

Aus dem Institut für Tierernährung und Stoffwechselfysiologie
der Christian Albrechts Universität zu Kiel

**Einfluss der Dosierung von Ochratoxin A, der
Rationszusammensetzung und des
Fütterungsniveaus auf die Metabolisierung und
Elimination von Ochratoxin A beim Schaf**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Agrar- und Ernährungswissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts Universität
zu Kiel

vorgelegt von
Dipl.-Ing. agr. Jan Peter Rolfs
aus Kiel

Kiel 2004

Gedruckt mit Genehmigung der Agrar- und Ernährungswissenschaftlichen Fakultät der
Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Dekan: Prof. Dr. F. Taube

1. Berichterstatter: Prof. Dr. S. Wolfram

2. Berichterstatter: Prof. Dr. K.-H. Südekum

Tag der mündlichen Prüfung: 15.07.2004

Zusammenfassung

Jan Peter Rolfs

Einfluss der Dosierung von Ochratoxin A, der Rationszusammensetzung und des Fütterungsniveaus auf die Metabolisierung und Elimination von Ochratoxin A beim Schaf

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, am Schaf den Einfluss unterschiedlicher Ochratoxin A (OA)-Dosierungen (Versuch 1), Rationszusammensetzungen (Versuch 2) und Ernährungsniveaus (Versuch 3) auf die systemische Verfügbarkeit von Ochratoxin A und Ochratoxin α ($O\alpha$), auf den Abbau von OA im Pansen, auf die Elimination von OA und $O\alpha$ über Kot und Harn sowie auf die Nährstoffverdaulichkeiten zu untersuchen.

In Versuch 1 erhielten zwölf adulte Schafe (4 Gruppen mit jeweils 3 Tieren) OA in 4 Dosierungen (0; 9,5; 19 oder 28,5 μg /kg Lebendmasse (LM)) über 31 Tage. Das Konzentratfutter:Grobfutter-Verhältnis (KGV) betrug 70:30. Als Konzentratfutter dienten Weizen und Weizenkleie, als Grobfutter wurde Grassilage eingesetzt. Das Ernährungsniveau entsprach dem energetischen Bedarf für Erhaltung von Schafen (0,43 MJME/kg^{0,75}). Die Versuche 2 und 3 wurden ebenfalls an 12 adulten Schafen durchgeführt und umfassten jeweils zwei Perioden mit einer Dauer von je 31 Tagen. Das Versuchsdesign in Versuch 2 entsprach einem balanciertem Zwei-Perioden-Wechselversuch. Als Konzentratfutter dienten jeweils Weizen und Sojaextraktionsschrot, als Grobfutter Grassilage. In Versuch 2 wurden die Schafe auf die Behandlungen 1) KGV 70:30, 2) KGV 70:30 + OA, 3) KGF 30:70 und 4) KGV 30:70 + OA verteilt. Die Dosierungen von OA betragen 0 und 14,3 μg /kg LM, das Fütterungsniveau entsprach dem 1,4-fachen des energetischen Bedarfs für Erhaltung. Der Versuchsaufbau in Versuch 3 entsprach in beiden Perioden Versuch 1. In der ersten Periode wurden die Tiere auf Erhaltungsbedarf gefüttert, in Periode zwei wurde das Fütterungsniveau um das 1,7fache gesteigert. Die Dosierungen von OA betragen in jeder Periode 0; 8,2; 17,0 oder 26,3 μg /kg LM.

In allen Versuchen wurde den Tieren an den Tagen 1, 5, 9, 13, 23 und 29 jeweils vor der Morgenfütterung eine Blutprobe aus der *vena jugularis* entnommen. In Versuch 3 entfiel Tag 29. Von Tag 15 bis 22 wurde eine quantitative Sammlung von Kot und Harn durchgeführt. Zur Berechnung der Verdaulichkeiten der Nährstoffe wurden repräsentative Futterproben gesammelt. Zusätzlich wurde den Tieren an den Tagen 24 und 25 mittels Schlundsonde zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Fütterung Pansenflüssigkeit entnommen. An Tag 26 wurde den Tieren zur Bestimmung der Ingesta-Passage eine Einmaldosis Cr-EDTA-Lösung in den Pansen-Hauben-Raum appliziert. In den Blutserum-, Pansensaft-, Kot- und Harnproben wurden OA und $O\alpha$ mittels HPLC analysiert.

Ochratoxin A wurde im Bluserum bei allen untersuchten Dosierungen nachgewiesen. Die Konzentration von OA stieg dabei mit zunehmender Dosierung von OA und mit fortschreitendem Zeitverlauf an. Das Ergebnis, dass das Mykotoxin selbst bei der niedrigsten gefütterten OA-Konzentration in der systemischen Zirkulation nachgewiesen werden konnte, weist auf einen unvollständigen Abbau von OA im Gastrointestinaltrakt hin (Versuch 1).

Eine Ration mit hohem KF-Anteil verlangsamte den intraruminalen Abbau von OA im Vergleich zu einer Ration mit niedrigem KF-Anteil. Dies könnte für die höheren Blutkonzentrationen von intaktem OA und für die geringere Exkretion von $O\alpha$ über den Harn bei den Tieren, die mit hohem KF-Anteil im Vergleich zu den Tieren, die mit niedrigem KF-Anteil gefüttert wurden, verantwortlich sein (Versuch 2).

In Versuch 3 stieg die Konzentration von OA im Blutserum innerhalb beider Fütterungsniveaus mit zunehmender Dosierung von OA an. Bei hohem Fütterungsniveau

II

zeigte sich eine signifikant gesteigerte Ingesta-Passage im Vergleich zum niedrigen Fütterungsniveau. Dies erklärt die gesteigerte Elimination von OA und O α via Kot mit zunehmenden Fütterungsniveau.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit weisen darauf hin, dass selbst bei geringen Dosierungen von OA (< 0,4 mg OA/Tag) die Hydrolyse von OA zu O α und Phenylalanin beim Schaf nicht vollständig abläuft und die Entgiftungskapazität beim Schaf deutlich geringer ist als bisher aus *in-vitro* Untersuchungen geschätzt wurde. Die Fütterung OA-kontaminierter Futtermittel scheint somit kein Weg zur vollständigen Detoxifikation zu sein (Versuch 1). Ein hoher KF-Anteil in der Ration führte zudem zu einer deutlichen Absenkung des ruminalen pH-Werts und ging mit einer erhöhten Verweildauer von OA im Pansen und einer gesteigerten Absorption aus dem Gastrointestinaltrakt einher (Versuch 2). Eine Steigerung des Ernährungsniveaus hingegen beeinflusste die Geschwindigkeit des intraruminalen Abbaues von OA im Pansen nicht, sondern erhöhte lediglich die Elimination von OA und O α über den Kot aufgrund einer gesteigerten Passagerate (Versuch 3). Die Nährstoffverdaulichkeiten wurden von OA nicht beeinflusst.

Summary

Jan Peter Rolfs

Effect of dose, diet composition and feeding level on metabolism and elimination of ochratoxin A in sheep

Three studies were conducted to determine the effect of the dose of ochratoxin A (OA), of diets with practically relevant concentrate/roughage ratios and of feeding level on the systemic availability of OA and O α , the ruminal degradation of OA and the elimination of OA and O α via faeces and urine. Possible effects of OA, diet composition and feeding level on ingesta passage and nutrient digestibilities were also investigated.

In the first experiment four groups, each with three sheep, were fed twice daily diets consisting of 70 % concentrates (wheat and wheat bran) and 30 % grass silage (dry matter basis). Treatments consisted of 0, 9.5, 19.0 and 28.5 μg OA/kg bw. In the second experiment 12 sheep were divided into 4 feeding groups according to a balanced two-period change-over design. They were fed a diet consisting of 70 % concentrate (wheat, soybean meal) and 30 % grass silage with 14.3 μg OA/kg bw and without OA (group 1 and 2) and a diet consisting of 30 % concentrate and 70 % grass silage with and without OA (group 3 and 4). Experiment 3 was conducted according to experiment 1, except that two periods were conducted. The energy supply in period 1 was 1.0 times and in period 2 1.7 times the requirement for maintenance. Treatments consisted of 0, 8.2, 17.0 and 26.3 μg OA/ kg bw.

Blood samples from the jugular vein were taken on days 1, 5, 9, 13, 23 and 29 prior to the morning feeding. On days 24 and 25 ruminal fluid was collected at 1, 4, 7, 10 and 13 hours after feeding. During the second half of the experimental periods, the animals were housed in metabolism crates and faeces and urine were collected over a period of 7 days. Cr-EDTA was applied into the rumen on day 26. OA and its metabolites were analysed in the faeces, urine and serum samples by HPLC. Additionally, feedstuffs and faeces were analysed for crude nutrients.

Ochratoxin A was detected in the serum at all levels of OA tested. The concentrations of OA in blood serum increased with feeding increasing amounts of OA. Serum concentrations of OA slightly increased with time of exposure. The finding that significant concentrations of OA were detected in the systemic circulation even at the lowest dietary OA concentration indicate incomplete degradation of OA within the forestomachs (experiment one).

A high concentrate diet delayed intraruminal degradation of OA compared with a high forage diet. This may be responsible for the higher blood concentrations of intact OA and for the lower urinary excretion of O α in animals fed the high concentrate diet (experiment two).

In experiment three the concentration of OA in the serum increased in both feeding levels with feeding increasing amounts of OA. At the high feeding level ingesta passage was significantly higher than at the low feeding level. This explains the enhanced elimination of OA and O α via faeces with increasing feeding level.

In all experiments OA had no effect on nutrient digestibilities and furthermore, a constant proportion of OA and O α (70 - 80%) of the dose was excreted in urine and faeces.

The results of the present study clearly indicate, that even at very low dietary concentrations of OA, complete detoxification of the mycotoxin within the reticulorumen does not prevent absorption of intact OA. Under intensive production conditions where high amounts of concentrate feed are used the amount of OA absorbed is significantly increased. On the other hand high feed intake is associated with accelerated digesta passage which leads to a higher faecal excretion of OA.

Inhaltsverzeichnis

Kapitel	Titel	Seite
1	Einleitung und Problemstellung	1
2	Literaturübersicht	3
2.1	Chemie von Ochratoxinen.....	3
2.2	Herkunft von Ochratoxinen.....	5
2.3	Natürliches Vorkommen von Ochratoxin A.....	6
2.3.1	Lebens- und Futtermittel pflanzlicher Herkunft.....	6
2.3.2	Lebens- und Futtermittel tierischer Herkunft.....	8
2.4	Einflüsse auf die Bildung von Ochratoxin A.....	9
2.4.1	Feuchtigkeit und Temperatur.....	9
2.4.2	Art des Substrates.....	11
2.4.3	Anwesenheit einer konkurrierenden Mikroflora.....	12
2.5	Stoffwechsel von Ochratoxin A.....	12
2.6	Toxikologie von Ochratoxin A.....	15
2.7	Prävention von OA-Kontamination, Stabilität und Dekontamination von Ochratoxin A.....	19
3	Experimenteller Teil	22
3.1	Material und Methoden	22
3.1.1	Einfluss der Dosierungen von OA in der Ration auf toxikokinetische Parameter beim Schaf (Versuch 1).....	22
3.1.2	Einfluss der Rationszusammensetzung auf toxikokinetische Parameter beim Schaf (Versuch 2).....	23
3.1.3	Einfluss der Ernährungsniveaus auf toxikokinetische Parameter beim Schaf (Versuch 3).....	27
3.1.4	Versuchsdurchführung, Probengewinnung und Probenaufbereitung.....	28
3.1.5	Bestimmung der Rohnährstoffe, Faserfraktionen und Passageparameter.....	30
3.1.6	Bestimmung von Ochratoxin A.....	31
3.1.7	Versuchsauswertung.....	34
3.2	Ergebnisse	40
3.2.1	Einfluss unterschiedlicher Dosierungen von Ochratoxin A auf toxikokinetische Parameter, Versuch 1.....	40

Kapitel	Titel	Seite
3.2.1.1	Konzentrationen von OA und Oα und pH-Werte in der Pansenflüssigkeit...	40
3.2.1.2	Konzentrationen von OA und Oα im Blutserum.....	43
3.2.1.3	Ausscheidung von OA und Oα über Kot und Harn	45
3.2.1.4	Nährstoffverdaulichkeiten und Passageparameter.....	47
3.2.1.5	Zusammenfassung der Ergebnisse (Versuch 1).....	49
3.2.2	Einfluss der Rationszusammensetzung auf toxikokinetische Parameter von Ochratoxin A beim Schaf (Versuch 2).....	49
3.2.2.1	Konzentrationen von OA und Oα und pH-Werte in der Pansenflüssigkeit...	49
3.2.2.2	Konzentrationen von OA und Oα im Blutserum.....	52
3.2.2.3	Ausscheidung von OA und Oα über Kot und Harn	54
3.2.2.4	Nährstoffverdaulichkeiten und Passageparameter.....	56
3.2.2.5	Zusammenfassung der Ergebnisse (Versuch 2).....	58
3.2.3	Einfluss des Fütterungsniveaus und der OA-Dosis auf toxikokinetische Parameter von Ochratoxin A beim Schaf (Versuch 3).....	58
3.2.3.1	Konzentrationen von OA und Oα und pH-Werte in der Pansenflüssigkeit...	58
3.2.3.2	Konzentrationen von OA und Oα im Blutserum.....	61
3.2.3.3	Ausscheidung von OA und Oα über Kot und Harn.....	64
3.2.3.4	Nährstoffverdaulichkeiten und Passageparameter.....	67
3.2.3.5	Zusammenfassung der Ergebnisse (Versuch 3).....	69
4	Diskussion	69
5	Praktische Anwendung	75
6	Anhang	76
7	Literaturverzeichnis	80

Abkürzungsverzeichnis

A.	Aspergillus
ADF	Säure-Detergenzien Faser
ADL	Säure-Detergenzien-Lignin
ATP	Adenosintriphosphat
AUC	Area under the concentration-time curve
a_w	Wasseraktivität
CrCl_3	Chromchlorid
DCD	Diphenylkarbazid
EDTA	Ethylendiaminotetraessigsäure
ELISA	Enzyme linked Immunosorbent Assay
GF	Grobfutter
GLM	general linear model
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
H_3PO_4	Phosphorsäure
i.d.	innerer Durchmesser
KF	Krafftutter
KFH	Krafftutter hoch
KFN	Krafftutter niedrig
LM	Lebendmasse
MW	Mittelwert
NaOH	Natriumhydroxid
NDF	Neutral-Detergenzien-Faser
NH_3	Ammoniak
OA	Ochratoxin A
$\text{O}\alpha$	Ochratoxin alpha
OB	Ochratoxin B
$\text{O}\beta$	Ochratoxin betha
OC	Ochratoxin C
OM	Organische Masse
p	Druck
P	Irrtumswahrscheinlichkeit
P.	Penicillium

VII

PEPCK	Phosphoenolpyruvatcarboxykinase
r	Korrelationskoeffizient
RF	Rauhfutter
SD	Standardabweichung
SE	standard error of means, Standardfehler
T _{1/2}	Halbwertszeit
TM	Trockenmasse
U	Umdrehungen
Vit E	Vitamin E

Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

Tabelle	Titel	Seite
Tabelle 1	Vorkommende Ochratoxine	5
Tabelle 2	Vorkommen von Ochratoxin A (OA) in pflanzlichen Produkten nach Literaturangaben	7
Tabelle 3	OA in Schweinenieren nach Literaturangaben	9
Tabelle 4	Vergleich der Wachstums- und Toxinbildungsbedingungen zwischen Aspergillien und Penicillien	11
Tabelle 5	Zusammensetzung der Ration (Versuch 1)	23
Tabelle 6	Rationen, Versuch 2	24
Tabelle 7	Zusammensetzung der Ration (Versuch 2)	25
Tabelle 8	Versuchsanordnung (Versuch 2)	26
Tabelle 9	Zusammensetzung der Ration (Versuch 3)	28
Tabelle 10	Zeitpunkte der Probengewinnung	29
Tabelle 11	Profile der Gradienten-Elution für die HPLC	34
Tabelle 12	pH-Werte im Pansensaft zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Fütterung bei unterschiedlichen Dosierungen von OA (Versuch 1)	40
Tabelle 13	Konzentrationen von OA (ng/ml) im Pansensaft zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Fütterung bei unterschiedlichen Dosierungen von OA (Versuch 1)	41
Tabelle 14	Konzentrationen von O α (ng/ml) im Pansensaft zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Fütterung bei unterschiedlichen Dosierungen von OA (Versuch 1)	42
Tabelle 15	Konzentrationen von OA (ng/ml) im Blutserum bei unterschiedlichen Dosierungen von OA (Versuch 1)	44
Tabelle 16	Konzentrationen von O α (ng/ml) im Blutserum bei unterschiedlichen Dosierungen von OA (Versuch 1)	44
Tabelle 17	Konzentrationen und Elimination von OA und O α in μ g in Kot und Harn (Versuch 1)	46
Tabelle 18	Elimination von OA und O α in % des aufgenommenen OA (Versuch 1)	47
Tabelle 19	Einfluss von OA auf die Verdaulichkeiten von Trockenmasse, Organischer Masse, Stärke und Zellwandfraktionen (Versuch 1)	48

Tabelle	Titel	Seite
Tabelle 20	Passageraten von Cr-EDTA aus dem 1. Kompartiment (L), dem Retikulorumen (K) sowie dem Zeitverzug bis zum ersten Auftreten des Markers im Kot (TD) (Versuch 1)	48
Tabelle 21	Einfluss eines unterschiedlichen Kraftfutter : Rauhfutter - Verhältnisses auf die pH-Werte im Pansensaft zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Fütterung (Versuch 2)	50
Tabelle 22	Einfluss eines unterschiedlichen Kraftfutter : Rauhfutter - Verhältnisses auf die Konzentrationen von OA (ng/ml) im Pansensaft zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Fütterung (Versuch 2)	50
Tabelle 23	Einfluss eines unterschiedlichen Kraftfutter : Rauhfutter - Verhältnisses auf die Konzentrationen von O α (ng/ml) im Pansensaft zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Fütterung (Versuch 2)	51
Tabelle 24	Einfluss eines unterschiedlichen Kraftfutter : Rauhfutter - Verhältnisses auf die Konzentrationen von OA (ng/ml) im Blutserum (Versuch 2)	52
Tabelle 25	Einfluss eines unterschiedlichen Kraftfutter : Rauhfutter - Verhältnisses auf die Konzentrationen von O α (ng/ml) im Blutserum (Versuch 2)	53
Tabelle 26	Einfluss eines unterschiedlichen Kraftfutter : Rauhfutter - Verhältnisses auf die Konzentration und Elimination von OA und O α in μ g über Kot und Harn (Versuch 2)	55
Tabelle 27	Einfluss eines unterschiedlichen Kraftfutter : Rauhfutter - Verhältnisses auf die Elimination von OA und O α in % des aufgenommenen OA über Kot und Harn (Versuch 2)	56
Tabelle 28	Einfluss von OA auf die Verdaulichkeiten von Trockenmasse, Organischer Masse, Stärke und Zellwandfraktionen bei unterschiedlichen Kraftfutter : Rauhfutter - Verhältnissen (Versuch 2)	57
Tabelle 29	Einfluss eines unterschiedlichen Kraftfutter : Rauhfutter - Verhältnisses auf die Passageraten von Cr-EDTA aus dem 1. Kompartiment (L), dem Retikulorumen (K) sowie dem Zeitverzug bis zum ersten Auftreten des Markers im Kot (TD) (Versuch 2)	57
Tabelle 30	Einfluss des Fütterungsniveaus auf die pH-Werte im Pansen bei unterschiedlichen Dosierungen von OA (Versuch 3)	59

Tabelle	Titel	Seite
Tabelle 31	Einfluss des Fütterungsniveaus auf die Konzentrationen von OA im Pansensaft bei unterschiedlichen Dosierungen von OA (Versuch 3)	60
Tabelle 32	Einfluss des Fütterungsniveaus auf die Konzentrationen von O α im Pansensaft bei unterschiedlichen Dosierungen von OA (Versuch 3)	61
Tabelle 33	Einfluss des Fütterungsniveaus auf die Konzentrationen von OA im Blutserum bei unterschiedlichen Dosierungen von OA (Versuch 3)	62
Tabelle 34	Einfluss des Fütterungsniveaus auf die Konzentrationen von O α im Blutserum bei unterschiedlichen Dosierungen von OA (Versuch 3)	63
Tabelle 35	Einfluss des Fütterungsniveaus auf die Elimination von OA und O α in μ g über Kot und Harn bei unterschiedlichen Dosierungen von OA (Versuch 3)	65
Tabelle 36	Einfluss des Fütterungsniveaus auf die Elimination von OA und O α in über Kot und Harn in % des aufgenommenen OA bei unterschiedlichen Dosierungen von OA (Versuch 3)	66
Tabelle 37	Einfluss des Fütterungsniveaus und von Ochratoxin A auf die Verdaulichkeiten von Trockenmasse, organischer Masse, Stärke und Zellwandfraktionen (Versuch 3)	67
Tabelle 38	Einfluss des Fütterungsniveaus auf die Passageraten von Cr-EDTA aus dem 1. Kompartiment (L), dem Retikulorumen (K) sowie dem Zeitverzug bis zum ersten Auftreten des Markers im Kot (TD) (Versuch 3)	68
Tabelle 39	Passageraten von Cr-EDTA aus dem 1. Kompartiment (L), dem Reticulorumen (K) sowie Zeitverzug bis zum ersten Auftreten des Markers im Kot bei unterschiedlichen Dosierungen von OA (Versuch 1)	76
Tabelle 40	Passageraten von Cr-EDTA aus dem 1. Kompartiment (L), dem Reticulorumen (K) sowie Zeitverzug bis zum ersten Auftreten des Markers im Kot bei unterschiedlichen Rationszusammensetzungen (Versuch 2)	77
Tabelle 41	Passageraten von Cr-EDTA aus dem 1. Kompartiment (L), dem Reticulorumen (K) sowie Zeitverzug bis zum ersten Auftreten des Markers im Kot bei Deckung des enegetischen Bedarfs für Erhaltung (Versuch 3)	78

Tabelle	Titel	Seite
Tabelle 42	Passageraten von Cr-EDTA aus dem 1. Kompartiment (L), dem Reticulorumen (K) sowie Zeitverzug bis zum ersten Auftreten des Markers im Kot einem Ernährungsniveau von 1,7 x Erhaltung (Versuch 3)	79
Tabelle 43	Zusammensetzung des Mineralfutters	79

Abbildung	Titel	Seite
Abbildung 1	Strukturformel von Ochratoxin A	3
Abbildung 2	Halbwertszeiten von Ochratoxin A im Pansen bei unterschiedlichen Dosierungen von OA	42
Abbildung 3	Einfluss eines unterschiedlichen Kraftfutter : Rauhfuttermverhältnisses auf die Halbwertszeiten von Ochratoxin A im Pansen	51

1 Einleitung und Problemstellung

Mykotoxine werden als sekundäre Stoffwechselprodukte in Abhängigkeit von Milieufaktoren (z.B. Feuchtigkeit, Temperatur) von bestimmten Schimmelpilzen gebildet. Zu diesen Toxinen gehören auch die von einigen *Aspergillus* und *Penicillium*-Stämmen vor allem auf Getreide gebildeten Ochratoxine. Dem primär nephrotoxischen Ochratoxin A (OA) kommt hierbei aufgrund seines häufigen Vorkommens in Nahrungs- und Futtermitteln und der im Vergleich zu anderen Ochratoxinen hohen Toxizität die größte Bedeutung zu (DWIVEDI und BURNS 1986). Ochratoxin A ist nachweislich der Hauptverursacher der mykotoxischen Nephropathie, die beim Schwein und Geflügel auftritt und wird mit der gehäuft auf dem Balkan vorkommenden Nephropathie beim Menschen in Verbindung gebracht.

In der Literatur werden zahlreiche weitere toxische Wirkungen von OA beschrieben. Sie umfassen hepatoxische, teratogene und carcinogene (KUIPER-GOODMAN und SCOTT 1989), sowie embryotoxische (MALAVEILLE et al. 1991), genotoxische (MARQUARDT und FROHLICH 1992) und immunsuppressive Wirkungen (MÜLLER et al. 1999 a, b).

Aufgrund des unterschiedlichen Aufbaus des Gastrointestinaltraktes ergeben sich beim Wiederkäuer im Vergleich zu Monogastriden einige physiologische Besonderheiten. Durch den extensiven hydrolytischen Abbau von OA zum weniger toxischen Metaboliten $O\alpha$ und L-Phenylalanin durch die Vormagenmikroflora gilt der Wiederkäuer als relativ unempfindlich gegenüber akuten toxischen Effekten von OA (RIBELIN et al. 1978). Nach LI et al. (1997) liegt die Hauptursache für die im Vergleich zu OA geringe Toxizität von $O\alpha$ in der gegenüber OA ca. 10-fach geringeren Halbwertszeit im Organismus.

Einen Hinweis auf die herausragende Bedeutung des mikrobiellen Abbaus von OA zu $O\alpha$ und Phenylalanin in den Vormägen von Wiederkäuern liefert eine Untersuchung von SREEMANNARAYANA et al. (1988). Die Autoren verfütterten an je 2 nicht ruminierende Kälber 0,5, 1 und 4 mg OA/kg LM. Bereits bei einer Dosis von 1 mg OA/kg LM verendete eines von zwei Kälbern, bei 4 mg OA/kg LM verendeten beide. Dagegen zeigten vier bereits ruminierende Kälber bei einer Dosis von 2 mg OA/kg LM keine klinischen Symptome einer Ochratoxikose.

Grundsätzlich stellt die Verfütterung von OA-kontaminiertem Futter an Wiederkäuer eine ökonomisch interessante Möglichkeit dar, mit OA kontaminierte Futtermittel zu nutzen und OA aus der Nahrungskette zu entfernen. Die Frage nach der Effizienz der Hydrolyse und nach dem Einfluss von durch die Fütterung beeinflussten Faktoren (z.B. ruminaler pH-Wert, Passagerate) auf die Hydrolyse von OA zu O α und Phenylalanin im Pansen ist allerdings noch unzureichend geklärt, insbesondere hinsichtlich gesicherter quantitativer Aussagen über die Toleranz von Wiederkäuern gegenüber OA. Die bisher vorliegenden Untersuchungen lassen erkennen, dass die Kapazität des Abbaues von OA in den Vormägen von Wiederkäuern offenbar begrenzt und von den jeweiligen Milieubedingungen im Pansen beeinflusst wird (XIAO et al. 1991a, b). Rückstände von OA im Schlachtkörper sind somit nicht grundsätzlich auszuschließen.

Um die Höhe des tatsächlichen Abbaus von OA zu O α und Phenylalanin beim Wiederkäuer zu untersuchen und um den Einfluss fütterungsbedingter Faktoren auf den Abbau von OA im Wiederkäuer zu ermitteln, wurden in der vorliegenden Arbeit in drei *in vivo*-Versuchen

1. der Einfluss der Dosierungen von OA,
2. der Einfluss der Rationszusammensetzungen und
3. der Einfluss der Fütterungsniveaus

auf die OA und O α -Gehalte in Pansenflüssigkeit und Blutserum, auf die Elimination von OA und O α über Harn und Kot und auf die Nährstoffverdaulichkeiten untersucht. In den Untersuchungen wurde OA aus kontaminiertem Weizen verwendet.

2 Literaturübersicht

2.1 Chemie von Ochratoxinen

Ochratoxine sind eine Gruppe strukturell verwandter Mykotoxine, von denen OA die häufigste Verbindung ist, die in pflanzlichem Material nachgewiesen wurde (KROGH 1987). Alle Ochratoxine sind Dihydroisokumarinderivate. Beim OA ist die Aminosäure L-β-Phenylalanin über eine Peptidbindung an der 7-Carboxylgruppe des Isokumaringerüstes (7-carboxy-5-chloro-8-hydroxy-3,4-dihydro-3R-methyl-Isokumarin = Ochratoxin α) angelagert. In Abbildung 1 ist die chemische Struktur einiger Ochratoxine dargestellt.

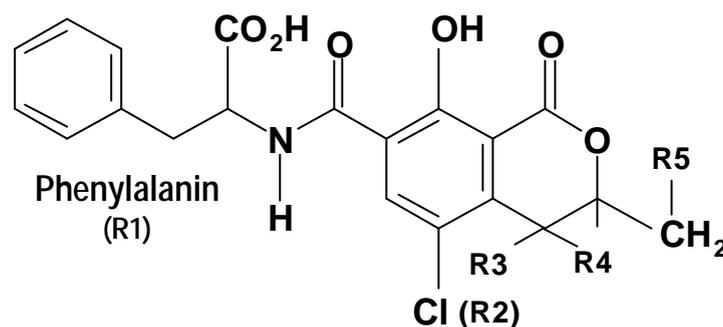


Abbildung 1: Strukturformel von Ochratoxin A; R1 bis R5 bezeichnen verschiedene Substituenten, die zu unterschiedlichen Formen von Ochratoxin führen,

OA hat ein Molekulargewicht von 403 und ist eine farblose Substanz mit einem Schmelzpunkt von 168 – 173 °C. In polaren organischen Lösungsmitteln löst es sich gut, während die Löslichkeit in Wasser schlecht ist. Bei einer Wellenlänge von 360 nm fluoresziert es grün-blau (ROLLE und MAYR 1993).

