Agrarwissenschaften

Anbaubegleitende Untersuchungen zu Vorkommen und Vermeidung von Aflatoxinen und Insektenbeschädigungen in der Produktion der Arzneipflanze *Cassia senna* L. in Indien

Philip Müller

Giessen 2005

1. Gutachter: apl. Prof. Dr. Thies Basedow
2. Gutachter: Prof. Dr. Bernd Honermeier
3. Gutachter: Prof. Dr. Günter Leithold

Prüfer: Prof. Dr. Wolfgang Köhler
Prüfer: Prof. Dr. Sylvia Schnell
Prüfer: Prof. Dr. Karl Hermann Mühling

Vorsitzende: Prof. Dr. Katja Becker-Brandenburg

Tag der mündlichen Prüfung: 25. Februar 2005

Aus dem Institut für Phytopathologie und Angewandte Zoologie der
Justus Liebig Universität Gießen

Anbaubegleitende Untersuchungen zu Vorkommen und Vermeidung von Aflatoxinen und Insektenbeschädigungen in der Produktion der Arzneipflanze *Cassia senna* L. in Indien

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors (Dr. agr.)
im Fachbereich
Agrarwissenschaften, Ökotrophologie
und Umweltmanagement
der Justus Liebig Universität Gießen

Vorgelegt von
Dipl. Ing. agr. PHILIP MÜLLER

Gießen, März 2005

1. Einleitung 1

1.1. Themenstellung der Arbeit 1

1.2. Ziele der Arbeit 1

1.3. Überblick über den Aufbau der Arbeit 2

2. Literaturübersicht 4

2.1. Aflatoxine 4

2.1.1. Definition 4

2.1.2. Biologie des Aspergillus 5

2.1.3. Systematik des Pilzes 6

2.1.4. Bedingungen der Aflatoxinbildung 6

2.1.5. Aflatoxinbildung vor und nach der Ernte 8

2.1.6. Toxikologie der Aflatoxine 9

2.1.7. Derzeitige Gesetzgebung für Aflatoxine 10

2.2. *Cassia senna* 11

2.2.1. Botanik 11

2.2.2. Inhaltsstoffe und Wirkungsweise 11

2.2.3. Nomenklatur der Pflanze 12

2.2.4. Das natürliche Verbreitungsgebiet 13

3. Anbau- und Verarbeitungsbedingungen von *Cassia senna* in den Untersuchungsgebieten 14

3.1. Die geographische Lage 14

3.1.1. Tamilnadu 14

3.1.2. Gujarat 15

3.2. Die Bodenverhältnisse in den Untersuchungsgebieten 16

3.2.1. Tamilnadu 16

3.2.2. Gujarat 17

3.3. Die Klimaverhältnisse der Untersuchungsgebiete 17

3.3.1. Tamilnadu 17

3.3.2. Gujarat 18

3.4. Die traditionelle Anbaupraxis von *Cassia senna* in Indien 19

3.4.1. Saatvorbereitung und Aussaat 20

3.4.1.1. Tamilnadu 20

3.4.1.2. Gujarat 21

3.4.2. Bearbeitung und Pflege 21

3.4.3. Ernten 22

3.4.3.1. Tamilnadu 22

3.4.3.2. Gujarat 23

3.4.4. Die Trocknung 23

3.4.4.1. Tamilnadu 23

3.4.4.2. Gujarat 24

3.4.5. Die Weiterverarbeitung 24

3.5. Die wirtschaftliche Bedeutung und der Handel von *Cassia senna* in Indien 25

3.5.1. Flächenerträge von *C. senna* in Indien 25

3.5.2. Indische Exportstatistik für *C. senna* 26

4. Methoden 28

4.1. Die angewandte HPLC Methode zur quantitativen Bestimmung der Aflatoxine B_1, B_2, G_1 und G_2 28

4.1.1. Hinweise zum sicheren Umgang 29

4.1.2. Probennahme 29

4.1.3. Herstellung der Probelösungen 29

4.1.3.1. Extraktion 29

4.1.3.2. Anreicherung der Extrakte mittels Immunoaffinitätssäulen 30

4.1.3.3. Kalibrationslösung 30

4.1.4. Parameter der HPLC 30

4.1.4.1. Kalibration 31

4.1.4.2. Handhabung der KOBRA-Zelle 32

4.1.5. Berechnung 32

4.1.6. Musterchromatogramme 33

4.2. Kurzfristig angewandte ELISA Methode der Firma Ridel-de Haen zur quantitativen Bestimmung von Aflatoxin B_1 34

4.3. Statistik 35

5. Ergebnisse 36

5.1. Die Verteilung von Aflatoxinen in *Cassia senna* 36
5.1.1. Einleitung 36
5.1.2. Material und Methode 37
5.1.2.1. Aflatoxine in unterschiedlichen Pflanzenteilen aus Feldsammlungen 37
5.1.2.2. Unterschiede im Aflatoxinbildungspotential von folia und fructus der *C. senna* 37
5.1.2.3. Verteilung der Aflatoxine in frischen Früchten von *C. senna* in Abhängigkeit zur Größe von Insektenbeschädigungen 37
5.1.2.4. Aflatoxine in frischen Früchten der *C. senna* mit unterschiedlich gefärbtem Pilzbefall 38
5.1.2.5. Aflatoxinverteilung in getrockneten Früchten der C. senna in Abhängigkeit zum mikroskopisch sichtbaren Mycelwachstum 38
5.1.2.6. Verteilung der Aflatoxine zwischen Samen und Perikarpanteilen getrockneter Früchte der *C. senna* 38
5.1.2.7. Verteilung der Aflatoxine innerhalb von Mahlgutfraktionen getrockneter Früchte der *C. senna* 39
5.1.3. Ergebnisse der Verteilung von Aflatoxinen in *C. senna* 39
5.1.3.1. Aflatoxine in unterschiedlichen Pflanzenteilen aus Feldsammlungen 39
5.1.3.2. Unterschiede im Aflatoxinbildungspotential von folia und fructus der *C. senna* 40
5.1.3.3. Verteilung der Aflatoxine in frischen Früchten der *C. senna* in Abhängigkeit zur Größe von Insektenbeschädigungen 40
5.1.3.4. Aflatoxine in frischen Früchten der *C. senna* mit unterschiedlich gefärbtem Pilzbefall 41
5.1.3.5. Aflatoxinverteilung in getrockneten Früchten der *C. senna* in Abhängigkeit zum mikroskopisch sichtbaren Mycelwachstum 42
5.1.3.6. Verteilung der Aflatoxine zwischen Samen und Perikarpanteilen getrockneter Früchte der *C. senna* 43
5.1.3.7. Verteilung der Aflatoxine innerhalb von Mahlgutfraktionen getrockneter Früchte der *C. senna* 45
5.1.4. Diskussion 46

5.2. Die Aflatoxinbildung in *C. senna* vor der Ernte 48
5.2.1. Einleitung 48
5.2.2. Material und Methoden 48
5.2.3. Ergebnisse 49
5.2.4. Diskussion 51
5.3. Identifizierung von Schädlingen, die Aflatoxinbildung in *C. senna* fructus auslösen können, und Ermittlung von Bekämpfungsmöglichkeiten 52
5.3.1. Einleitung 52
5.3.2. Methode 52
5.3.3. Ergebnisse 53
5.3.4. Diskussion 55
5.4. Feldversuche zur Reduzierung von Aflatoxinen vor der Ernte 55
5.4.1. Einleitung 55
5.4.2. Versuchsaufbau 56
5.4.3. Versuchsdurchführung 56
5.4.4. Ergebnisse der Bewässerungs- und Neemfeld – versuche 58
5.4.5. Diskussion 59
5.5. Die Aflatoxinbildung in *C. senna* bei unterschiedlichen Trocknungsverfahren 60
5.5.1. Methode 61
5.5.2. Ergebnisse 62
5.5.3. Diskussion 67
5.6. Die Aflatoxinentwicklung während der Lagerung von *C. senna* fructus in Indien 68
5.6.1. Einleitung 68
5.6.2. Material und Methoden 68
5.6.3. Ergebnisse 69
5.6.4. Diskussion 73
5.7. Regionale und saisonale Unterschiede im Aflatoxinvorkommen bei *C. senna* fructus 73
5.7.1. Einleitung 73
5.7.2. Methode 74
5.7.3. Ergebnisse 74
5.7.4. Diskussion 79
5.8. Versuche in Indien mit *Cassia senna acutifolia* (Sudan Senna) 80
5.8.1. Einleitung 80

5.8.2. Methode 80
5.8.3. Ergebnisse 81
5.8.4. Diskussion 82
5.9. Mikrobiologische Untersuchungen von pulverisierten Früchten der *C. senna* 83
5.9.1. Einleitung 83
5.9.2. Methode 83
5.9.3. Ergebnisse 85
5.9.4. Diskussion 90

6. Gesamtbetrachtung der Aflatoxinproblematik von *Cassia senna* in Indien 92

7. Zusammenfassung 100

8. Summary 105

9. Literaturverzeichnis 110

10. Curriculum Vitae 123

11. Anhang 124

Abkürzungsverzeichnis

Acre	=	Flächeneinheit; 1 acre = 4047 m²
AFB	=	Aflatoxin B
AFG	=	Aflatoxin G
a_w-Wert	=	Wasserdampfdruck über dem Substrat im Verhältnis zum Wasserdampfdruck über reinem Wasser
ELISA	=	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
HPLC	=	Hochdruck-Flüssig-Chromatographie
IARC	=	International Agency for Research on Cancer
n.n.	=	nicht nachweisbar
ppb	=	µg/kg
R	=	Reagenz des DAB 1996

1. Einleitung

1.1. Themenstellung der Arbeit

Senna *(Cassia senna* L. *Caesalpinacaeae*) gehört zu den wichtigsten Arzneipflanzen der Welt. Das Wissen über den pharmakologischen Nutzen und den Gebrauch als Arzneipflanze lässt sich bis weit in die Antike zurückverfolgen (BETT 1952). In der europäischen Medizin sind sie spätestens seit Serapion d. Ä., der im 9. Jahrhundert lebte, Bestandteil der bekannten Heilkunde. *C. senna* gehört heute zu den weltweit meistgenutzten pflanzlichen Laxanzien (DER MARDEROSIAN 1999). Die Blätter und Früchte der Pflanze werden normalerweise als Tee, Pulver oder standardisierte Extrakte konsumiert. Deutschland ist in Europa der bedeutensde Verarbeiter dieser Droge und importiert nach HARNISCHFEGER & STOLZE (1983) jährlich ca. 1000 Tonnen dieser Droge.

Aufgrund neuer gesetzlicher Regelungen wurde im Jahre 1990 von der pharmazeutischen Industrie mit der stichprobenartigen Kontrolle von Aflatoxinrückständen in *Cassia senna* begonnen. Aflatoxine sind von bestimmten Pilzen produzierte giftige Substanzen. Dabei wurde deutlich, dass insbesondere die aus indischem Anbau stammenden Früchte der *C. senna* häufig erhöhte Aflatoxinkonzentrationen aufweisen. Verunreinigungen mit Aflatoxinen wurden als ein zentrales Qualitätsproblem indischer *C. senna* erkannt.

1.2. Ziele der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, den Ort und Zeitpunkt sowie die Ursachen und Bedingungen der Bildung von Aflatoxinen in der Arzneipflanze *C. senna* zu ermitteln, um eine sichere Produktion der Arzneipflanze gemäß den gesetzlichen Anforderungen zu gewährleisten.

Es wurde untersucht,

- in welchen Pflanzenbestandteilen sich Aflatoxine befinden,
- welche Merkmale auf Aflatoxinbelastung hindeuten,
- wie groß die Aflatoxinbildung vor der Ernte ist,
- welchen Einfluss Beschädigungen von Insekten auf den Aflatoxingehalt haben,
- wie das Trocknungsverfahren die Aflatoxinkontaminationen beeinflusst,
- welchen Einfluss die Lagerung in Indien auf die Aflatoxingehalte hat,

- welche saisonalen und regionalen Unterschiede es gibt,
- welche herkunftspezifischen Unterschiede es gibt und
- welche Rückschlüsse die Bestimmung von Pilzkeimzahlen auf die Aflatoxinkonzentration zulassen.

Die Fragestellungen wurden erarbeitet, indem über fünf Jahre (1995-2000) hinweg kontinuierlich in mehr als 1000 Proben der Arzneipflanze die Aflatoxingehalte bestimmt wurden.

Die Proben bestanden zu einem aus auf Feldern geerntetem Frischmaterial, zum anderen aus in Dörfern gewonnenen Trocknungsproben der Anbauregionen in Tamilnadu und Gujarat sowie aus Lagerbeständen aller großen indischen Exporteure.

