabares F, Khiaosa-Ard R, Schmidt M, Bartl E-M, Kehrer J, Nagl V, Faas J, Sulyok M, Krska R, Zebeli Q. 2022. Cocktails of Mycotoxins, Phytoestrogens, and Other Secondary Metabolites in Diets of Dairy Cows in Austria: Inferences from Diet Composition and Geo-Climatic Factors. *Toxins*, 14 (7).
- Placinta C, D'Mello J, Macdonald A. 1999. A review of worldwide contamination of cereal grains and animal feed with *Fusarium* mycotoxins. *Animal Feed Science and Technology*, 78 (1-2): 21–37.
- Razzazi-Fazeli E, Böhm J, Adler A, Zentek J. 2003. *Fusarium* mycotoxins and their significance in animal husbandry. *Wiener Tierärztliche Monatsschrift*, 90 (8): 202–210.
- Reisinger N, Schürer-Waldheim S, Mayer E, Debevere S, Antonissen G, Sulyok M, Nagl V. 2019. Mycotoxin Occurrence in Maize Silage-A Neglected Risk for Bovine Gut Health? *Toxins*, 11 (10).
- Rodriguez-Blanco M, Ramos AJ, Sanchis V, Marañón S. 2021. Mycotoxins occurrence and fungal populations in different types of silages for dairy cows in Spain. *Fungal Biology*, 125 (2): 103–114.
- Seeling K, Lebzién P, Dänicke S, Spilke J, Südekum K-H, Flachowsky G. 2006. 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.

Streit E, Schatzmayr G, Tassis P, Tzika E, Marin D, Taranu I, Tabuc C, Nicolau A, Aprodu I, Puel O, Oswald IP. 2012. Current situation of mycotoxin contamination and co-occurrence in animal feed--focus on Europe. *Toxins*, 4 (10): 788–809.

VDLUFA. 2012. VDLUFA-Methodenbuch Bd. III Die chemische Untersuchung von Futtermitteln. Dritte Auflage. Darmstadt: VDLUFA-Verlag.

Wang J, Liu Z, Han Z, Wei Z, Zhang Y, Wang K, Yang Z. 2020. Fumonisin B1 triggers the formation of bovine neutrophil extracellular traps. *Toxicology Letters*, 332: 140–145.

Whitlow, L.; Hagler, W. *Mold and Mycotoxin Issues in Dairy Cattle: Effects, Prevention and Treatment*. *Adv. Dairy Technol.* 2008, 20, 195–209.

10. Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1: MIT FUSARIUM PROLIFERATUM INFIZIERTER MAISKOLBEN (RAZZAZI-FAZELI ET AL. 2003)	8
ABBILDUNG 2: MIT FUSARIUM GRAMINEAUM INFIZIERTER MAISKOLBEN (RAZZAZI-FAZELI ET AL. 2003)	8
ABBILDUNG 3: SCHRITTE DER MYKOTOXINANALYSE (ALSHANNAQ UND YU 2017)	12
ABBILDUNG 4: STRUKTURFORMEL VON FUMONISIN B1 (MARIN ET AL. 2013)	20
ABBILDUNG 5: EFFEKTE DER MYKOTOXINE AUF DIE RINDERGESUNDHEIT (BIOMIN 2020)	24
ABBILDUNG 6: ZEITPUNKTE DER PROBENENTNAHME (BASELINE TAG 22, FUM-CHALLENGE TAG 24)	27
ABBILDUNG 7: HERZFREQUENZ IM PHASENVERGLEICH	33
ABBILDUNG 8: ATEMFREQUENZ IM PHASENVERGLEICH	33
ABBILDUNG 9: INNERE KÖRPERTEMPERATUR IM PHASENVERGLEICH	34
ABBILDUNG 10: PANSEN MOTORIK IM PHASENVERGLEICH	34
ABBILDUNG 11: MITTLERER; MINIMUM; MAXIMUM PH IM PHASENVERGLEICH	35
ABBILDUNG 12: PANSEN PH-WERT IM TAGESVERLAUF	35
ABBILDUNG 13: GESAMTKONZENTRATION DER FLÜCHTIGEN FETTSÄUREN IM ZEITLICHEN VERLAUF	36
ABBILDUNG 14: ANTEIL DER FLÜCHTIGEN FETTSÄUREN IN PROZENT VOR UND NACH DER FUM-EXPOSITION	36
ABBILDUNG 15: LEBERENZYME IM VERGLEICH DIREKT VOR DER FUM-EXPOSITION UND ZUM MESSZEITPUNKT 7H NACH DER INTOKIKATION (TRENDS MIT $P < 0,1$ WERDEN MIT # GEKENNZEICHNET, EFFEKTE MIT $P < 0,05$ WERDEN MIT * GEKENNZEICHNET)	37
ABBILDUNG 16: FUTTERAUFNAHME, FRESSZEIT PRO TAG, WIEDERKAUZEIT PRO TAG, WIEDERKAUSCHLÄGE PRO BOLUS IM PHASENVERGLEICH (EFFEKTE MIT $P < 0,05$ WERDEN MIT * GEKENNZEICHNET)	38

11. Tabellenverzeichnis

TABELLE 1: <i>EUROPÄISCHE HÖCHSTWERTE UND RICHTWERTE FÜR DIE WICHTIGSTEN MYKOTOXINE IN FUTTERMITTELN FÜR MILCHKÜHE</i>	10
TABELLE 2: DATEN DER UNTERSUCHTEN TIERE	26
TABELLE 3: <i>ZUSAMMENSETZUNG DER GEFÜTTERTEN TOTALMISCHRATION</i>	29
TABELLE 4: HAUPTMYKOTOXINE IN TOTALMISCHRATION (NACHWEISGRENZE VON 20 µG/KG FÜR AFLATOXIN A, T-2 TOXIN UND OCHRATOXIN A):	39