Tabelle 1 zeigt die bisher nachgewiesenen Ochratoxine nach MARQUARDT und FROHLICH (1992). Ochratoxin B (OB) stellt das dechlorierte OA-Analog dar (HARWIG 1974). Ochratoxin C ist der Ethylester von OA und damit relativ leicht in dieses

umwandelbar (FUCHS et al. 1984). Der Methylester von OA ist rein synthetischer Natur. Bei saurer Hydrolyse von OA entstehen L- β -Phenylalanin und Ochratoxin α ($O\alpha$), welches im Vergleich zu OA als gering toxisch betrachtet wird (CREPPY et al. 1983a). Auch hydroxylierte Formen von OA wurden nachgewiesen. STØREN et al. (1982) wiesen im Rattenharn 4R- und 4S-OH-OA nach. STØRMER et al. (1981) inkubierten OA mit Lebermikrosomen von Ratten und wiesen anschließend ebenfalls 4R- und 4S-OH-OA nach. In einer weiteren Studie mit Lebermikrosomen von Kaninchen wiesen sie auch 10-OH-OA nach (STØRMER et al. 1983).

Unter Laborbedingungen ist das Phenylalanin offensichtlich gegen andere Aminosäuren austauschbar. CREPPY et al. (1983b) ermittelten, dass OA, welches statt mit Phenylalanin mit einer anderen aromatischen Aminosäure (z.B. Tyrosin, Valin) peptidartig verknüpft war, stets eine höhere Toxizität aufwies als bei Verknüpfung mit einer nicht aromatischen Aminosäure. Ob diese Verbindungen allerdings unter physiologischen Bedingungen gebildet werden, ist noch fraglich. HADIDANE et al. (1992) konnten *in vitro* bereits die Bildung der OA-Analoga OA (Serin), OA (Hydroxyprolin) und OA (Lysin) durch den Pilz *Aspergillus alutaceus* nachweisen.

Als Nachweisverfahren für Ochratoxine hat sich die HPLC-Technik (Hochleistungsflüssigkeits-Chromatographie) mit Fluoreszenzdetektion etabliert. Für das Screening größerer Mengen findet auch das ELISA-Verfahren (Enzyme Linked Immunsorbent Assay) Anwendung (nach SCHUH und SCHWEIGHARDT 1981)

Tabelle 1: Bisher nachgewiesene Ochratoxine ¹⁾

Name	Abkürzung	R1	R2	R3	R4	R5
Ochratoxin A	OA	Phenylalanin	Cl	H	H	H
Ochratoxin B	OB	Phenylalanin	H	H	H	H
Ochratoxin C	OC	Phenylalanin, Ethylester	Cl	H	H	H
Ochratoxin A (Methylester)		Phenylalanin, Methylester	Cl	H	H	H
Ochratoxin B (Methylester)		Phenylalanin, Methylester	H	H	H	H
Ochratoxin B (Ethylester)		Phenylalanin, Ethylester	H	H	H	H
Ochratoxin α	O α	OH	Cl	H	H	H
Ochratoxin β	O β	OH	H	H	H	H
4R-Hydroxyochratoxin A	(4R)-OH-OA	Phenylalanin	Cl	H	OH	H
4S-Hydroxyochratoxin A	(4S)-OH-OA	Phenylalanin	Cl	OH	H	H
10-Hydroxyochratoxin A	10-OH-OA	Phenylalanin	Cl	H	H	OH
Ochratoxin A, Tyrosin- Analogon		Tyrosin	Cl	H	H	H
Ochratoxin A, Serin- Analogon		Serin	Cl	H	H	H
Ochratoxin A, Hydroxyprolin- Analogon		Hydroxyprolin	Cl	H	H	H
Ochratoxin A, Lysin- Analogon		Lysin	Cl	H	H	H

¹⁾ Zur Stellung der Reste R1 – R5 im Molekül siehe Abbildung 1

2.2 Herkunft von Ochratoxinen

Erstmals isolierten VAN DER MERWE et al. (1965) OA neben anderen Ochratoxinen vom Stamm *A. ochraceus* in Südafrika. Nach der heutigen Nomenklatur wird dieser Pilz als *A. alutaceus* bezeichnet.

Nach MARQUARDT und FROHLICH (1992) sind von den Aspergillus-Stämmen *A. alutaceus*, *A. ostianus*, *A. quercius* (Synonym: *A. melleus*) und *A. sulphureus* (Synonym: *A. fresenii*) diejenigen, die OA produzieren. Hierbei kommt *A. alutaceus* die größte Bedeutung zu.

Penicillium verrucosum (Synonym: *P. viridicatum*) ist nach PITT (1987) der einzige der Penicillium-Stämme, der OA produziert. Es werden zwei verschiedene Chemotypen unterschieden. Chemotyp 1 produziert neben OA im Unterschied zu Chemotyp 2 noch Vercaulon und Citrinin als Begleittoxine (FRISVAD und FILTENBORG 1989). EL BANNA (1987) konnte allerdings auch bei *P. purpurescens* die Synthese von OA nachweisen.

2.3 Natürliches Vorkommen von Ochtratoxin A

2.3.1 Lebens - und Futtermittel pflanzlicher Herkunft

Bei toxinbildenden Pilzen kann zwischen Feld- und Lagerpilzen unterschieden werden. Nach SHOTWELL und HESSELTINE (1983) wird OA nach dem derzeitigen Kenntnisstand nur im Lager gebildet, wobei das bevorzugte Substrat Getreide ist. Die Konidien haften allerdings schon auf dem Feld den Körnern an. Treten während des Transportes oder der Lagerung die nachfolgend unter 2.4 beschriebenen günstigen Bedingungen für Wachstum ein, kommt es zur Keimung und zur Mykotoxinbildung. SHOTWELL et al. (1969) beschrieben erstmals das natürliche Vorkommen von OA im Mais. Zahlreiche Berichte aus späteren Jahren belegten, dass OA auf verschiedenen Getreidearten (SHOTWELL et al. 1976 a, KROGH et al. 1974 a), einigen Bohnenarten, Kaffee, Kakao, Soja und anderen Lebensmitteln wie Gewürzen und Nüssen gebildet wurde. Bei Genussmitteln wie Bier, Wein, Lakritz und anderen konnten trotz der Verarbeitungsprozesse OA im Endprodukt nachgewiesen werden. Tabelle 2 liefert eine Auflistung einzelner Beispiele über das Vorkommen von OA in pflanzlichen Produkten in Europa. Nach DWIVEDI und BURNS (1986) ist das natürliche Vorkommen in Lebens- und Futtermitteln weit verbreitet. Dabei bestehen regionale Unterschiede, die in

unterschiedlichen klimatischen und geographischen Verhältnissen ihre Ursache finden (siehe 2.4). Nach JØRGENSEN et al. (1996) kommt OA vor allem in gemäßigten Klimazonen vor. Bedingt durch den Wassergehalt der Körner bei Ernte und Lagerung bestehen jährliche Unterschiede. Ein zuverlässiger Nachweis im Futter ist oft schwierig, da OA oft eine inhomogene, nesterartige Verteilung im Futtermittel aufweist. Nach Untersuchungen von HULT et al. (1979) kann die Bestimmung im Schweineblut dagegen als zuverlässiger Nachweis für eine OA-Kontamination des Futters genutzt werden.

Tabelle 2: Vorkommen von Ochratoxin A (OA) in pflanzlichen Produkten

Produkt	Land	Probenzahl	Befallsquote (%)	Gehalte (mg OA/kg)	Quelle
Gerste, Hafer Weizen,	Deutschland	232	12,9	0,1 – 206	BAUER et al. 1987
Gerste, Hafer Weizen, Mais	Deutschland	43	42,0	2,0 – 304	HADLOK et al. 1989
Gerste, Hafer	Dänemark	33	57,6	28 – 27500	KROGH et al. 1973
Gerste, Hafer	Schweden	84	8,3	16 – 409	KROGH et al. 1974
Gerste, Mais Weizen,	Jugoslawien	47	12,8	5 – 90	KROGH et al. 1977
Mais	Deutschland	40	7,5	0,1 – 137	BAUER et al. 1987
Mais	Frankreich	463	2,6	15 – 200	GALTIER 1975
Mais	USA	293	1,0	83 – 166	SHOTWELL et al. 1971
Mischfutter	Deutschland	630	14,1	0,2 – 12,5	BAUER et al. 1987
Mischfutter	Polen	203	4,9	10 – 50	JUSZKIEWICZ et al. 1977

2.3.2 Lebens - und Futtermittel tierischer Herkunft

Nach Aufnahme von kontaminiertem Futter gelangt OA auch in den tierischen Organismus und zeigt eine gewisse Persistenz im Stoffwechsel. KROGH (1987) beschrieb für das Schwein eine enge Korrelation zwischen der OA-Konzentration im Futter und den OA-Rückständen in Niere, Leber und Fettgewebe ($r = 0,78 - 0,86$). SCHEUER et al. (1984) konnten in Fleischerzeugnissen vom Schwein, denen Blut, Blutplasma und Innereien zugesetzt wurden, bei 16-19 % der Proben ebenfalls OA nachweisen, allerdings in geringen Konzentrationen (meistens $< 0,2 \mu\text{g/kg}$, maximal $3,4 \mu\text{g/kg}$ in Koch- und Brühwurst). In Tabelle 3 sind bisher bekannt gewordene Befunde über OA-Gehalte in Schweinenieren nach MAJERUS et al. (1989) zusammengefasst. Hierbei wird zwischen zufällig gezogenen und pathologisch verdächtigen Proben unterschieden.

BREITHOLZ-EMANUELSSON et al. (1993) wiesen in Kuhmilch und Humanmilch sowie in menschlichem Blut OA nach. Demnach kann OA aus dem Blut auch in die Milch übergehen. Ebenfalls kann eine sekundäre Kotamination der Milch nach bisherigen Erkenntnissen nicht ausgeschlossen werden.

Der Transfer von OA aus den Futtermitteln in das tierische Gewebe (Carry-over) führte in den EU-Staaten Dänemark, Österreich, Frankreich und Griechenland zu gesetzlich vorgeschriebenen Höchstmengen für OA im Tierkörper (nach HÖHLER 1998). In der EG-Verordnung Nr. 472/2002 zur Festsetzung der Höchstgehalte von OA und anderen Mykotoxinen wurden die Höchstgehalte für OA in rohen Getreidekörnern auf $5 \mu\text{g/kg}$, in allen Getreideerzeugnissen auf $3 \mu\text{g/kg}$ und in getrockneten Weintrauben auf $10 \mu\text{g/kg}$ festgelegt.

Nach LUSKY et al. (1994) steht für die Belastung des Menschen sicherlich die direkte Aufnahme von OA über pflanzliche Lebensmittel im Vordergrund. Nach Ansicht dieser Autoren dürfte die Aufnahme über Lebensmittel tierischer Herkunft zweitrangig sein.

Tabelle 3: Ochratoxin A in Schweinenierenen¹⁾

Proben- zahl	positiv (%)	Gehalt (mg/kg) der positiven Proben	Art der Probe- nahme²⁾	Land	Literaturstelle
300	14	0,5-10,2	Z	BRD	Scheuer et al. 1984
129	24,8	2,0-104	V	Schweden	Rutquist et al. 1977
90	26,7	2,0-88	V	Schweden	Josefsson 1979
25	19,9	>25	V	Dänemark	Buchmann et al. 1985
86	20,0	2,0-67	Z	Dänemark	Krogh et al. 1973
104	21,0	0,1-1,8	Z	BRD	Bauer und Gedek 1983
20	100,0	0,2-195,5	V	Dänemark	Bauer und Gareis 1987
100	15,0	0,5-16,4	Z	BRD	Majerus und Woller 1983
122	39	2-100	Z	Ungarn	Sandor et al. 1982

¹⁾ Quelle: MAJERUS et al. (1989)

²⁾ Z = zufällig, V = verdächtig

2.4 Einflüsse auf die Bildung von Ochratoxin A

Voraussetzung für die Bildung von OA ist das Vorkommen und die Entwicklung der oben genannten Pilzarten, insbesondere also *Aspergillien* und *Penicillien*. Die Entwicklung der Schimmelpilze und die Menge des produzierten OA hängen von zahlreichen Faktoren ab. Diese schließen Feuchtigkeit, Temperatur, Art des Substrates und die Anwesenheit einer konkurrierenden Mikroflora mit ein (MARQUARDT und FROHLICH 1992).

2.4.1 Feuchtigkeit und Temperatur

Entscheidend für das Wachstum der verschiedenen Spezies ist der Gehalt an frei verfügbarem Wasser. Ein Maß für die Verfügbarkeit von Wasser in einem Substrat für mikrobielles Wachstum ist die sogenannte Wasseraktivität (a_w -Wert). Der a_w -Wert ist definiert als Verhältnis zwischen dem Wasserdampfdruck über dem Substrat (p) zum

Wasserdampfdruck reinen Wassers ($p_0 = 1$). Jeder Zusatz wasserbindender Substanzen bewirkt, dass $p < p_0$ und damit der a_w -Wert < 1 wird (KRÄMER 1987). Der optimale a_w -Wert für *A. alutaceus* für maximale Toxinproduktion liegt nach LILLEHOY und ELLING (1983) bei 0,94. Der minimale a_w -Wert liegt zwischen 0,83 und 0,87 (untere Grenze für Toxinproduktion). Der Wassergehalt steht in unmittelbarem Zusammenhang mit der Temperatur. Nach MÜLLER und BOLEY (1992) sinkt der minimale a_w -Wert bei steigenden Temperaturen, während bei niedrigeren Temperaturen höhere a_w -Werte benötigt werden.

NORTHOLT et al. (1979) ermittelten bei Laboruntersuchungen für *A. alutaceus* und *P. verrucosum* bei einer Temperatur von 24 °C einen optimalen a_w -Wert zwischen 0,95 und 0,99. Desweiteren zeigte sich in dieser Untersuchung, daß *A. alutaceus* in einem Temperaturbereich von 12 - 37 °C und *P. verrucosum* in einem Temperaturbereich von 4 - 31 °C Ochratoxin bildet. Die ermittelten minimalen a_w -Werte lagen bei *A. alutaceus* zwischen 0,83 und 0,87, bei *P. verrucosum* zwischen 0,83 und 0,86.

Aspergillus-Arten benötigen folglich höhere Temperaturen für Wachstum und Toxinproduktion als Penicillium-Arten (KROGH 1987). Man findet daher die Aspergillus-Arten vorwiegend in tropischen bis subtropischen Klimazonen, während Penicillium-Arten in kühleren Regionen häufiger anzutreffen sind.

Ein Vergleich zwischen *A. ochraceus* und *P. viridicatum* hinsichtlich ihrer Wachstums- und Toxinbildungsbedingungen zeigt Tabelle 4.

Tabelle 4: Vergleich der Wachstums- und Toxinbildungsbedingungen zwischen Aspergillien und Penicillien

	A. alutaceus	P. viridicatum
Wachstumsbedingungen		
Temperatur	8 - 37 °C	0 - 31 °C
a _w -Wert	0,95 - 0,99	0,95 - 0,99
Toxinbildungsbedingungen		
Temperatur	12 - 37 °C	4 - 31 °C
Temperaturoptimum	31 - 37 °C	16 - 24 °C
a _w -Wert	0,83 - 0,87	0,83 - 0,99
a _w -Wert Maximum	0,99	0,95 - 0,99

(Quelle: MAJERUS et al. 1989)

2.4.2 Art des Substrates

Nicht nur Temperatur und Wasser sind für die Entwicklung von Schimmelpilzen entscheidend, sondern es müssen auch Nährstoffe zur Verfügung stehen, die von den Pilzen aufgenommen werden können. Daher spielt die Art des Substrates eine große Rolle.

MADHYASTHA et al. (1990) untersuchten in einer *In vitro*-Studie die OA-, OB- und Citrinin-Produktion von *A. alutaceus* und *P. verrucosum* jeweils auf zwei Getreidearten (Mais und Weizen) und auf zwei Ölsaaten (Sojabohne und Erdnuss). Die Ergebnisse zeigten, dass *A. alutaceus* auf Ölsaaten eine wesentlich höhere Produktion von OA (243 bis 342 µg/g) und OB (132 bis 389 µg/g) aufwies als auf Getreidearten (72 bis 74 µg OA/g bzw. 0 µg OB/g). Citrinin wurde nie nachgewiesen. *P. verrucosum* hingegen produzierte wesentlich mehr OA (21 bis 98 µg/g) und Citrinin (102 bis 126 µg/g) auf den Getreidearten als auf den Ölsaaten (7 bis 18 µg OA/g bzw. 0 µg Citrinin/g). Ochratoxin B wurde nicht gebildet. HÄGGBLÖM und GHOSH (1985) untersuchten die OA-Produktion von *A. alutaceus* und *P. viridicatum* auf Gerste mit unterschiedlichen Proteingehalten. Die OA-Produktion bei beiden Pilzen steigerte sich bei Erhöhung des Proteingehaltes sowie der Erhöhung der Temperatur von 12 auf 25 °C, wobei *P. viridicatum* schneller und mehr OA produzierte.

2.4.3 Anwesenheit einer konkurrierenden Mikroflora

Innerhalb einer Mikroflora treten Konkurrenzeffekte zwischen verschiedenen Keimen auf. Ein Pilz kann unter günstigen Bedingungen durch sein eigenes schnelles Wachstum die Entwicklung der konkurrierenden Mikroflora behindern und kann dann Schadstoffe als primär pflanzenpathogene Substanzen sezernieren (BÖHM 1992).

CHELACK et al. (1991 a) ermittelten auf sterilisierter Gerste nach Beimpfung mit *P. verrucosum* eine wesentlich höhere OA-Produktion als auf unsterilisierter Gerste. Wurde der sterilen Gerste die vorher isolierte Nicht-OA-produzierende Mikroflora wieder zugesetzt, so sank die OA-Produktion wieder. Nach Gamma-Bestrahlung von Gerste und anschließender Inokulation wurde eine deutlich höhere OA-Produktion durch *A. alutaceus* festgestellt als im Vergleich zu einer Inokulation auf Gerste, die unbestrahlt war (CHELACK et al. 1991 b). Zum gleichen Ergebnis kamen MÜLLER und BOLEY (1991), die nach Autoklavierung von Weizen und anschließender Inokulation eine deutlich höhere OA-Produktion durch *P. verrucosum* feststellten, als auf nicht autoklaviertem Weizen. Allerdings, so argumentierten die Autoren, könne dieses auch daran liegen, dass es wegen des durch die Autoklavierung bedingten Aufschlusses der Nährstoffe zu einem besseren Wachstum der Pilze kommt.

2.5 Stoffwechsel von Ochratoxin A im Säugerorganismus

Die Aufnahme von OA erfolgt mit der Nahrung. Dabei gelangt absorbiertes OA vor allem über die Portalvene und im geringen Umfang auch über das Lymphsystem in die systemische Zirkulation (KUMAGAI und AIBARA 1982).

Aufgrund der hohen Bindungsaffinität zu Plasmaproteinen, an die sich OA nach GALTIER (1974) fast vollständig bindet, ist im Körper die Konzentration von OA im Blutserum am höchsten. Serumalbumin wurde in dieser Studie als das im wesentlichen an der Bindung beteiligte Plasmaprotein identifiziert. STOIKOVICH et al. (1984) ermittelten eine zweite

bisher nicht näher charakterisierte Proteinfraktion mit noch höherer Bindungsaffinität zu OA als Serumalbumin.

In geringen Mengen konnte auch freies OA im Blut nachgewiesen werden. Nach HAGELBERG et al. (1989) lag der Anteil von freiem OA im Plasma von Maus, Ratte, Schwein, Affe und Mensch mit Konzentrationen von 10^{-6} bis 10^{-9} mol/l bei weniger als 0,2 % der OA-Gesamtkonzentration, während beim Karpfen 22 % in ungebundener Form vorlagen. KUMAGAI (1985) zeigte, dass die Proteinbindung zur Verzögerung der Elimination von OA aus der systemischen Zirkulation beiträgt. Bei Albumin-defizienten Ratten wurde eine sehr viel schnellere Abnahme des Plasmaspiegels und wesentlich höhere Ausscheidungsraten von OA in Harn und Galle im Vergleich zu Kontrollratten beobachtet. Die Halbwertszeit ($T_{1/2}$) im Blut unterscheidet sich von Tierart zu Tierart allerdings sehr (GALTIER et al. 1979, 1981). Bei Ratten betrug sie nach oraler und intravenöser Applikation von 2,5 mg OA/kg LM 58 bzw. 53 h. Bei Schweinen, Kaninchen und Hühnern betrug sie nach oraler Gabe von 0,5 bzw. 2 mg/kg LM 88,8, 8,2 und 4,1 h. Nach Li et al. (1997) ist die $T_{1/2}$ von OA wesentlich länger als die der Metaboliten (z. B. $O\alpha$). Der „oszillierende“ Konzentrationsverlauf von OA im Blut von Mäusen nach oraler oder intramuskulärer Applikation deutet nach ROTH et al. (1988) auf einen enterohepatischen Kreislauf hin.

OA wird im Magendarmtrakt durch Abspaltung von Phenylalanin zum weniger toxischen $O\alpha$ umgewandelt. Die Hydrolyse erfolgt dabei vor allem durch die mikrobielle Flora und Fauna. GALTIER und ALVINERIE (1976) wiesen in einer *In vitro*-Studie nach, dass die mikrobielle Flora des Blinddarmes von Ratten die Peptidbindung von OA hydrolysiert. MÜLLER (1995) belegte in einer *In vitro*-Studie die Hydrolyse im Panseninhalt. Auch im Caecuminhalt und in Homogenaten aus Duodenum, Ileum und Pankreas der Ratte konnten SUZUKI et al. (1977) die Hydrolyse zeigen. MADHYASTHA et al. (1992a) wiesen nach, dass die Hydrolyse von OA zu $O\alpha$ und Phenylalanin bei der Ratte hauptsächlich im Blinddarm und Dickdarm ausgeführt wird. In der Niere und der Leber der Ratte wurde entweder keine oder nur eine sehr geringe Hydrolyse von OA zu $O\alpha$ festgestellt (SUZUKI et al. 1977). In Hepatozyten von Ratten war diese Reaktion ebenfalls nicht existent

(HANSEN et al. 1982). Die Enzyme, mit deren Hilfe die intestinale Mikroflora die Hydrolyse ausführt, wurden bisher nicht identifiziert. Für die körpereigenen Enzyme Carboxypeptidase A und Chymotrypsin konnte lediglich *in vitro* diese Fähigkeit nachgewiesen werden (PITOUT 1969, DOSTER und SINNHUBER 1972). Somit bleibt unklar, inwieweit *in vivo* ein Abbau von OA durch körpereigene Peptidasen im Magendarmtrakt erfolgt.

Die Elimination von OA erfolgt über den Harn und über die Galle. Zur renalen Sekretion bzw. Reabsorption von OA liegen mehrere Untersuchungen vor. Mit einem pK-Wert von 7,04 ist OA eine schwache Säure und liegt bei physiologischem pH-Wert als Anion vor. SCHWERDT et al. (1996) zeigten, dass die renale Akkumulation organischer Anionen über einen Cotransporter erfolgt, der in der peritubulären (basolateralen) Membran renaler Epithelzellen lokalisiert ist und für den p-Aminohippurat (PAH) die Modellsubstanz ist. Die peritubuläre Aufnahme organischer Anionen (der Transport aus dem Blut in proximale Zellen) wird über drei sich ergänzende Mechanismen bewerkstelligt (PRITCHARD et al. 1987, PRICHARD 1993): (1) Na⁺/K⁺-ATPase (basolateral), (2) Natrium-Dicarboxylat (DC)-Cotransporter (Na-DC-Cotransporter, basolateral), (3) Anionenaustauscher (OA vs. DC).

Der zuletzt genannte Prozess ist ein klassischer Transporter für organische Anionen, der extrazelluläre organische Anionen aus dem Tubuluslumen gegen einen elektrochemischen Gradienten in die renalen Zellen im Austausch für intrazelluläre Dicarboxylate (z.B. α -Ketoglutarat) entlang ihres elektrochemischen Gradienten aufnimmt. Der Dicarboxylat-Gradient wird sowohl von zellulärer Produktion von α -Ketoglutarat als auch von der Aktivität des Na-DC Cotransporters beeinflusst. Dieser Transporter verbindet die Aufnahme von Dicarboxylat aus dem Plasma mit dem Transport von Natrium entlang des elektrochemischen Gradienten in renale Zellen. Der nach außen gerichtete elektrochemische Gradient von Natrium wird seinerseits durch die Aktivität der Na/K-ATPase beeinflusst (WELBORN et al. 1998).

ZINGERLE et al. (1996) zeigten in einer *In vivo*-Untersuchung bei Ratten, dass entlang des Nephrons sowohl im proximalen als auch im distalen Bereich OA reabsorbiert werden kann. Nach SILBERNAGL et al. (1987) erfolgt die Reabsorption von OA in diesen

Bereichen durch den H⁺-Dipeptid-Cotransporter (pH-abhängig) und z.T. durch nichtionische Diffusion. Unter physiologischen Bedingungen ist nach DAHLMANN et al. (1998) die Reabsorption im proximalen Tubulus und im dicken aufsteigendem Ast der Henleschen Schleife und im Sammelrohr der Ratte am größten. In einer Untersuchung von GROVES et al. (1999) zeigte sich, dass der sekretorische Fluss bei Kaninchen ca. achtmal größer als der Reabsorptionsfluss ist, womit sich eine deutliche Nettosekretion ergibt.

2.6 Toxikologie von Ochratoxin A

Mykotoxikosen stellen Vergiftungen dar, die durch die Aufnahme von Pilzgiften hervorgerufen werden. Nach SCHIEFER et al. (1990) lassen sich drei klinische Verlaufsformen unterscheiden:

1. Primär akute Mykotoxikose

Akuter Krankheitsverlauf mit sichtbaren Symptomen (z. B. gestörte Nierenfunktion), die im Extremfall zum Tod führen können.

2. Primär chronische Mykotoxikose

Sie äußert sich in Leistungsdepressionen (z. B. schlechtere Reproduktionsleistung). Klinische Symptome sind bei dieser Verlaufsform latent.

3. Sekundäre Erkrankung als Folge der Mykotoxinaufnahme

Durch die (chronische) Aufnahme niedriger Toxinkonzentrationen steigt z. B. die Anfälligkeit gegenüber bakteriellen und viralen Infektionskrankheiten.

Bereits vor über 70 Jahren entdeckte LARSEN (1928) in Dänemark die sogenannte mykotoxische Nephropathie als chronische Erkrankung mit geringer Mortalität bei Schweinen. Bei anderen Tierarten (z. B. Geflügel, Pferd) führten Ochratoxine zu ähnlichen Schädigungen der Niere. Die Nierenschädigung beim Schwein besteht in einer selektiven Schädigung des proximalen Tubulusepithels, die zu Polyurie, Proteinurie und Glucosurie

und schließlich zu einer hochgradigen Dehydratation führt (PLONAIT et al. 1988). Nach ROLLE und MAYR (1993) greifen diese Veränderungen in ausgeprägten Fällen auf die Glomeruli über.

Neben der beschriebenen Nierenschädigung treten im Zusammenhang mit einer Ochratoxikose weitere Effekte von OA auf. Diese beinhalten z.B. eine verminderte Wachstumsleistung (DWIVEDI und BURNS 1986), gestörte Blutgerinnung (DOERR et al. 1981), Veränderungen in der Skelettstruktur (HUFF et al. 1980), Anämie (HUFF et al. 1979), Leukozytopenie (CHANG et al. 1979), verminderte Glykogensynthese (HUFF et al. 1979), verminderte leukozytäre Phagozytose und veränderte Konzentrationen von Serumparametern, wie eine verminderte Konzentration von Plasmaproteinen, Harnstoff, Cholesterol und Tryglyceriden und eine erhöhte Kreatininkonzentration und bei Vögeln auch erhöhte Harnsäurespiegel (HUFF et al. 1988).

Bei Schweinen, die fünf Wochen lang mit 0,2 bzw. 1,2 mg OA/kg Futter gefüttert wurden, nahmen in den Nieren die Aktivitäten der Phosphoenolpyruvatcarboxykinase (PEPCK) und der cytosolischen γ -Glutamyltranspeptidase nach einer Woche jeweils um ca. 40 % ab und blieben auf diesem Niveau stabil (KROGH et al. 1988). Dabei scheint besonders die Aktivität von PEPCK ein sensitiver Indikator für die porcine Nephropathie zu sein und stellt daher eine Möglichkeit zur Diagnostik OA-induzierter Nierenschäden dar. Die PEPCK ist ein Schlüsselenzym der Gluconeogenese. Nach MEISNER und SELANIK (1979) korrelierte der Rückgang der Enzymaktivität gut mit der renalen Gluconeogenese aus Malat, Glutamin, Lactat und Pyruvat, welche um 28, 32, 39 bzw. 61 % gehemmt wurde. Die Möglichkeit, dass auch andere Enzyme (z. B. die Pyruvat-Carboxylase) ebenfalls beeinträchtigt werden, kann nicht ausgeschlossen werden. Die Aktivität der Leber-PEPCK wurde in dieser Untersuchung nicht beeinflusst.

Das Wissen über Toxizitätsmechanismen von OA ist noch nicht vollständig. In der Literatur werden drei Mechanismen beschrieben:

1. Hemmung der tRNA-Synthetasen und eine damit verbundene reduzierte Proteinsynthese (MARQUARDT und FROHLICH 1992).
2. Hemmung der mitochondrialen Respiration, die mit einer ATP-Depletion korreliert ist (RÖSCHENTHALER et al. 1984).
3. Pro-oxidative Mechanismen, die unter anderem zu einer gesteigerten Lipidperoxidation führen (FINK-GREMMELS et al. 1995).