Zur Ermittlung von Vor- und Nacherntekonzepten zur Vermeidung der Aflatoxinbildung bei *C. senna* wurden Proben untersucht, die aus folgenden Quellen stammten:

- Laborversuche zur Aflatoxinbildung in *C. senna*
- Feldversuche, in denen anbautechnische Möglichkeiten erprobt wurden
- einem eingerichteten Sortier- und Trocknungsplatz, auf dem verschiedene Trocknungs- und Detoxifizierungsverfahren untersucht wurden
- Lagerversuche

In 52 Proben mit bekannten Aflatoxingehalten wurden Pilzkeimzahlen bestimmt. Die Bestimmung der Pilzkeimzahlen in Proben der *C. senna* mit bekannten Aflatoxingehalten wurde am Institut für Phytophatologie der Justus-Liebig-Universität in Gießen durchgeführt.

1.3. Überblick über den Aufbau der Arbeit

In dieser Arbeit werden zunächst die derzeitigen Erkenntnisse der Wissenschaft zu Aflatoxinen in pflanzlichen Produkten dargestellt. Die aflatoxinproduzierenden Pilze werden genannt, und auf die Bedingungen der Aflatoxinbildung wird eingegangen. Es werden kurz die bekannten toxikologischen Auswirkungen des Mykotoxins und die derzeitigen gesetzlichen Regelungen dargestellt.

Daran anschließend wird die Arzneipflanze *C. senna* beschrieben. Eingegangen wird auf die Botanik, die Nomenklatur, die natürliche Verbreitung sowie kurz die pharmakologische Wirkung der Pflanze.

In Kapitel 3 werden die Untersuchungsgebiete in Indien mit den dortigen Anbau-, Ernte- und Aufarbeitungsverfahren für *C. senna* beschrieben. Die Unterschiede zwischen den Untersuchungsgebieten in Tamilnadu und Gujarat sind für spätere Diskussionen bedeutsam.

Das 4. Kapitel beinhaltet die Methoden der Aflatoxinuntersuchungen in *C. senna*. Es werden die Methoden der Aflatoxinbestimmung und die Auswertungsverfahren dieser Arbeit beschrieben.

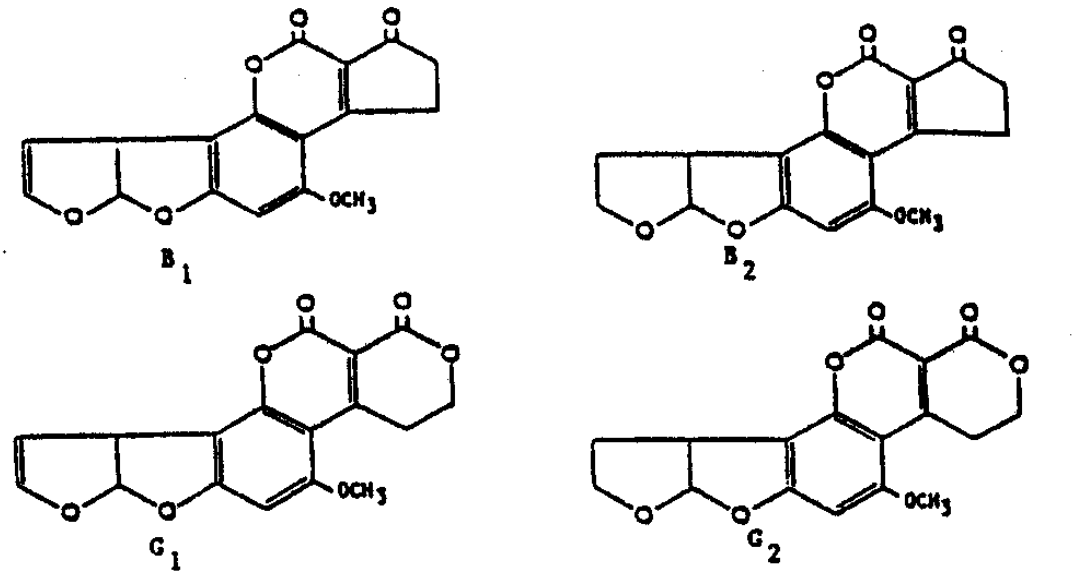
In Kapitel 5 werden die untersuchten Fragestellungen von der Verteilung der Aflatoxine in der Pflanze über die Aflatoxinbildung vor, während und nach der Trocknung bis hin zu regionalen, saisonalen und herkunftspezifischen Unterschieden der Aflatoxinbildung in 9 Unterkapiteln dargestellt. Da diesbezüglich eine Vielzahl unterschiedlicher Feld- und Laborversuche durchgeführt wurden, ist zu jedem ein eigener Einleitungs-, Methoden-, Ergebnis- und Diskussionsteil verfasst worden, um die jeweiligen Zusammenhänge stets präsent zu haben. Die daran folgende Gesamtbetrachtung setzt die einzelnen Ergebnisse in Beziehung zueinander und führt zu einer zusammenfassenden Bewertung. Abschließend folgt eine Zusammenfassung und eine Kurzfassung der Arbeit in Englisch.

2. Literaturübersicht

2.1. Aflatoxine

2.1.1. Definition

Aflatoxine sind Mykotoxine, also von Pilzen gebildete Substanzen, die für lebende Organismen giftig sein können. Insgesamt werden mehr als zehn Substanzen Aflatoxine genannt (ONG 1975, BEUCHAT 1978). Chemisch handelt es sich bei Aflatoxinen um Difurancoumarin-Derivate (WEIDENBÖRNER 1998). Die wichtigsten in Pflanzen vorkommenden Aflatoxine sind B_1, B_2, G_1, G_2. Aflatoxin B_2 bzw. G_2 stellen die zweifach hydrierten Derivate von Aflatoxin B_1 und G_1 dar.



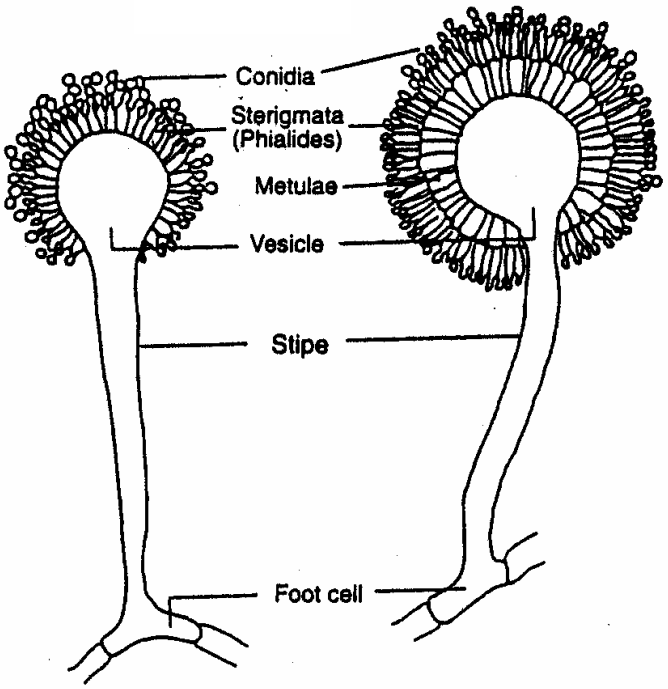
(Quelle: Gourama & Bullerman 1995)

***Abb. 1*:** *Strukturformeln von Aflatoxin B_1. B_2,, G_1 und G_2*

B-Aflatoxine fluoreszieren unter UV-Licht blau, G-Aflatoxine fluoreszieren grün. Die Indexzahl gibt die Toxizität des Aflatoxins an, wobei 1 eine extrem hohe und 2 eine geringere Toxizität bedeutet. Aflatoxin B_1 ist sowohl das giftigste, als auch in der Regel das in der größten Konzentration vorkommende Toxin. Aflatoxine finden sich nicht nur in den Hyphen und Konidien der Aflatoxinbildner, sondern diffundieren auch in das umgebende Substrat (WILSON & ABRAMSON 1992, MÜLLER & WEBER 1996).

2.1.2. Biologie des *Aspergillus*

Aflatoxine werden von Pilzen der Gattung *Aspergillus* gebildet (DAVIS 1981). Charakterisiert wird die Gattung *Aspergillus* durch die Ausbildung von asexuellen Konidiosporen in einer speziellen Gießkannen ähnelnden Form, die vom Entdecker ANTONIO MICHELI (1729) Aspergillum genannt wurde. Dieses Aspergillum ist entweder uniseriat oder biseriat (siehe Abb. 2).



(Quelle: Gourama & Bullerman 1995)

Abb.2: *Uniseriate und biseriate Aspergilli von Aspergillus flavus*

Aufgrund der großen Anzahl von Enzymen, die *Aspergillus*-Pilze für ihre Entwicklung bilden können, sind sie in der Lage, unterschiedlichste Ausgangsubstrate für ihr Wachstum zu nutzen. Sie wachsen auf fast allen Pflanzenmaterialien, wie auf Samen, Leder, Papier, Holz und Textilien aber auch auf Farben, vielen Kunststoffen und Gummi (TOMAS 1977, COKER et al. 1984). Während *A. flavus* fast alle pflanzlichen Substrate für sein Wachstum nutzen kann, bildet er nur in einigen Aflatoxine.

Die größte Bedeutung für die Aflatoxinbildung haben die verwandten Spezies *Aspergillus flavus* Link und *A. parasiticus* Van Tieghem (ELLIS et al. 1991). Als weiterer Aflatoxinbildner

wird auch *A. nomius* beschrieben (KURTZMAN et al. 1987). *A. flavus* und *A. parasiticus* sind an ihren in der Regel gelbgrünlichen Sporenträgern zu erkennen (GOURAMA & BULLERMAN 1995). Unter den *A. flavus* und *A. parasiticus* Pilzen gibt es eine Vielzahl verschiedener Stämme mit sehr hohen bis überhaupt keinem Aflatoxinbildungspotential (COTTY & BHATNAGAR 1994). Von *A. flavus* werden die Aflatoxine B_1 und B_2 gebildet und von *A. parasiticus* zusätzlich die Aflatoxine G_1 und G_2 (GOURAMA & BULLERMAN 1995). Pilze der Sektion *A. parasiticus* sind stärker an den Boden gebunden und kommen vermehrt in Erdnüssen vor, während *A. flavus* besser an oberirdische Lebensbedingungen angepasst ist und in Mais, Baumwollsamen und Baumnüssen dominiert (DIENER et al. 1987).

A. flavus gehört zu den thermophilen und xerophilen Schimmelpilzen, so dass er sich vor allem unter heißen und trockenen Bedingungen gegen konkurrierende Mikroflora durchsetzen kann. Aflatoxine werden daher vermehrt in tropischen und subtropischen Regionen gebildet.

2.1.3. Systematik des Pilzes

Eine traditionelle mykologische Systematik von AINSWORTH et al. (1971) zählt die Gattung *Aspergillus* zur Klasse der Hyphomycetes, der Ordnung Hyphomycetales und der Familie der Moniliaceae. WEIDENBÖRNER (1998) zählt die Gattung Aspergillus zu der Unterabteilung Deuteromycota (Fungi imperfecti). Nach WEIDENBÖRNER (1998) ist bei diesen Pilzen keine Hauptfruchtform bekannt, sondern ausschließlich parasexuelle Vermehrungsformen. Diese Vermehrungsform der Pilze führt zu einer hohen, taxonomisch schwer fassbaren Variabilität morphologischer und physiologischer Merkmale. Nach HAKSWORTH et. al (1995) ist deshalb eine endgültige Einteilung für diese Pilze in Klasse, Ordnung und Familie noch nicht möglich. Aufgrund der schwierigen toxonomischen Differenzierung der *Aspergillus*- Arten werden untere anderem auch *A. flavus* und *A. parasiticus* von vielen Wissenschaftlern unter *Aspergillus*-Sektion flavi zusammengefasst (NESCI & ETCHEVERRY 2002). So auch in dieser Arbeit. Wenn im Folgenden von *A. flavus* gesprochen wird, sind beide aflatoxinbildende Species gemeint.

2.1.4. Bedingungen der Aflatoxinbildung

Die Bildung von Aflatoxinen ist eine Konsequenz aus Pilz, Substrat und Umweltbedingung (GOURAMA & BULLERMAN 1995). Wichtige Faktoren sind dabei:

Pilz:

Für die Aflatoxinproduktion sind aflatoxigene Pilzstämme eine zwingende Voraussetzung. Die gebildeten Aflatoxinkonzentrationen sind dabei abhängig vom Aflatoxinbildungspotential der vorhandenen Pilzstämme sowie deren gegebene Konkurrenzverhältnisse zu anderen Pilzen im Substrat.

Substrat:

Es gibt Substrate mit besonders hohem Aflatoxingefährdungspotential und welche mit niedrigem oder gar keinem. Nach WEIDENBÖRNER (1998) gehören Erdnüsse, Mais, Paranüsse, Baumwollsamen, Pistazien und Kopra zu den Früchten mit hohem Aflatoxingefährdungspotential; Feigen, Mandeln, Pekannüsse, Walnüsse, und Rosinen haben ein mittleres Aflatoxingefährdungspotential; verschiedene Hirsearten, Weizen, Hafer, Gerste, Reis, Sojabohnen und andere Körnerleguminosen unterliegen eher selten einer Aflatoxinkontamination. Fettreiche Samen haben in der Regel ein sehr hohes Aflatoxingefährdungspotential, Getreide ein meist deutlich geringeres, und grüne Blattware kann kaum für die Aflatoxinsynthese des Pilzes genutzt werden.

Temperatur:

Laborversuche haben ergeben, dass *A. flavus* zwischen 10 °C und 43 °C wachsen kann und die Optimaltemperaturen bei 30–35 °C liegen (LACEY & MAGAN 1991, WILSON & ABRAMSON 1992). Nach JACOBSEN et al. (1993) können Aflatoxine von *A. flavus* in dem Temperaturbereich von 12 °C bis 42 °C gebildet werden. GOURAMA & BULLERMAN (1995) beschreiben eine allgemein anerkannte Optimaltemperatur für die Aflatoxinbildung des Pilzes von 25–28 °C. Die Temperaturansprüche des Pilzes sind also recht hoch, weshalb auch die Aflatoxinproblematik auf wärmere Klimazonen begrenzt ist.

Feuchtigkeit:

Als trockenresistenter Pilz benötigt *A. flavus* für Wachstum und Aflatoxinbildung relativ geringe Restfeuchten in seinem Substrat. Nach WEIDENBÖRNER (1998) liegen die minimalen a_w–Werte für das Wachstum von *A. flavus* bei 0,78–0,84 und für die Aflatoxinproduktion bei 0,83–0,87 (NORTHOLT et al. 1977). Das bedeutet, dass je nach Substrat, Temperatur und Luftfeuchtigkeit Wassergehalte von 8 bis 16 % für eine Aflatoxinsynthese ausreichen (TRENK & HARTMAN 1970, DIENER & DAVIS 1970, JACOBSEN et al. 1993). Eine physiologische Obergrenze für die Aflatoxinbildung besteht

nicht. So produziert der Pilz im Labor auch Aflatoxine in wässrigen Lösungen (aw-Wert=1). Außerhalb von Laborbedingungen wird jedoch in den meisten Pflanzenmaterialen bei sehr hohen Feuchtigkeitsgehalten kein Aflatoxin mehr gebildet; so liegt die obere Grenze der Aflatoxinbildung in Erdnüssen bei etwa 25 % Restfeuchte (GOLDBLATT & DOLLEAR 1977). JACOBSEN et al. (1993) beschreiben eine allgemeine Obergrenze der Aflatoxinbildung bei 30% Restfeuchte. Als Ursache wird von CHANG & MARKAKIS (1981) die verstärkte Konkurrenz von anderen Pilzen, Hefen und Bakterien und deren Stoffwechselprodukten bei hoher Restfeuchte diskutiert. Aflatoxine werden also in der Regel bei nur begrenztem Wasserangebot gebildet.

Weitere relevante Umweltbedingungen:

Zu den aflatoxinrelevanten Umweltbedingungen zählen außerdem noch der pH-Wert und die Gasatmosphäre. *A. flavus* kann in einem pH-Bereich zwischen 3 bis 8 wachsen. Er bevorzugt eine eher alkalische Umgebung und kann stark saures Milieu nur schlecht tolerieren (WHEELER et al. 1991). A. flavus benötigt zwar Sauerstoff für Wachstum und Entwicklung, er ist jedoch gut an Bedingungen mit geringen O_2- (0,14 % LACELY 1984) und hohen CO_2-Konzentrationen angepasst (ELLIS et al. 1994).

2.1.5. Aflatoxinbildung vor und nach der Ernte

Aflatoxine können sowohl vor als auch nach der Ernte gebildet werden (BHATNAGAR et al. 1991, GOURAMA & BULLERMAN 1995). Die Aflatoxinbildung vor der Ernte kann gefördert werden durch

- Trockenstress (HILL et al. 1983, STAHR et al. 1990, SANDERS et al. 1993),
- Insektenbefall (BORGEMEISTER et al. 1994, HELL 1997, SÉTAMOU et al. 1998),
- Nährstoffmangel (JONES & DUNCAN 1981, PAYNE et al. 1989) und
- Konkurrenzstress durch geringen Pflanzenabstand und Unkrautdruck (LILLEHOJ 1983, SANDER et al. 1985).

Besonders anfällig für hohe Aflatoxinkontaminationen sind Pflanzen, die mit geringen Bodenfeuchten bei hohen Temperaturen mit relativen Luftfeuchten von >80 % wachsen müssen (JACOBSEN et al. 1993). DIENER et al. (1987) beschreiben, dass unter Trockenstress stehende Pflanzen anfälliger für Pilzinfektionen sind, da das ökologische Gleichgewicht im Boden zugunsten aflatoxinproduzierenden Aspergilli-Stämmen verschoben wird.

Insekten kommt eine besondere Bedeutung für das Aflatoxinvorkommen zu und zwar vor als auch nach der Ernte, indem sie zum einen als Vektoren für den Pilz fungieren (DIENER et al. 1987) und zum anderen die Pflanzen schwächen und beschädigen sowie ihren Kot als Substrat für den Pilz zurücklassen (BILGRAMI et al. 1992).

Das Genus *Aspergillus* galt lange vornehmlich als Lagerpilz. Eine unsachgemäße Lagerung mit kritischen Restfeuchten bei hohen Temperaturen kann zu starkem Befall von *Aspergillus*-Pilzen führen und bei anfälligen Produkten zu einer massiven Bildung von Aflatoxinen.

2.1.6. Toxikologie der Aflatoxine

Aflatoxine gehören zu den giftigsten Substanzen in der Natur (EATON & GALLAGHER 1994). Aflatoxine können auf den menschlichen und tierischen Organismus akut toxisch, kanzerogen, mutagen, teratogen und immunschwächend wirken. Aflatoxin B_1 ist das Aflatoxin mit dem höchsten kanzerogenen Potential und wurde von der IARC (International Agency for Research on Cancer) in die Kategorie 1 eingeordnet. Hierzu gehören Substanzen bei denen anhand von epidemiologischen Untersuchungen ausreichend kanzerogene Wirkung beim Menschen (IARC 1993) bewiesen werden konnte.

Wirkungsweise:

Die Kanzerogenität der Aflatoxine beruht auf der Bildung eines äußerst reaktiven Epoxids während der Metabolisierung. Dieses Epoxid bildet Addukte mit Makromolekülen, u. a. mit Nukleotiden der DNA, wodurch es zu Strangbrüchen, genetischen Mutationen und zur Tumorbildung kommen kann. Da die Metabolisierung hauptsächlich in den Leberzellen stattfindet, wirken Aflatoxine vor allem hepatokanzerogen (DIRHEIMER, 2000).

Symptome:

Die klinischen Symptome einer akuten Aflatoxikose sind sowohl bei Menschen als auch bei Nutztieren weit gefächert. Bei landwirtschaftlichen Nutztieren reichen sie von Reduzierung der Gewichtszunahme bzw. der Milchleistung über Leberveränderungen, Hämorrhagien an mehreren Körperstellen, Ataxien bis zum plötzlichen Niederstürzen oder Tod der Tiere (FACHBEREICH LOEL, 1999). Bei Menschen führt die Aufnahme großer Dosen von Aflatoxin zu akutem Leberversagen sowie schweren Nierenschäden. Anhand der Ergebnisse von Tierstudien wird der LD50-Wert für den Menschen auf 1 bis 10 mg Aflatoxin B_1/kg Lebensmittel geschätzt (WEIDENBÖRNER

2001). Es gibt weltweit Befunde von akuten Aflatoxikosen bei Menschen und Haustieren (KRISHANAMACHARI 1975).

Große Bedeutung hat die chronische Aflatoxinexposition insbesondere in warmen und trockenen Regionen der Erde, in denen Grundnahrungsmittel mit erhöhten Aflatoxinkonzentrationen konsumiert werden müssen. Dort werden Aflatoxine u. a. mit Krankheiten wie Leberkrebs, dem Reye's Syndrom, der Indischen Kinderzirrhose (Leberzirrhose), chronischer Gastritis und Kwashiorkor in Zusammenhang gebracht (HENDRICKSE 1984, WANG et al. 1983, BHAT & MILLER, 1991).

Bedeutung:

Aflatoxine gehören zu den genotoxischen und krebserzeugenden Stoffen, für die es keine Schwellen- oder Grenzwerte gibt, unterhalb derer keine schädliche Wirkung beobachtet wird. Es ist somit momentan unmöglich, eine zulässige tägliche Aufnahmemenge festzulegen. Man versucht dieser Problematik durch die Festsetzung möglichst niedriger Grenzwerte zu begegnen.

2.1.7. Derzeitige Gesetzgebung für Aflatoxine

Aufgrund ihrer Giftigkeit haben weltweit viele Länder Grenzwerte für Aflatoxine festgelegt. Sie liegen in der Regel zwischen 5 und 50 µg/kg (HANSEN 1993). Die US Food and Drug Administration hat für die meisten Nahrungs- und Futtermittel einen Grenzwert für Aflatoxine von 20 µg/kg definiert. In der EU gelten derzeit die wohl strengsten Richtlinien, die in Verordnungen über zulässige Höchstmengen an Aflatoxine festgehalten sind.

- Verordnung über Höchstmengen an Mykotoxinen in Lebensmitteln vom 2. Juni 1999
- Verordnung über das Verbot der Verwendung von mit Aflatoxinen kontaminierten Stoffen bei der Herstellung von Arzneimitteln vom 19. Juli 2000
- Verordnung zur Festsetzung der Höchstgehalte für bestimmte Kontaminanten in Lebensmitteln vom 8. März 2001

Die Verordnungen regeln, dass für alle Erzeugnisse, die für den direkten Verzehr bestimmt sind, ein Grenzwert von 2 µg/kg Aflatoxin B_1 und 4 µg/kg für die Summe der Aflatoxine B_1,B_2,G_1, und G_2 festgehalten wird. Ausnahmen gelten sowohl für den Handel, und zwar für Produkte, in denen vor dem Verzehr mittels Sortier- und anderen physikalischen Verfahren die Aflatoxingehalte gesenkt werden können, als auch für nationale Vorschriften von Mitgliedstaaten über Höchstgehalte für Aflatoxin in bestimmten Lebensmitteln, für die keine

Gemeinschaftsvorschriften erlassen wurden. Der Gesetzgeber versucht damit dem Umstand Folge zu leisten, dass es beim gegenwärtigen Stand der wissenschaftlich-technischen Kenntnisse durch Verbesserung der Produktions- und Lagertechniken unmöglich ist, das Auftreten der Schimmelpilze und folglich das Vorkommen von Aflatoxinen in Lebensmitteln gänzlich zu verhindern.

2.2. Cassia senna

2.2.1. Botanik

Cassia senna L. gehört zu der Familie der Caesalpiniaceae**.** Sie ist ein bis zu 2 m hoher Strauch. Ihre Blätter sind fünf- bis neunpaarig gefiedert. Die Blattspindel ist 7 bis 14 cm lang und hat oberseitig eine deutliche Rinne. Die Blättchen sind lineallanzettlich, 1 bis 6 cm lang und 0,3 bis 2 cm breit. Die Blütenstände sind blattachselständige, aufrechte Trauben mit zahlreichen gestielten, zygomorphen Blüten. Die Blüten haben fünf eiförmig-lanzettliche, dachziegelig deckende Kelchblätter und fünf gelb braun geaderte Kronblätter. Von den zehn Staubblättern sind nur sieben fertil. Die drei oberen sterilen Staubblätter sind 2 mm kurz, die vier seitlichen sind 7 mm lang und die drei unteren säbelartig gekrümmten. Die als Schauapparat dienenden Antheren sind 12 mm lang. Die etwas nierenförmigen 15 bis 17 mm breiten und 4 bis 5,5 cm langen Hülsen sind flach. Der Samen ist gelblich, zusammengedrückt, eiförmig-keilförmig mit kurzem Stiel und runzeliger Oberfläche (MADAUS 1979).

2.2.2. Inhaltsstoffe und Wirkungsweise

Sennesblätter und –Früchte gehören zu den klassischen Anthrachinondrogen. Sie enthalten eine hohe Anzahl verschiedener Anthrachinonderivaten wie Chrysonphanol, Emodin, Aloe-Emodin und Rhein (LEMLI 1986, SELVARAJ & SUBASH CHANDER 1978). Sie liegen in der Pflanze hauptsächlich in Anthronform, am C-8 mit Glucose verknüpft, vor. Bei der Trocknung oder dem Welken der Blätter entstehen durch Kombination oxidativer und enzymatischer Vorgänge Dianthrochinone wie die pharmakologisch bedeutsamen Sennoside A, B, C und D (STOLL & BECKER 1950, LEMLI & CUVEELE 1978). Der Gesamtgehalt an Sennosiden liegt dabei zwischen 2-7 % des Trockengewichts (ATZORN et al. 1981, LOHAR et al. 1979).