Mäusen, denen eine intraperitoneale Dosis von 1 mg OA/kg LM verabreicht wurde, zeigten eine Hemmung der Proteinsynthese in der Niere um 68%, in der Milz um 75% und in der Leber um 26%. Die Hemmung konnte bei gleichzeitiger Gabe von Phenylalanin verhindert werden (CREPPY et al. 1984). Hieraus folgerten die Autoren, dass es sich um eine kompetitive Hemmung von Phenylalanin mit OA handelt. Nach CREPPY et al. (1983a) hemmt OA das Enzym Phenylalanin-tRNA-Synthetase, welches die Aminoacylierung der für Phenylalanin spezifischen tRNA-Moleküle katalysiert. Keine Hemmung der Proteinsynthese *in vitro* erfolgte durch $O\alpha$. Nach MOORE and TRUELOVE (1970) hemmte $O\alpha$ zwar im selben Maße wie OA die Respiration der Mitochondrien, doch aufgrund der nach LI et al. (1997) ca. 10-fach geringeren Halbwertszeit im Organismus von $O\alpha$ im Vergleich zu OA, scheint dieser Effekt *in vivo* keine Rolle zu spielen.

Phenylalanin scheint im Bereich der Toxizität von OA eine zentrale Rolle zu spielen. Unter *in vitro*-Bedingungen war die OA-induzierte Hemmung der Proteinbiosynthese von Ratten-Hepatozyten durch Zugabe von Phenylalanin vollständig reversibel (CREPPY et al. (1979) Eine Verminderung nephrotoxischer Wirkungen bei der Ratte (KANE et al. 1986), die Verhinderung der OA-induzierten Teratogenese bei Ratten (MAYURA et al. 1984) und verminderte immunsuppressive Effekte bei Mäusen (HAUBECK et al. 1981) durch Phenylalanin sind ebenfalls beschrieben.

Ähnliche Wirkungen wie von Phenylalanin wurden von Aspartam (L-Aspartyl-L-Phenylalaninmethylester), einem Strukturanalogon zu OA und Phenylalanin beschrieben. In einer *in vitro*-Untersuchung von BAUDRIMONT et al. (1997) wurde in Nierenzellen

von Affen eine OA-bedingte Reduktion der Proteinsynthese festgestellt. Wurde Aspartam in zehnfach höherer Konzentration als OA appliziert, so wurde ein partieller Schutz gegenüber der OA-induzierten Inhibition der Proteinsynthese festgestellt. Wurde Aspartam 24 Stunden vor OA verabreicht, so war der Schutz wesentlich effizienter. Aspartam beugte in dieser Untersuchung den durch OA induzierten verminderten Enzymaktivitäten, wie der Laktat-Dehydrogenase, γ -Glutamyl-Transferase und alkalische Phosphatase in OA-behandelten Zellen vor.

In *in vitro* Studien mit Mitochondrien der Rattenleber wurde beobachtet, dass OA die Atmung der Mitochondrien hemmt, indem es als kompetitiver Hemmfaktor der Transportproteine für Succinat, Malonat, ADP, ATP und anorganisches Phosphat, die in der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert sind, fungiert (MEISNER und CHAN 1974). MEISNER (1976) zeigte an Mitochondrienpräparationen, dass die Aufnahme von OA in die Mitochondrien ein energieabhängiger Prozess ist, der zur Folge hat, dass sich der mitochondriale ATP-Vorrat entleert. Nach ALEO et al. (1991) ist die Toxizität von OA im proximalen Tubulus der Rattenniere nicht auf eine eisenabhängige Lipidperoxidation zurückzuführen, sondern auf eine Hemmung der Mitochondrienfunktion.

Die Erzeugung freier Radikale und eine gesteigerte Lipidperoxidation sind der dritte wichtige Toxizitätsmechanismus von OA. RAHIMTULA et al. (1988) zeigten in einer *in vitro*-Untersuchung, dass OA in Lebermikrosomen der Ratte die Rate der NADPH- oder Ascorbat abhängigen Lipidperoxidation, welche anhand des Anstiegs von Malondialdehyd erfasst wurde, steigerte. *In vivo*-Untersuchungen von HASINOFF et al. (1990) und OMAR et al. (1990, 1991) zeigten, dass OA ein Chelat mit Eisen bildete. Dieses Chelat produzierte in Anwesenheit des NADPH-abhängigen Cytochrom P-450-Reduktase-Systems reaktive Sauerstoffverbindungen (ROS). Diese reagierten wiederum mit Lipiden unter Bildung von Lipidperoxiden.

Die Produktion von ROS wird allgemein durch Antioxidantien (z.B. Vit. A, C, E) kontrolliert. MALAVEILLE et al. (1994) zeigten, dass durch die Zugabe der Antioxidans Trolox C, einem wasserlöslichem Vitamin E-Analagon, bei *E. coli* die genotoxischen Effekte von OA verhindert wurden. Einen ähnlichen protektiven Effekt in Mäusen konnten

BOSE und SINHA (1994) für Vitamin C und KUMARI und SINHA (1994) für Vitamin A zeigen.

PLANK et al. (1990) untersuchte die protektive Wirkung von Aktivkohle, verschiedenen Bentoniten und hydriertem Na-Ca-Al-Silikat gegenüber OA beim Schwein. Während der Zusatz von hydriertem Na-Ca-Al-Silikat (1 %) und saurem Bentonit (1 %, 10 %) zu OA-haltigem Futter (1 mg/kg) keinen Einfluss auf die OA-Konzentration im Serum und in den Geweben hatte, bewirkte eine 1 %-ige Zumischung von Aktivkohle eine leichte Senkung des Toxinspiegels. Eine 5 - 10 %-ige Zulage dieses Adsorbens führte zu einer deutlichen Absenkung des Toxinspiegels (50 - 80 %). In einem 16 Wochen dauerndem Versuch zeigten die Autoren ebenfalls, dass durch eine langfristige Aktivkohleapplikation gleichzeitig die Resorption essentieller Futterinhaltsstoffe (z. B. Vit E) negativ beeinflusst wird. Eine Verdünnung des Energie- und Nährstoffgehaltes sind ebenfalls zu erwarten. Daher ist ein prophylaktischer Zusatz von 5-10 % Aktivkohle nicht realistisch. MADHYASTHA et al. (1992) zeigten, dass durch Zugabe von Cholestyramin sowohl die OA-Konzentration im Blut als auch die über den Harn ausgeschiedene OA-Menge deutlich verringert wird. Die Ausscheidung über Faeces war hingegen gesteigert. Dies lässt auf eine verringerte Bioverfügbarkeit von OA schließen. Der Preis für Cholestyramin ist nach KERKADI et al. (1998) allerdings für eine ökonomisch sinnvolle Anwendung in der Tierproduktion zu hoch.

2.7 Prävention von OA-Kontaminationen, Stabilität und Dekontamination von Ochratoxin A

Um nach der Ernte das Pilzwachstum bzw. die Bildung von OA zu vermeiden, ist es notwendig, Bedingungen einzustellen, bei denen das Pilzwachstum weitgehend gebremst wird. Nach Befunden von ABRAMSON (1992) ist die routinemäßig durchgeführte Trocknung des Getreides nach der Ernte auf einen Feuchtegehalt von 15% oder weniger ausreichend, um die Bildung von OA zuverlässig zu vermeiden. Nach der Trocknung muss die Temperatur möglichst niedrig gehalten werden. Die Temperaturen, bei denen das Pilzwachstum stagniert, sind von der Pilzart abhängig (siehe 2.4). Zur Vermeidung

mikrobiellen Wachstums können, wenn keine Möglichkeiten zur schnellen Trocknung des Ernteguts gegeben sind, chemische Konservierungsmittel (z.B. Propionsäure) eingesetzt werden (MÜLLER et al. 1980).

Zumindest in Getreide ist OA nicht stabil. TRENK et al. (1971) zeigten, dass der Gehalt von OA (nach Zusatz von 1800 µg/kg) in Hafermehl bei 28°C innerhalb von drei Wochen um 38% und innerhalb von zwölf Wochen um 55 % sank. Welcher Mechanismus dem Abbau zugrunde lag, konnte nicht geklärt werden. Zur Stabilität von OA gegenüber lebensmitteltechnologischen Verfahren wurden verschiedene Untersuchungen durchgeführt. Aufgrund der relativen Hitzestabilität von OA konnte der OA-Gehalt durch Kochen oder Braten von Schweinefleisch (JOSEFFSON und MÖLLER 1980) oder durch Backen von Brot und Biskuits (OSBORN 1979) lediglich verringert werden. Nach CHELKOWSKI et al. (1980) wird bei der mahlentechnischen Verarbeitung von Getreide ein Teil des Mykotoxins mit der äußeren Schicht vom Korn abgetrennt. Eine Trocken- oder Nassreinigung von Getreide führt nach CHELKOWSKI et al. (1981) zu keiner Verminderung der OA-Kontamination.

Die Behandlung mit Ammoniak stellt ein Detoxifikationsverfahren von OA dar. MADSEN et al. (1983) konnten bei Gerste durch Begasung mit einem Luft-Ammoniak-Gemisch (5 % NH₃) die Ausgangsgehalte dieses Toxins deutlich senken. Die Autoren weisen allerdings auch darauf hin, dass durch die NH₃-Behandlung die Proteinqualität der Futtermittel abnimmt. Die Futteraufnahme, Gewichtszunahme und Futterverwertung von Schweinen wurde durch die NH₃-Behandlung ebenfalls negativ beeinflusst (MADSEN et al. 1983).

Ferner gibt es Versuche, OA biologisch zu deaktivieren, da manche Mikroorganismen in der Lage sind, OA abzubauen. VARGA et al. (2000) untersuchten *in vitro* die Fähigkeit einiger *Aspergillus*-Stämme, OA abzubauen. *Aspergillus fumigatus* und schwarze *Aspergillus*-Stämme führten die Hydrolyse von OA zu O α und Phenylalanin aus. Ein atoxischer *A. niger* Stamm führte die Hydrolyse sowohl in festem als auch in flüssigem Medium aus. Aus einer Untersuchung von STANDER et al. (2000), in der zahlreiche kommerzielle Hydrolasen auf ihre Fähigkeit, OA zu O α und Phenylalanin zu hydolysieren getestet wurden, geht hervor, dass eine Lipase von *A. niger* die Hydrolyse ausführen kann. Der Abbau von OA durch einige *Lactobacillus*, *Streptococcus* und *Bifidobacterium*

Stämme wurde ebenfalls in Milch beobachtet (SKRINJAR et al. 1996). Über den Einsatz von Bakterienstämmen für die Detoxifikation von OA-kontaminierten Futtermitteln existieren noch keine Berichte. *Aspergillus niger* wird allerdings in der Futtermittelindustrie bereits für die Produktion verschiedener Enzyme und organischer Säuren eingesetzt.

Aufgrund der ausgeprägten hydrolytischen Tätigkeit der Pansenmikroorganismen wäre die Verfütterung OA-kontaminierten Getreides an Wiederkäuer eine interessante Möglichkeit, OA-kontaminierte Futtermittel ökonomisch zu verwerten und OA ohne große Aufwendungen für Detoxifikationsverfahren aus der Nahrungskette zu entfernen.

Nach KIESSLING et al. (1982) sind vor allem die Protozoen (ca. 88 %) und zu geringerem Anteil Bakterien (ca. 12 %) für die Hydrolyse von OA zu O α im Pansen verantwortlich. Lebende Protozoen sind in Pansen, Haube und Blättermagen anzutreffen (WILLIAMS und COLEMAN 1992). In diesen Kompartimenten des Gastrointestinaltraktes konnten HULT et al. (1976) auch die Hydrolyse von OA zu O α und Phenylalanin nachweisen. RIBELIN et al. (1978) fanden bei intravenöser Applikation einer Einmaldosis von OA im Harn von Rindern nur OA, bei oraler Verabreichung nur den Metaboliten O α und erklärten dies mit der extensiven hydrolytischen Tätigkeit der Pansenflora.

Der Nachweis der Metabolisierung von OA im Pansen reicht allerdings nicht aus, um die Verfütterung kontaminierten Getreides an Wiederkäuer als Dekontaminationsverfahren einzusetzen. Zum einen muss dafür die Entgiftungskapazität des Pansens bei chronischer Fütterung von OA-kontaminierten Futtermitteln bekannt sein, zum anderen müssen mögliche Einflüsse auf die vorherrschenden Bedingungen im Pansen in Hinsicht auf die Effizienz der hydrolytischen Tätigkeit der Vormagenflora berücksichtigt werden. Weiterhin besteht die Möglichkeit, dass OA *in vivo* zu weiteren Metaboliten ab- bzw. umgebaut wird, deren Toxizität zu klären ist.

3 Experimenteller Teil

3.1 Material und Methoden

3.1.1 Einfluss der Dosierungen von Ochratoxin A in der Ration auf toxikokinetische Parameter von Ochratoxin A beim Schaf (Versuch 1)

Ziel von Versuch 1 war es, den Einfluss der Dosierungen von OA auf die Gehalte von OA und O α im Blutserum und in der Pansenflüssigkeit, auf die Elimination von OA und O α über Kot und Harn und auf die Nährstoffverdaulichkeiten zu untersuchen.

Im Versuch standen 12 Hammel der Rasse Coburger Fuchsschaf mit einer LM von $39,3 \pm 1,5$ kg (MW \pm SD) zur Verfügung. Die Haltung erfolgte von Tag 1 bis Tag 14 in Gruppenhaltung mit Einzelanbindung während der Fütterung. Von Tag 15 bis Tag 31 wurden die Tiere in Stoffwechsellkäfigen gehalten.

Die Fütterung erfolgte zweimal täglich jeweils um 7:30 Uhr und um 18:30 Uhr. Wasser stand den Tieren über Selbsttränken zur freien Aufnahme zur Verfügung. Das OA wurde zu Beginn jeder Fütterung mit einer 100 g-Portion Weizen, die den jeweils nötigen Anteil OA kontaminierten Weizens enthielt. Ochratoxin A wurde auf dem Weizen von einer Kultur von *Aspergillus ochraceus* NRRL 3174 nach dem Verfahren von XIAO et al. (1995) produziert. Der hochkontaminierte Weizen (3 mg OA/g) wurde mit dem Futterweizen, der vorher in einer Getreidemühle mit der Siebgröße 3 mm vermahlen wurde, auf eine Konzentration von 11,0 μ g OA/g verdünnt. Jeweils drei Schafe erhielten einen OA-Anteil in der Ration in Höhe von 0, 9,5, 19,0 oder 28,5 μ g OA/kg Lebendmasse (entspricht einer täglichen Aufnahme von 0, 387, 774 und 1161 μ g OA Tag). Es ergaben sich folglich 4 Behandlungen.

Die Schafe erhielten eine Ration, mit einem Konzentratfutter:Grobfutter-Verhältnis von 70:30 in der Trockenmasse. Die Fütterung erfolgte auf Basis des energetischen Bedarfs für Erhaltung von 0,43 MJ/kg LM^{0,75} (GfE 1996). Als Konzentratfutter wurde in dem Versuch Weizen, Weizenkleie und Mineralfutter eingesetzt, als Grobfutter diente Grassilage. Die

analysierten Rohnährstoffgehalte der Rationskomponenten und die Rationszusammensetzung sind in Tabelle 5 dargestellt.

Tabelle 5: Zusammensetzung der Rationskomponenten und der Gesamtration (Versuch 1)

Rationskomponenten	Weizen	Weizen- kleie	Mineral- futter¹⁾	Gras- silage	Gesamt- ration, %
% in der Ration	41,5	2,8	2,5	28,2	-
Trockenmasse, %	85,2	86,4	96,9	39,9	51,5
Asche	1,4	6,1	82,6	6,5	4,7
Organische Masse	98,6	93,9	17,5	93,6	70,4
Rohfaser	3,0	9,4		34,8	11,3
Rohprotein	13,2	17,2		9,7	8,7
Rohfett	1,2	3,5		1,8	1,1
Stärke	69,8	16,1		1,2	29,7
NDF²⁾	15,4	43,9		62,8	25,3
ADF²⁾	3,4	12,7		35,8	11,9
ADL²⁾	0,9	4,6		4,0	1,6

¹⁾ Zusammensetzung des Mineralfutters nach Herstellerangaben (siehe Anhang Tabelle 44)

²⁾ NDF = Neutral-Detergenzienfaser, ADF = Säure-Detergenzienfaser, ADL = Säure-Detergenzienlignin

3.1.2 Einfluss der Rationszusammensetzung auf toxikokinetische Parameter von Ochratoxin A beim Schaf (Versuch 2)

Ziel von Versuch 2 war es, den Einfluss der Rationszusammensetzung auf die Gehalte von OA und O α im Blutserum und in der Pansenflüssigkeit, auf die Elimination von OA und O α über Kot und Harn und auf die Nährstoffverdaulichkeiten zu untersuchen.

Es kamen 12 Hammel einer Weiskopf-Textel Kreuzung mit einem LM von 58 ± 3.0 kg (MW \pm SD) zum Einsatz. Die Haltung und das Fütterungsregime wurden wie in Versuch 1 durchgeführt.

Die Schafe wurden in 4 Fütterungsgruppen mit je 3 Tieren unterteilt. Eingesetzt wurden zwei Rationen, die sich im Konzentratfutter:Grobfutter-Verhältnis (KF:GF) unterschieden. Je Periode bekamen jeweils 6 der 12 Tiere eine Ration mit einem KF: GF- Verhältnis von 70:30 bzw. 30:70. Als Konzentratfutter dienten Weizen, Sojaextraktionsschrot und Mineralfutter, als Grobfutter wurde Grassilage verwendet. Innerhalb einer Ration wurde bei jeweils drei Tieren ein Teil des Weizens durch OA-kontaminierten Weizen ersetzt, so dass sich zusätzlich jeweils die Behandlungen 0 und 14,3 μ g OA/kg LM (entsprechend einer täglichen Aufnahme von 0 und 940 μ g OA/Tag) ergaben (Tabelle 6). In Periode 2 wurden die Tiere so getauscht, so dass die Versuchsanordnung einem „*balanced two-period changeover design*“ (GILL und MAGEE 1976) entsprach, dessen Aufbau in Tabelle 7 wiedergegeben ist.

Die analysierten Rohnährstoffgehalte der Rationskomponenten und die Rationszusammensetzung sind in Tabelle 8 dargestellt. Das Ernährungsniveau entsprach dem 1,4-fachen des energetischen Bedarfs für Erhaltung ($0,43$ MJ/kg LM^{0,75}, GfE 1996).

Tabelle 6: Rationen (Versuch 2)

Ration ¹	KF:GF-Verhältnis ²	OA-Aufnahme (mg/kg LM ³)
KFH-OA	70:30	14,3
KFH	70:30	0
KFN-OA	30:70	14,3
KFN	30:70	0

¹ KFH= Konzentratfutter hoch, KFN= Konzentratfutter niedrig, OA= mit OA-kontaminiertem Weizen in der Ration

² KF:GF- Verhältnis = Kraftfutter:Grobfutter- Verhältnis

³ LM = Lebendmasse

Tabelle 7: Versuchsanordnung (Versuch 2)¹

Tier	Periode 1	Periode 2
1	KFN	KFH
2	KFH	KFN
3	KFN	KFN-OA
4	KFH	KFN-OA
5	KFN	KFH-OA
6	KFH	KFH-OA
7	KFH-OA	KFN
8	KFN-OA	KFN
9	KFH-OA	KFH
10	KFN-OA	KFH
11	KFH-OA	KFN-OA
12	KFN-OA	KFH-OA

¹ KFH= Konzentratfutter hoch, KFN= Konzentratfutter niedrig, OA= mit OA-kontaminiertem Weizen in der Ration

Tabelle 8: Rationszusammensetzung der Rationskomponenten und der Gesamtration (Versuch 2)

Rationskomponenten	Weizen	SES¹⁾	Mineral- futter²⁾	Gras- silage	Gesamtration, %	
% in der Ration						
KF:GF = 70:30	59,8	6,8	5,7	27,7	-	
KF:GF = 30:70	26,5	3,1	4,9	65,5	-	
					KF:GF 70:30	KF:GF 30:70
Trockenmasse, %	87,0	89,6	98,6	38,5	74,4	55,9
Asche	1,5	6,9	92,6	8,3	8,9	10,0
Organische Masse	98,5	93,1	7,4	91,7	91,1	89,4
Rohfaser	2,0	7,4		33,0	10,8	22,4
Rohprotein	13,1	47,2		10,6	14,0	11,9
Rohfett	1,7	2,8		1,7	1,7	1,7
Stärke	63,2	1,8		1,2	38,3	17,6
NDF³⁾	13,4	15,0		62,2	20,3	44,8
ADF³⁾	2,8	9,9		37,2	12,7	25,4
ADL³⁾	0,7	0,6		2,9	1,3	2,1

¹⁾ SES = Sojaextraktionsschrot

²⁾ Zusammensetzung des Mineralfutters nach Herstellerangaben (siehe Anhang Tabelle 44)

³⁾ NDF = Neutral-Detergenzienfaser, ADF = Säure-Detergenzienfaser, ADL = Säure-Detergenzienlignin

3.1.3 Einfluss des Fütterungsniveaus auf toxikokinetische Parameter von Ochratoxin A beim Schaf (Versuch 3)

In Versuch 3 wurde der Einfluss des Fütterungsniveaus und der OA-Dosis auf die Gehalte von OA und O α im Blutserum und in der Pansenflüssigkeit, auf die Elimination von OA und O α über Kot und Harn und auf die Nährstoffverdaulichkeiten untersucht.

Es kamen 12 Hammel einer Weisskopf-Textel Kreuzung mit einem LM von $48 \pm 3,9$ kg (MW \pm SD) zum Einsatz. Die Haltung und das Fütterungsregime wurden wie in Versuch 1 bzw. 2 durchgeführt. Versuch 3 umfasste zwei Perioden mit einer Dauer von jeweils 31 Tagen.

Das Ernährungsniveau in Periode 1 entsprach dem energetischen Erhaltungsbedarf von Schafen ($0,43 \text{ MJ/kg}^{0,75}$, GfE 1996), in Periode 2 wurde das Ernährungsniveau um den Faktor 1,7 gesteigert. Die Ration setzte sich in beiden Perioden aus 70 % Konzentratfutter und 30 % Grobfutter zusammen. Als Konzentratfutter dienten Weizen und Sojaextraktionsschrot und Mineralfutter, als Grobfutter wurde eine Grassilage eingesetzt. Die analysierten Rohnährstoffgehalte der Rationskomponenten und die Rationszusammensetzung sind in Tabelle 10 dargestellt. Die Schafe wurden in beiden Perioden in 4 Fütterungsgruppen mit je 3 Tieren unterteilt. Je Periode ergaben sich somit wie in Versuch 1 vier Behandlungen mit den täglichen OA-Aufnahmen von 0, 8,2, 17,0 oder 26,3 μg OA/kg Lebendmasse (dies entspricht täglichen OA-Aufnahmen von 0, 374, 743 und 1069 μg /Tier).

Tabelle 9: Rationszusammensetzung der Rationskomponenten und der Gesamtration (Versuch 3)

Rationskomponenten	Weizen	SES¹⁾	Mineral- futter²⁾	Gras- silage	Gesamt - ration, %
% in der Ration	56,4	6,1	2,8	34,7	100
Trockenmasse	86,7	87,8	98,5	41,1	71,3
Asche	1,6	6,8	91,8	8,1	6,7
Organische Masse	98,4	93,3	8,2	91,9	93,7
Rohfaser	2,2	7,2		34,1	13,5
Rohprotein	13,7	47,2		10,4	14,2
Rohfett	1,7	3,2		1,5	1,7
Stärke	61,4	0,8		0,9	35,0
NDF³⁾	14,7	16,6		64,5	31,7
ADF³⁾	3,2	10,5		38,1	15,7
ADL³⁾	0,8	0,7		3,1	1,6

¹⁾ SES = Sojaextraktionsschrot

²⁾ Zusammensetzung des Mineralfutters nach Herstellerangaben (siehe Anhang Tabelle 44)

³⁾ NDF = Neutral-Detergenzienfaser, ADF = Säure-Detergenzienfaser, ADL = Säure-Detergenzienlignin

3.1.4 Versuchsdurchführung, Probengewinnung und Probenaufbereitung (Versuch 1 bis 3)

Die Art der Probenentnahme und der jeweilige Zeitpunkt sind in Tabelle 10 dargestellt. Die Blutentnahme erfolgte jeweils vor Beginn der Morgenfütterung an den Tagen 1, 5, 9, 13, 23 durch Punktion der *vena jugularis*. In Versuch 1 und 2 wurde zusätzlich an Tag 29 Blut entnommen. Zur Serumgewinnung wurden die Blutproben eine Stunde bei Raumtemperatur stehen gelassen und anschließend bei 4000 U/min und 4 °C für 30 Minuten zentrifugiert. Anschließend wurde das Serum in 1 bis 2 ml Portionen aufgeteilt und in Eppendorcups pipettiert und bei –18 °C bis zur weiteren Analyse aufbewahrt.

Tabelle 10: Zeitplan für die Probenentnahme

Art der Probe	Zeitpunkt der Gewinnung
Blut	Tag 1, 5, 9, 13, 23, 29 ¹
Kot und Harn (quantitativ)	Tag 15 – 22
Pansensaft	Tag 24 und Tag 25
Cr-EDTA	Tag 26-31

¹ Probenahme an Tag 29 entfiel bei Versuch 3

Um die Elimination von OA und O α über Kot und Harn zu erfassen, erfolgte die quantitative Kot- und Harnsammlung in allen Versuchen jeweils über einen Zeitraum von 7 Tagen (Tag 15 – 22) mittels Kotschürzen bzw. Harnwannen, die jeweils zur Fütterung entleert wurden. Nach Bestimmung der Gesamtmengen des gesammelten Kots und Harns wurden die kumulativen Proben homogenisiert und anschließend eine repräsentative Probe entnommen (ca. 1 kg bzw. 1 l), die bei –18 °C bis zur weiteren Analyse eingefroren wurde.

Zusätzlich wurden zur Ermittlung der Nährstoffverdaulichkeiten während der Kot- und Harnsammelperiode repräsentative Proben der eingesetzten Rationen gesammelt und ebenfalls bei –18 °C bis zur weiteren Analyse aufbewahrt.

Pansensaft wurde in allen Versuchen am Tag 24 um 7:00, 11:00 und 17:00 Uhr und am Tag 25 um 8:00 und 14:00 Uhr mit einer Schlundsonde nach GEISHAUSER und GITZEL (1996) entnommen. Die pH-Wert-Messung erfolgte unmittelbar nach Pansensaftentnahme. Anschließend wurden 30 ml Pansensaft mit 6 ml *ortho*-Phosphorsäure (2,25 mol/l) zur Inaktivierung der Pansenflora angesäuert, gut durchmischt und bei -18 °C bis zur weiteren Analyse aufbewahrt.

An Tag 26 wurde den Tieren zur Bestimmung der Ingesta-Passagerate via Schlundsonde 180 ml Cr-EDTA- Lösung (5,54 g Cr/l) in den Pansen-Hauben-Raum appliziert. Für die Herstellung der Cr-EDTA-Lösung nach dem Verfahren von BRANDT und KÜHN (1987) wurden pro Ansatz 28,4 g reines CrCl₃ x 6 H₂O in ca. 325 ml dest. Wasser gelöst (Lösung A) und 40 g Na₂-EDTA („Titrplex III“) in 425 ml dest. Wasser gelöst (Lösung B). Die

Lösungen A und B wurden anschließend vermischt und eine Stunde am Rückflusskühler gekocht. Nach dem Abkühlen wurde die Lösung mit 32 %iger NaOH-Lösung neutralisiert. Fünf Ansätze wurden gepoolt und auf eine Menge von 5 Liter mit aqua bidest aufgefüllt.

Der Kot wurde in jeder Versuchsperiode nach Applikation der Cr-EDTA-Lösung nach 0, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 30, 36, 42, 48, 60, 72, 84, 96, 108, 120 und 144 Stunden aus den Kotschürzen entnommen. Die so gewonnenen Frischkotproben wurden sofort bei $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren und bis zur Analyse aufbewahrt.

3.1.5 Bestimmung der Rohnährstoffe und Faserfraktionen

In den Futtermittel- und Kotproben wurden die Rohnährstoffe, Stärke und Zellwandfraktionen analysiert.

Für jeden Versuch wurden die Futtermittel- und Kotproben der quantitativen Sammelperiode (Tag 15 bis 22) gemischt. Die Trockenmasse wurde mittels Gefriertrocknung (48 Stunden) und anschließender Trocknung einer Teilmenge im Trockenschrank bei 105°C über Nacht ermittelt. Die gefriergetrockneten Proben wurden in der Zentrifugalmühle durch ein 1 mm Sieb vermahlen. Für die Stärke- und Ochratoxin A-Analyse wurden diese durch ein 0,2 mm Sieb vermahlen. Die organische Masse wurde durch Veraschung bei 550°C über einen Zeitraum von 3 Stunden bestimmt. Die Rohproteinbestimmung erfolgte gemäß den Vorschriften des VDLUFA (BASLER 1993). Die Detergenzienfaserfraktionen wurden nach dem von GOERING und VAN SOEST (1970) beschriebenen Verfahren analysiert. Die Stärkebestimmung erfolgte nach dem Verfahren von BRANDT et al. (1987). Die Stärke wurde dabei durch eine thermostabile α -Amylase (Termamyl L 120, Novo Industrials, Bagsværd, Dänemark) und eine Amyloglycosidase zu Glucose gespalten. Die Glucose wurde mit Hilfe eines ATP-NADP-Gemisches phosphoryliert und ihr Gehalt in der Lösung durch die proportionale Konzentrationsänderung von NADPH im Photometer bestimmt.

Zur Analyse von Cr-EDTA wurden die Kotproben zunächst aufgetaut, mit der Gabel zerkleinert und gemischt. Zehn Gramm Kot wurden dann gemäß Methodenbuch des VDLUFA mit Schwefelsäure aufgeschlossen (Kjeldahl-Aufschluss, BASLER 1993).

Die Analyse von Cr-EDTA im Kjeldahlaufschluss erfolgte nach dem Verfahren von BRANDT und KÜHN (1987). Zehn Milliliter des Kjeldahlaufschlusses wurden in einen 50 ml Messkolben pipettiert. Die Säurekonzentration der Lösung wurde mit NaOH (10 mol/l) herabgesetzt bis eine Blaufärbung eintrat. Anschließend wurden sofort 3 ml H_2SO_4 (2 mol/l) dazugegeben. Der Lösung wurden 250 μl 2%ige Cer(IV)sulfatlösung zugesetzt und geschüttelt. Die Oxidation von Cr (III) zu Cr (VI) erfolgte 1 Stunde bei 95 °C im Wasserbad. Die abgekühlte Lösung wurde nach Zugabe von 2 Tropfen 0,1-%igem p-Nitrophenol als Indikator mit NaOH (1,5 mol/l) bis zur Gelbfärbung titriert und sofort mit 10 ml Phosphatpuffer und 500 μl 12%iger Aluminiumsulfatlösung versetzt, auf 50 ml mit bidestilliertem Wasser aufgefüllt und dann durch Blauband-Filterpapier filtriert. Zehn Milliliter des Filtrats wurden in ein Reagenzglas pipettiert, mit 3 ml 12,5-%iger H_3PO_4 versetzt und gut geschüttelt. Nach mindestens 3 Minuten Wartezeit wurde durch Zugabe von 0,5 ml 0,5%iger azetonischer Diphenylkarbazidlösung (DCD-Lösung) der Farbkomplex gebildet. Die Extinktion der Messlösung wurde genau 10 und 20 Minuten nach Zugabe der DCD-Lösung bei einer Wellenlänge von 546 nm photometrisch gegen bidestilliertes Wasser gemessen.

3.1.6 Bestimmung von Ochratoxin A

Ochratoxin A und dessen Metabolit $\text{O}\alpha$ wurden in Harn, Kot, Blutserum, Pansenflüssigkeit und in den eingesetzten Futtermitteln analysiert. Die Extraktion der Serumproben erfolgte nach der Methode von HULT et al (1979). Ein Milliliter Serum wurde in ein 35-ml Zentrifugenröhrchen pipettiert und mit 10 ml eines HCl (0,05 mol/l)/ MgCl_2 (0,1 mol/l)-Gemisches und 1,5 ml einer NaCl-Lösung (0,15 mol/l) versetzt und gut geschüttelt. Die Probe wurde mit 8 ml Chloroform versetzt und das Gemisch 30 min auf einem Horizontalschüttler geschüttelt. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 4000 g für 10 min. Der wässrige Überstand wurde abgesaugt und der Chloroformrückstand in ein Zentrifugenröhrchen überführt und nach Zusatz von 1,5 ml bidestilliertes Wasser 5 min auf einem Horizontalschüttler geschüttelt und dann erneut zentrifugiert (4000 g für 10 Minuten). Der wässrige Überstand wurde abgesaugt und 5 ml des Chloroformrückstandes in ein Glasröhrchen überführt und bis zur Trockne eingedampft (Speed Vac® System AES

1010 Savant Instruments, Holbrook, NY). Vor der HPLC-Analyse wurden die Rückstände der Proben in 1 ml Methanol gelöst.

Für die Kotproben wurde dieses Verfahren ebenfalls angewendet. Ein Gramm Kot wurde in ein Zentrifugenröhrchen (50 ml) gefüllt. Nach Hinzufügen von 10 ml des HCl:MgCl₂-Gemisches wurde mit 0,5 ml HCl (6 mol/l) ein pH-Wert von 2,3 bis 3,0 eingestellt. Zwölf ml Chloroform wurden zugesetzt und die Probe 30 min im Horizontalschüttler geschüttelt. Nach Zentrifugation (4000 g, 10 min) und Absaugen des wässrigen Überstandes wurde der Chloroformrückstand in ein weiteres Zentrifugenröhrchen überführt, mit 3 ml bidestilliertem Wasser versetzt, 5 Minuten im Horizontalschüttler geschüttelt und anschließend bei 4000 g 10 min zentrifugiert. Fünf Milliliter des Chloroformrückstandes wurde in ein Glasröhrchen überführt und verdampft. Die Rückstände der Proben wurden in 3 ml Methanol gelöst.

Die Harnproben wurden aufgetaut. Anschließend wurden 30 ml der Harnprobe mit 85 %iger H₃PO₄ auf einen pH-Wert von 2,0 – 2,5 angesäuert. Dann erfolgte die Extraktion von 9 ml angesäuertem Harn mit 15 ml Chloroform wie bei den Kotproben.

Der Pansensaft wurde nach der Methode von XIAO et al. (1991) analysiert. Der tiefgefrorene bereits angesäuerte Pansensaft wurde aufgetaut und durchmischt. Fünf Milliliter des Pansensaftes wurden dann in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen mit 15 ml Chloroform versetzt und anschließend bei 10000 g 15 min zentrifugiert. Nach Absaugen des wässrigen Überstandes wurde der Chloroformrückstand in ein weiteres Zentrifugenröhrchen überführt und 2 ml bidestilliertes Wasser zugesetzt. Das Gemisch wurde 5 Minuten im Horizontalschüttler geschüttelt und bei 4000 g 10 Minuten lang zentrifugiert. Fünf ml des Chloroformrückstandes wurden in ein Glasröhrchen überführt und verdampft. Die Rückstände der Proben wurden in 3 ml Methanol gelöst.

Ein Gramm der gefriergetrockneten und auf 0,2 mm vermahlenden Futtermittelproben wurden mit 20 ml eines Gemisches aus Methanol und bidestilliertem Wasser versetzt, dessen pH-Wert mit 85 %iger H₃PO₄ auf 2,1 gesenkt wurde. Das Gemisch wurde 30 min im Horizontalschüttler geschüttelt und bei 10000 g für 15 min zentrifugiert. Eine

repräsentative Probe des Überstandes (1 ml) wurde gezogen und für die HPLC-Analyse mit Methanol versetzt.

Das angewendete HPLC-Verfahren für die OA-Analyse wurde bei XIAO et al. (1996) beschrieben. Das HPLC-System beinhaltete einen Waters 717 plus Autosampler, einen Waters 600E HPLC-Kontroller, ein Waters In-Line Degasser und einen Waters 474 Fluoreszenzdetektor, eingestellt auf eine Exzitation und Emission von 330 und 450 nm sowie ein Millipore/Waters TCM column oven System (Waters, Eschborn Deutschland). Ein Aliquot von 30 μ l der in Methanol gelösten Proben wurden auf eine 250 \times 4,6 mm (i.d.) Nova-Pak-C₁₈ Säule, ausgestattet mit einer 20 mm \times 3,9 mm (i.d.), 4 μ m Nova-Pak C₁₈ Vorsäule, bei einer Flussrate von 1,5 ml/min und einer Temperatur von 40 °C gespritzt. Die Analysen wurden durchgeführt, indem Gradienten-Elutions-Profile benutzt wurden. Die mobile Phase bestand aus bidestilliertem Wasser, dessen pH-Wert mit konzentrierter H₃PO₄ (85%) auf 2,1 gesenkt wurde (Lösung A) und 90 % Methanol mit 10 % Isopropanol (v/v Lösung B). Um die Trennung von OA und O α von anderen gelösten Substanzen zu erleichtern, wurden zwei unterschiedliche Gradienten-Profile genutzt, die in Tabelle 12 dargestellt sind. Der kurze Gradient wurde bei Serum-, Futtermittel- und Pansensaftproben, der lange Gradient bei Kot- und Harnproben angewendet. Für die Präparation der Standards wurden OA und O α in reinem Ethanol gelöst und basierend auf ihrem molaren Absorptionskoeffizienten von 5500/M/cm bei 333 nm für OA und 6200/M/cm bei 335 nm für O α spektralphotometrisch kalibriert. Anschließend wurden die Standards bis zur Trockne verdampft. Die trockenen Proben wurden in Methanol gelöst, so dass sie eine Konzentration von 1 – 50 ng OA/ml aufwiesen. Die Quantifizierung von OA und O α wurde auf Basis der Flächen der Peaks mit der Millennium Chromatographie Software (Waters, Eschborn, Germany) kalkuliert. Die Identifikation von OA und O α in den Proben wurde auf Basis der jeweiligen Retentionszeit der Standards durchgeführt. Die Retentionszeiten von OA und O α betragen 4,0 bzw. 11,5 min für den kurzen und 15,6 bzw. 28,9 min für den langen Gradienten. Alle Proben wurden mit Doppelbestimmung analysiert. Die Nachweisgrenze für OA und O α betrug jeweils 0,2 ng/ml. Die Wiederfindung betrug 94 %.

Tabelle 11: Profile der Gradienten-Elution für die HPLC Analyse

Kurzer Gradient			Langer Gradient		
Zeit (Min.)	Lösung A ¹⁾ (%)	Lösung B ²⁾ (%)	Zeit, (Min.)	Lösung A (%)	Lösung B (%)
0.0	50	50	0.0	72	28
12.0	25	75	5.0	72	28
12.1	10	90	12.0	52	48
17.0	10	90	18.0	52	48
17.1	50	50	28.0	25	75
22.0	50	50	29.0	10	90
			34.0	10	90
			35.0	72	28
			40.0	72	28

¹⁾ Zusammensetzung Wasser bidest. und H₃PO₄

²⁾ Zusammensetzung 90% Methanol und 10% Isopropanol (v/v)

3.1.7 Versuchsauswertung

Berechnung der Verdaulichkeiten

Zur Berechnung der Verdaulichkeiten wurden in der Bilanzperiode (Tag 15-22) die verzehrte Futtermenge und die mit den Faeces ausgeschiedenen Stoffe quantitativ erfasst und auf ihre Gehalte an Rohnährstoffen analysiert.

$$\text{Verdaulichkeit} = ((I_x - F_x) / I_x) * 100$$

X = Nährstoff (z.B.: TM, OM, ADF,..)

I = Mit dem Futter aufgenommene Menge des Nährstoffes x

F = Mit den Faeces ausgeschiedene Menge des Nährstoffes x

Für die Berechnung der prozentualen Ausscheidung von OA wurden die Konzentrationen von $O\alpha$ nach folgender Formel in OA-Äquivalente umgerechnet:

$$\text{OA-Äquivalent} = (\text{ng } O\alpha/A) \times B$$

A = Molekulargewicht von $O\alpha$

B = Molekulargewicht von OA

Berechnung der AUC, Halbwertszeiten und Passageparameter

Die AUC (= area under the curve, ng x Tag/ml) wurde gemäß der Trapez-Regel für die Blut- und Pansenwerte kalkuliert. Mit Hilfe des Programms GraphPad™version 2.0 (Graph Pad Software San Diego, CA) wurden die Halbwertszeiten von OA im Pansen berechnet.

Die Berechnung der Passageparameter erfolgte aus den Markerkonzentrationen im Kot nach der Methode der Gammaverteilung (POND et al. 1988). Für die Berechnung wurden zwei Kompartimente für Misch – und Passagevorgänge angenommen (GROVUM und WILLIAMS, 1973; MOORE et al. 1992). Der Ort des ersten oder schnellen Kompartimentes ist noch nicht restlos geklärt. Möglicherweise steht es in Beziehung zu Subkompartimenten im Reticulorumen, in denen sich Mischvorgänge abspielen. Es könnte auch postduodenal beeinflusst werden (MERTENS 1993). Das zweite oder langsame Kompartiment repräsentiert die Passage durch das Reticulorumen. Folgende Passageparameter wurden ermittelt:

L: schnelle Passagerate, Passage aus dem 1. Kompartiment

K: Passagerate aus dem Reticulorumen

TD: Zeitverzug bis zum ersten Auftreten des Markers im Kot

Als fraktionelle Passagerate K (h^{-1}) gilt der Anteil der Ingesta, der pro Stunde das Reticulorumen verlässt (KASKE 1997). Aus den Markerkonzentrationen im Kot wurden die Exkretionskurven erstellt und mit Hilfe des nichtlinearen Verfahrens von SAS (2000;

PROC NLIN[®]; iterative Methode nach MARQUARDT), beschrieben bei POND et al (1988), an Modelle ohne Zeitabhängigkeit (G1G1) bzw. an Modelle mit steigenden Grad an Gamma-Zeitabhängigkeit (GnG1, n = 2 bis 4) angepasst. Die verwendeten Modelle sind bei MOORE et al. (1992) in SAS[®]-Programmiersprache aufgeführt. Wegen der guten Anpassung von G4G1 an die Markerexkretionskurven wurden nachfolgend alle Parameter der Gammaverteilung nach diesem Modell ermittelt. Die Modelle G1G1, G2G1 und G3G1 sind im Anhang aufgeführt.

Statistische Auswertung

Einfluss unterschiedlicher Dosierungen von Ochratoxin A in der Ration auf toxikokinetische Parameter von Ochratoxin A beim Schaf (Versuch 1)

Die statistische Auswertung der Blut- und Pansenparameter wurde gemäß einem Repeated Measurement Design durchgeführt (SAS Version 6.12 SAS inst. Inc., Cary, NC). Die Struktur SP (POW) wurde als Kovarianzstruktur benutzt, in der die Kovarianz im Lauf der Zeit abnimmt. Die Varianzanalyse wurde für alle am Einzeltier erfassten Parameter nach folgendem Modell durchgeführt:

$$Y_{ij} = \mu + \text{Dosis}_i + \text{Zeit}_j + (\text{Dosis} \times \text{Zeit})_{ij} + e_{ij}$$

Y_{ij}	=	Beobachtungswert
μ	=	Gesamtmittelwert
Dosis_i	=	fixer Effekt der Dosis, $i = 1, 2, 3, 4$
Zeit_j	=	fixer Effekt der Zeit, $j = 1, 5, 9, 13, 23, 29$ Tage (Blut) oder $j = 1, 4, 7, 10, 13$ Stunden (Pansen)
$(\text{Dosis} \times \text{Zeit})_{ij}$	=	Interaktion Dosis_i und Zeit_j
e_{ij}	=	Restfehler

Wenn eine signifikante Dosis \times Zeit Interaktion ermittelt wurde ($P < 0,05$), wurden die Mittelwerte zu den jeweiligen Zeitpunkten gemäß dem „Fisher`s least significance difference Tests“ analysiert. Die varianzanalytische Auswertung der Verdaulichkeiten, der Passageraten, der OA- und O α -Konzentrationen in Kot und Harn, der AUC-Werte von OA und O α in Blutserum und Pansenflüssigkeit und der Halbwertszeiten von OA im Blutserum und Pansenflüssigkeit erfolgte mit der General-linear-models-Prozedur von SAS. Sie umfasste die Prüfung von Dosiswirkungen. Ergab die varianzanalytische Auswertung signifikante Effekte ($P < 0,05$), wurden diese mit Hilfe des „Fisher`s least significance difference Tests“ statistisch überprüft. In den Ergebnistabellen sind für die einzelnen Dosierungen die ermittelten „least square“- Mittelwerte angegeben.

Einfluss der Rationszusammensetzung auf toxikokinetische Parameter von Ochratoxin A beim Schaf (Versuch 2)

Die statistische Auswertung der Blut- und Pansenparameter erfolgte wie in Versuch 1. Die Varianzanalyse wurde für alle am Einzeltier erfassten Parameter nach folgendem Modell durchgeführt:

$$Y_{ijk} = \mu + KGV_i + Dosis_j + Zeit_k + (KGV \times Zeit)_{ik} + (KGV \times Dosis)_{ij} + (Dosis \times Zeit)_{jk} + e_{ijk}$$

Y_{ij}	=	Beobachtungswert
μ	=	Gesamtmittelwert
KGV_i	=	fixer Effekt des Konzentrat:Grobfutter-Verhältnisses, $i = 1, 2$
$Dosis_j$	=	fixer Effekt der Dosierung, $j = 1, 2$
$Zeit_k$	=	fixer Effekt der Zeit, $k = 1, 5, 9, 13, 23, 29$ Tage (Blut) oder $j = 1, 4, 7, 10, 13$ Stunden (Pansen)
$(KGV \times Zeit)_{ik}$	=	Interaktion Konzentrat:Grobfutter-Verhältnis _i und Zeit _k
$(KGV \times Dosis)_{ij}$	=	Interaktion Konzentrat:Grobfutter-Verhältnis _i und Dosis _j
$(Dosis \times Zeit)_{jk}$	=	Interaktion Dosierung _j und Zeit _k
e_{ijk}	=	Restfehler

Wenn eine signifikante Dosis \times Zeit Interaktion ermittelt wurde ($P < 0,05$), wurden die Mittelwerte zu den jeweiligen Zeitpunkten gemäß dem „Fisher`s least significance difference Tests“ analysiert. Die varianzanalytische Auswertung der Verdaulichkeiten, der Passageraten, der OA- und O α -Konzentrationen in Kot und Harn, der AUC-Werte von OA und O α in Blutserum und Pansenflüssigkeit und der Halbwertszeiten von OA im Blutserum und Pansenflüssigkeit erfolgte mit der General-linear-models-Prozedur von SAS. Sie umfasste die Prüfung von Dosis- und KGV-Effekten. Ergab die varianzanalytische Auswertung signifikante Effekte ($P < 0,05$), wurden diese mit Hilfe des „Fisher`s least significance difference Tests“ statistisch überprüft. In den Ergebnistabellen sind für die einzelnen Dosierungen die ermittelten „least square“- Mittelwerte angegeben.

Einfluss des Fütterungsniveaus auf toxikokinetische Parameter von Ochratoxin A beim Schaf (Versuch 3)

Die statistische Auswertung der Blut- und Harnparameter erfolgte wie in Versuch 1, mit der Ausnahme, dass der Effekt des Tieres als zufällig angesehen wurde. Die Varianzanalyse wurde für alle am Einzeltier erfassten Parameter nach folgendem Modell durchgeführt:

$$Y_{ijk} = \mu + FA_i + Dosis_j + Zeit_k + (FA \times Zeit)_{ik} + (FA \times Dosis)_{ij} + (Dosis \times Zeit)_{jk} + e_{ijk}$$

Y_{ij}	=	Beobachtungswert
μ	=	Gesamtmittelwert
FA_i	=	fixer Effekt der Futteraufnahme, $i = 1, 2$
$Dosis_j$	=	fixer Effekt der Dosierung, $j = 1, 2, 3, 4$
$Zeit_k$	=	fixer Effekt der Zeit, $k = 1, 5, 9, 13, 23, 29$ Tage (Blut) oder $j = 1, 4, 7, 10, 13$ Stunden (Pansen)
$(FA \times Zeit)_{ik}$	=	Interaktion Futteraufnahme _i und Zeit _k
$(FA \times Dosis)_{ij}$	=	Interaktion Futteraufnahme _i und Dosis _j
$(Dosis \times Zeit)_{jk}$	=	Interaktion Dosierung _j und Zeit _k
e_{ijk}	=	Restfehler

Wenn eine signifikante Dosis \times Zeit Interaktion ermittelt wurde ($P < 0,05$), wurden die Mittelwerte zu den jeweiligen Zeitpunkten gemäß dem „Fisher`s least significance difference Tests“ analysiert. Die varianzanalytische Auswertung der Verdaulichkeiten, der Passageraten, der OA- und O α -Konzentrationen in Kot und Harn, der AUC-Werte von OA und O α in Blutserum und Pansensaft und der Halbwertszeiten von OA im Blutserum und Pansensaft erfolgte mit der MIXED-Prozedur von SAS. Sie umfasste die Prüfung von Dosis- und Futteraufnahmeeffekten. Ergab die varianzanalytische Auswertung signifikante Effekte ($P < 0,05$), wurden diese mit Hilfe des „Fisher`s least significance difference Tests“ statistisch überprüft. In den Ergebnistabellen sind für die einzelnen Dosierungen die ermittelten „least square“- Mittelwerte angegeben.

3.2 Ergebnisse

3.2.1 Toxikokinetische Parameter von Ochratoxin A beim Schaf (Versuch 1)

3.2.1.1 Konzentrationen von OA und O_a und pH-Werte in der Pansenflüssigkeit (Versuch 1)

Zwei Tiere, die klinische Symptome der Moderhinke zeigten wurden aus dem Versuch genommen und von den statistischen Auswertungen ausgeschlossen. Alle übrigen Tiere zeigten keinerlei Krankheitssymptome, auch nicht in Verbindung mit OA. Das angebotene Futter wurde stets vollständig aufgenommen.

In Tabelle 12 sind die pH-Werte in der Pansenflüssigkeit zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Fütterung dargestellt. Die pH-Werte sanken bei allen Dosierungen von OA nach der Fütterung zunächst ab und stiegen dann ab 7 h nach der Fütterung wieder an. Zu keinem der Zeitpunkte unterschieden sich die pH-Werte zwischen den Dosierungen signifikant ($p > 0,05$).

Tabelle 12: pH-Werte in der Pansenflüssigkeit zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Fütterung bei unterschiedlichen Dosierungen von OA (Versuch 1)

Zeit (h)	OA (mg /Tag)				
	0	387	774	1161	SE
1	6,7	6,3	6,4	6,3	0,1
4	6,3	6,7	6,2	6,4	0,1
7	6,4	6,6	6,5	6,4	0,1
10	6,8	6,8	6,8	7,0	0,1
13	7,0	7,1	7,0	7,4	0,1

Die Konzentrationen von OA in der Pansenflüssigkeit sind in Tabelle 13 dargestellt. Eine Stunde nach Fütterung zeigten sich mit zunehmender Dosierung steigende Konzentrationen von OA im Pansen. Zu späteren Zeitpunkten konnte ein Verschwinden von OA aus dem Pansen bei allen Dosierungen beobachtet werden. Nach 10 Stunden konnte OA im Pansen nur noch in geringen Mengen nachgewiesen werden, so dass keine signifikanten Effekte der Dosierung mehr auftraten ($p > 0,05$). Die Halbwertszeiten von OA im Pansen zeigten keine signifikante Unterschiede ($p > 0,05$) zwischen den Dosierungen (Abbildung 2).

Die Konzentration von $O\alpha$ in der Pansenflüssigkeit stieg mit wachsendem Abstand vom Fütterungszeitpunkt und mit zunehmender Dosierung von OA nur leicht an (Tabelle 14). Ab dem Zeitpunkt 7 h nach Fütterung ergaben sich signifikant unterschiedliche $O\alpha$ -Konzentrationen zwischen allen Dosierungen ($p > 0,05$).

Tabelle 13: Konzentrationen von OA (ng/ml) in der Pansenflüssigkeit zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Fütterung bei unterschiedlichen Dosierungen von OA (Versuch 1)

Zeit (h)	OA (mg /Tag)				SE
	0	387	774	1161	
1	n.n ¹	14,3 ^{Aa}	36,2 ^{Ba}	52,8 ^{Ca}	1,8
4	n.n	6,3 ^{Ab}	20,6 ^{Bb}	22,6 ^{Bb}	1,8
7	n.n	1,5 ^{Ab}	10,9 ^{Bc}	13,1 ^{Bc}	1,8
10	n.n	0 ^b	5,1 ^{cd}	2,8 ^d	1,8
13	n.n	0 ^b	0 ^d	1,6 ^d	1,8

A, B, C Mittelwerte mit unterschiedlichen Buchstaben innerhalb einer Zeile unterscheiden sich signifikant ($p > 0,05$)

a, b, c, d, Mittelwerte mit unterschiedlichen Buchstaben innerhalb einer Spalte unterscheiden sich signifikant ($p > 0,05$)

¹ n.n. = nicht nachweisbar ($< 0,2$ ng/ml)

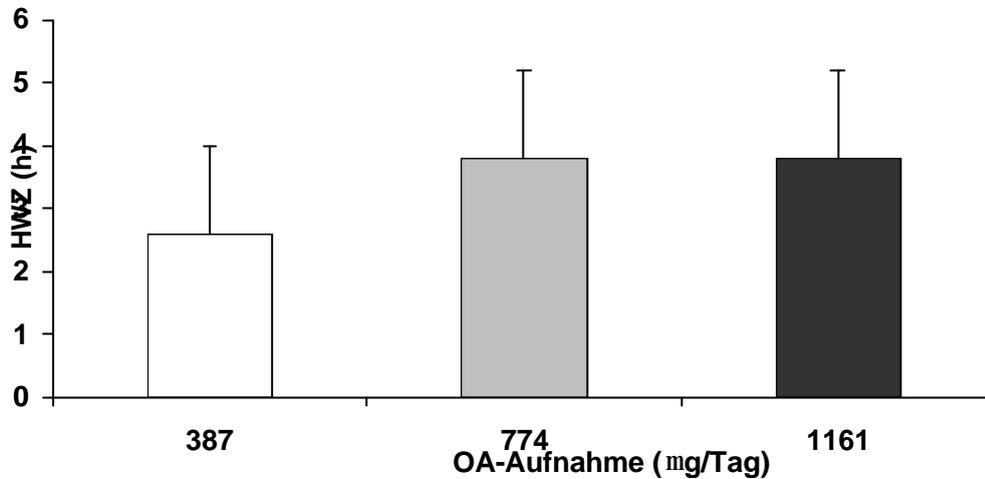


Abbildung 2: Halbwertszeiten (HWZ) von Ochratoxin A im Pansen bei unterschiedlichen Dosierungen von OA (Versuch 1)

Tabelle 14: Konzentrationen von O_a (ng/ml) in der Pansenflüssigkeit zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Fütterung bei unterschiedlichen Dosierungen von OA (Versuch 1)

Zeit (h)	Menge des aufgenommenen OA in mg /Tag				SE
	0	387	774	1161	
1	n.n ¹	10,3 ^A	18,7 ^{Aa}	32,9 ^{Ba}	1,6
4	n.n	10,5 ^A	19,2 ^{Aa}	37,6 ^{Bb}	1,6
7	n.n	11,6 ^A	25,9 ^{Bb}	43,6 ^{Cbc}	1,6
10	n.n	12,8 ^A	24,7 ^{Bab}	47,7 ^{Cc}	1,6
13	n.n	11,1 ^A	29,3 ^{Bc}	43,5 ^{Cbc}	1,6

A, B, C Mittelwerte mit unterschiedlichen Buchstaben innerhalb einer Zeile unterscheiden sich signifikant ($p > 0,05$)

a, b, c Mittelwerte mit unterschiedlichen Buchstaben innerhalb einer Spalte unterscheiden sich signifikant ($p > 0,05$)

¹ n.n. = nicht nachweisbar ($< 0,2$ ng/ml)

3.2.1.2 Konzentrationen von OA und O α im Blutserum (Versuch 1)

Die Konzentrationen von OA und O α im Blutserum sind in den Tabellen 15 bzw. 16 dargestellt. Vor der ersten Gabe von OA (Tag 1) konnte kein OA und O α im Blutserum nachgewiesen werden. Die Konzentrationen von OA im Blutserum stiegen nach Tag 1 bei allen Dosierungen an. Eine Dosisabhängigkeit der Serumwerte manifestierte sich zu jedem Zeitpunkt bis auf 9 h nach Fütterung. Signifikante Effekte der Dosis auf die O α -Konzentration im Blutserum konnten zwischen der höchsten und der niedrigsten OA-Dosierung an den Tagen 5, 9 und 23 ermittelt werden. Die übrigen Konzentrationsunterschiede zwischen den Dosierungen ließen sich aufgrund der geringen Konzentration von O α im Serum (ca. 1 ng/ml) nicht statistisch absichern. Die über den gesamten Versuchszeitraum gemittelten OA- und O α -Konzentrationen bei den vier Dosierungen betragen für OA 0, 5,3, 8,0 und 11,7 ng/ml und für O α 0, 0,6, 1,1 und 1,3 ng/ml. Die AUC als Maß für die systemische Verfügbarkeit von OA bzw. O α stiegen mit zunehmender Dosierung an. Signifikante Effekte der Dosierung konnten für die AUC von OA zwischen der höchsten und der niedrigsten Dosierung gefunden werden ($p > 0,05$). Auch die AUC von O α stieg mit zunehmender Dosierung von OA an, die Differenz war jedoch statistisch nicht signifikant.