Bei Einnahme von Sennosiden werden diese nicht resorbiert, sondern erst im Dickdarm durch Darmbakterien in die pharmakologisch aktiven Substanzen wie das Rhein-9-anthron und Rhein gespalten (KOBASHI et al. 1980, SASAKI et al. 1979). Dort wirken diese zum einem auf

die Peristaltik, indem sie die nicht-propulsiven Kontraktionen hemmen und die propulsiven Kontraktionen verstärken (GARCIA-VILLAR et al. 1980) und zum anderen auf den Wasser- und Elektrolythaushalt. Dabei wird die Wasseraufnahme zu einer regelrechten Sekretion von Flüssigkeit in den Darm umgewandelt (LENG-PESCHLOW 1980). Auf diese Weise wirken Sennesszubereitungen als gutverträgliche mittelkräftige Laxanzien, deren abführende Wirkung sich innerhalb von sechs Stunden manifestiert (GOODMAN & GILMAN 1970).

2.2.3. Nomenklatur der Pflanze

Aufgrund der weiten natürlichen Verbreitung (siehe Kapitel 2.2.4.) gibt es eine Vielzahl unterschiedlicher Formen und Rassen von *C. senna*. Zusätzlich hat die große weltweite pharmakologische Bedeutung dazu beigetragen, dass es eine Vielzahl an wissenschaftlichen Namen und eine noch größere an volkstümlichen Bezeichnungen für diese Pflanze gibt. Einige Beispiele synonymer wissenschaftlicher Bezeichnungen für *Cassia senna* sind *Cassia angustifolia* Vahl., *Senna officinalis* Roxb., *Cassia lanceolata* Prodr., *Cassia medica* Forssk., *Cassia medicinalis* Bisch., *Cassia acutifolia* Del., *Cassia alexandrina* (Mill.)Thell., *Senna alexandrina* Mill., *Senna acutifolia* Batka.

Viele Pharmakopien der Welt unterscheiden aufgrund der beiden Hauptherkünfte für den kommerziellen Handel zwischen indischer und afrikanischer Senna.

Die indische Form wird zumeist als *Cassia angustifolia* Vahl. (= *Senna officinalis* Roxb., *Cassia lanceolata* Prodr.) oder auch als Tiruneveli Senna bezeichnet. Sie wird hauptsächlich in Tamilnadu und Gujarat kultiviert. Sein natürliches Verbreitungsgebiet erstreckt sich nach HEGENAUER (1996) von Eritrea bis Indien. Anzumerken ist, dass sie in ihrem Hauptanbaugebiet in Tamilnadu nicht wild anzutreffen ist, da sie die heftigen Niederschläge in der Regenzeit nicht verträgt.

Die afrikanische Form von *C. senna* wird auch *Cassia acutifolia* Del. (= *Cassia alexandrina* (Mill.) Thell., *Senna alexandrina* Mill., *Senna acutifolia* Batka. oder auch Afrikanische, Ägyptische oder Alexandriner Senna genannt. Die Verbreitung von *C. acutifolia* Del. ist nach GÄRTNER (1982) auf die afrikanische Sahel-Zone begrenzt. Das Zentrum der kommerziellen Nutzung von *C. acutifolia* Del. ist das Niltal im nördlichen Sudan. Im Gegensatz zur indischen *C. angustifolia* werden vornehmlich Wildsammlungen vorgenommen. Äußerlich unterscheiden sie sich in Form und Größe der Früchte. Die aus dem Sudan stammenden Früchte sind mehr gekrümmt und breiter als die in Tamilnadu angebauten. Die Früchte von den in

Gujarat gefundenen Wildformen der *C. senna* (GUPTA 1974, eigene Funde) hatten Ähnlichkeit mit denen aus dem Sudan.

Nach LEMLI et. al. (1983) unterscheidet sich *C. acutifolia* und *C. angustifolia.* durch verschiedene Naphtalen-Glykoside, die Tinnevellin-Glykoside (nur in *C. angustifolia.*) und die 6-Hydroxymusizin-Glykoside (nur in *C. acutifolia*). UPADHYAYA & SINGH (1989) bestätigen jedoch wieder die phytochemische Identität.

Aufgrund der umstrittenen Differenzierung der beiden Arten wird in dieser Arbeit hauptsächlich der Oberbegriff *C. senna* verwendet, auch wenn es sich in erster Linie um Pflanzen indischer Herkunft handelt. Unterschieden wird in *C. angustifolia* und *C. acutifolia* bei den vergleichenden Versuchen mit indischem und aus dem Sudan stammendem Saatgut der Pflanze.

2.2.4. Das natürliche Verbreitungsgebiet

Cassia senna ist eine mehrjährige Wüstenpflanze (BRUNETON 1995) mit einer weiten natürlichen Verbreitung in den heißen, semiariden bis ariden Trockenzonen des asiatischen, arabischen sowie afrikanischen Kontinents (IWU 1990, AL-YAHYA 1987, GUPTA 1974, SHIRAI 1985). Ihr bevorzugter Standort in den Trockenzonen sind Senken, an denen sich bei Regenereignissen Niederschlagswasser sammelt (MAHMOUD 1985). Für die Keimung sind die Ansprüche an das Wasserangebot hoch, da *C. senna* eine sehr feste Samenschale besitzt (BHATIA & CHAWAN 1983). An solchen Senken ist besonders gut gewährleistet, dass der Samen genug Feuchtigkeit zum Keimen hat und die Samenschale durch den Wassertransport leicht aufgeraut wurde, was die Keimfähigkeit begünstigt. Sie gedeiht aber auch, meist in Gruppen, auf offenen Flächen (ISMAIL & BABIKIR 1986). Sobald *C. senna* ihr ausgeprägtes Wurzelsystem einmal ausgebildet hat, braucht sie keine weiteren Niederschläge zum Überleben. Die Pflanze reagiert sehr empfindlich auf Staunässe (GÄRTNER 1982). *C. senna* besitzt eine sehr hohe Salztolerranz (AYOUB 1977, MAHMOUD 1985) und ist deshalb auch auf Senken in ariden Gebieten besonders konkurrenzfähig.

3. e Anbau- und Verarbeitungsbedingungen von *Cassia* senna in den Untersuchungsgebieten

3.1. Die geographische Lage

Die Hauptanbaugebiete für *C. senna* in Indien liegen im südindischen Bundesstaat Tamilnadu und im nordindischen Bundesstaat Gujarat (Abb. 3). Während dieser Studie wurden erfolgreiche Versuche unternommen den Anbau von C. senna auch im Bundesstaat Rajasthan in der Umgebung von Jaipur zu etablieren.

(Quelle: http://encarta.msn.com/encnet/features/mapcenter/map.aspx)

Abb. 3: *Anbaugebiete für C. senna in Indien*

3.1.1. Tamilnadu

Die Anbaugebiete in Tamilnadu für *C. senna* liegen hauptsächlich in den besonders trockenen südöstlichen Distrikten des Bundesstaates. Im Distrikt Tirunelveli werden in der Tro-

ckenzeit auf Reisfeldern Sennes-Blätter produziert. Chidanbaranar, nördlich von Tuticorin gelegen, ist das Hauptanbaugebiet für Sennes-Früchte. In den Distrikten Kamaragar bei Tuticorin, Ramanamapuram und Madurai wird Senna ohne ausgeprägte Bevorzugung der Blatt- oder Fruchternte angebaut.

(Quelle: http://encarta.msn.com/encnet/features/mapcenter/map.aspx)

Abb. 4: *Anbaugebiete im südindische Bundesstaat Tamilnadu für C. senna*

3.1.2. Gujarat

Ein nicht unbedeutender Teil der indischen Senna-Produktion stammt aus dem nordindischen Anbaugebiet im Bundesstaat Gujarat, der auf der Halbinsel Kutch liegenden Distrikte Anjar, Bhuj und Rappar.

Senna wurde hier bis zu den 80er-Jahren des 20. Jahrhunderts nur als Wildpflanze für die traditionelle indische Medizin genutzt (Angabe lokaler Händler). Erst seit 1983 wurde südindisches Saatgut importiert und kommerzieller Anbau für den internationalen Handel betrieben. Die meisten Anbauflächen liegen in der Nähe der Städte Anjar und Bachau sowie im Nordos-

ten der Halbinsel Kutch. Die Region ist nur sehr dünn besiedelt, weshalb hier im Gegensatz zu dem Anbaugebiet in Tamilnadu die Arbeitskräfte knapp, aber genug geeignete Anbauflächen vorhanden sind.

(Quelle: http://encarta.msn.com/encnet/features/mapcenter/map.aspx)

Abb.5: *Anbaugebiete im nordindische Bundesstaat Gujarat für C. senna*

3.2. Die Bodenverhältnisse in den Untersuchungsgebieten

3.2.1. Tamilnadu

Die landwirtschaftlich genutzten Böden werden vor Ort in Black-Cotton-Soil, Red-Soil und Sandy-Soil eingeteilt. Senna wird in Tamilnadu hauptsächlich auf den Black-Soil-Böden angebaut. Diese gehören zur Ordung der Vertisole. Es sind dunkle Böden mit hohem Tongehalt

(> 30 %), die große, tiefe Risse in der Trockenzeit aufweisen. Der pH-Wert der Böden ist neutral bis stark alkalisch, pH 7–9 (KARUNAKARAN 1991).

Große Anbauflächen für Senna sind die Alluvialböden in Wasserrückhaltebecken der Region. Sie wurden angelegt, um die Grundwasserneubildung zu fördern. Während der Regenzeit entstehen dort durch Dämme gehaltene große flache Seen. Sobald diese austrocknen, wird dort Senna ausgesät, die für solche Standorte optimal geeignet ist (siehe natürliches Verbreitungsgebiet). Prinzipiell kann *C. senna* auf fast allen in Tamilnadu anzutreffenden Böden kultiviert werden. Sie stellt keine besonderen Ansprüche an die Bodenqualität und ist besonders trockenresistent. Desshalb wird sie fast ausschließlich auf Standorten angebaut, auf denen aufgrund fehlenden Wassers oder hoher Alkalität der Böden der Anbau von anderen Früchten wie Baumwolle, Chili oder Reis nicht mehr oder nur sehr begrenzt möglich ist. Auf sandigen Böden sind die Mengenerträge geringer, die Wirkstoffkonzentrationen an Sennosiden jedoch höher als auf den Black-Soil-Böden (SHARMA et al. 1980).

3.2.2. Gujarat

Während in Küstennähe und im Rann of Kutch Salzböden wie Solonetze und Solontschake dominieren, ist das Zentrum der Halbinsel Kuch, dem Gebiet des Sennaanbau, vor allem von Rohböden bedeckt. Es handelt sich in erster Linie um lehmige Sande mit Sandanteilen von 60–77 %, Schuffanteilen (hier 2–50 µm) von 7–9 % und Tonanteilen 6–10 % (DHIR & JAIN 1982). Die Böden werden nach FAO Namenklatur als Ustipsamments bzw. Torripsamments (torridus (lat.) = heiß und trocken) angesprochen (SOIL SURVEY STAFF 1975).

Die Böden, auf denen Senna in Gujarat angebaut wird, sind somit bedeutend leichter als die in Tamilnadu. Staunässe kommt auch während der Regenzeit auf den leichten Sanden in Gujarat kaum vor, so dass Senna hier mehrjährig kultiviert werden kann.

3.3. Die Klimaverhältnisse der Untersuchungsgebiete

3.3.1. Tamilnadu

Das Klima in den südindischen Anbaugebieten ist bis auf die Monsunzeit sehr trocken und heiß. Die jährliche Niederschlagsmenge von ca. 700 mm fällt fast ausschließlich während des Südostmonsuns in den Monaten Oktober bis Dezember (Abb. 6). In den Monaten März und April können so genannte Summer-Shower auftreten, meist regional stark begrenzte, kurze, heftige Gewitterniederschläge. Die restlichen Monate sind nahezu niederschlagsfrei.

Die mittlere Jahrestemperatur liegt bei 28 °C mit nur geringen tageszeitlichen und jahreszeitlichen Schwankungen. Nachts fallen die Temperaturen ganzjährig nicht unter 20 °C und tagsüber steigen sie auch in den Sommermonaten auf nicht mehr als 40 °C an.

Das Einsetzen des Südwest-Monsuns im westlich gelegenen, feuchttropischen Bundesstaat Kerala führt in den trockenen Sommermonaten zu kontinuierlich starken Westwinden in der südindischen Anbauregion von *C. senna*.