Tabelle 15: Konzentrationen von OA (ng/ml) im Blutserum bei unterschiedlichen Dosierungen von OA (Versuch 1)

Zeit (d)	OA (mg /Tag)				SE
	0	387	774	1161	
1 ¹	n.n ²	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0,7
5	n.n	1,5 ^{Aa}	4,6 ^{Bb}	10,6 ^{Cb}	0,7
9	n.n	3,4 ^{ab}	6,0 ^{bc}	6,4 ^b	0,7
13	n.n	3,3 ^{Abab}	7,6 ^{Bcd}	12,8 ^{Bb}	0,7
23	n.n	6,0 ^{Ab}	9,4 ^{Abd}	18,2 ^{Bb}	0,7
29	n.n	3,9 ^{Aab}	12,5 ^{Be}	11,6 ^{Bb}	0,7
AUC³	-	102 ^A	196 ^{AB}	337 ^B	25,4

A, B, C Mittelwerte mit unterschiedlichen Buchstaben innerhalb einer Zeile unterscheiden sich signifikant ($p > 0,05$)

a, b, c, d, e Mittelwerte mit unterschiedlichen Buchstaben innerhalb einer Spalte unterscheiden sich signifikant ($p > 0,05$)

¹ Blutentnahme vor Applikation von OA, ² n.n. = nicht nachweisbar (<0,2 ng/ml),
³ AUC = area under the curve (ng*Tag/ml)

Tabelle 16: Konzentrationen von O_a (ng/ml) im Blutserum bei unterschiedlichen Dosierungen von OA (Versuch 1)

Zeit (d)	OA (mg /Tag)				SE
	0	387	774	1161	
1 ¹	n.n ²	0,0	0,0 ^a	0,0 ^a	0,2
5	n.n	0,5 ^A	0,9 ^{ABb}	1,4 ^{Bbc}	0,2
9	n.n	0,8 ^A	0,9 ^{ABb}	1,6 ^{Bc}	0,2
13	n.n	0,4	1,0 ^b	0,7 ^{ab}	0,2
23	n.n	0,6 ^A	1,0 ^{ABb}	1,3 ^{Bbc}	0,2
29	n.n	0,7	1,4 ^c	1,4 ^{bc}	0,2
AUC³	-	13,9	22,6	31,5	5,3

A, B, C Mittelwerte mit unterschiedlichen Buchstaben innerhalb einer Zeile unterscheiden sich signifikant ($p > 0,05$)

a, b, c Mittelwerte mit unterschiedlichen Buchstaben innerhalb einer Spalte unterscheiden sich signifikant ($p > 0,05$)

¹ Blutentnahme vor Applikation von OA, ² n.n. = nicht nachweisbar (<0,2 ng/ml)

3.2.1.3 Ausscheidung von OA und O α über Kot und Harn (Versuch 1)

Im Kot und Harn der mit OA behandelten Tiere wurden OA und O α in signifikanten Mengen gefunden. Mit zunehmender Dosierung von OA stieg dabei auch die Elimination von OA und O α über Kot und Harn an (Tabellen 17 und 18). Der Anteil des mit dem Urin ausgeschiedenen OA in % der aufgenommenen Menge von OA wurde bei allen Dosierungen in Form von O α ausgeschieden (36,3 - 55,7 %), während im Kot lediglich 16,2 bis 26,3 % in Form von O α ausgeschieden wurden. Eine signifikant höhere Ausscheidung von O α über den Kot von der höchsten im Vergleich zu den übrigen Dosierungen, ausgedrückt in % der aufgenommenen OA-Menge, führte zu einer entsprechend höheren Gesamtausscheidung von OA (in Form von OA und O α) über den Kot in der höchsten Dosierung im Vergleich zu den niedrigeren. Ebenso zeigte sich bei der höchsten Dosierung eine signifikant höhere Ausscheidung von OA über den Harn im Vergleich zu Dosierung 774 μ g OA/Tag.

Insgesamt wurde OA im Vergleich zu O α sowohl im Kot (1,5 - 2,5 % der aufgenommenen OA-Menge), als auch im Harn (6,0 - 8,9 % der aufgenommenen OA-Menge) in geringeren Mengen ausgeschieden. Die Gesamtexkretion via Kot und Harn lag einheitlich zwischen 74 und 79 % der OA-Aufnahme ($p > 0,05$). Zweiundzwanzig bis 26 % der aufgenommenen OA-Menge wurden nicht wiedergefunden.

Tabelle 17: Konzentrationen und Elimination von OA und O_a in mg über Kot und Harn bei unterschiedlichen OA-Aufnahmen (Versuch 1)

Konzentration von OA und O _a in Kot und Harn					
OA (mg /Tag)					
	0	387	774	1161	SE
Kot					
O _a , ng/g TM	n.n ¹	212,0 ^A	396,0 ^A	809,9 ^B	82,7
OA, ng/g TM	n.n	30,8 ^A	57,2 ^A	123,1 ^B	16,7
O _a , gesamt in mg	n.n	279,3 ^A	556,0 ^B	1357,9 ^C	144,6
OA, gesamt in mg	n.n	40,7 ^A	80,1 ^A	206,5 ^B	26,7
Harn					
O _a , ng/g TM	n.n	158,6 ^A	283,4 ^B	227,3 ^{AB}	37,5
OA, ng/g TM	n.n	28,4	48,4	113,0	25,9
O _a , gesamt in mg	n.n	958,8 ^A	1881,0 ^B	1875,6 ^B	325,6
OA, gesamt in mg	n.n	167,8 ^A	322,8 ^B	724,2 ^C	43,2

^{A, B, C} Mittelwerte mit unterschiedlichen Buchstaben innerhalb einer Zeile unterscheiden sich signifikant ($p > 0,05$)

¹ n.n. = nicht nachweisbar (< 0,2 ng/ml)

Tabelle 18: Elimination von OA und Oa in % des aufgenommenen Ochratoxin A, (Versuch 1)

	OA (mg /Tag)				SE
	0	387	774	1161	
Kot					
Oa	-	16,2 ^A	16,2 ^A	26,3 ^B	2,8
OA	-	1,5	1,5	2,5	0,4
Summe	-	17,7 ^A	17,6 ^A	28,8 ^B	3,1
Harn					
Oa	-	55,7	54,7	36,3	7,1
OA	-	6,2 ^{AB}	6,0 ^A	8,9 ^B	0,9
Summe	-	61,9	60,6	45,2	6,5
Kot +Harn	-	79,6	78,2	74,1	3,9

^{A, B,} Mittelwerte mit unterschiedlichen Buchstaben innerhalb einer Zeile unterscheiden sich signifikant ($p > 0,05$)

¹ Für die Berechnung der Ausscheidung von OA in % der aufgenommenen OA-Menge wurden die Konzentrationen von O α in OA-Äquivalente umgerechnet (siehe 3.1.7)

3.2.1.4 Nährstoffverdaulichkeiten und Passageparameter (Versuch 1)

Die Verdaulichkeiten der TM, OM, NDF und ADF waren jeweils bei der höchsten Dosierung signifikant niedriger ($p > 0,05$) als bei der Kontrollgruppe (Tabelle 19). Nur die Verdaulichkeit der Stärke blieb unbeeinflusst ($P > 0,05$).

Tabelle 19: Einfluss von Ochratoxin A auf die Verdaulichkeiten von Trockenmasse (TM), Organischer Masse (OM), Stärke und Zellwandfraktionen (Versuch 1)

Verdaulichkeiten (%)	OA (mg /Tag)				SE
	0	387	774	1161	
TM	77,3 ^A	75,1 ^{AB}	74,7 ^{AB}	71,0 ^B	1,4
OM	79,4 ^A	76,8 ^{AB}	76,9 ^{AB}	73,2 ^B	1,2
Stärke	99,6	99,6	97,6	98,1	0,8
NDF ¹	65,7 ^A	60,1 ^{AB}	60,8 ^{AB}	54,8 ^B	2,4
ADF ¹	58,8 ^A	53,1 ^{AB}	54,2 ^{AB}	46,4 ^B	3,8

^{A, B} Mittelwerte mit unterschiedlichen Buchstaben innerhalb einer Zeile unterscheiden sich signifikant ($p > 0,05$)

¹ NDF = Neutral-Detergenzien Faser, ADF = Säure-Detergenzien Faser

In Tabelle 20 sind die Parameter der Cr-EDTA-Passage dargestellt. Für die Passagerate aus dem 1. Kompartiment (L) und dem Reticulum (K) konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Dosierungen festgestellt werden. Die Verzögerung zwischen Applikation und dem ersten Auftreten des Markers im Kot (TD) war lediglich in der Kontrollgruppe signifikant höher als bei den übrigen Dosierungen ($p > 0,05$).

Tabelle 20: Passageraten von Cr-EDTA aus dem 1. Kompartiment (L), dem Retikulum (K) sowie Verzögerung Zwischen Applikation und erstem Auftreten des Markers im Kot (TD) (Versuch 1)

Parameter	OA-Aufnahme in mg/Tag				SE	Effekt (P<)
	0	387	774	1161		
L (h ⁻¹)	0,2302	0,1472	0,1883	0,1022	0,05	0,3275
K (h ⁻¹)	0,0350	0,0353	0,0236	0,0603	0,02	0,4092
TD (h)	19,8861 ^B	0,2866 ^A	12,2907 ^{AB}	0,0000 ^A	5,33	0,0675

^{A, B} Mittelwerte mit unterschiedlichen Buchstaben innerhalb einer Zeile unterscheiden sich signifikant ($p > 0,05$)

3.2.1.5 Zusammenfassung der Ergebnisse (Versuch 1)

Bei allen OA-Dosierungen wurde intaktes OA im Blutserum, Kot und Harn gefunden. Die Hydrolyse von OA zu O α und Phenylalanin in den Vormägen lief demnach nicht vollständig ab. Ein signifikanter Effekt der Dosierung konnte in der Pansenflüssigkeit, Blutserum, Kot und Harn gezeigt werden. Betrachtet man die Gesamtausscheidung von OA (in Form von OA und O α) so wurden bei allen Dosierungen einheitlich 74 bis 79 % der OA-Aufnahme (davon 7,5 – 11,4 % in Form von OA) eliminiert.

3.2.2 Einfluss der Rationszusammensetzung auf toxikokinetische Parameter von Ochratoxin A beim Schaf (Versuch 2)

3.2.2.1 Konzentrationen von OA und O α und pH-Werte in der Pansenflüssigkeit (Versuch 2)

Ein hoher KF-Anteil (70%) in der Ration gegenüber einem niedrigen KF-Anteil (30%) führte zu niedrigeren pH-Werten in der Pansenflüssigkeit (Tabelle 21).

Die Konzentrationen von OA im Pansensaft zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Fütterung sind in Tabelle 22 dargestellt. Die Erhöhung des KF-Anteiles in der Ration führte zu den Zeitpunkten 1, 4 und 7 Stunden nach der Fütterung zu höheren Konzentrationen von OA im Pansen ($p > 0,05$). Die AUC-Werte von OA stiegen mit höherem KF-Anteil in der Ration signifikant an ($p > 0,05$). Abbildung 3 zeigt die Halbwertszeiten des Verschwindens von OA aus der Pansenflüssigkeit bei den unterschiedlichen Rationszusammensetzungen. Die Ergebnisse zeigen, dass ein hoher KF-Anteil in der Ration zu einem verlangsamten Verschwinden von OA aus dem Pansen und damit zu einer verlängerten Verweildauer im Pansen geführt hat. Die O α -Konzentration im Pansen stieg bei beiden Rationszusammensetzungen mit zunehmenden Abstand vom Fütterungszeitpunkt an (Tabelle 23). Zehn und 13 Stunden nach der Fütterung kam es bei einem hohem im Vergleich zu einem niedrigen KF-Anteil zu signifikant höheren O α -Konzentrationen im Pansen. Die Flächen unter der Konzentrations-Zeit Kurve von O α stieg wie bei OA mit zunehmenden KF-Anteil in der Ration signifikant an ($p > 0,05$).

Tabelle 21: Einfluss eines unterschiedlichen Konzentratfutter (KF):Grobfutter (GF) – Verhältnisses auf die pH-Werte im Pansensaft zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Fütterung (Versuch 2)

Zeit (h)	KF : RF = 70 : 30		KF : RF = 30 : 70		SE
	940 mg OA/Tag	0 mg OA/Tag	940 mg OA/Tag	0 mg OA/Tag	
1	6,3 ^A	6,5 ^{AB}	6,6 ^B	6,6 ^B	0,1
4	6,0 ^A	6,2 ^A	6,5 ^B	6,6 ^B	0,1
7	6,4 ^{AB}	6,4 ^A	6,8 ^C	6,7 ^{BC}	0,1
10	6,6 ^A	6,6 ^A	6,9 ^B	6,8 ^{AB}	0,1
13	6,7 ^A	6,9 ^{AB}	6,9 ^{AB}	7,1 ^B	0,1

A, B, C Mittelwerte mit unterschiedlichen Buchstaben innerhalb einer Zeile unterscheiden sich signifikant ($p > 0,05$)

Tabelle 22: Einfluss eines unterschiedlichen Konzentratfutter (KF):Grobfutter (GF) – Verhältnisses auf die Konzentrationen von OA (ng/ml) im Pansensaft zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Fütterung (Versuch 2)

Zeit (h)	KF : RF = 70 : 30		KF : RF = 30 : 70		SE
	940 mg OA/Tag	0 mg OA/Tag	940 mg OA/Tag	0 mg OA/Tag	
1	26,1 ^{Ba}	n.n. ¹	18,6 ^{Aa}	n.n.	0,8
4	11,3 ^{Bb}	n.n.	5,2 ^{Ab}	n.n.	0,8
7	6,7 ^{Bc}	n.n.	0,2 ^{Ac}	n.n.	0,8
10	1,4 ^d	n.n.	0,1 ^c	n.n.	0,8
13	0,3 ^d	n.n.	0,2 ^c	n.n.	0,8
AUC¹	90,0 ^B	-	44,9 ^A	-	7,6

A, B Mittelwerte mit unterschiedlichen Buchstaben innerhalb einer Zeile unterscheiden sich signifikant ($p > 0,05$)

a, b, c, d Mittelwerte mit unterschiedlichen Buchstaben innerhalb einer Spalte unterscheiden sich signifikant ($p > 0,05$)

¹ n.n. = nicht nachweisbar (<0,2 ng/ml), AUC = area under the curve (ng*Tag/ml)

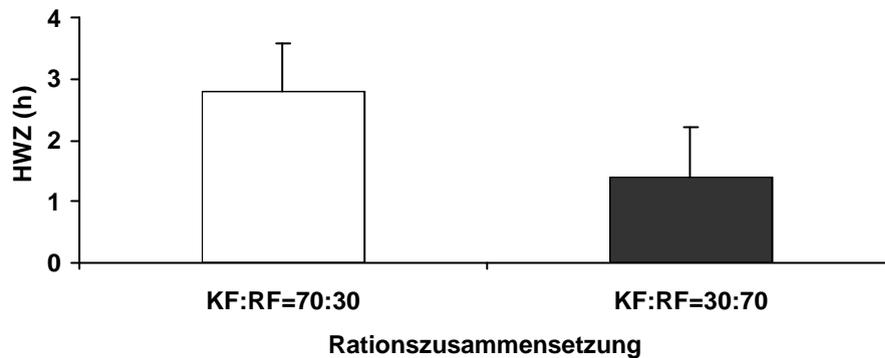


Abbildung 3: Einfluss eines unterschiedlichen Konzentratfutter (KF):Grobfutter (GF) – Verhältnisses auf die Halbwertszeiten (HWZ) von Ochratoxin A im Pansen bei einer OA-Aufnahme von 940 mg/Tag (Versuch 2)

Tabelle 23: Einfluss eines unterschiedlichen Konzentratfutter (KF):Grobfutter (GF) – Verhältnisses auf die Konzentrationen von Oa (ng/ml) im Pansensaft zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Fütterung (Versuch 2)

Zeit (h)	KF : RF = 70 : 30		KF : RF = 30 : 70		SE
	940 mg OA/Tag	0 mg OA/Tag	940 mg OA/Tag	0 mg OA/Tag	
1	11,7	n.n. ¹	9,7	n.n.	1,0
4	17,1	n.n.	15,6	n.n.	1,0
7	21,9	n.n.	20,9	n.n.	1,0
10	22,4 ^B	n.n.	18,0 ^A	n.n.	1,0
13	16,6 ^B	n.n.	13,6 ^A	n.n.	1,0
AUC*	223,1 ^B	-	198,7 ^A	-	4,9

^{A, B} Mittelwerte mit unterschiedlichen Buchstaben innerhalb einer Zeile unterscheiden sich signifikant ($p > 0,05$)

¹ n.n. = nicht nachweisbar (<0,2 ng/ml), ² AUC = area under the curve (ng *Tag/ml)

3.2.2.2 Einfluss der Rationszusammensetzung auf die Konzentrationen von OA und O α im Blutserum (Versuch 2)

Bei keiner der Rationen konnte zu Versuchsbeginn (Tag 1) im Blutserum weder OA noch O α nachgewiesen werden (Tabellen 24 und 25). Von Tag 5 bis Tag 29 stiegen die OA-Konzentrationen im Blutserum in der Gruppe mit hohem KF-Anteil von 5,1 bis auf 9,4 ng/ml an. In der Gruppe mit niedrigem KF-Anteil blieben die Konzentration zwischen 2,9 und 4,0 ng/ml immer niedriger, so dass sich mit zunehmender Versuchsdauer die Differenz zwischen den Behandlungen vergrößerte. Ab Tag 13 traten somit signifikant höhere OA-Konzentrationen im Blut bei der Gruppe mit hohem KF-Anteil im Vergleich zur Gruppe mit niedrigem KF-Anteil in der Ration auf (Tab. 24).

Tabelle 24: Einfluss eines unterschiedlichen Konzentratfutter (KF):Grobfutter (GF) – Verhältnisses auf die Konzentration von OA (ng/ml) im Blutserum (Versuch 2)

Zeit (Tage)	KF : RF = 70 : 30		KF : RF = 30 : 70		SE
	940 mg OA/Tag	0 mg OA/Tag	940 mg OA/Tag	0 mg OA/Tag	
1 ¹	0 ^a	n.n. ²	0 ^a	n.n.	0,7
5	5,1 ^b	n.n.	4,0 ^b	n.n.	0,7
9	4,3 ^b	n.n.	2,9 ^b	n.n.	0,7
13	5,7 ^{Bbc}	n.n.	3,4 ^{Ab}	n.n.	0,7
23	7,1 ^{Bc}	n.n.	3,8 ^{Ab}	n.n.	0,7
29	9,4 ^{Bd}	n.n.	3,8 ^{Ab}	n.n.	0,7
AUC³	165,0 ^B	n.n.	78,4 ^A	n.n.	15,2

^{A, B} Mittelwerte mit unterschiedlichen Buchstaben innerhalb einer Zeile unterscheiden sich signifikant ($p > 0,05$)

^{a, b, c, d} Mittelwerte mit unterschiedlichen Buchstaben innerhalb einer Spalte unterscheiden sich signifikant ($p > 0,05$)

¹ Blutentnahme vor Applikation von OA, ² n.n. = nicht nachweisbar (<0,2 ng/ml),
³ AUC = area under the curve (ng*Tag/ml)

An den Tagen 5 und 9 zeigten sich bei hohem KF-Anteil noch signifikant höhere O α -Konzentrationen im Blut als bei niedrigem KF-Anteil (Tabelle 25). Ab Tag 13 waren die O α -Konzentrationen im Blut jedoch bei beiden Rationszusammensetzungen ähnlich. Die AUC-Werte von OA und O α nahmen jeweils mit zunehmenden KF-Anteil in der Ration signifikant zu (Tabellen 24 und 25), wobei der Effekt für OA wesentlich deutlicher war.

Die durchschnittlichen OA-Konzentrationen im Blutserum der beiden Rationszusammensetzungen über den gesamten Zeitraum betragen für OA 6,3 bei hohem und 3,6 ng/ml bei niedrigem KF-Anteil. Die entsprechenden durchschnittlichen O α -Konzentrationen betragen 1,6 und 0,6 ng/ml.

Tabelle 25: Einfluss eines unterschiedlichen Konzentratfutter (KF):Grobfutter (GF) – Verhältnisses auf die Konzentration von O α (ng/ml) im Blutserum (Versuch 2)

Zeit (Tage)	KF : RF = 70 : 30		KF : RF = 30 : 70		SE
	940 mg OA/Tag	0 mg OA/Tag	940 mg OA/Tag	0 mg OA/Tag	
1 ¹	0 ^a	n.n. ²	0 ^a	n.n.	0,1
5	1,0 ^{Bbc}	n.n.	0,7 ^{Ab}	n.n.	0,1
9	1,3 ^{Bc}	n.n.	0,6 ^{Ab}	n.n.	0,1
13	1,3 ^c	n.n.	1,2 ^c	n.n.	0,1
23	1,1 ^{bc}	n.n.	1,1 ^c	n.n.	0,1
29	0,9 ^b	n.n.	0,8 ^b	n.n.	0,1
AUC³	28,0 ^B	n.n.	22,7 ^A	n.n.	1,1

A, B Mittelwerte mit unterschiedlichen Buchstaben innerhalb einer Zeile unterscheiden sich signifikant ($p > 0,05$)

a, b, c Mittelwerte mit unterschiedlichen Buchstaben innerhalb einer Spalte unterscheiden sich signifikant ($p > 0,05$)

¹ Blutentnahme vor Applikation von OA, ² n.n. = nicht nachweisbar (<0,2 ng/ml),

³ AUC = area under the curve (ng*Tag/ml)

3.2.2.3 Ausscheidung von OA und O α über Kot und Harn (Versuch 2)

In den Tabellen 26 und 27 ist die Ausscheidung von OA und O α über Kot und Harn dargestellt. Es zeigte sich, dass die Erhöhung des KF-Anteiles in der Ration zu einer signifikanten Erhöhung der O α -Ausscheidung in μg über den Kot und zu einer signifikanten Verminderung der O α -Ausscheidung in μg über den Harn führte. Die Ausscheidung von OA in μg über den Kot und den Harn blieb von der KF-Erhöhung unbeeinflusst. Wurde die Ausscheidung in % der aufgenommenen OA-Menge dargestellt, so zeigten sich dieselben Ergebnisse. Somit wurde bei hohem KF-Anteil in der Ration insgesamt signifikant mehr OA (in Form von OA und O α) über den Kot und signifikant weniger OA (in Form von OA und O α) über den Harn ausgeschieden als in der Gruppe mit niedrigem KF-Anteil (dargestellt in % der aufgenommenen Menge von OA). Betrachtet man die Gesamtausscheidung, so wurden einheitlich 78,3 – 81,1 % OA (in Form von OA und O α) der aufgenommenen OA-Menge über Kot und Harn eliminiert.

Tabelle 26: Einfluss eines unterschiedlichen Konzentrat (KF):Grobfutter (RF) – Verhältnisses auf die Elimination von OA und Oa in mg über Kot und Harn (Versuch 2)

Konzentration und Elimination von OA und Oa über Kot und Harn					
	KF : RF = 70 : 30		KF : RF = 30 : 70		SE
	940 mg OA/Tag	0 mg OA/Tag	940 mg OA/Tag	0 mg OA/Tag	
Kot					
Oa, ng/g TM	374,2 ^B	n.n. ¹	157,5 ^A	n.n.	10,6
OA, ng/g TM	32,0	n.n.	28,6	n.n.	5,5
Oa, gesamt in mg	843,8 ^B	n.n.	531,5 ^A	n.n.	14,5
OA, gesamt in mg	46,3	n.n.	63,0	n.n.	8,4
Harn					
Oa, ng/ml	109,9	n.n.	163,4	n.n.	28,0
OA, ng/ml	13,4	n.n.	12,5	n.n.	1,4
Oa, gesamt in mg	3349,4 ^A	n.n.	3976,8 ^B	n.n.	137,7
OA, gesamt in mg	274,3	n.n.	166,7	n.n.	47,5

^{A, B} Mittelwerte mit unterschiedlichen Buchstaben innerhalb einer Zeile unterscheiden sich signifikant ($p > 0,05$)

¹ n.n. = nicht nachweisbar ($< 0,2$ ng/ml)

Tabelle 27: Einfluss eines unterschiedlichen Konzentrat (KF):Grobfutter (RF) – Verhältnisses auf die Elimination von OA und Oa in % des aufgenommenen Ochratoxin A (Versuch 2)¹

	KF : RF = 70 : 30		KF : RF = 30 : 70		SE
	940 mg OA/Tag	0 mg OA/Tag	940 mg OA/Tag	0 mg OA/Tag	
Kot					
Oa	14,7 ^B	-	9,3 ^A	-	0,4
OA	0,8	-	1,1	-	0,2
Summe	15,5 ^B	-	10,4 ^A	-	0,5
Harn					
Oa	58,0 ^A	-	67,7 ^B	-	1,9
OA	4,8	-	3,0	-	0,8
Summe	62,8 ^A	-	70,7 ^B	-	1,8
Kot +Harn	78,3	-	81,1	-	1,8

^{A, B} Mittelwerte mit unterschiedlichen Buchstaben innerhalb einer Zeile unterscheiden sich signifikant ($p > 0,05$)

¹ Für die Berechnung der Ausscheidung von OA in % der aufgenommenen OA-Menge wurden die Konzentrationen von Oa in OA-Äquivalente umgerechnet (siehe 3.1.7)

3.2.2.4 Nährstoffverdaulichkeiten und Passageparameter (Versuch 2)

Ein hoher KF-Anteil in der Ration führte zu signifikant höheren Verdaulichkeiten der Trockenmasse, der organischen Masse und der Stärke. Ochratoxin A hatte bei beiden Rationen keinen Einfluss auf die Verdaulichkeitsparameter der Zellwandbestandteile (Tabelle 28).

Tabelle 28: Einfluss von Ochratoxin A (OA) auf die Verdaulichkeiten von Trockenmasse (TM), Organischer Masse (OM), Stärke und Zellwandfraktionen bei unterschiedlichen Konzentratfutter (KF):Grobfutter (GF) – Verhältnissen in der Ration (Versuch 2)

Verdaulichkeiten (%)	KF : RF = 70 : 30		KF : RF = 30 : 70		SE
	940 mg	0 mg	940 mg	0 mg	
	OA/Tag	OA/Tag	OA/Tag	OA/Tag	
TM	79,7 ^B	79,9 ^B	71,6 ^A	70,9 ^A	0,8
OM	82,0 ^B	82,5 ^B	73,1 ^A	72,1 ^A	0,8
Stärke	99,9 ^B	99,9 ^B	99,4 ^A	98,9 ^A	0,1
NDF ¹	70,5	71,2	69,2	66,8	1,4
ADF ¹	64,4	64,0	66,0	68,0	1,6

^{A, B} Mittelwerte mit unterschiedlichen Buchstaben in einer Zeile unterschieden sich signifikant ($p > 0,05$)

¹ NDF = Neutral-Detergenzien Faser, ADF = Säure-Detergenzien Faser

In Tabelle 29 sind die Parameter der Cr-EDTA-Passage dargestellt. Für die Passagerate aus dem ersten Kompartiment (L), dem Retikolorumen (K) und der Zeit bis zum ersten Auftreten des Markers im Kot (TD) war kein Effekt der Rationszusammensetzung ($p > 0,05$) und kein Effekt der Behandlung festzustellen.

Tabelle 29: Einfluss eines unterschiedlichen Konzentratfutter (KF):Grobfutter (GF) – Verhältnisses in der Ration auf die Passageraten von Cr-EDTA aus dem 1. Kompartiment (L), dem Retikolorum (K) sowie dem Zeitverzug bis zum ersten Auftreten des Markers im Kot (TD) (Versuch 2)

Parameter	KF : RF = 70 : 30		KF : RF = 30 : 70		SE	Effekt (P <)
	940 mg	0 mg	940 mg	0 mg		
	OA/Tag	OA/Tag	OA/Tag	OA/Tag		
L (h ⁻¹)	0,2043	0,3247	0,1913	0,8669	0,3113	0,3930
K (h ⁻¹)	0,0814	0,0871	0,0648	0,0581	0,0125	0,3396
TD (h)	5,5131	6,3878	4,1420	5,7885	0,8524	0,8524

3.2.2.5 Zusammenfassung der Ergebnisse (Versuch 2)

Ein hoher KF-Anteil in der Ration führte zu einer deutlichen Absekung des ruminalen pH-Werts und ging mit einer erhöhten Verweildauer von OA im Pansen einher. Die Absorption von OA aus dem Gastrointestinaltrakt wurde signifikant gesteigert. Bei hohem KF-Anteil wurde signifikant mehr $O\alpha$ über den Kot und signifikant weniger $O\alpha$ über den Harn ausgeschieden.

3.2.3 Einfluss des Ernährungsniveaus auf toxikokinetische Parameter von Ochratoxin A beim Schaf (Versuch 3)

3.2.3.1 OA- und O_a -Konzentrationen und pH-Werte in der Pansenflüssigkeit (Versuch 3)

In Periode 2 trat bei einem Tier am Tag 13 starker Durchfall und Fressunlust auf. Das Tier wurde deshalb aus dem Versuch genommen und ab Tag 15 von der statistischen Analyse ausgeschlossen. Die übrigen Tiere zeigten keinerlei Krankheitssymptome.

In Tabelle 30 ist der Einfluss des Fütterungsniveaus und der OA-Dosis auf die ruminalen pH-Werte dargestellt. Eine Erhöhung des Fütterungsniveaus führte zum einen bei der Kontrollgruppe zu den Zeitpunkten 4, 7 und 10 Stunden nach Fütterung, zum anderen bei der Dosierung 743 μg OA/Tag zu den Zeitpunkten 1, 4 und 13 und bei der Dosierung 1069 μg OA/Tag zum Zeitpunkt 10 Stunden nach Fütterung zu einer signifikanten Erhöhung des pH-Wertes der Pansenflüssigkeit. Ein Effekt der Dosis konnte nicht gezeigt werden.

Tabelle 30: Einfluss des Fütterungsniveaus und der OA-Dosis auf die pH-Werte in der Pansenflüssigkeit (Versuch 3)

Zeit (h) nach Fütterungsbeginn			1	4	7	10	13	
OA-Aufnahme (mg/Tag)	0	Fütterungsniveau	1,0 x Erh ¹⁾	6,3	6,0 ^A	6,2 ^A	6,3 ^A	7,0
			1,7 x Erh	6,6	6,5 ^B	6,9 ^B	6,8 ^B	7,0
	374		1,0 x Erh	6,5	6,5	6,4	6,7	6,8
			1,7 x Erh	6,4	6,4	6,5	6,8	7,1
	743		1,0 x Erh	6,2 ^A	6,0 ^A	6,2	6,5	6,6 ^A
			1,7 x Erh	6,6 ^B	6,4 ^B	6,3	6,8	7,0 ^B
	1069		1,0 x Erh	6,4	6,2	6,5	6,7 ^A	6,7
			1,7 x Erh	6,5	6,5	6,8	7,1 ^B	7,0
SE			0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	
Effekt	Dosis		0,9969	0,0650	0,0169	0,0591	0,5281	
(P <)	FA ²⁾		0,0541	0,0015	0,0026	0,0005	0,0059	
	Dosis x FA		0,3617	0,0019	0,0032	0,0021	0,0562	

A, B Mittelwerte mit unterschiedlichen Buchstaben in einer Spalte innerhalb einer OA-Dosierung unterscheiden sich signifikant ($p < 0,05$)

¹ Erh = Erhaltung, ² FA = Futteraufnahme

Tabellen 31 zeigt den Einfluss des Fütterungsniveaus und der OA-Dosis auf die Konzentrationen von OA und O α im Pansen zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Fütterung. Lediglich bei der höchsten Dosierung führte das erhöhte Fütterungsniveau zu den Zeitpunkten 1 und 4 Stunden nach Fütterung zu signifikant niedrigeren Konzentrationen von OA im Pansen. Innerhalb aller Dosierungen kam es zu einem ähnlichen Verschwinden von OA. Bei beiden Fütterungsniveaus und allen Dosierungen konnten zu den Zeitpunkten 1 und 4 Stunden nach Fütterung signifikante Effekte der Dosis und Dosis x Fütterungsniveau Interaktionen gezeigt werden. Die Halbwertszeiten von OA blieben vom Fütterungsniveau unbeeinflusst.

Tabelle 31: Einfluss unterschiedlicher Fütterungsniveaus und der OA-Dosis auf die Konzentrationen von OA in der Pansenflüssigkeit (Versuch 3)

Zeit (h)		nach	1	4	7	10	13	AUC ¹	HWZ ²	
Fütterungsbeginn										
OA-Aufnahme (mg/Tag)	0	Fütterungsniveau	1,0 x Erh ³	n.n. ⁴	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	-	-
			1,7 x Erh	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	-	-
	374	Fütterungsniveau	1,0 x Erh	9,9 ^b	5,5 ^{ab}	4,6 ^{ab}	2,7 ^a	2,3 ^a	56,6	3,9
			1,7 x Erh	8,6 ^b	5,5 ^b	0,5 ^a	0,6 ^a	0,6 ^a	34,9	2,3
	743	Fütterungsniveau	1,0 x Erh	22,9 ^c	10,7 ^b	5,5 ^{ab}	1,4 ^a	0,0 ^a	87,6	1,9
			1,7 x Erh	16,9 ^c	8,4 ^b	1,9 ^a	1,2 ^a	0,7 ^a	60,9	1,8
	1069	Fütterungsniveau	1,0 x Erh	35,4 ^{Bc}	19,6 ^{Bb}	2,8 ^a	1,1 ^a	0,0 ^a	123,5	2,1
			1,7 x Erh	21,5 ^{Ac}	12,4 ^{Ab}	3,1 ^a	3,2 ^a	0,6 ^a	89,1	2,5
SE			1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	27,0	1,4	
Effekt	Dosis		0,0001	0,0001	0,7278	0,9358	0,9745	0,0234	0,7280	
(P <)	FA⁵		0,0255	0,3041	0,4315	0,9880	0,9644	0,3190	0,6995	
	Dosis x FA		0,0001	0,0011	0,9007	0,9964	0,9997	0,6275	0,7439	

A, B Mittelwerte mit unterschiedlichen Buchstaben in einer Spalte innerhalb einer OA-Dosierung unterscheiden sich signifikant ($p < 0,05$)

a, b, c Mittelwerte mit unterschiedlichen Buchstaben in einer Zeile unterscheiden sich signifikant ($p < 0,05$)

¹ AUC = area under the curve (ng x Tag/ml), ² HWZ = Halbwertszeit, ³ Erh = Erhaltung, ⁴ n.n. = nicht nachweisbar (< 0,2 ng/ml), ⁵ FA = Futteraufnahme

Für die entsprechenden O α -Konzentration im Pansen (Tabelle 32) konnte innerhalb der Dosierungen 743 und 1069 μg OA/Tag ein Effekt des Fütterungsniveau gezeigt werden. Eine Erhöhung der Futteraufnahme führte bei der Dosierung von 743 μg OA/Tag zu allen Zeitpunkten bis auf 4 Stunden nach Fütterung und bei der Dosierung von 1069 μg OA/Tag zu den Zeitpunkten 7 und 10 Stunden nach Fütterung zu einer signifikanten Senkung der O α -Konzentration im Pansen. Bei beiden Fütterungsniveaus und allen Dosierungen konnten zu allen Zeitpunkten signifikante Effekte der Dosis und Dosis x Futteraufnahme Interaktionen gezeigt werden. Die Flächen unter der Konzentrations-Zeit Kurve von O α nahmen bei diesen Dosierungen mit zunehmenden Fütterungsniveau signifikant ab. Bei

einer Dosierung von 374 μg OA/Tag konnten keine Effekte des Fütterungsniveaus auf die pH-Werte, OA- und O α -Konzentration und die entsprechenden AUC gezeigt werden.

Tabelle 32: Einfluss unterschiedlicher Fütterungsniveaus und der OA-Dosis auf die Konzentrationen von O α in der Pansenflüssigkeit (Versuch 3)

Zeit (h) nach Fütterungsbeginn			1	4	7	10	13	AUC ¹	
OA-Aufnahme (mg/Tag)	0	Fütterungsniveau	1,0 x Erh ²	n.n. ³	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	-
			1,7 x Erh	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	-
	374		1,0 x Erh	14,1	8,3	17,2	14,9	10,7	158,3
			1,7 x Erh	7,4	7,9	8,6	9,8	8,9	103,4
	743		1,0 x Erh	30,9 ^{Ba}	29,1 ^a	35,4 ^{Bab}	39,1 ^{Bb}	31,9 ^{Ba}	405,2 ^B
			1,7 x Erh	16,6 ^A	18,3	17,4 ^A	17,0 ^A	17,0 ^A	208,6 ^A
	1069		1,0 x Erh	38,0 ^a	46,9 ^{ab}	55,0 ^{Bc}	48,6 ^{Bb}	39,6 ^a	544,9 ^B
			1,7 x Erh	28,2 ^a	39,3 ^b	32,5 ^{Aa}	34,8 ^{Aab}	42,1 ^b	448,1 ^A
SE			1,7	1,7	1,7	1,7	1,7	27,0	
Effekt	Dosis		0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	
(P <)	FA ⁴		0,0263	0,7915	0,0005	0,0034	0,3050	0,0201	
	Dosis x FA		0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,2077	

^{A, B} Mittelwerte mit unterschiedlichen Buchstaben in einer Spalte innerhalb einer OA-Dosierung unterscheiden sich signifikant ($p < 0,05$)

^{a, b, c} Mittelwerte mit unterschiedlichen Buchstaben in einer Zeile unterscheiden sich signifikant ($p < 0,05$)

¹ AUC = area under the curve (ng x Tag/ml), ² Erh = Erhaltung, ³ n.n. = nicht nachweisbar ($< 0,2$ ng/ml), ⁴ FA = Futteraufnahme

3.2.3.3 Konzentrationen von OA und O α im Blutserum (Versuch 3)

Der Einfluss des Fütterungsniveaus und der OA-Dosis auf die OA-Konzentrationen im Blutserum ist in Tabelle 33 dargestellt. Vor der ersten Fütterung von kontaminiertem Weizen (Tag 1) war bei keiner Dosierung OA nachweisbar. Bei der Dosierung von 374 μg OA/Tag konnte, wie bereits im Pansen, kein Effekt der Futteraufnahme auf die Konzentration von OA sowie auf die entsprechende AUC im Blut festgestellt werden. Die Erhöhung des Fütterungsniveaus führte bei der Dosierung von 743 μg OA/Tag an den

Tagen 5 und 9 zu einer signifikanten Senkung der OA-Konzentration, während bei der Dosierung von 1069 μg OA/Tag die Futteraufnahmeerhöhung an denselben Tagen zu einer signifikanten Erhöhung der Konzentration von OA im Blut führte. Entsprechend kam es durch Steigerung der Futteraufnahme innerhalb der Dosierung 743 μg OA/Tag zu einer signifikanten Abnahme und innerhalb der Dosierung 1069 μg OA/Tag zu einer signifikanten Zunahme der Fläche unter der Konzentrations-Zeit Kurve. Die durchschnittlichen OA-Konzentrationen bei den vier Dosierungen über den gesamten Zeitraum betragen bei niedrigem Fütterungsniveau 0, 1,9, 7,5 und 4,9 ng/ml und bei hohem Fütterungsniveau 0, 2,2, 5,6 und 7,8 ng/ml. Signifikante Effekte der Dosierung konnten an den Tagen 5, 9, 13 und 23 festgestellt werden.

Tabelle 33: Einfluss unterschiedlicher Fütterungsniveaus auf die Konzentrationen von OA im Blutserum (Versuch 3)

Zeit (h) nach Fütterungsbeginn			1 ¹	5	9	13	23	AUC ²		
OA-Aufnahme (mg/Tag)	0	Fütterungsniveau	1,0 x Erh ³	n.n. ⁴	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	-	
			1,7 x Erh	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	-	
	374		1,0 x Erh	0,0 ^a	2,3 ^b	1,8 ^{ab}	2,4 ^b	0,9 ^{ab}	46,6	
			1,7 x Erh	0,0 ^a	1,9 ^b	2,5 ^b	2,8 ^b	1,5 ^b	60,6	
	743		1,0 x Erh	0,0 ^a	10,8 ^{Bc}	8,8 ^{Bbc}	5,8 ^{bc}	4,7 ^b	153,5 ^B	
			1,7 x Erh	0,0 ^a	3,7 ^{Ab}	3,9 ^{Ab}	3,6 ^b	4,3 ^b	81,2 ^A	
	1069		1,0 x Erh	0,0 ^a	4,7 ^{Ab}	4,6 ^{Ab}	5,8 ^b	4,5 ^b	114,0 ^A	
			1,7 x Erh	0,0 ^a	9,6 ^{Bc}	9,7 ^{Bc}	7,4 ^c	4,5 ^b	165,3 ^B	
	SE			1,4	1,4	1,4	1,4	1,5	21,8	
	Effekt		Dosis		0,9891	0,0001	0,0001	0,0001	0,0009	0,0008
	(P <)		FA⁵		1,0000	0,4822	0,7998	0,9572	0,9628	0,9123
			Dosis x FA		1,0000	0,0001	0,0001	0,0006	0,0178	0,1080

A, B Mittelwerte mit unterschiedlichen Buchstaben in einer Spalte innerhalb einer OA-Dosierung unterscheiden sich signifikant ($p < 0,05$)

a, b, c Mittelwerte mit unterschiedlichen Buchstaben in einer Zeile unterscheiden sich signifikant ($p < 0,05$)

¹ Blutentnahme vor der Applikation von OA, ² AUC = area under the curve (ng x Tag/ml), ³Erh = Erhaltung, ⁴ n.n. = nicht nachweisbar ($< 0,2$ ng/ml),

⁵ FA = Futteraufnahme

Bei den korrespondierenden $O\alpha$ -Konzentrationen im Blut (Tabelle 34) ergaben sich, bei der Dosierung von 743 μg OA/Tag an allen Tagen und bei der Dosierung von 1069 mg OA/Tag an den Tagen 5 und 9 bei niedrigem Ernährungsniveau signifikant höhere Konzentrationen von $O\alpha$ als bei hohem Fütterungsniveau. Der jeweilige AUC-Wert für $O\alpha$ war ebenfalls innerhalb dieser Dosierungen bei niedrigem Fütterungsniveau signifikant höher als bei hohem Fütterungsniveau. Die durchschnittlichen $O\alpha$ -Konzentrationen über den gesamten Zeitraum betragen 0, 0,9, 1,7 und 2,0 ng/ml bei niedrigem und 0, 0,6, 1,0 und 1,7 ng/ml bei hohem Fütterungsniveau.

Tabelle 34: Einfluss unterschiedlicher Fütterungsniveaus auf die Konzentrationen von $O\alpha$ im Blutserum (Versuch 3)

Zeit (h) nach Fütterungsbeginn			1 ¹	5	9	13	23	AUC ²	
OA-Aufnahme (mg/Tag)	0	Fütterungsniveau	1,0 x Erh ³	n.n. ⁴	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	-
			1,7 x Erh	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	-
	374		1,0 x Erh	0,0 ^a	0,8 ^b	0,8 ^b	0,8 ^b	0,6 ^b	15,4
			1,7 x Erh	0,0 ^a	0,8 ^b	0,5 ^b	0,6 ^b	0,5 ^b	11,8
	743		1,0 x Erh	0,0 ^a	2,1 ^{Bc}	1,8 ^{Bb}	1,5 ^{Bb}	1,4 ^{Bb}	33,6 ^B
			1,7 x Erh	0,0 ^a	1,0 ^{Ab}	0,9 ^{Ab}	1,0 ^{Ab}	1,0 ^{Ab}	20,3 ^A
	1069	1,0 x Erh	0,0 ^a	2,3 ^{Bc}	2,3 ^{Bc}	1,7 ^b	1,8 ^b	40,2 ^A	
		1,7 x Erh	0,0 ^a	1,8 ^{Ab}	1,5 ^{Ab}	1,5 ^{ab}	1,8 ^{ab}	32,1 ^B	
	SE			0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	1,5
	Effekt	Dosis		0,9878	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001
(P <)	FA ⁵		1,0000	0,0001	0,0001	0,0027	0,0083	0,0004	
	Dosis x FA		1,0000	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0118	

A, B Mittelwerte mit unterschiedlichen Buchstaben in einer Spalte innerhalb einer OA-Dosierung unterscheiden sich signifikant ($p < 0,05$)

a, b, c Mittelwerte mit unterschiedlichen Buchstaben in einer Zeile unterscheiden sich signifikant ($p < 0,05$)

¹ Blutentnahme vor der Applikation von OA, ² AUC = area under the curve (ng x Tag/ml), ³ Erh = Erhaltung, ⁴ n.n. = nicht nachweisbar ($< 0,2$ ng/ml),

⁵ FA = Futtermittelaufnahme

3.2.3.3 Ausscheidung von OA und O α über Kot und Harn (Versuch 3)

Der Einfluss des Fütterungsniveaus und der OA-Dosis auf die Ausscheidung von OA und O α in μg und in % der aufgenommenen Menge über Kot und Harn sind in den Tabellen 35 und 36 dargestellt. Das höhere Fütterungsniveau führte im Vergleich zum niedrigen innerhalb aller Dosierungen zu einer gesteigerten Ausscheidung von OA und O α über den Kot in % der OA-Aufnahme. Die Ausscheidung von OA und O α in % der OA-Aufnahme über den Harn wurde nicht durch das Fütterungsniveau beeinflusst. Lediglich innerhalb der höchsten Dosierung führte ein höheres Fütterungsniveau zu einer signifikant niedrigeren Ausscheidung von O α in μg . Die Summe der Ausscheidung von OA und O α über den Harn in % der OA-Aufnahme blieb vom Fütterungsniveau unbeeinflusst. Die Gesamtausscheidung von OA und O α über Kot und Harn lag einheitlich zwischen 66,8 und 71,9 % der OA-Aufnahme und zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den Fütterungsniveaus ($p > 0,05$). Bei der Ausscheidung von OA und O α über den Harn und von O α über den Kot (in μg und in % der OA-Aufnahme) zeigten sich signifikante Dosiseffekte.

Tabelle 35: Einfluss des Fütterungsniveaus auf die Ausscheidung von OA und Oa in mg über Kot und Harn (Versuch 3)

			Kot		Harn		
			Oa in mg	OA in mg	Oa in mg	OA in mg	
OA-Aufnahme (mg/Tag)	0,0	Fütterungsniveau	1,0 x Erh ²	n.n. ¹	n.n.	n.n.	n.n.
			1,7 x Erh	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
	374	Fütterungsniveau	1,0 x Erh	319,5	19,7 ^A	1215,9	90,7
			1,7 x Erh	480,0	44,6 ^B	1100,5	108,3
	743	Fütterungsniveau	1,0 x Erh	531,3 ^A	14, ^{8Ac}	2765,2	248,3
			1,7 x Erh	1026,7 ^B	79,0 ^B	2215,1	208,5
	1069	Fütterungsniveau	1,0 x Erh	867,8	24,0 ^c	3921,6 ^B	500,3
			1,7 x Erh	1181,7	59,5 ^{Ab}	2887,1 ^A	335,3
	SE			120,1	11,0	380,5	107,1
	Effekt	Dosis		0,0001	0,9331	0,0001	0,0115
	(P <)	FA³		0,0212	0,0004	0,0623	0,6989
		Dosis x FA		0,2182	0,5527	0,2685	0,7014

A, B Mittelwerte mit unterschiedlichen Buchstaben innerhalb einer Dosierung in einer Spalte unterscheiden sich signifikant ($p < 0,05$)

¹ n.n. = nicht nachgewiesen (< 0,2 ng/ml), ² Erh = erhaltung, ³ FA = Futteraufnahme

Tabelle 36: Einfluss des Fütterungsniveaus auf die Ausscheidung von OA und Oa über Kot und Harn in % der OA-Aufnahme (Versuch 3)

			Kot			Harn			Kot +	
			Oa	OA	Summe	Oa	OA	Summe	Harn	
OA-Aufnahme (mg/Tag)	0,0	Fütterungsniveau	1,0 x Erh ²	-	-	-	-	-	-	
			1,7 x Erh	-	-	-	-	-	-	
	374	Fütterungsniveau	1,0 x Erh	13,6 ^A	0,7 ^A	14,3 ^A	44,8	7,7	52,5	66,8
			1,7 x Erh	19,3 ^B	1,8 ^B	21,1 ^B	43,2	4,3	47,5	68,6
	743	Fütterungsniveau	1,0 x Erh	10,5 ^A	0,3 ^A	10,8 ^A	54,8	4,1	58,9	69,7
			1,7 x Erh	19,6 ^B	1,5 ^B	21,1 ^B	44,1	4,8	48,9	70,0
	1069	Fütterungsniveau	1,0 x Erh	12,0 ^A	0,3 ^A	12,3 ^A	52,6	7,0	59,6	71,9
			1,7 x Erh	17,3 ^B	1,0 ^B	18,3 ^B	45,6	5,3	50,9	69,3
SE			2,8	1,3	3,0	8,2	2,6	8,2	7,8	
Effekt	Dosis		0,0031	0,0005	0,0021	0,0003	0,0766	0,0002	0,0001	
(P <)	FA³		0,0005	0,0003	0,0006	0,3270	0,4988	0,2290	0,9073	
	Dosis x FA		0,0134	0,0293	0,0493	0,8350	0,7902	0,8651	0,9516	

A, B Mittelwerte mit unterschiedlichen Buchstaben innerhalb einer Dosierung in einer Spalte unterscheiden sich signifikant ($p < 0,05$)

¹ Für die Berechnung der Ausscheidung von OA in % der aufgenommenen OA-Menge wurden die Konzentrationen von Oa in OA-Äquivalente umgerechnet (siehe 3.1.7), ² Erh = Erhaltung, ³ FA = Futteraufnahme

3.2.3.4 Nährstoffverdaulichkeiten und Passageparameter (Versuch 3)

In Tabelle 37 ist der Einfluss des Fütterungsniveaus und der unterschiedlichen Dosierungen auf die Verdaulichkeiten von TM, OM, Stärke und Zellwandfraktionen dargestellt. Bei niedrigem Fütterungsniveau zeigten sich bei den Dosierungen von 0, 743 und 1069 µg OA/Tag signifikant höhere Verdaulichkeiten der TM und der OM. Bei einer OA-Aufnahme von 1069 µg OA/Tag ergab sich beim hohen Fütterungsniveau zusätzlich eine signifikante Abnahme der NDF-Verdaulichkeit. Dosiseffekte konnten nicht gezeigt werden.

Tabelle 37: Einfluss des Fütterungsniveaus und der OA-Dosis auf die Verdaulichkeit von Trockenmasse (TM), organischer Masse (OM) Stärke und Zellwandfraktionen (Versuch 3)

Parameter			TM	OM	Stärke	ADF ²	NDF ³	
OA-Aufnahme (mg/Tag)	0,0	Fütterungsniveau	1,0 x Erh ¹	80,7 ^B	84,4 ^B	99,9	64,1	70,8
			1,7 x Erh	73,6 ^A	74,8 ^A	98,2	59,0	63,6
	374		1,0 x Erh	78,8	82,4	99,9	60,4	68,8
			1,7 x Erh	76,0	77,5	98,2	59,1	65,0
	743		1,0 x Erh	80,8 ^B	84,5 ^B	99,9	63,7	72,2
			1,7 x Erh	75,9 ^A	77,2 ^A	99,4	59,1	65,4
	1069		1,0 x Erh	79,6	83,8 ^B	99,9	64,2	72,7 ^B
			1,7 x Erh	76,2	77,6 ^A	98,0	60,1	64,9 ^A
SE			2,2	2,2	0,8	4,1	3,8	
Effekt (P <)	Dosis		0,9499	0,9331	0,6550	0,9135	0,9154	
	FA ⁴		0,0036	0,0004	0,0181	0,1503	0,139	
	Dosis x FA		0,5392	0,5527	0,6880	0,9358	0,8841	

^{A, B} Mittelwerte mit unterschiedlichen Buchstaben in einer Spalte innerhalb einer OA-Aufnahme unterscheiden sich signifikant ($p < 0,05$)

¹ Erh = Erhaltung, ² ADF = Säure-Detergenzienfaser, ³ NDF = Neutral-Detergenzienfaser, ⁴ FA = Futteraufnahme

Sowohl für die Ingesta-Passage aus dem 1. Kompartiment (L) als auch aus dem Retikulum (K) konnte jeweils eine höhere Passagerate bei höherem im Vergleich zum niedrigem Fütterungsniveau ermittelt werden. Statistisch signifikant war der Unterschied für die Passage aus dem Retikulum zwischen den Fütterungsniveaus aber nur bei den Dosierungen 743 und 1069 $\mu\text{g}/\text{Tag}$. Die Passageraten aus dem 1. Kompartiment waren jeweils innerhalb der Dosierungen 374 und 743 $\mu\text{g OA}/\text{kg LM}$ bei höherem Fütterungsniveau signifikant höher als bei niedrigem Fütterungsniveau. Die Zeit bis zum ersten Auftreten des Markers im Kot war länger, wenn die Tiere auf niedrigem Niveau gefüttert wurden. Statistisch konnten diese Werte aber nicht abgesichert werden. Dosiseffekte konnten nicht gezeigt werden.

Tabelle 38: Einfluss unterschiedlicher Fütterungsniveaus auf die Passageraten aus dem 1. Kompartiment (L) und dem Reticulorum (K) sowie Zeitverzug bis zum ersten Auftreten des Markers im Kot (TD) (Versuch 3)

Parameter			L (h^{-1})	K (h^{-1})	TD (h)
OA-Aufnahme (mg/Tag)	0,0	1,0 x Erh ¹	0,3516 ^A	0,0283	12,3773
		1,7 x Erh	1,0228 ^B	0,0452	6,5562
	374	1,0 x Erh	0,1217 ^A	0,0465	8,5361
		1,7 x Erh	0,7862 ^B	0,0562	6,1828
	743	1,0 x Erh	0,0909 ^A	0,0523 ^A	2,8121
		1,7 x Erh	0,7221 ^B	0,0983 ^B	2,4751
	1069	1,0 x Erh	0,0942	0,0596 ^A	2,4302
		1,7 x Erh	1,0707	0,1308 ^B	1,7606
SE			0,4	0,4	0,4
Effekt	Dosis		0,5319	0,1403	0,2450
(P <)	FA ²		0,0488	0,0704	0,7518
	Dosis x FA		0,7073	0,2901	0,5302

^{A, B} Mittelwerte mit unterschiedlichen Buchstaben in einer Spalte innerhalb einer OA-Aufnahme unterscheiden sich signifikant ($p < 0,05$)

¹ Erh = Erhaltung, ² FA = Futteraufnahme

3.2.3.5 Zusammenfassung der Ergebnisse (Versuch 3)

Eine Steigerung des Fütterungsniveaus führte zu einer erhöhten Passagerate aus dem Reticulorumen und zu einer signifikant höheren Elimination von OA und O α über den Kot. Die Dosis von OA beeinflusste innerhalb beider Fütterungsniveaus die OA-Konzentrationen in der Pansenflüssigkeit, Blutserum, Kot und Harn signifikant.

4 Diskussion

Allgemein gilt der Wiederkäuer aufgrund der umfangreichen Hydrolyse von OA zum weniger toxischen Metaboliten O α und Phenylalanin als weitestgehend resistent gegenüber akut toxischen Effekten von OA. Die Verfütterung von OA-kontaminiertem Futter an Wiederkäuer stellt grundsätzlich eine interessante Möglichkeit dar, OA-kontaminierte Futtermittel zu nutzen und OA aus der Nahrungskette zu entfernen. Das Ausmaß der Hydrolyse von OA zu O α und Phenylalanin beim Wiederkäuer wurde bereits in mehreren *In vitro*-Untersuchungen mit Pansenflüssigkeit von Kühen und Schafen untersucht. KIESSLING et al. (1984) leiteten aus einer solchen Untersuchung mit Pansenflüssigkeit ab, dass Wiederkäuer 5 - 12 mg OA/kg Futter zu O α und Phenylalanin abbauen können. MÜLLER (1995) ermittelte in einer ähnlichen Studie eine Abbaukapazität von 33 - 72 mg OA/Tag für Milchkühe und 3 - 7 mg OA/Tag für Schafe. In einer *In vivo* - Untersuchung von HÖHLER et al. (1999) wiesen die Autoren jedoch bereits bei einer täglichen Aufnahme von ca. 1,5 mg OA intaktes OA im Blutserum nach. Bei der doppelten Dosierung stiegen die gemessenen Plasmakonzentrationen bereits auf das 6- bis 10-fache an. Diese erheblichen Unterschiede in den Ergebnissen zwischen *In vitro* - und *In vivo* - Untersuchungen könnten darauf beruhen, dass *in vitro* nur der reine hydrolytische Abbau von OA zu O α und Phenylalanin erfasst wurde. *In vivo* könnten jedoch neben dem Abbau auch die Absorption und die Passagegeschwindigkeit auf das Verschwinden von OA aus den Vormägen einen Einfluss haben. Dies wird im Folgenden anhand der Ergebnisse der eigenen Untersuchungen und anhand von Ergebnissen aus der Literatur diskutiert.

Der Abbau von OA in den Vormägen erfolgt nach KIESSLING et al. (1984) v.a. durch die Protozoen (ca. 88 %) und zu geringerem Anteil durch Bakterien (ca. 12 %). Die Zahl und Aktivität der Protozoen wird nicht nur durch Tierfaktoren (z.B. Alter, Rasse, Leistung), sondern auch durch Umweltfaktoren beeinflusst, zu denen neben der Jahreszeit und der vorhandenen Artengemeinschaft im wesentlichen die Fütterungsfaktoren zählen (Müller 1995). Vor allem der Gehalt leicht fermentierbarer Kohlenhydrate bestimmt die Protozoenpopulation. Nach DENNIS et al. (1983) führt die Zugabe von Konzentratfutter (Getreide) bis zu 70% zum Grundfutter zu einer Erhöhung der Protozoenmenge. Ebenso stellt die Kohlenhydratquelle einen Einflussfaktor dar. Nach ABE und IRIKI (1978) hatte ein Zuckerzusatz einen größeren Effekt auf den Anstieg der Protozoenpopulation als Stärke. Cellulose zeigte keinen Effekt. MÜLLER et al. (1998) ermittelten in einer *In vitro* - Untersuchung verkürzte Halbwertszeiten von OA in der Pansenflüssigkeit, wenn Heu oder Grassilage durch Frischgras ersetzt wurden und der Konzentratfutteranteil in der Ration von 10 auf 50 % erhöht wurde. In Versuch 2 der vorliegenden Untersuchung zeigte sich jedoch, dass es durch die Steigerung des KF-Anteils in der Ration zu einer erhöhten Verweildauer von OA im Pansen kam, die mit einer deutlichen Absenkung des ruminalen pH-Wertes einherging. Diese unterschiedlichen Befunde lassen sich möglicherweise mit Unterschieden in der Ration und den damit verbundenen Fermentationsprozessen erklären. Durch die rasche Fermentation von Stärke kommt es zu einer Senkung des pH-Wertes, der sich negativ auf die pH-sensitiven Protozoen auswirken kann. Nach EADIE und MANN (1970) konnten keine Protozoen im Pansensaft von Bullen und Färsen nachgewiesen werden, wenn die Ration nur aus Kraftfutter bestand. Die Autoren führten es auf die niedrigen pH-Werte (< 6,0) zurück. XIAO et al. (1991a, b) fanden eine 4,3-fach höhere Bioverfügbarkeit von OA bei nur mit Kraftfutter gefütterten Schafen (ruminaler pH-Wert von 5,7) im Vergleich zu nur mit Heu gefütterten Schafen (ruminaler pH-Wert von 7,1). Der ruminale Abbau von OA über den Tagesverlauf ist nicht konstant. Nach KIESSLING et al. (1984) ist die OA-Hydrolyse im Pansen unmittelbar vor der Fütterung am höchsten, die niedrigste ergab sich eine Stunde nach Fütterung. Später stieg die Hydrolysekapazität wieder bis zum nächsten Fütterungszeitpunkt. Als Ursache wurde eine mögliche gehemmte Protozoenaktivität bei niedrigen pH-Werten angeführt. Der tageszeitlich bzw.

fütterungsabhängige Verlauf des ruminalen pH-wertes trat in allen Versuchen ebenfalls auf.