Trotz des überwiegend ariden Klimas ist die Luftfeuchtigkeit, bedingt durch die Nähe zum Meer und zum feuchttropischen Bundesstaat Kerala ganzjährig hoch. Auch während der Trockenzeit liegt die relative Luftfeuchtigkeit zwischen 60 % bis 80 %.

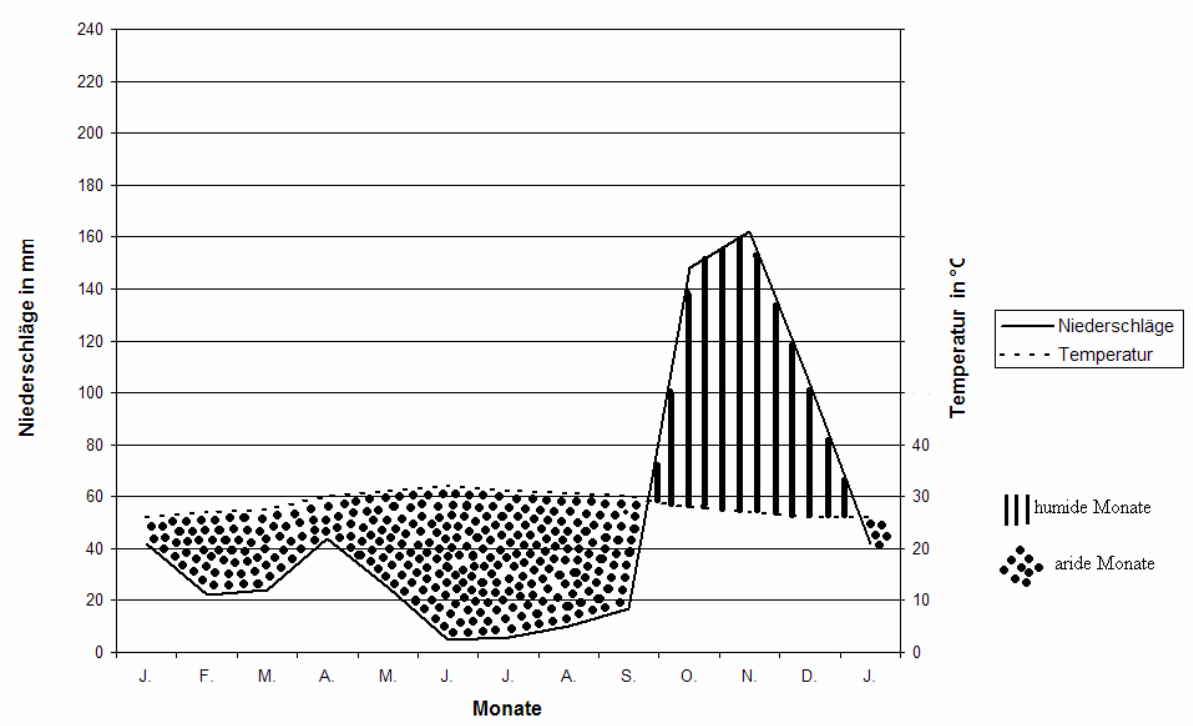


Abb.6: *Klimadiagramm Chidambaranar Distrikt (verändert nach KARUNAKARAN 1991)*

3.3.2. Gujarat

Das Klima des Anbaugebietes in Gujarat auf der Halbinsel Kutch ist noch arider als das in Tamilnadu. Die jährliche Niederschlagsmenge von nur ca. 300 mm fällt fast ausschließlich in den Sommermonaten Juli/August (Abb. 7). Regional begrenzt kann der Niederschlag auf manchen Flächen ein Jahr völlig ausbleiben.

Die mittlere Jahrestemperatur ist mit 26 °C etwas niedriger als in Tamilnadu. Dies ist auf die deutlich kühleren Wintermonate zurückzuführen. Die jahreszeitlichen sowie die Tag-Nacht-

Temperaturschwankungen sind deutlich stärker ausgeprägt als in Tamilnadu. In Gujarat fallen in den Wintermonaten nachts die Temperaturen auf unter 10 °C, und die Tagesmittelwerte liegen unter 20 °C. In den Sommermonaten steigen die Tagesmaximaltemperaturen auf über 40 °C und auch die Sommernächte sind mit teilweise über 30 °C wärmer als in Tamilnadu.

Bis auf die Regenzeit herrschen in dieser Region ablandige, nördliche Winde vor. Sie bringen sehr trockene Luft aus der Wüste Thar. Dies führt zu niedrigeren relativen Luftfeuchtigkeiten (ca. 50 %) im Vergleich zum Anbaugebiet in Tamilnadu. In der Trockenzeit fällt die relative Luftfeuchtigkeit tagsüber auf unter 20 %. Nachts können die Temperaturen jedoch so stark fallen, dass es in den Morgenstunden zu Taubildung kommt.

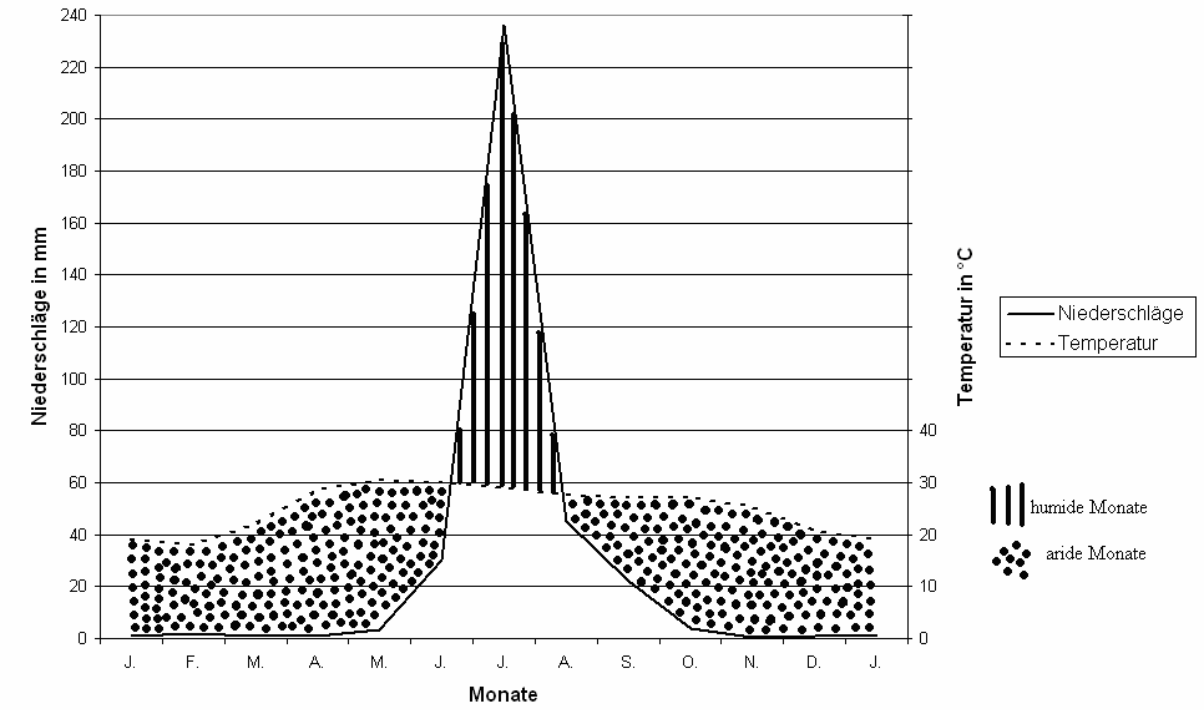


Abb. 7: *Klimadiagramm Buhj (verändert nach WALTER & LIETH 1960)*

3.4. Die traditionelle Anbaupraxis von *Cassia senna* in Indien

In Indien wird der Anbau von *C. senna* in sehr traditioneller Weise durchgeführt. Es werden so gut wie keine Maschinen eingesetzt, bis auf ganz wenige Ausnahmen, wo einfache Traktoren zum Pflügen benutzt werden. Die Männer sind für Pflügen, Säen und die eventuelle Bewässerung zuständig, die Frauen für Ernte, Trocknung und Säuberung der Sennesdrogen. Die Anbauflächen sind bei privatem Land nur wenige Acre groß (1 Acre = 4047 m²), bei gemein-

schaftlichem Anbau auf Land im Kommunaleigentum, wie das der Wasserrückhaltebecken, bis über 1000 Acre.

Für die Bestimmung der Zeitpunkte von Pflügen, Aussaat und Ernte werden häufig Astrologen zu Rate gezogen.

3.4.1. Saatvorbereitung und Aussaat

3.4.1.1. Tamilnadu

In Tamilnadu wird Senna einjährig kultiviert. Nachdem die alten Pflanzen ausgerissen und vom Feld entfernt worden sind, wird der Boden gepflügt. Dies geschieht in der Regel mit von Ochsen gezogenen Holzpflügen und Pflugtiefen von 10 bis 20 cm. Falls organische Düngemittel zur Verfügung stehen, werden diese vor dem Pflügen auf dem Feld ausgebracht. Auf dem ein- bis dreimal grob gepflügten Acker werden ca. 15 bis 25 kg/ha Sennessamen manuell ausgesät. Es wird eine Pflanzendichte von 6 bis 12 Pflanzen/m² angestrebt (GUPTA 1984, PAREEK et al. 1983). Teilweise wird die Keimfähigkeit der Samen beschleunigt, indem die harte Samenschale durch Reiben mit Sand angerauht wird oder indem die Samen vor der Aussaat zwölf Stunden in Wasser vorgequollen werden (KAPUR et al. 1977; SHAH et al. 1981). Wenn zusätzlich zur Aussaat auch anorganische NPK-Düngemittel manuell ausgebracht worden sind (KALYANASUNDARAM et. al. 1981 und SHARMA et. al. 1982 empfehlen eine Düngergabe von 50 kg N/ha und 25 kg P_2O_5/ha), werden diese mit den Samen durch ein weiteres oberflächliches Pflügen oder Grubbern in den Boden eingearbeitet. Falls keine anorganischen Düngemittel eingesetzt wurden, wartet man in der Regel auf den nächsten Regen, der den grob gepflügten Boden einebnet und die Samen einarbeitet. Dies geschieht in den Monaten von Mitte Oktober bis April.

Auf den bevorzugten dunklen, tonigen Böden kann Senna aufgrund der Gefahr von Staunässe erst gegen Ende der Regenzeit ausgesät werden. Sie wird dort vielfach in wachsende Bestände von Chili (*Capsicum anuum)*, Baumwolle (*Gossypium hirsutum)* oder Sonnenblumen (*Helianthus annuus)* untergesät, um in der trockenen Jahreszeit Flächenerträge zu erzielen.

Auf den leichten sandigen Böden wird Senna schon während der Regenzeit ausgesät, häufig als Mischkultur mit Koriander (*Coriander sativum)* oder Hülsenfrüchten wie Linsen und Kichererbsen.

Bei ausreichenden Niederschlägen in den Monaten März und April wird Senna noch als Zweitfrucht nach Koriander, Hirse oder Futterfrüchten angebaut, genauso wie auf den bewäs-

serbaren Reisfeldern nördlich von Tiruneveli, wo die Aussaat bis Ende April vorgenommen wird.

3.4.1.2. Gujarat

In Gujarat wird Senna mehrjährig kultiviert Das bedeutet, dass Senna nur alle drei bis fünf Jahre angesät werden muss.

Nachdem die Pflanzenreste entfernt wurden, wird der Boden vor dem Einsetzen des Monsuns meistens mit einem von einem Kamel gezogenen Pflug gewendet. Nach den ersten Regenfällen wird der Samen mit hölzernem Säscharen in ca. 30 cm weiten Reihen 1 bis 2 cm tief gesät (BHATIA 1983). Weitere Niederschläge sind nötig, damit die Saat aufgeht. In Gujarat wird Senna fast ausschließlich in Reinkultur angebaut. Es gibt nur ganz vereinzelt Fälle, bei denen Senna in Mischkultur mit Mungo-Bohnen *(Phaseolus mungo)* und Tomaten kultiviert wird.

3.4.2. Bearbeitung und Pflege

Senna gilt in ganz Indien als „care free cash crop“. Sie kann im Gegensatz zu ihren Konkurrenten wie Chili oder Baumwolle auch ohne Pestizid- und Düngereinsatz kultiviert werden. Zusätzlich ist sie unabhängiger von Niederschlägen und Bewässerung. Notwendig für Senna ist lediglich das Jäten von Unkräutern. Dieses wird entweder mit der Hacke oder mit dem vom Ochsen gezogenen Pflug durchgeführt und zwar etwa 25–30 Tage, 75–80 Tage und 110 Tage nach der Aussaat (SHAH et al.1981). Eine häufig beobachtete Praxis, in Gujarat fast die ausschließlich angewandte, ist das Weiden von Ziegenherden auf den Senna-Feldern. *C. senna* ist für diese Tiere toxisch (EL-SAYED et al. 1983). Sie rühren die Sennespflanze nicht an, fressen nur die Unkräuter und lassen ihren Dung als wertvolle Nährstoffe zurück.