Die erhöhte Bioverfügbarkeit von OA (erhöhte Plasmaspiegel beim hohen im Vergleich zum niedrigen KF-Anteil in der Ration) könnte allerdings zusätzlich durch eine veränderte Absorption von OA aus dem Pansen bei niedrigen pH-Werten verursacht werden. Allerdings liegen bisher keine Studien über die Absorption von OA aus den unterschiedlichen Kompartimenten des Gastrointestinaltraktes beim Wiederkäuer vor. In einer Untersuchung an Ratten konnten KUMAGAI und AIBARA (1982) zeigen, dass im Magen, Dünndarm und Dickdarm der Ratte OA absorbiert wurde, wobei im Jejunum die Absorptionskapazität am höchsten war.

KUMAGAI (1988) ermittelte in einer *in vitro* Studie, die unter anderem den Einfluss des pH-Wertes im proximalen Jejunum der Ratte auf die Absorption von OA aus dem Darm ins Blut untersuchte, dass mit sinkendem pH-Wert die Aufnahme von OA (pK-Wert = 7,04) in die Darmschleimhaut erleichtert wird. Zu erklären ist dies damit, dass bei niedrigem pH-Wert vorwiegend die nichtdissoziierte, lipophilere Form von OA vorliegt, welche leichter auf passivem Wege in das Dünndarmepithel aufgenommen werden kann. Dieses Ergebnis ist möglicherweise auf den Pansen übertragbar, da auch hier an der Epitheloberfläche eine Sekretion von Protonen über einen Na^+/H^+ -Austauscher stattfindet. Eine erhöhte Absorption aus dem Pansen könnte folglich immer dann stattfinden, wenn der pH-Wert erniedrigt und der Abbau zu $\text{O}\alpha$ und Phenylalanin gehemmt ist. Bei höheren pH-Werten wäre dann der gegenteilige Effekt zu erwarten. Ein verminderter Abbau in den Vormägen bedingt wiederum eine erhöhte luminale OA-Konzentration. Eine erhöhte Absorption von OA aus dem Pansen, bedingt durch ein erhöhtes Diffusionsgefälle bei höheren Konzentrationen von OA, könnte ebenfalls eine Rolle spielen. Das erhöhte Diffusionsgefälle bei höheren OA-Konzentrationen im Pansen könnte möglicherweise die in Versuch 1 und 3 bei steigenden Dosierungen gezeigten gesteigerten Plasmaspiegel von OA und die gesteigerte Ausscheidungen von OA über den Harn erklären. In Versuch 1 kam es bei der höchsten Dosierung im Vergleich zu den niedrigeren Dosierungen zu einer signifikant höheren OA-Ausscheidung über den Harn. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass die Abbaukapazität von OA im Pansen bei dieser Dosierung (1161 $\mu\text{g}/\text{Tag}$)

bereits saturiert ist und OA daher vermehrt unabgebaut ausgeschieden wird. In Versuch 3 konnte dies allerdings weder bei hohem noch bei niedrigem Fütterungsniveau bestätigt werden.

In Versuch 2 könnten die erhöhte Lipophilie von OA bei niedrigen pH-Werten, das durch die höheren ruminalen OA-Konzentrationen bedingte erhöhte Diffusionsgefälle von OA aus dem Pansen ins Blut und die erhöhte Verweildauer im Pansen bei hohem KF-Anteil zu einer gesteigerten Absorption von OA aus dem Magen-Darm-Trakt und damit zu einer verminderten Ausscheidung von $O\alpha$ über den Harn beigetragen haben. Der Befund, dass erst ab Tag 13 signifikant höhere OA-Konzentrationen im Blutserum bei hohem im Vergleich zu niedrigem KF-Anteil auftraten, ist ein Hinweis darauf, dass offenbar erst bei chronischer Fütterung von OA über einen längeren Zeitraum mit signifikanten Effekten bezüglich der Blutparameter von OA zu rechnen ist. Die Vermutung, dass eine längere Verweildauer von OA im Pansen auch zu niedrigeren $O\alpha$ -Konzentrationen führt, konnte in Versuch 2 ab dem Zeitpunkt 10 Stunden nach Fütterung bestätigt werden. Die durchgehend niedrigen $O\alpha$ -Konzentrationen im Blut (zwischen 0,6 und 1,3 ng/ml) sind aufgrund der geringen Halbwertszeit von $O\alpha$ und der niedrigen Frequenz der Probenahmen nur begrenzt aussagefähig. Für eine vermehrte Absorption von $O\alpha$ aus dem Pansen ins Blut bei niedrigem KF-Anteil spricht, dass die Ausscheidung von $O\alpha$ über den Kot bei dieser Behandlung signifikant niedriger, die renale Elimination von $O\alpha$ aber höher war im Vergleich zu einem hohem KF-Anteil in der Ration.

Ebenso wie der ruminale Abbau und die Absorption von OA aus den Vormägen könnte eine erhöhte Passagegeschwindigkeit über eine gesteigerte Passage von OA aus dem Pansen zu einer beschleunigten Elimination von OA aus den Vormägen führen. Hierdurch würde OA der hydrolytischen Spaltung entzogen werden und müsste im Kot in höheren Mengen ausgeschieden werden als bei niedrigeren Passagegeschwindigkeiten. Dies setzt voraus, dass die hydrolytische Kapazität im Dickdarm wesentlich geringer ist als in den Vormägen (siehe Seite 74). Die Erhöhung der Passagerate aus dem Reticulorumen durch Erhöhung des Ernährungsniveaus, welche in Versuch 3 bei den Behandlungen 743 und 1069 $\mu\text{g}/\text{Tag}$ bei hohem Ernährungsniveau signifikant höher war als bei niedrigem, bestätigt die Untersuchung von ROTHFUSS et al. (1997). Auch hier nahm für $\text{C}_7\text{-EDTA}$

die Passagerate aus dem Reticulorumen bei Ochsen mit einer Steigerung des Ernährungsniveaus von der Deckung des Erhaltungsbedarfs auf das 1,5-fache des Erhaltungsbedarfs signifikant zu. Dies führte in der vorliegenden Arbeit offenbar bei allen Dosierungen mit hohem Ernährungsniveau zu signifikant höheren Ausscheidungen von OA und $O\alpha$ über den Kot als bei niedrigem Ernährungsniveau. Da bei Behandlung 374 $\mu\text{g}/\text{Tag}$ keine Unterschiede in den Passageparametern zwischen den Ernährungsniveaus ermittelt werden konnte, könnte eine weitere Möglichkeit darin liegen, dass es mit einer Steigerung der Futterraufnahme auch zu einer Steigerung der biliären Sekretion von OA bei Wiederkäuern kommt. Hierzu gibt es bisher allerdings keine Untersuchungen.

Mit erhöhtem KF-Anteil in der Ration nimmt die Partikel- und Flüssigkeitspassage aus dem Reticulorumen normalerweise ab (OWENS und GOETSCH 1986). Dies liegt vermutlich an der verminderten Wiederkautätigkeit und dem in der Folge abgeschwächten Speichelfluss (MERTENS 1993). Im Versuch 2 unterschieden sich die Passageraten aus dem Reticulorumen allerdings nicht zwischen den Rationen KFH-OA und KFN-OA. Eine mögliche Erklärung für die gesteigerte fäkale Ausscheidung von $O\alpha$ mit zunehmenden KF-Anteil in der Ration könnte eine gesteigerte Absorption von OA aus den Vormägen sein, die sich in signifikant höheren OA-Konzentrationen im Blut bei hohem im Vergleich zum niedrigem KF-Anteil in der Ration manifestierte. Höhere Blutwerte lassen zunächst eine höhere Elimination von OA über die Niere erwarten. Allerdings zeigte sich lediglich eine um 1,8 %-Punkte erhöhte Ausscheidung von OA über den Harn bei Behandlung KFH-OA im Vergleich zu KFN-OA. Dieser Unterschied konnte statistisch nicht gesichert werden. Daher könnte spekuliert werden, dass es bei einem hohem KF-Anteil in der Ration zu einer gesteigerten biliären Sekretion von OA und $O\alpha$ gekommen ist, welche sich in den Kotkonzentrationen von OA und $O\alpha$ der Behandlungen widerspiegelt. Unklar ist, ob ein gesteigerter KF-Anteil in der Ration die biliäre Sekretion steigert und welchen Anteil die biliäre Sekretion an der Gesamtausscheidung hat. Nach ROTH et al. (1988) besteht ein erheblicher Anteil des von Mäusen mit der Galle ausgeschiedenen OA aus Konjugaten (Glucuronide und Sulfate). Im Dünndarm konnten die Autoren keine Konjugate nachweisen. Dies führten sie darauf zurück, dass die biliär ausgeschiedenen konjugierten Formen von OA durch die intestinale Mikroflora dekonjugiert werden und es anschließend

zu einer Reabsorption von OA kommt. Neben der Reabsorption besteht noch die Möglichkeit, dass die Dickdarmflora OA zu $O\alpha$ und Phenylalanin hydrolysiert.

Da sich die OA-Ausscheidungen über den Kot zwischen den Behandlungen KFH-OA und KFN-OA nicht unterschieden, ist das möglicherweise vermehrt anflutende OA im Darm bei Behandlung KFH-OA möglicherweise von der Darmflora zu $O\alpha$ und Phenylalanin hydrolysiert worden und führte damit zu einer signifikant höheren Ausscheidung von $O\alpha$ über den Kot bei hohem im Vergleich zu niedrigem KF-Anteil in der Ration, unter der Voraussetzung, dass keine Unterschiede in der Absorption von OA aus den Darmabschnitten zwischen den Behandlungen KFH-OA und KFN-OA vorhanden waren. Über die Hydrolysekapazität der Dickdarmflora beim Wiederkäuer und der Absorption von OA aus dem Darm existieren bisher noch keine Untersuchungen.

Aufgrund der hohen Toxizität von OA besteht die Möglichkeit, dass OA auch die Mikroorganismen im Pansen negativ beeinflusst. Die in Versuch 1 ermittelten niedrigeren Verdaulichkeiten der TM, OM und der Zellwandfraktionen (ADF und NDF) der höchsten Dosierung im Vergleich zur Kontrollgruppe, lassen sich durch eventuelle toxische Effekte von OA auf die Mikroorganismen im Pansen erklären. Um zu prüfen, ob OA die Pansenfermentation durch Schädigung der Pansenpopulation beeinflusst, untersuchte MÜLLER (1995) den Einfluss von OA auf die Gasbildung des Pansensaftes von Kühen und Schafen (Hohenheimer Futterwerttest). Trotz relativ hoher Einsatzmengen von OA (1,5, 3 und 6 mg/kg Futter) konnte keine Beeinträchtigung der Mikroorganismen im Pansen durch OA nachgewiesen werden.

Da in Versuch 2 kein Effekt von OA, sondern nur der Rationszusammensetzung auf die Nährstoffverdaulichkeiten und in Versuch 3 nur Effekte des Fütterungsniveaus und nicht der Dosierung von OA auf die Verdaulichkeiten von TM, OM, Stärke und Zellwandbestandteilen festzustellen waren, ist hieraus zu schließen, dass OA unter den Bedingungen der vorgelegten Arbeit vermutlich keine toxischen Effekte auf die Mikroorganismen im Pansen ausübt und damit auch nicht die Protozoen negativ beeinflusst.

5 Praktische Anwendung

Aufgrund der Tatsache, dass OA über das Futter sich in tierischem Gewebe anreichern kann und der Übergang von OA in die Kuhmilch gezeigt wurde (SKAUG 1999), stellt sich die Frage, unter welchen Voraussetzungen eine Verfütterung OA-kontaminierter Futtermittel an Wiederkäuer für den Menschen ungefährlich erscheint.

Schon bei einer Dosis von 378 µg OA/Tag konnte intaktes OA im Blutserum gezeigt werden, wobei die Plasmawerte von OA mit steigender OA-Dosierung anstiegen. Die ruminale Hydrolyse von OA zu O α und Phenylalanin ist demnach nicht vollständig abgelaufen. Ein hoher KF-Anteil in der Ration führte zudem zu einer Absekkung des ruminalen pH-Wertes und ging mit einer erhöhten Verweildauer von OA im Pansen einher. Damit wurde die Absorption aus dem Pansen in die systemische Zirkulation signifikant gesteigert. Unter intensiven Produktionsbedingungen scheint demnach eine erhöhte „Carry-over“-Gefahr zu bestehen. Die sehr stark variierenden Konzentrationen von OA im Blut in Versuch 3 bei einem hohen KF-Anteil in der Ration unabhängig vom Ernährungsniveau lassen den Schluss zu, dass bei hohem KF-Anteil in der Ration offensichtlich erhöhte Gefahr besteht, dass es zu einer Verringerung der hydrolytischen Tätigkeit der Protozoen kommt und damit wahrscheinlicher mit gewissen Rückständen im Schlachtkörper oder der Milch zu rechnen ist. Diesem Prozess entgegen wirkt jedoch eine gesteigerte Passagerate bei Erhöhung des Fütterungsniveaus, wodurch es zu einem vermehrten Ausscheiden von OA über den Kot kommen würde.

So lässt sich zusammenfassend sagen, dass die Gefahr einer Anreicherung von OA in den Geweben und ein Übergang von OA in die Milch mit steigender Dosierung von OA, mit Erhöhung des KF-Anteiles in der Ration und bei niedrigem Fütterungsniveau ansteigt. In allen Versuchen wurden ca. 70 – 80 % der aufgenommenen OA-Menge über Kot und Harn wieder ausgeschieden. Die Gefährdung für den Menschen ist daher als gering einzustufen. In einer Untersuchung des Codex Committee on Food Additives and Contaminations (1999) wurde gezeigt, dass 50 % der potentiellen täglichen Aufnahme von OA aus Getreide und Getreideprodukten, 30 % aus Rotwein, Kaffee und Bier aufgenommen werden. Geflügel und Schweinefleisch haben mit insgesamt ca. 4 % nur einen geringen Anteil an der OA-Aufnahme. Rindfleisch wurde als unbedenklich eingestuft.

6 Anhang

Tabelle 39: Passageraten von Cr-EDTA aus dem 1. Kompartiment (L) und dem Reticolorum (K) sowie Zeitverzug bis zum ersten Auftreten des Markers im Kot bei unterschiedlichen Dosierungen von OA, Versuch 1

Parameter	Modell	OA (ng/Tag)				SE
		0	374	743	1069	
L (h ⁻¹)	G1G1	0,1082	0,0389	0,0284	0,0386	0,1842
	G2G1	0,2797	0,0582	0,0566	0,0577	0,0363
	G3G1	0,6537	0,1050	0,2425	0,0694	0,3059
	G4G1	0,2302	0,1472	0,1883	0,1022	0,0414
K (h ⁻¹)	G1G1	0,0513	0,0389	0,0176	0,0386	0,0013
	G2G1	0,0255	0,0542	0,0443	0,0557	0,0140
	G3G1	0,0350	0,0407	0,0245	0,0694	0,0135
	G4G1	0,0350	0,0353	0,0236	0,0603	0,0156
TD (h)	G1G1	18,8407	10,5356	19,8651	14,6757	5,7583
	G2G1	16,8211	4,5904	11,2619	7,9263	5,6596
	G3G1	20,5967	2,1763	12,3297	2,1352	5,0777
	G4G1	19,8861	0,2866	12,2907	0,0000	5,3356

Tabelle 40: Passageraten von Cr-EDTA aus dem 1. Kompartiment (L) und dem Reticolorum (K) sowie Zeitverzug bis zum ersten Auftreten des Markers im Kot bei unterschiedlichen Rationszusammensetzungen, Versuch 2

Parameter	Modell	Behandlung				SE
		KFH OA	KFH	KFN OA	KFN	
L (h ⁻¹)	G1G1	0,4050	0,3572	0,4564	0,4366	0,2353
	G2G1	0,1195	0,1038	0,0900	0,5893	0,3535
	G3G1	0,1713	0,2736	0,1498	0,7156	0,4232
	G4G1	0,2132	0,3247	0,1918	0,7667	0,4314
K (h ⁻¹)	G1G1	0,0393	0,0457	0,0324	0,0410	0,0013
	G2G1	0,0770	0,0729	0,1044	0,0934	0,0124
	G3G1	0,0777	0,0790	0,0763	0,0747	0,0002
	G4G1	0,0813	0,0872	0,0648	0,0974	0,0011
TD (h)	G1G1	13,8075	13,7295	12,3544	13,7279	2,9508
	G2G1	10,4123	10,2462	8,8382	8,9102	4,2666
	G3G1	7,7401	8,9489	6,0254	5,8401	13,129
	G4G1	5,5127	6,3879	4,1420	5,4869	5,1554

Tabelle 41: Passageraten von Cr-EDTA aus dem 1. Kompartiment (L) und dem Reticulum (K) sowie Zeitverzug bis zum ersten Auftreten des Markers im Kot bei Deckung des energetischen Bedarfs für Erhaltung, Versuch 3

Parameter	Modell	OA (mg/Tag)				SE
		0	374	743	1069	
L (h ⁻¹)	G1G1	0,0298	0,0448	0,0437	0,0360	0,0041
	G2G1	0,1565	0,0678	0,0516	0,0518	0,0595
	G3G1	0,1260	0,0962	0,0635	0,0679	0,0769
	G4G1	0,3516	0,1217	0,0909	0,0942	0,3198
K (h ⁻¹)	G1G1	0,1131	0,0448	0,0494	0,0360	0,0205
	G2G1	0,0350	0,0563	0,0516	0,0518	0,0067
	G3G1	0,0403	0,0570	0,0635	0,0581	0,0103
	G4G1	0,0283	0,0465	0,0523	0,0596	0,0210
TD (h)	G1G1	16,0585	20,6220	27,2209	17,1359	6,0060
	G2G1	14,6174	14,2862	9,4587	10,0561	2,9963
	G3G1	12,7849	9,8064	4,0863	4,1720	3,4766
	G4G1	10,3773	8,5361	2,8121	2,4302	3,1955

Tabelle 42: Passageraten von Cr-EDTA aus dem 1. Kompartiment (L) und dem Reticulum (K) sowie Zeitverzug bis zum ersten Auftreten des Markers im Kot bei einem Ernährungsniveau von 1,7 x Erhaltung, Versuch 3

Parameter	Modell	OA-Aufnahme in mg/Tag				SE
		0	374	743	1069	
L (hr ⁻¹)	G1G1	0,0973	0,0347	0,0674	0,0684	0,0041
	G2G1	0,2483	0,3095	0,4703	0,1018	0,0595
	G3G1	0,3013	0,6980	0,5978	0,1293	0,0769
	G4G1	1,0402	0,7862	0,7221	0,1707	0,3198
K (hr ⁻¹)	G1G1	0,0641	0,5883	0,3084	0,0684	0,0205
	G2G1	0,0773	0,1234	0,0887	0,1018	0,0067
	G3G1	0,0582	0,0624	0,1063	0,1293	0,0103
	G4G1	0,0447	0,0465	0,0983	0,1308	0,0210
TD (h)	G1G1	7,3282	13,8259	8,5724	10,2091	6,0060
	G2G1	5,8430	9,6950	6,1515	7,0140	2,9963
	G3G1	5,1059	9,1522	2,9979	4,1653	3,4766
	G4G1	4,8361	8,5361	2,4751	1,7606	3,1955

Tabelle 43: Zusammensetzung des Mineralfutters¹

Inhaltsstoffe	Zusatzstoffe
16,00 % Calcium	800.000 I.E. Vitamin A
4,00 % Phosphor	80.000 I.E. Vitamin D ₃
10,00 % Natrium	1.000 mg Vitamin E
4,00 Magnesium	4250 mg Zink
	2.000 mg Mangan
2.000 mg Eisen
	50 mg Jod
	40 mg Selen

¹ Zusammensetzung nach Herstellerangaben (Salvana Tiernahrung GmbH)

7 Literaturverzeichnis

ABE, M., T. IRIKI (1978):

Effects of diet on the protozoal population in permeable continuous cultures of rumen contents. *J. Nutr.* 39: 197-202

ALEO, M. D., R. D. WYATT, R. G. SCHNELLMANN (1991):

Mitochondrial dysfunction is an early event in ochratoxin A but not oosporein toxicity to renal proximal tubules. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 107: 73-80

ABRAMSON, D., J. T. MILLS, R. N. SINHA (1992):

Ochratoxin A production in Bavarian cereal grains stored at 15 and 19% moisture content. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 23: 259-265

BASSLER, R. (Ed.1988, 1993):

VDLUFA Methodenbuch, Band III. Die chemische Zusammensetzung von Futtermitteln. 3. Auflage, 2. Ergänzungslieferung 1988 und 3. Ergänzungslieferung 1993. VDLUFA-Verlag, Darmstadt

BAUDRIMONT, I., A. M. BETBEDER, E. E. CREPPY (1997):

Reduction of the ochratoxin A-induced cytotoxicity in Vero cells by aspartam. *Arch. Toxicol.* 71: 290-298

BÖHM, J. (1992):

Über die Bedeutung der Mykotoxine Desoxynivalenol, Zearalenon, und Ochratoxin A für landwirtschaftliche Nutztiere. *Arch. Anim. Nutr.* 42: 95-111

BOSE, S., S. P. SINHA (1994):

Modulation of ochratoxin-produced genotoxicity in mice by vitamin C. *Fd. Chem. Toxic.* 32, 533-537

BOUDRA, H., P. LE BARS, J. LE BARS (1995):

Thermostability of ochratoxin A in wheat under two moisture conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 1156-1158

BRANDT, M., I. KÜHN (1987):

Photometrische Bestimmung von Cr-EDTA als Cr-Diphenylkarbazon-Komplex im Darminhalt und Kot nach Kjeldahl-Aufschluss. *Arch. Anim. Nutr.* 37: 452-453

BRANDT, M., A. SCHULDT, P. MANNERKORPI, T. VEARASILP (1987):

Zur enzymatischen Stärkebestimmung im Darminhalt und Kot von Kühen mit hitzestabiler Amylase. *Arch. Anim. Nutr.* 37: 455

BREITHOLZ-EMANUELSSON, A., M. OLSEN, A. OSKARSSON, I. PALMINGER, K. HULT (1993):

Ochratoxin in cow's milk and in human milk with corresponding human blood samples. *J. AOAC. Int.* 76, 842-846

CHANG, C. F., F. S. CHU (1977):

The fate of ochratoxin A in rats. Food Cosmet. Toxicol. 15: 199-204

CHANG, C. F., W. E. HUFF, P. B. HAMILTON (1979):

A leucocytopenia induced in chickens by dietary Ochratoxin A. Poultry Sci. 58: 555-558

CHELACK, W. S., J. BORSA, R. R. MARQUARDT, A. A. FROHLICH (1991b):

Role of competitive microbial flora in the radiation-induced enhancement of ochratoxin production by *Aspergillus alutaceus* var. *alutaceus* NRRL 3174. Appl. Environm. Microbiol. 57, 2492-2496

CHELACK, W. S., J. BORSA, J. G. SZEKELY, R. R. MARQUARDT, A. A. FROHLICH (1991a):

Variants of *Aspergillus alutaceus* var. *alutaceus* (formerly *Aspergillus ochraceus*) with altered ochratoxin A production. Appl. Environm. Microbiol. 57, 2487-2491

CHELKOWSKI, J., P. GOLINSKI, B. GODLEWSKA, W. RADOMYSKA (1980):

Reduction of ochratoxin contamination in cereals by technological processing. Przegląd Zbozowo-Młynarski 24 (6): 6-7

CHELKOWSKI, J., P. GOLINSKI, K. SZEBIOTKO (1981):

Mycotoxins in cereal grain. Part II. The fate of ochratoxin A after processing of wheat and barley grain. Nahrung 25: 423-426

CHELKOWSKI, J., K. SZEBIOTZKO, P. GOLINSKI, M. BUCHOWSKI, B. GODLEWSKA, W. RADOMYSKA, M. WIEWIORSKA (1982):

Mycotoxins in cereal grain. Part V. Changes of cereal value after ammoniation and mycotoxins (ochratoxins) inactivation. Nahrung 26: 1-7

CHU, F. S. (1974):

Studies on ochratoxins. CRC Crit. Rev. Toxicol. 2: 499-524

CODEX COMMITTEE ON FOOD ADDITIVES AND CONTAMINANTS (1999):

Position paper of ochratoxin A (1999). Codex Alimentarius Commission, World Health Organization, CX/FAC99/14

CREPPY, E. E., D. KERN, P. S. STEYN, R. VLEGGAAR, R. RÖSCHENTHALER, G. DIRHEIMER (1983a):

Comparativ study of the effect of ochratoxin A analogues on yeast aminoacyl-tRNA synthetases and on the growth and protein synthesis of hepatoma cells. Toxicol. Lett. 19: 217-224

CREPPY, E. E., F. C. STØRMER, D. KERN, R. RÖSCHENTHALER, G. DIRHEIMER (1983b):

Effects of ochratoxin A metabolites on yeast phenylalanyl-t-RNA synthetase and on growth and in vivo protein synthesis of hepatoma cells. Chem. Biol. Interact. 47: 239-247

DAHLMANN, A., W. H. DANTZLER, S. SILBERNAGL, M. GEKLE (1998):

Detailed mapping of ochratoxin A reabsorption along the rat nephron *in vivo*: The nephrotoxin can be reabsorbed in all segments by different mechanisms. *J. of Pharmacol. and Experim. therap.* 286: 157-162

DENNIS, S. M., M. J. ARAMBEL, E. E. BARTLEY, A. D. DAYTON (1983):

Effect of energy concentration and source of nitrogen on numbers and types of rumen protozoa. *J. Dairy Sci.* 66: 1248-1254

DOERR, J. A., W. E. HUFF, P. B. HAMILTON, E. B. LILLEHOY (1981):

Severe coagulopathy in young chickens produced by ochratoxin A. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 59: 157-163

DOSTER, R. C., R. O. SINNHUBER (1972):

Comparative rates of hydrolysis of ochratoxin A and B *in vitro*. *Fd. Cosmet. Toxicol.* 10: 389-394

DWIVEDI, P., R. B. BURNS (1986):

The natural occurrence of ochratoxin A and its effects in poultry. A review. Part 1. *Epidemiology and toxicity. World's Poult. Sci. J.* 42: 32-47

EADIE, J. M., S. O. MANN (1970):

Development of the rumen microbial population: High starch diets and instability. In: *Physiology of digestion and metabolism in the ruminant. Bd. 3* (Ed. A. T. Philippson) Oriel Press Ltd., Newcastle upon Tyne: 335-347

EL BANNA, A. A., J. I. PITT, L. LEISTNER (1987):

Production of mycotoxins by *Penicillium* species. *System. Appl. Microbiol.* 10: 42-46

FINK-GREMMELS, J. (1995):

Toxicity and metabolism of ochratoxin A, *Natural Tox.* 3: 214-220

FUCHS, R., K. HULT, M. PERAICA, B. RADIC, R. PLESTINA (1984):

Conversion of ochratoxin C into Ochratoxin A *in vivo*. *Appl. Environ. Microbiol.* 48: 41-42

GALTIER, P. (1974):

Devenir de l'ochratoxin A dans l'organisme animal. I. Transport sanguin de la toxine chez le rat. *Ann. Rech. Vet.* 5: 311-318

GALTIER, P., M. ALVINERIE, J. L. CHARPENTEAU (1981):

The pharmacokinetic profile of ochratoxin A in pigs, rabbits and chickens. *Food Cosmet. Toxic.* 18: 493-496

GALTIER, P., J. L. CHARPENTEAU, M. ALVINERIE, C. LABOUCHE (1979):

The pharmacokinetic profile of ochratoxin A in the rat after oral and intravenous administration. *Drug Metab. Dispos.* 7: 429-434

GALTIER, P. & ALVINERIE, M. (1976):

In vitro transformation of ochratoxin A by animal microbial floras. *Ann. Rec. Vet.* 7: 91-98

GEISHAUSER, T., A. GITZEL (1996):

A comparison of rumen fluid sampled by oro-ruminal probe versus rumen fistula. *Small Rumin. Res.* 21: 63-69

GFE (Gesellschaft für Ernährungsphysiologie), 1986:

Mitteilungen des Ausschusses für Bedarfsnormen der Gesellschaft für Ernährungsphysiologie. *Proc. Soc. Nutr. Physiol.* 5: 149-152

GILL, J., W. T. MAGEE, (1976):

Balanced two-period changeover designs for several treatments. *J. Anim. Sci.* 42, 775-777

GOERING, H. K., P. J. VAN SOEST (1970):

Forage fiber analyses (apparatus, reagents, procedures and some applications). *Agric. Handbook No. 379*. ARS, USDA, Washington DC.