Bei hohen Marktpreisen für Senna und sich ankündigenden Niederschlägen oder Bewässerungsmöglichkeiten werden nach der ersten Ernte anorganische Düngemittel eingesetzt. Wenn Senna als Mischkultur mit Chili oder Baumwolle angebaut wird, wächst die Pflanze auf Feldern, die bis zum Ende der Chili- oder Baumwollernte im Mai mit anorganischen NPK-Düngemitteln und Insektiziden behandelt wurden.

Trotz der extremen Genügsamkeit ist der Wasservorrat im Boden der limitierende Wachstumsfaktor für Senna. Wenn die Möglichkeit besteht, wie in Tamilnadu in einem sehr begrenzten Ausmaß, sollte die Pflanze nach jeder Ernte bewässert werden.

3.4.3. Ernten

3.4.3.1. Tamilnadu

In Tamilnadu werden Sennesblätter und Sennesfrüchte getrennt voneinander geerntet. Etwa 50 Tage nach der Aussaat kann die erste Blatternte erfolgen. Der optimale Erntezeitpunkt für Sennesblätter ist kurz vor Einsetzen der Blüte (PAREEK et al.1984, LOHAR et al. 1979). Junge Blätter haben zwar höhere Sennosid-Konzentrationen als ältere Blätter (EL-GENGGAIHI et al. 1975), doch sind die Mengenerträge niedriger und die Blätter haben noch nicht die häufig gewünschte dunkelgrüne, leicht bläuliche Färbung. Überdies sind sie zu klein.

Auf den ganz auf die Blatternte spezialisierten Anbauflächen bei Tiruneveli wird häufig folgendes praktiziert. Um möglichst viele und große wirkstoffreiche Sennesblätter zu ernten, werden beim Einsetzen der Blüte die Blütenstände der Sennespflanzen gekappt. Durch die so künstlich verlängerte vegetative Wachstumszeit kann die Blatternte um 75 % gesteigert werden (PAREEK et al. 1983). Auf Flächen, die auf einen optimalen Gesamtertrag von Blättern und Früchten ausgerichtet sind, wie dies beim der großflächige Anbau in den ausgetrockneten Wasserrückhaltebecken der Fall ist, werden die Blätter jeweils erst kurz vor der Fruchternte oder ca. 90 Tage nach Aussaat geerntet. Bei den mehr auf die Fruchternte spezialisierten Anbauflächen, wie vor allem die, auf denen Senna als Mischkultur mit Baumwolle oder Chili kultiviert wird, erfolgt die Blatternte erst nach der ersten oder sogar zweiten Fruchternte.

Die Ernte erfolgt manuell, indem die ganzen Blätter von der Pflanze abgezupft werden, oder die einzelnen Blättchen abgestreift werden. Etwa alle 20 bis 35 Tage kann eine weitere Blatternte erfolgen, so dass drei bis fünf Ernten pro Saison durchgeführt werden können. Nach PUSHPA SING & MOHAN RAO (1982 a) können Erträge bis 1600 kg/ha erreicht werden, was ca. 5000 kg/ha an frischen Sennesblättern entspricht.

Sennesfrüchte werden etwa 100 Tage nach der Aussaat oder ab dem Monat März zum ersten Mal geerntet. Je nach Wachstumsbedingungen liegt der optimale Zeitpunkt für die Fruchternte 25 bis 35 Tage nach Einsetzen der Blüte (PUSHAP SING & MOHAN RAO 1982 b). Dabei werden die einzelnen Fruchtstände mit einem kleinen gebogenen Messer abgeschnitten oder einfach die einzelnen Früchte mit der Hand abgestreift. Ein Fruchtstand trägt 10 bis 25 Früchte, wobei die unteren Früchte schon voll ausgereift sein können und eine braune Farbe besitzen, während sich an der Spitze des Fruchtstandes noch Blüten oder unausgereifte Früchte befinden können. Je nach Wachstumsbedingungen und Blatternten können dann etwa 30 bis 50 Tage nach der ersten Fruchternte eine bis drei weitere Fruchternten durchgeführt werden.

Es können so bis zu 1500 kg/ha frische Früchte geerntet werden. Der Wassergehalt beträgt ca. 85 % in unreifen Früchten und in völlig ausgereiften und an der Pflanze getrockneten Früchten 10 %. Im Mittel liegt der Wassergehalt bei den ersten Ernten bei 75 % und reduziert sich im Laufe der Trockenzeit auf 65 % im frischen Erntegut.

Da die Wachstumsbedingungen auf einem Feld aufgrund unterschiedlicher Saattiefen, Saatmengen sowie Boden- und Wasserverhältnisse häufig ungleich sind, haben die Pflanzen eines Feldes vor allem bei der ersten Ernte nicht den gleichen Entwicklungsstand. Die Ernte eines Feldes kann deshalb, selbst bei einer ausreichenden Zahl an Arbeitskräften, über mehrere Tage andauern. Eine Person kann pro Tag in den Morgen- oder Abendstunden etwa 30 kg Frischmaterial ernten, das in Jutesäcken zu den Trocknungsplätzen transportiert wird.

3.4.3.2. Gujarat

In Gujarat gibt es keine getrennte Blatt- und Fruchternte. Die Ernte erfolgt, indem die ganze Pflanze bis auf den Wurzelstock abgeschnitten wird. Geerntet wird alle zwei bis drei Monate während der Trockenzeit in den Monaten September bis zum Einsetzen des Monsuns im Mai. Bei der ersten Ernte nach der Regenzeit kann es dazu kommen, dass einige Pflanzenbestände schon länger als drei Monate seit der letzten Ernte gewachsen sind und qualitativ als überreif einzustufen sind.

Die Flächenerträge sind bei dieser Erntemethode geringer, dafür ist die Ernte weniger arbeitsintensiv als in Tamilnadu. Es können etwa 4000 kg/ha frisches Ganzpflanzenmaterial pro Saison geerntet werden, wobei eine Person bis zu 300 kg pro Tag erntet.

3.4.4. Die Trocknung

3.4.4.1. Tamilnadu

Die Sennesblätter werden im Schatten getrocknet. Bei einer Trocknung in der Sonne würden die zarten Blättchen durch die intensive Strahlung verbrennen. Die Trocknung wird deshalb entweder unter Bäumen oder in überdachten, gut durchlüfteten Räumen durchgeführt. Die Blätter werden dazu in einer Lage ausgebreitet und drei bis fünf Tage luftgetrocknet. Nach der Trocknung werden sie in Jutesäcken gesammelt und über Händler zu den Weiterverarbeitungsbetrieben nach Tuticorin verkauft.

Sennesfrüchte werden in der Sonne getrocknet. Dies geschieht entweder direkt auf dem Feld oder auf offenen Plätzen und Dächern in den Dörfern. Die Fruchtstände werden in 5 bis 10

cm hohen Lagen ausgebreitet und mindestens einmal täglich gewendet. Die Trocknung dauert drei bis vier Tage.

Nach der Trocknung lösen sich die Stängel von den Früchten. Sie werden durch manuelles Auslesen und durch Sieben von den Früchten getrennt. Die dabei ausfallenden Samen werden für die nächste Aussaat gewonnen. Die so vorgereinigte Ware wird in Jutesäcken gesammelt und bei ausreichender Menge an Händler für die Weiterverarbeitung verkauft.

3.4.4.2. Gujarat

In Gujarat erfolgt die Trocknung in der Regel auf dem Feld oder auf Plätzen in der Nähe der Dörfer. Die abgeschnittenen ganzen Strauchteile werden dort auf 1 bis 1,5 m hohe Haufen geschichtet und in der Sonne getrocknet. Einmal am Tag wird das Erntegut mit Holzgabeln gewendet. Die Trocknung dauert ca. vier bis fünf Tage. Am Ende der Trocknung wird das Sennesmaterial mit Stöcken bearbeitet, damit sich Blätter und Früchte von den Zweigen und Stängeln lösen. Zweige mit einem Durchmesser> 4 mm werden aussortiert und bleiben als Brennmaterial in den Dörfern. Das Gemisch aus Blättern, feinen Stängeln und Früchten wird als Krude bezeichnet und in 50 kg-Säcken auf die Märkte in Anjar und Bachau gebracht, wo es auf Auktionen an die weiterverarbeitenden Betriebe versteigert wird.

3.4.5. Die Weiterverarbeitung

Das Ziel der Weiterverarbeitung ist die Reinigung und die Sortierung der Sennesblätter nach Farbe und Größe. Zuerst wird das Material von Steinen, Sand, Stängeln mit Hilfe einer Windsichtung gereinigt und dann mit Trommelsieben mit Maschenweiten von 3, 6, 8 und 10 mm nach unterschiedlichen Handelsgrößen sortiert. Es gibt die Handelsgrößen Nr. 1 bis 5 wobei die Nr. 1 die größten Blätter mit einer Blattbreite von über 10 mm und Blattlängen von ca. 2 cm darstellt. Die anderen Klassen sind entsprechend der Siebgröße kleiner. Blätter der Handelsgröße Nr. 5 (< 3 mm) bestehen hauptsächlich aus zerbrochenen Blätter und aus Blattspindeln, die für Extraktionszwecke genutzt werden. Chargen mit besonders wohlgefärbten grünen Blättern werden als „Prime Ware“ bezeichnet, die anderen als „FAQ“ (fare average quality of the season) (PILARCZYK 1962).

Bei den Sennesfrüchten erfolgt eine Reinigung von fremden Bestandteilen mittels Trommelsieben. Die Handelsware wird jedoch nicht nach Größe unterschieden, sondern nach Färbung und Trocknungsmethode. Es gibt „FAQ-“, „HP-“ (Hand Picked) und „FP-“ (Fresh Pods) Qualitäten. „HP“-Qualitäten bestehen aus ausschließlich grünen Früchten, bei denen häufig in der

getrockneten Ware durch Handsortierung die fehlfarbenen Früchte entfernt wurden. „FP"-Qualität bedeutet, dass die Ware vom Exporteur als Frischware gekauft und getrocknet wurde. Häufig werden in solcher Ware noch vor der Trocknung fehlfarbene und von Insekten beschädigte Früchte aussortiert. FP-Früchte sind eine wirkstoffreiche und wohlgefärbte Qualität.

Die gereinigte und sortierte Sennesdroge wird in der Regel zu 180 kg-Ballen gepresst, die in Containern weltweit verschifft werden. Der Hauptexporthafen für Senna in Indien ist der von Tuticorin, aber auch von Kandlah (Gujarat) und Mumbay Port wird Senna exportiert.

3.5. Die wirtschaftliche Bedeutung und der Handel von *Cassia senna* in Indien

C. senna ist nach Opium (*Papaver somniferum* L.) und Plantago (*Plantago phsylium* L.) die drittwichtigste Arzneipflanze Indiens (KALYANASUNDARAM et. al. 1981). Indien ist weltweit der größte Exporteur von getrockneten Drogen der *C. senna* und in zunehmendem Maße auch von Verarbeitungsprodukten wie Kalzium Sennoside.

Für den indischen Bauern bedeutet die sehr genügsame Pflanze in erster Linie die Möglichkeit, auf Standorten, auf denen er kaum noch Nahrungsmittel oder andere Cash Crops erfolgreich anbauen kann, eine sichere Ernte und Einkommen während der Trockenperioden zu erzielen.

3.5.1. Flächenerträge von *C. senna* in Indien

Die Erträge sind den Anbauverhältnissen entsprechend sehr schwankend. Eine Gesamternte von 750 kg getrockneter Früchte und Blätter pro Hektar und Jahr wird auf den meisten Standorten in Tamilnadu als eine gute Ernte angesehen. Die Flächenerträge in Gujarat liegen aufgrund der klimatischen und anbautechnischen Unterschiede unter denen in Tamilnadu. Je nach Standort und der Bevorzugung der Blatt- oder Fruchternte, wie es nur in Tamilnadu praktiziert wird, werden folgende Flächenerträge erzielt (Tab. 1).

Tab. 1.: *Flächenerträge per annum getrockneter Drogenqualitäten von* C. senna *in Indien bei unterschiedlicher Ausrichtung der Ernte*

Gebiete	Früchte kg/ha	Blätter kg/ha
Frucht spezialisiert, Tamilnadu	350 – 500	250 – 350
Frucht und Blatt, Tamilnadu	100 – 250	400 – 700
nur Blatt (bewässert), Tamilnadu	0 kg	1000
Ganzpflanzenernte, Gujarat	50 – 100	300 – 500

Quelle: Befragung lokaler Fachleute

3.5.2. Indische Exportstatistik für C. senna

Indien exportiert jährlich ca. 5000 t der Arzneipflanze *C. senna* mit leicht steigender Tendenz (Tab. 2). Die meiste Ware verlässt Indien über den Hafen in Tuticorin, wo seit Beginn des 19. Jahrhunderts die größten Sennaexporteure ansässig sind. Der Anteil der in Gujarat angebauten Ware hatte in dem Untersuchungszeitraum eine steigende Tendenz, während der Anbau in Tamilnadu leicht rückläufig war. Die in Gujarat angebaute Ware, ca. 30 % der Sennesblätter und 10 % der Sennesfrüchte vom Gesamtexport, wurde zum überwiegenden Teil auch über Tuticorin exportiert.

Tab. 2: *Senna-Exporte Indiens der Jahre 1989–1995*

Jahr	Sennesblätter (in t)	Sennesfrüchte (in t)
1989	3000	900
1990	3250	700
1991	3400	750
1992	4200	900
1993	4000	850
1994	4250	825
1995	4600	700

Quelle: Hafenstatistik Tuticorin Port

C. senna wird insbesondere nach Europa Asien und Amerika exportiert (Tab. 3). Europa ist der größte Importeur, wobei Deutschland die Vorreiterrolle Englands übernommen hat. Der überwiegende Teil der Ware verlässt Deutschland jedoch wieder als Fertigprodukte in Tees, Kapseln oder Tabletten sowie zertifizierter Roh- und Halbfertigware in alle Welt.

Tab. 3: *Senna-Importe verschiedener Regionen (in t)*

Jahr	Europa		Asien		Amerika	
April–März	Früchte	Blätter	Früchte	Blätter	Früchte	Blätter
1989	600	1500	165	900	135	600
1990	420	1625	175	975	105	650
1991	450	1700	188	1020	112	680
1992	575	2100	190	1260	135	840
1993	560	2000	162	1200	128	800
1994	545	2125	156	1275	124	850
1995	420	2300	175	1380	105	920

Quelle: Hafenstatistik Tuticorin Port

4. Methoden

Hier werden die angewandeten Methoden der Aflatoxinbestimmungen sowie die Darstellungen und statistischen Auswertungen der Konzentrationsergebnisse beschrieben. Die einzelnen Versuchsaufbauten und Durchführungen sind der Übersicht halber in Kapitel 5.1 bis 5.9 dargestellt.

Zur Bestimmung der Aflatoxingehalte in *C. senna* wurde ein spezielles HPLC–Verfahren mit vorrangehender Anreicherung mittels Immunoaffinitätssäulen angewandt. Zu Beginn der Untersuchung wurde zusätzlich auch noch das ELISA–Verfahren der Firma *Riedel-de Haen* eingesetzt. Da sich die ELISA–Methode jedoch als zu ungenau bei der Konzentrationsbestimmung im unteren Konzentrationsbereich erwies, wurde dieses Verfahren wieder aufgegeben. Die Ergebnisse der Konzentrationsbestimmungen dieser Arbeit, die mittels des ELISA–Verfahrens von *Riedel-de Haen* gewonnen wurden, sind aufgrund der Ungenauigkeit der Konzentrationsbestimmung im unteren Konzentrationsbereich zumeist nur in Anzahl belasteter und unbelasteter Proben angegeben. Da das ELISA–Verfahren in dieser Arbeit nur eine untergeordnete Rolle spielt und sich die auf ELISA basierenden Testverfahren in der Zwischenzeit weiterentwickelt haben, wird auf diese Methode der Aflatoxinbestimmung nur sehr kurz nach der hauptsächlich angewandten HPLC–Methode eingegangen.

4.1. Die angewandte HPLC Methode zur quantitativen Bestimmung der Aflatoxine B_1, B_2, G_1 und G_2

Als Extraktionsmittel von homogenisiertem Material der *C. senna* wurde 85 %iges Aceton eingesetzt. Das Zentrifugat dieser Lösung wurde mit Puffer verdünnt und die Aflatoxine eines Aliquots über eine Immunoaffinitätssäule angereichert. Eluiert wurde mit einer Mischung aus Methanol und Acetonitril (1 : 1 v/v). Das mit Wasser 1 : 1 v/v verdünnte Eluat wurde mittels HPLC unter Einsatz einer LiChrospher® RP–18 Säule isokratisch mit Wasser, Methanol und Acetonitril (60 : 20 : 20; v/v/v; + 119 mg KBr und 100 µl 65 %ige HNO_3) getrennt. Die Detektion erfolgt nach Derivatisierung mittels KOBRA-Zelle und Fluoreszenzmessung (362 nm Anregungswellenlänge und 440 nm Emissionswellenlänge). Die Quantifizierung wurde mit externem Standard und einer Eichgeraden durchgeführt.

4.1.1. Hinweise zum sicheren Umgang

Es sind bei allen Arbeiten die „Schutzmaßnahmen beim Umgang mit Mykotoxinen“ nach TAUCHMANN (1972) berücksichtigt worden.

4.1.2. Probennahme

Frische *C. senna* (Wassergehalt > 60 %)

Für die Aflatoxinbestimmung in der Frischware wurden repräsentative Mischproben (siehe auch Anhang 10.1) von jeweils 2 kg frischen Früchten genommen. Die Mischprobe bestand aus mindestens 500 g/100 kg Droge. Falls die zu untersuchende Probe aus versuchsbedingter Ursache < 2 kg war, wurde das gesamte zur Verfügung stehende Probenmaterial benutzt. Die Proben wurden, falls sie nicht sofort extrahiert werden konnten, spätestens 6 h nach der Ernte bei –18 °C tiefgefroren. Direkt vor der Extraktion wurden die Proben mittels eines Wolfes auf < 3mm zerkleinert und das zerkleinerte Material nochmals gut durchmengt.

Getrocknete *C. senna*

Für jede Aflatoxinbestimmung in der Trockenware wurde eine repräsentative Mischprobe von mindestens 2 kg eingesetzt. Die Mischprobe bestand aus 500 g/100 kg Droge. Falls die zu untersuchende Probe aus versuchsbedingter Ursache < 1 kg war, wurde das gesamte zur Verfügung stehende Probenmaterial benutzt. Die Proben wurden auf < 2 mm vermahlen und das gewonnene Probenpulver nochmals homogenisiert.

4.1.3. Herstellung der Probelösungen

4.1.3.1. Extraktion

Frische *C. senna* (Wassergehalt > 60 %)

50 g des zerkleinerten Probenmaterials wurde in 100 ml Aceton 100 % mit dem Ultra-Turrax bei hoher Drehzahl extrahiert. Die weitere Probenaufarbeitung erfolgte wie die der getrockneten Proben. Zusätzlich wurde der Trocknungsverlust der Proben durch Wiegen vor und nach der Trocknung bei 105 °C bis zur Gewichtskonstanz ermittelt.

Getrocknete *C. senna*

25 g Probe wurde mit 125 ml Aceton 85 % versetzt und 5 min mit dem Ultra-Turrax bei hoher Drehzahl extrahiert.

4.1.3.2. Anreicherung der Extrakte mittels Immunoaffinitätssäulen

Die so erhaltenen Suspensionen wurden 10 min bei 11.000 UPM zentrifugiert. 5 ml des klaren Überstands wurden mit Pufferlösung pH 7 auf 50 ml im Messkolben verdünnt. Von dieser Lösung wurden 20 ml auf die Immunoaffinitätssäule (Raumtemperatur) aufgegeben. Es war wichtig, dass die Durchflussrate nicht größer als 2 ml/min ist. Anschließend wurde die Säule mit 20 ml Wasser gewaschen. Die nach dem Waschvorgang in der Säule verbleibenden Wasserrückstände wurden durch mehrfaches Durchpressen von Luft mit einer Spritze weitestgehend entfernt, um die nachfolgende Denaturierung mit dem Elutionsmittel nicht zu stören. Das Gel darf nicht vollkommen trocken sein, es muss noch gelartige Konsistenz haben.

Die Elution erfolgte mit jeweils 1 ml Methanol und Acetonitril (1 : 1 v/v). Es war zu beachten, dass die Elutionslösung frisch angesetzt ist. Die Durchflussrate soll einen Tropfen pro Sekunde betragen. Außerdem soll die Verweilzeit des Eluenten in der Säule mindestens 30 Sekunden sein. Bei den in Indien hergestellten Extrakten wurden diese Lösungen bei -18 °C eingefroren und in Kühlboxen für die HPLC-Analyse nach Deutschland geschickt. Die Lösung mit 1 ml Wasser verdünnt ist bereit für die HPLC-Analyse.

4.1.3.3. Kalibrationslösung

200 µl der Kalibrationsstammlösung werden mit Wasser, Methanol und Acetonitril (60 : 20 : 20 v/v/v) zu jeweils 50 ml verdünnt.

4.1.4. Parameter der HPLC

Säule:	Merck LiChrospher® 100 RP 18; 5 µm; ID 4 mm; 250 mm Länge
Eluent:	isokratisch; Wasser : Methanol : Acetonitril (60 : 20 : 20; v/v/v; +119 mg KBr und 100 µl HNO_3 65% pro Liter) Der Eluent sollte eine Stunde im Ultraschallbad entgast werden.
Fluss:	0,8 ml/min
Ofentemperatur:	40 °C
Nachsäulenderivatisierung:	KOBRA-Zelle, 100 µA

Injektionsvolumen:	100 µl (Probe)
Laufzeit:	20 Minuten
Detektion:	Anregungswellenlänge 362 nm, Emissionswellenlänge 440 nm

4.1.4.1. Kalibration

Externer Standard, 10, 50 und 100 µl Aufgabevolumen. Die erhaltenen Daten werden in eine Regressionsrechnung eingestellt und der Ergebnisberechnung zugrunde gelegt, wenn der Korrelationskoeffizient > 0,99 ist (aufgrund der verwendeten Software hier Korrelationskoeffizient = R^2).