GOLINSKI, P., CHELKOWSKI, J., KONARKOWSKI, A., SZEBIOTKO, K. (1986):

Einfluss einer Fütterung mit unterschiedlich kontaminiertem Futter (Ochratoxin A) auf männliche und weibliche Broilerküken. *Fleischwirtschaft* 66: 115-117

GROVUM, W. L., WILLIAMS, V. J. (1973):

Rate of passage of digesta in sheep. 4. Passage of marker through the alimentary tract and the biological relevance of rate-constants derived from the changes in concentration of marker in faeces. *Br. J. Nutr.* 30: 313-329

GROVES, C. E., G. NOWAK, M. MORALES (1999):

Ochratoxin A secretion in primary cultures of rabbit renal proximal tubule cells. *J. Am. Soc. Nephrol.* 10: 13-20

HADIDANE, R., H. BACHA, E. E. CREPPY, M. HAMMAMI, F. ELLOUZE, G. DIRHEIMER (1992):

Isolation and structure determination of natural analogues of the mycotoxin ochratoxin A produced by *Aspergillus ochraceus*. *Toxicol.* 76: 233-243

HADLOK, R. M. (1989):

Ochratoxin-Vorkommen im Blut von Schlachtschweinen und von Menschen. Vortrag 11. Mykotoxin-Workshop 22.-24.5 1989b, Berlin

HÄGGBLOM, P. E., J. GHOSH (1985):

Postharvest Production of Ochratoxin A by *Aspergillus ochraceus* and *Penicillium viridicatum* in Barley with different Protein levels. *Env. Micro.* 49: 787-790

HAGELBERG, S., K. HULT, R. FUCHS (1989):

Toxicokinetics of ochratoxin A in several species and its plasma-binding properties. *J. Appl. Toxicol.* 9: 91-96

- HANSEN, C. E., S. DUELAND, S. A. DREVON, F. C. STÆRMER (1982):**
Metabolism of ochratoxin A by primary cultures of rat hepatocytes. *Appl. Environ. Microbiol.* 43: 1267-1271
- HARWIG, J. (1974):**
Ochratoxin A and related metabolites. In: *Mycotoxins*. (Ed.: Purchase I.F.H) Elsevier, Oxford, New York: 345-368
- HASINOFF, B. B., A. D. RAHIMTULA, R. F. OMAR (1990):**
NADPH-cytochrome-P-450 reductase promoted hydroxyl radical production by the iron (III)-ochratoxin A complex. *Biochem. Biophys. Acta* 1036: 78-81
- HÖHLER, D. (1998):**
Ochratoxin A in food and feed: occurrence, legislation and mode of action. *Z. Ernährungswiss* 37: 2-12
- HÖHLER, D., K.-H. SÜDEKUM, S. WOLFFRAM, A. A. FROHLICH, R. R. MARQUARDT (1999):**
Metabolism and excretion of ochratoxin A in sheep. *J. Anim. Sci.* 77: 1217-1223
- HUFF, W. E., C. F. CHANG, M. F. WARREN, P. B. HAMILTON (1979):**
Ochratoxin A-induced iron deficiency anemia. *Appl. Environ. Microbiol.* 37: 601-604
- HUFF, W. E., J. A. DOERR, P. B. HAMILTON, D. D. HAMANN, R. E. PETERSON, A. CIEGLER (1980):**
Evaluation of bone strength during aflatoxicosis in broiler chickens. *Appl. Microbiol.* 40: 102-107
- HUFF, W. E., L. F. KUBENA, R. B. HARVEY (1988).**
Progression of ochratoxicosis in broiler chickens. *Poultry Sci.* 67: 1139-1146
- HULT, K., E. HÖKBY, U. HÄGGLUND, S. GATENBECK, L. RUTQUIST, G. SELLEY (1979):**
Ochratoxin A in pig blood: method of analysis and use as a tool for feed studies. *Appl. Environ. Microbiol.* 38: 772-776
- HULT, K., E. HÖKBY, S. GATENBECK, L. RUTQUIST (1980):**
Ochratoxin A in blood from slaughter pigs in Sweden; use in evaluation of toxin content of consumed feed. *Appl. Environ. Microbiol.* 39: 828-830
- HULT, K., A. TEILING, S. GATENBECK (1976):**
Degradation of ochratoxin A by a ruminant. *Appl. Environ. Microbiol.* 32: 443-444
- JØRGENSEN, K., G. RASMUSSEN, I. THORUP (1996):**
Ochratoxin A in Danish cereals 1986 - 1992 and daily intake by the danish population. *Food Addit. Contam.* 13: 95-104

JOSEFSSON, E. B. G., MÖLLER, T. E. (1980):

Heat stability of ochratoxin A in pig products. *J. Sci. Food Agric.* 31: 1313-1315

KERKADI, A., C. BARRIAULT, B. TUCHWEBER, A. A. FROHLICH, R. R. MARQUARDT, G. BOUCHARDT, I. M. YOUSSEF (1998):

Dietary cholestyramin reduces ochratoxin A-induced nephrotoxicity in the rat by decreasing plasma levels and enhancing fecal excretion of the toxin. *J. Toxicol. Environ. Health* 53: 231-250

KIESSLING, K. H., H. PETTERSON, K. SANDHOLM, M. OLSEN (1984):

Metabolism of aflatoxin, ochratoxin, zearaleone and three tricothecenes by intact ruminal fluid, rumen protozoa and rumen bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 47: 1070-1073

KRÄMER, J. (1987):

Lebensmittelmikrobiologie. Ulmer Verlag, Stuttgart. 81-84

KROGH, P (1987):

Ochratoxins in food. In: *Mykotoxins in food.* (P. KROGH, Ed.), Academic Press Ltd., London, 97-121

KROGH, P., N. H. AXELSEN, F. ELLING, N. GYRD-HANSEN, B. HALD, J. HYLDGAARD-JENSEN, A. E. LARSEN, A. MADSEN, H. P. MORTENSEN, T. MÆLLER, O. K. PETERSEN, U. RAVNSKOV, M. ROSTGAARD, O. AALUND (1974):

Experimental porcine nephropathy. Changes of renal function and structure induced by ochratoxinA-contaminated feed. *Acta Path. Microbiol. Scand. Sect. A (Suppl.)* 246:1-21

KROGH, P., N. GYRD-HANSEN, B. HALD, S. LARSEN, J. P. NIELSEN, M. SMITH, C. IVANOFF, H. MEISNER (1988):

Renal enzyme activities in experimental ochratoxin A-induced porcine nephropathy: diagnostic potential of phosphoenolpyruvate carboxykinase and gamma-glutamyltranspeptidase activity. *J. Toxicol. Environ. Health* 23: 1-4

KUIPER-GOODMAN, T., P. M. SCOTT (1989):

Risk assessment of the mycotoxin ochratoxin A. *Biomed. Environ. Sci.* 2: 179-248

KUMAGAI, S. (1985):

Ochratoxin A: plasma concentration and excretion into bile and urine in albumin-deficient rats. *Food Chem. Toxicol.* 23: 941-943

KUMAGAI, S. (1988):

Effects of plasma ochratoxin A and luminal pH on the jejunal absorption of ochratoxin A in rats. *Food Chem. Toxicol.* 26: 753-757

KUMAGAI, S., K. AIBARA (1982):

Intestinal absorption and secretion of ochratoxin A in the rat. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 64, 94-102

KUMARI, D., S. P. SINHA (1994):

Effect of retinol on ochratoxin-produced genotoxicity in mice. *Food Chem. Toxic.* 32: 471-475

LARSEN, S. (1928):

On chronic degeneration of the kidneys caused by mouldy rye. *Dansk Maanedsskr. Dyrlaeg.* 40: 259-284, 289-300

LEE, S., J. T. BEERY, F. S. CHU (1984):

Immunohistochemical fate of ochratoxin A in mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 72: 218-227

LEVI, C. P., H. L. TRENK, H. K. MOHR (1974):

Study on occurrence of ochratoxin A in green coffee beans. *J. AOAC* 57: 866-870

LI, S., R. R. MARQUARDT, A. A. FROHLICH, T. G. VITTI, G. CROW (1997):

Pharmacokinetics of ochratoxin A and its metabolites in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 145: 82-90

LILLEHOY, E. B., F. ELLING (1983):

Environmental conditions that facilitate ochratoxin A contamination of agriculture commodities. *Acta Agric. Scand.* 33: 113-126

LLOYD, W. E. (1980):

Citrinin and ochratoxin toxicoses in cattle in the United States. 2nd International Symposium of veterinary laboratory diagnosticians, Lucerne/Switzerland 129: 435-439

LUCAS, M., F. H. LEI, J. A. BLAIR (1980):

The influence of buffer pH, glucose and sodium ion concentration and the microclimate in rat proximal jejunum in vitro. *Pfugers Arch.* 385: 137-142

LUND, F., J. C. FRISVAD (1994):

Chemotaxonomy of *Penicillium aurantiogriseum* and related species. *Mycol. Res.* 98: 481-492

LUSKY, K., D. TESCH, R. GÖBEL (1995):

Untersuchung der Wirkung von natürlichem und kristallinem Ochratoxin A nach Verfütterung über 28 Tage beim Schwein mit anschließender Untersuchung des Rückstandverhaltens beider Formen des Mykotoxins in Körperflüssigkeit und Organen sowie in Fleisch - und Wurstwaren. *Arch. Lebensm.-Hyg.* 46: 45-48

MADHYASTHA, S. M., A. A. FROHLICH, R. R. MARQUARDT (1992a):

Hydrolysis of Ochratoxin A by the microbial activity of digesta in the gastrointestinal tract of rats. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 23: 468-472

MADHYASTHA, S. M., A. A. FROHLICH, R. R. MARQUARDT (1992b):

Effect of dietary cholestyramine on the elimination pattern of ochratoxin A in rats. *Fd. Chem. Toxic.* 30: 709-714

MADHYASTHA, S. M., R. R. MARQUARDT, A. A. FROHLICH, G. PLATFORD, D. ABRAMSON (1990):

Effect of different cereal and oilseed substrates on the growth and production of toxins by *Aspergillus alutaceus* and *Penicillium verrucosum*. J. Agric. Food Chem. 38: 1506-1510

MADSEN, A., B. HALD, E. LILLEHOY, H. P. MORTENSEN (1982):

Feeding experiments with ochratoxin A contaminated barley for bacon pigs. II. Naturally contaminated barley given for 6 weeks from 20 kg compared with normal barley supplemented with crystallin ochratoxin A and / or citrinin. Acta Agric. Scand. 32: 369-372

MADSEN, A., B. HALD, H. P. MORTENSEN (1983):

Feeding experiments with ochratoxin A contaminated barley for bacon pigs. 3. Detoxification by ammoniation heating + NaOH or autoclaving. Acta Agric. Scand. 33: 171-175

MAJERUS, P. H. OTTENDER, C. HOWER (1989):

Beitrag zum Vorkommen von Ochratoxin A in Schweineblutserum. Dtsch. Lebensm. Rundschau 85: 307-313

MALAVEILLE, C., G. BRUHN, H. BARTSCH (1991):

Genotoxicity of ochratoxin A and structurally related compounds in E. coli strains studies on their mode of action. In: Mycotoxins, Endemic Nephropathy and Urinary Tract Tumours. (M. CASTEGNARO, R. PLESTINA, G. DIRHEIMER, I. N. CHERNOZEMSKY, H. BARTSCH, Eds.), International Agency for Research on Cancer, Lyon, IARC Scient. Public. 115: 261-266

MARQUARDT, R. R., A. A. FROHLICH (1992):

A review of recent advances in understanding ochratoxicosis. J. Anim. Sci. 70: 3968-3988

McKENZIE, K. S., A. B. SARR, K. MAYURA, R. H. BAILEY, D. R. MILLER, T. D. ROGERS, W. P. NORRED, K. A. VOSS, R. D. PLATTNER, L. F. KUBENA, T. D. PHILLIPS (1997):

Oxidative Degradation and detoxifikation of mycotoxins using a novel source of ozone. Food and Chemical Toxicology 35: 807-820

MEISNER, H. (1976):

Energy-dependent uptake of ochratoxin A by mitochondria. Arch. Biochem. Biophys. 173: 132-140

MEISNER, H., S. CHAN (1974):

Ochratoxin A, an inhibitor of mitochondrial transport system. Biochem. 13: 2795-2800

MEISNER, H., P. SELANIK (1979):

Inhibition of renal gluconeogenesis in rats by ochratoxin. Biochem. J. 180: 681-684

MERTENS, D. R. (1993):

Kinetics of cell wall digestion and passage in ruminants. In: Forage cell wall structure and digestibility (H. G. JUNG, D. R. BUXTON, R. D. HATFIELD und J. RALPHS, Eds.), American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, Soil Society of America, Madison, WI. 535-570

MICCO, C., M. GROSS, M. MIRAGLIA, C. BRERA (1989):

A study of the contamination by ochratoxin A of green and roasted coffee beans. Food Add. Cont. 6 (3): 333-339

MOORE, J. A., POND, K. R., POORE, M. H., GOODWIN, T. G. (1992):

Influence of model and marker on digesta kinetic estimates for sheep. J. Anim. Sci. 70: 3528-3540

MOORE, J. A., TRUELOVE, B. (1970):

Ochratoxin A: inhibition of mitochondrial respiration. Science 168: 1102-1103

MORTENSEN, H. P., B. HALD, A. MADSEN (1983):

Feeding experiments with ochratoxin A contaminated barley for bacon pigs. 5. Ochratoxin A in pig blood. Acta Agric. Scand. 33: 235-239

MÜLLER, H.-M., A. BOLEY (1991):

Einfluß der Autoklavierung und Oberflächendesinfektion von Weizen (*triticum aestivum*) auf die Produktion von Ergosterin, Ochratoxin A und Citrinin durch *Penicillium verrucosum*. Zentralbl. Mikrobiol. 146: 445-451

MÜLLER, H.-M., A. BOLEY (1992):

Untersuchungen zur Kühllagerung von Weizen. 1. Mitteilung - Ergosterin, Ochratoxin A und Citrinin nach Zuimpfung von *Penicillium verrucosum*. Arch. Anim. Nutr. 42: 351-363

MÜLLER, H. M., C. LERCH, K. MÜLLER, W. EGGERT (1998):

Kinetic profiles of ochratoxin A and Ochratoxin α during in vitro incubation in buffered forestomach and abosomal contents from cows. Natural toxins 6: 251-258

MÜLLER, H. M., K. MÜLLER, H. STEINGASS (2001):

Effect of feeding regime on the metabolism of ochratoxin A during the in vitro incubation in buffered rumen fluid from cows. Arch. Anim. Nutr. 54: 265-279

MÜLLER, H. M., E. SCHRÖPPEL, M. THALER (1980):

Einfluss von Propionsäuredosierung und Kornfeuchte auf die Entwicklung und Mykotoxinbildung von *Penicillien* und *Aspergillen* in Körnermais. Landwirtsch. Forschung 34 (1-2): 23-34

MÜLLER, G., P. KIELSTEIN, H. ROSNER, A. BERNDT, M. HELLER, H. KÖHLER (1999a):

Studies of the influence of ochratoxin A on immune and defence reactions in weaners. Mycoses 42: 495-505

MÜLLER, G., P. KIELSTEIN, H. ROSNER, A. BERNDT, M. HELLER, H. KÖHLER (1999b):

Studies on the influence of combined administration of ochratoxin A, fumonisin B1, deoxynivalenol and T2 toxin on immune and defence reactions in weaner pigs. *Mycoses* 42: 485-493

MÜLLER, K. (1995):

Einfluß der Fütterung und anderer Faktoren auf den Umsatz von Ochratoxin A in Pansenflüssigkeit *in vitro* und *in vivo*. Dissertation, Universität Hohenheim, Germany

NORTHOLT, M. D., H. P. VAN EGMOND, W. E. PAULSCH (1979):

Ochratoxin A production by some fungal species in relation to water activity and temperature. *J. Food Prot.* 42:485-490

OMAR, R. F., B. B. HASINOFF, F. MEJILLA, A. D. RAHIMTULA (1990):

Mechanism of ochratoxin A stimulated lipid peroxidation. *Biochem. Pharmacol.* 40: 1183-1191

OMAR; R. F., A. D. RAHIMTULA, H. BARTSCH (1991):

Role of cytochrome P-450 in ochratoxin A-stimulated lipid peroxidation. *J. Biochem. Toxicol.* 6: 203-209

OMAR, R. F., GELBOIN, H. V., RAHIMTULA, A. D. (1996):

Effect of cytochrome P450 induction on the metabolism and toxicity of ochratoxin A. *Biochem. Pharmacol.* 51:207-216

ORTH, R. (1981):

Einfluß von physikalischen Faktoren auf die Bildung von Mykotoxinen. In: *Mykotoxine in Lebensmitteln*. G. Fischer Verlag, Stuttgart, New York: 85-100

OSBORNE, B. G. (1979):

Reversed-phase high performance liquid chromatography determination of ochratoxin A in flour and bakery products. *J. Sci. Agri.* 30: 1065-1070

OWENS, F. N., A. L. GOETSCH (1986):

Digesta passage and microbial protein synthesis, In: L. P. Milligan, W. L. Grovum, A. Dobson (Eds.) *Control of digestion and metabolism in ruminants*, Prentice-Hall, Englewood Cliff, NJ pp. 196-226

PITOUT, M. J. (1969):

The hydrolysis of ochratoxin A by some proteolytic enzymes. *Biochem. Pharmacol.* 18: 485-491

PITT, J. I. (1987):

Penicillium viridicatum, *Penicillium verrucosum*, and production of ochratoxin A. *Appl. Environ. Microbiol.* 53: 266-269

PLANK, G., J. BAUER, A. GRÜNKEMEYER, S. FISCHER, B. GEDEK, H. BERNER (1990):

Untersuchungen zur protektiven Wirkung von Adsorbentien gegenüber Ochratoxin A beim Schwein. Tierärztl. Prax. 18: 438-489

PLONAIT, H., K. BICKHARDT (1988):

Lehrbuch der Schweinekrankheiten. Verlag Paul Parey, Berlin, Hamburg: 258-259

POND, K. R., ELLIS, W. C., MATIS, J. H., FERREIRO, H. M., und SUTTON, J. D. (1988):

Compartmental models for estimating attributes of digesta flow in cattle. Br. J. Nutr. 60: 571-595

PRITCHARD, J. B., D. S. MILLER (1993):

Mechanisms mediating renal secretion of organic anions and cations. Physiol. Rev. 73: 765-796

PRITCHARD, J. B. (1987):

Luminal and peritubular steps in the renal transport of *p*-aminohippurate. Biochim Biophys Acta 906: 295-308

RAHIMTULA, A. D., J.-C. BEREZIAT, V. BUSSACHINI-GRIOT, H. BARTSCH (1988):

Lipid peroxidation as a possible cause of ochratoxin A toxicity. Biochem. Pharmacol. 37: 4469-4477

RAMAKRISHNA, N., J. LACEY, J. E. SMITH (1996):

Colonization of barley grain by *Penicillium verrucosum* and ochratoxin A formation in the presence of competing fungi. J. Food Prot. 59: 1311-1317

RIBELIN, W. E., K. FUKUSHIMA, P. E. STILL (1978):

The toxicity of ochratoxin to ruminants. Can. J. Comp. Med. 42: 172-176

RÖSCHENTHALER, R., CREPPY, E. E., G. DIRHEIMER (1984):

Ochratoxin A - on the mode of action of a ubiquitous mycotoxin. J. Toxicol. Toxin Review. 1: 53-86

ROLLE, M., A. MAYR (1993):

Medizinische Mikrobiologie, Infektions - und Seuchenlehre. Ferdinand Enke Verlag Stuttgart, 846-850

ROTH, A., K. CHAKOR, E. E. CREPPY, A. KANE, R. RÖSCHENTHALER, G. DIRHEIMER (1988):

Evidence for an enterohepatic circulation of ochratoxin A in mice. Toxicol. 48: 293-308

ROTHFUSS, H., K.-H. SÜDEKUM, M. STANGASSINGER (1997):

Ermittlung der Passage eines Markers im Verdauungstrakt von Milchkühen mit Hilfe unterschiedlicher Schätzverfahren: Einfluss von Laktationsstadium, Fütterungsniveau und Rationszusammensetzung. Arch. Anim. Nutr. 50: 43-61

SAS (1998):

SAS/STAT User`s Guide. SAS Institut Inc., Cary, NC

SCHEUER, R., K. BERNARD, L. LEISTNER (1984):

Rückstände von Ochratoxin A in Schweinenieren. Mitteilungsblatt Bundesanst. Fleischforschung (Kulmbach) 83: 5781-5784

SCHIEFER, H. B. (1990):

Mycotoxicosis of domestic animals and their diagnosis. Can. J. Physiol. Pharmacol. 68: 987-990

SCHWERDT, G., R. FREUDINGER, S. SILBERNAGL, M. GEKLE (1998):

Apical uptake of radiolabelled ochratoxin A in Madin-Darby canine kidney cells. Toxicol. 131: 193-202

SHOTWELL, O. L., C. W. HESSELTINE, M. L. GOULDEN (1969):

Ochratoxin A: Occurrence as natural contaminant of corn sample. Appl. Microbiol. 17: 765-766

SHOTWELL, O. L., C. W. HESSELTINE (1983):

Five-year study of mycotoxins in virginia wheat and dent corn. J. AOAC. 66: 1466-1469

SHOTWELL, O. L., M. L. GOULDEN, C. W. HESSELTINE (1976):

Survey of U.S. wheat for ochratoxin A and aflatoxin. J. AOAC 59: 122-124

SKAUG, M. A. (1999):

Analysis of Norwegian milk and infant formulas for ochratoxin A. Food Additives and Contaminants 16: 75-78

SKRINJAR, M., J. L. RASIC, V. STOJICIC (1996):

Lowering ochratoxin A level in milk by yoghurt bacteria and bifidobacteria. Folia Microbiol. 41: 26-28

SREEMANNARAYANA, O., A. A. FROHLICH, T. G. VITTI, R. R. MARQUARDT, D. ABRAMSON (1988):

Studies of tolerance and disposition of ochratoxin A in young calves. J. Anim. Sci. 66: 1703-1711

STANDER, M. A., U. T. BORNSCHEUER, E. HENKE, P. S. STEYN (2000):

Screening of commercial hydrolases for the degradation of ochratoxin A. J. Food Chem. 48: 5736-5739

STØREN, O., H. HOLM, F. C. STÆRMER (1982):

Metabolism of ochratoxin A by rats. *Appl. Environ. Microbiol.* 44: 785-789

STØRMER, F. C., C. E. HANSEN, J. I. PEDERSEN, G. HVISTENDAL, A. J. AASEN (1981):

Formation of (4r)- and (4S)-4-hydroxyochratoxin A from ochratoxin by liver microsomes from various species. *Appl. Environ. Microbiol.* 42: 1051-1056

STØRMER, F. C., O. STØREN, C. E. HANSEN, J. I. PEDERSEN, A. J. AASEN (1983):

Formation of (4R)-and (4S)-hydroxyochratoxin A from ochratoxin A by rabbit liver microsomes. *Appl. Environ. Microbiol.* 45: 1183-1187

STOJKOVICH, R., K. HULT, S. GAMULIN, R. PLESTINA (1984):

High affinity binding of ochratoxin A to plasma constituents. *Biochem. Int.* 9: 33-38

SUZUKI, S., T. SATOH, M. YAMAZAKI (1977):

The pharmacokinetics of ochratoxin A in rats. *Japan. J. Pharmacol.* 27: 735-744

TRENK, H. L., M. E. BUTZ, F. S. CHU (1971):

Production of ochratoxins in different cereal products by *Aspergillus ochraceus*. *Appl. Microbiol.* 21: 1032-1035

TSUDA, M., T. SEKINE, M. TAKEDA, S. H. CHA, Y. KANAI, M. KIMURA, H. ENDOU (1999):

Transport of ochratoxin A by renal multispecific organic anion transporter 1. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 289: 1301-1305

ULRICH, K. J., G. RUMRICH (1988):

Contraluminal transport systems in the proximal renal tubule involved in the secretion of organic anions. *Am. J. Physiol.* 254: 453-462

VANDEGRAFT, E. E., C. W. HESSELTINE, O. L. SHOTWELL (1975):

Grain preservatives: Effect on aflatoxin and ochratoxin production. *Cer. Chem.* 52: 79-84

VAN DER MERWE, K. J., P. S. STEYN, L. FOURIE, D. B. SCOTT, J. J. THERON (1965):

Ochratoxin A, a toxic metabolite produced by *Aspergillus ochraceus*. *Wilhelm Nature* 205: 1112-1113

VARGA, J., K. RIGO, J. TEREN (2000):

Degradation of ochratoxin A by *Aspergillus* species. *Int. J. of Food Microbiol.* 59: 1-7

WELBORN, J. R., C. E. GROVES, S. H. WRIGHT (1998):

Peritubular transport of ochratoxin A by single rabbit renal proximal tubulus. *J. Am. Soc. Nephrol.* 9: 1973-1982

WILLIAMS, A. G., COLEMAN, G. S. (1992):
The rumen protozoa. New York: Springer Verlag

XIAO, H., R. R. MARQUARDT, D. ABRANSON, A. A. FROHLICH (1996):
Metabolites of ochratoxins in rat urine and in a culture of *Aspergillus ochraceus*. Appl. Environ. Microbiol. 62: 648-655

XIAO, H., R. R. MARQUARDT, A. A. FROHLICH, Y. Z. LING (1995):
Synthesis and structure elucidation of analogues of ochratoxin A. J. Agric. Food Chem. 43: 524-530

XIAO, H., R. R. MARQUARDT, A. A. FROHLICH, G. D. PHILIPS, T. G. VITTI (1991a):
Effect of hay and grain diet on the rate of hydrolysis of ochratoxin A in the rumen of sheep. J. Anim. Sci. 69: 3706-3714

XIAO, H., R. R. MARQUARDT, A. A. FROHLICH, G. D. PHILIPS, T. G. VITTI (1991b):
Effect of hay and grain diet on the bioavailability of ochratoxin A in the rumen of sheep. J. Anim. Sci. 69: 3715-3723

ZINGERLE, M., S. SILBERNAGL, M. GEKLE (1996):
Reabsorption of the nephrotoxin Ochratoxin A along the rat nephron *in vivo*. J. Pharmacol. And Experim. Therap. 280: 220-224

Lebenslauf

Persönliche Angaben:

Name: Jan Peter Rolfs
geboren am: 12.08.1974
in: Kiel
Familienstand: verheiratet mit Claudia Rolfs, geb. Harms
28.12.1997 Geburt von Josephine Rolfs
21.02.2001 Geburt von Lenny Fabian Rolfs

Schulbildung:

1981 – 1985 Grundschule Kirchbarkau
1985 – 1994 Gymnasium Max-Plank-Schule Kiel
Abschluss mit Abitur

Zivildienst:

10/1994 – 10/1995 Umweltschutzamt Kiel

Studium:

10/1995 – 10/2000 Studium der Agrarwissenschaften, Fachrichtung Tierproduktion,
an der Christian-Albrechts-Universität Kiel
Abschluss: Diplom-Agraringenieur

Praktikum:

6/1998 – 12/1998 landwirtschaftliches Praktikum (Milchvieh und Ackerbau) in Postfeld,
Schleswig Holstein

Berufstätigkeit:

10/2000 – 10/2003 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Tierernährung und
Stoffwechselphysiologie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
seit 11/2003 Landwirtschaftlicher Verkaufsberater der Firma Trede und von Pein
GmbH, Itzehoe

Danksagung

Nach Abschluss meiner Dissertation möchte ich den Mitarbeitern des Institutes für Tierernährung und Stoffwechselfysiologie der Universität Kiel und meiner Familie ganz herzlich für die freundliche Unterstützung und Hilfe danken. Ein ganz herzlicher Dank geht an die Deutsche Forschungsgemeinschaft für die Förderung der Agrarwissenschaften und für die Finanzierung des Forschungsprojektes (SU 124/5-1, SU 124/5-2).

Mein ganz besonderer Dank gilt:

Herrn Prof. Dr. S. Wolfram für die freundliche Aufnahme in seiner Arbeitsgruppe, die Überlassung des Themas und die zahlreichen fachlichen Anregungen, Hilfestellungen und prägenden Diskussionen und für die Förderung meiner Arbeit;

Herrn Prof. Dr. K.-H. Südekum für die freundliche Aufnahme am Institut, die vielfältige Unterstützung in der Versuchsdurchführung und der Versuchsauswertung und seine ständige Diskussions- und Hilfsbereitschaft;

Herrn Ralf Blank für die Unterstützung, besonders bei der Auswertung und Analytik von OA,

Frau Anne Westphal für die unermüdliche analytische Bestimmung von Cr-EDTA und für die Mithilfe im Stall,

Frau Rita Kopp und Frau Monika Paschke-Beese für die analytische Bestimmung der Rohnährstoffe,

Frau Wiebke Kühl, die mir im Labor und im Stall immer zur Seite stand, sowie Clemens Benthin und allen Hiwis,

Frau Moebus für ihre ständige Unterstützung, wenn die Computer wieder nicht so wollten,

Meiner Frau, meinen Kindern und meinen Eltern für die moralische Unterstützung und das ungläubige Verständnis, wenn ich beispielsweise nachts im Stall wieder und wieder Kotschürzen leerte.