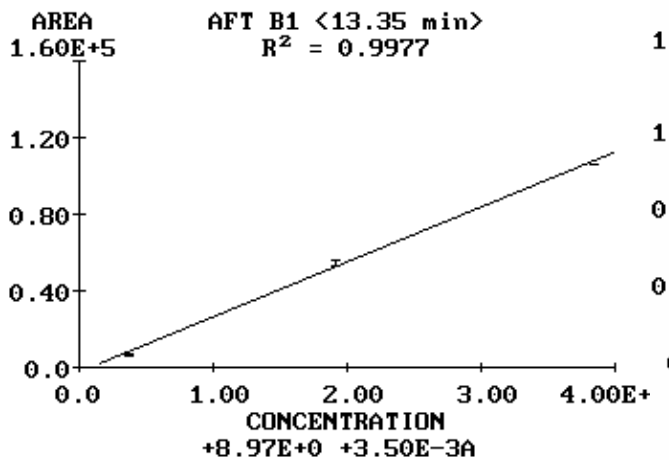


Abb. 7: *Beispiel Kalibration Aflatoxin B1*

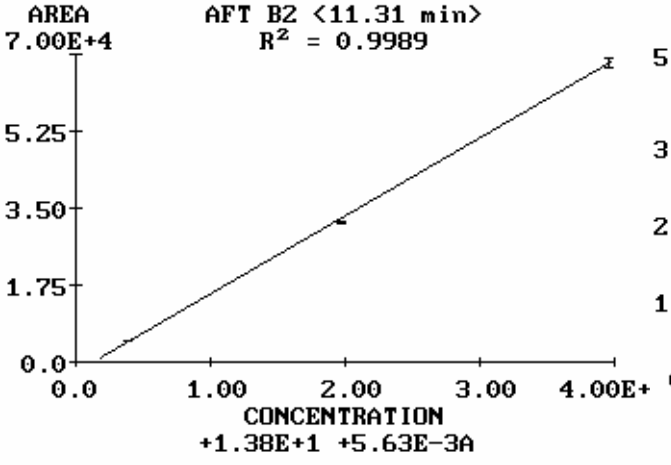


Abb. 8: *Beispiel Kalibration Aflatoxin B2*

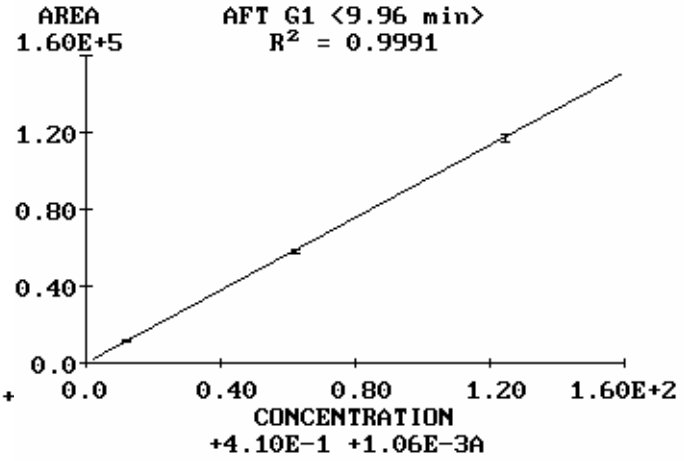


Abb. 9: *Beispiel Kalibration Aflatoxin G1*

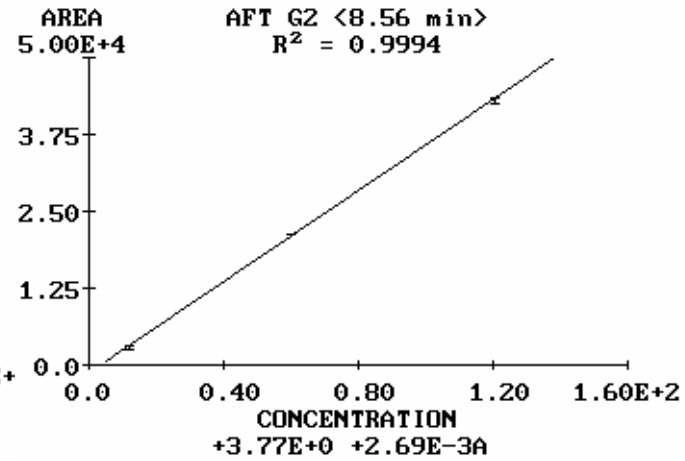


Abb. 10: *Beispiel Kalibration Aflatoxin G2*

4.1.4.2. Handhabung der KOBRA-Zelle

Die KOBRA-Zelle muss immer mit Flüssigkeit gefüllt sein, um die Membran feucht zu halten. Es dürfen nur Anschlüsse aus Kunststoff verwendet werden. Alle Anschlüsse sind von Hand anzulegen (Vorsicht: nicht zu stark anziehen). Es darf kein Strom an der Zelle anliegen, ohne dass Fließmittel durch die Zelle fließt. Die Innendurchmesser der Kapillarverbindungen zwischen Ausgang Trennsäule und KOBRA-Zellen-Ausgang zum Abfall sollen gleiche Werte aufweisen, um zu große Druckunterschiede in der Zelle zu vermeiden. Die Zelle darf nicht mit reinem organischen Fließmittel durchspült werden. Zum Spülen der Säule muss die Zelle aus dem System genommen werden. Weiterhin muss darauf geachtet werden, dass sich in der Säule kein reines organisches Elutionsmittel mehr befindet, wenn die KOBRA-Zelle dem System wieder angeschlossen wird. Nach der Analyse zuerst die Stromversorgung der Zelle abschalten, nach vier Minuten warten, dann den Fluss abschalten und die Zelle aus dem System herausnehmen. Anschließend die Zelle mit Hilfe einer Spritze und destilliertem Wasser spülen.

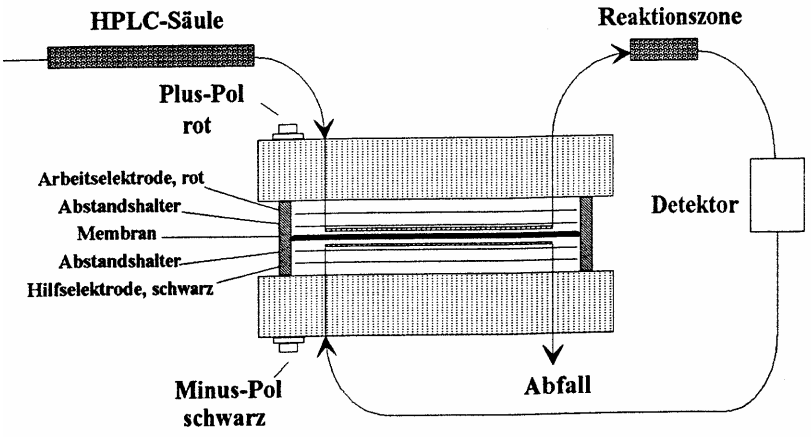


Abb.11 : *Anschlüsse der KOBRA-Zelle*

4.1.5. Berechnung

Die Auswertung erfolgt anhand einer Eichgeraden eines externen Standards, getrennt nach trockenen und feuchten Probensubstanzen

Getrocknete Droge (Wassergehalt < 12 %)

$$\frac{\text{gefunden (pg)} * 100 + \text{Einwage}}{100 * \text{Einwaage (g)}} = \mu g/kg \text{ Aflatoxin}$$

Berechnungsbeispiel:

Mittelwert gefunden: 432,051 pg
Einwaage: 24,97 g

Daraus ergibt sich ein Aflatoxin B_1-Gehalt von 21,6 µg/kg

Feuchte Drogen (Wassergehalt > 60 %)

$$\frac{\text{gefunden (pg)} * (100 + (\text{Einwaage (g)} * \text{Trockenverlust (\%)} / 100)}{100 * \text{Einwaage (g)}} = \text{µg/kg Aflatoxin}$$

Berechnungsbeispiel:

gefunden (pg):	351,045 pg
Einwaage (g):	63,78 g
Trocknungsverlust (5):	70,1 %

Daraus ergibt sich ein Aflatoxin B_1-Gehalt von 8,0 µg/kg.
Diese Berechnung wird auch für die Aflatoxine B_2, G_1 ,G_2 durchgeführt. Der Einfachheit halber wird im Folgenden meist nur die Summe der Aflatoxine B_1, B_2 ,G_1, G_2 angegeben.

4.1.6. Musterchromatogramme

Abb. 12 zeigt ein Chomatogramm einer Kalibrationslösung und Abb. 13 das einer Probenlösung. Das Musterchromatogramm der Probenlösung ist repräsentativ für die in dieser Arbeit untersuchten *C. senna*-fructus-Proben. Aus der Abb. 13 geht hervor, dass in den Proben hauptsächlich Aflatoxine B_1 nachgewiesen werden konnte. Alle anderen Aflatoxine waren, wenn überhaupt, nur unbedeutend vertreten (siehe auch Anhang 11.4.2. Tab. 29). Bezüglich der Einhaltung gesetzlich verordneter europäischer Qualitätsstandards war in allen Proben allein die Aflatoxin B_1-Konzentration ausschlaggebend. Der Vollständigkeit wegen wird in dieser Arbeit immer die Summe aller nachgewiesenen Aflatoxine angegeben.

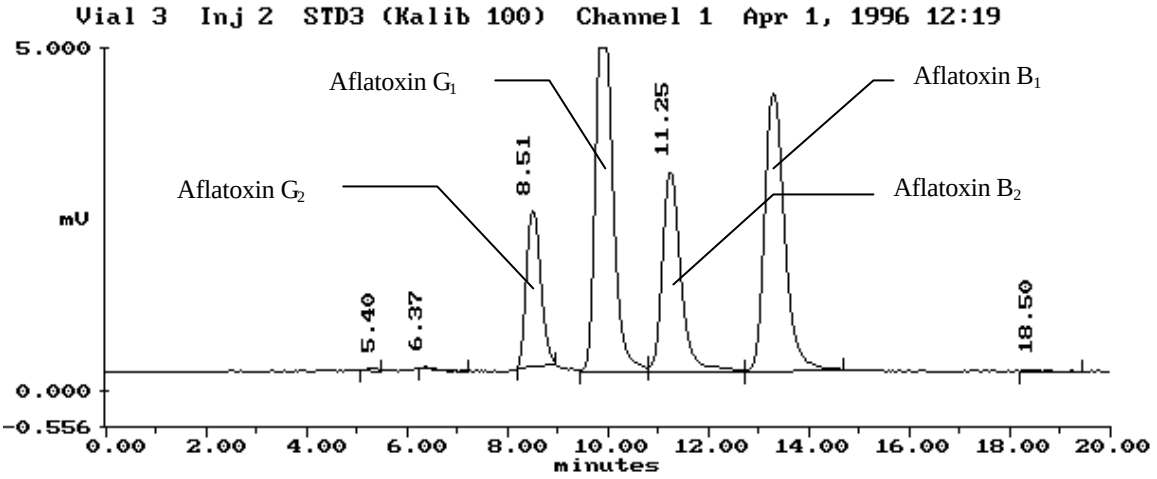


Abb. 12: *Musterchromatogramm einer Kalibrationslösung*

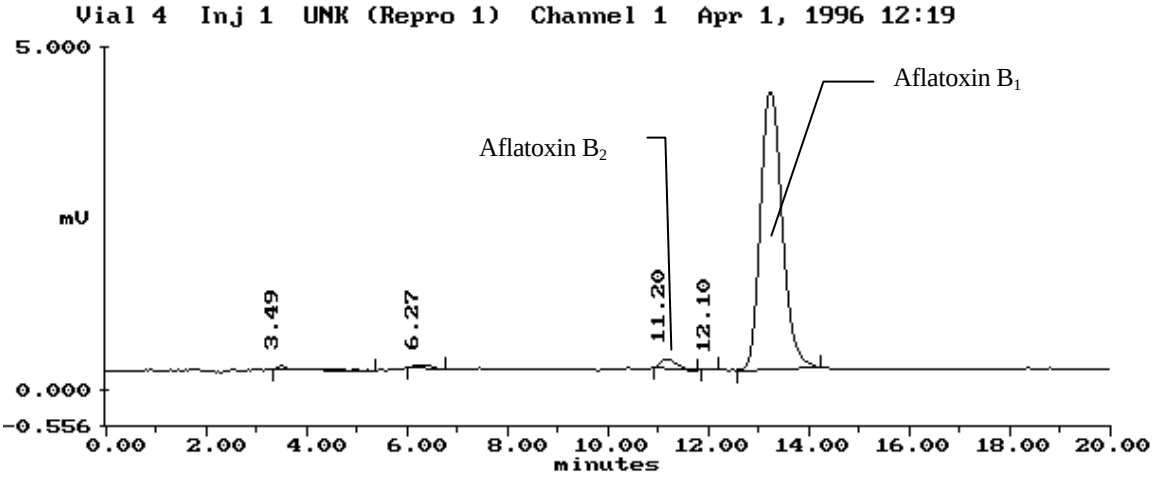


Abb. 13: *Musterchromatogramm einer Probenlösung aus* C. senna *fructus*

4.2. Kurzfristig angewandte ELISA Methode der Firma *Ridel-de Haen* zur quantitativen Bestimmung von Aflatoxin B_1

Mittels der ELISA-Methode wurde ausschließlich die Konzentration Aflatoxin B_1 der Proben bestimmt. Probennahme und Umgang unterschieden sich nicht von dem der HPLC-Methode. Die Extraktion der Proben erfolgte in Methanol/Wasser (70/30) bei getrockneten Proben und in reinem Methanol bei frischen Proben. Die Proben wurden anschließend zentrifugiert und ein Aliquot des Überstandes mit Dichlormethan einer flüssig/flüssig-Extraktion unterzogen. Alle anderen Schritte wurden gemäß der Testanleitung von *Riedel de Hean* durchgeführt. Es wurde die simultane Inkubation angewendet, bei der die aus der Probe extrahierten Aflatoxine mit den speziell konjugierten Aflatoxinen des Testkits um die Antikörper in der beschichteten Microwells konkurrierten. Nach der Reaktionszeit wurden die Microwells entleert und mit einer Waschlösung von unspezifischen Reagenzien befreit. Nach der Waschung wurden die

Microwells mit einer enzymhaltigen Lösung des Testkits gefüllt, die zu einer Farbreaktion der konjugierten Aflatoxine führte. Die Farbreaktion konnte mittels eines Photometers gemessen werden. War die Farbreaktion stark, waren die meisten Antikörper des Microwells von konjugierten Aflatoxinen des Testkits besetzt und es befand sich wenig Aflatoxin in der Probe; war die Farbreaktion schwach, befanden sich viele Aflatoxine in der Probe. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte durch die bei jeder Testdurchführung neu ermittelten Eichgeraden mit Hilfe von externen Standards.

4.3. Statistik

Der überwiegende Teil der Versuche führte zu vielen Proben die wenig mit Aflatoxin belastete waren und zu wenigen hoch belasteten Proben. Die Standardnormalverteilung der Ergebnisse war bei den meisten Versuchen nicht gegeben. Aus diesem Grunde erfolgt die Darstellung der Ergebnisse der Aflatoxinanalysen häufig durch Angabe der Maximal- und Minimalwerten sowie den Quartilen und zusätzlich mit einem Vergleich von Median und Mittelwert.

Bei der graphischen Darstellung von Aflatoxinkonzentrationen wurden die Achsen der Konzentrationen der Übersicht halber häufig logarithmisch skaliert. Bei der Berechnung von Regressions- und Korrelationskoeffizienten wurden die Werte der Aflatoxinbestimmungen mit ln x+1 transformiert, um die Voraussetzung der Normalverteilung zu erreichen (HELL 1997). Die Überprüfung der Regressionskoeffizienten erfolgte mittels des einseitigen F-Tests und die der Maßkorrelationskoeffizienten mittels eines t-Tests (KÖHLER et al.1984).

Die Validierung der Probennahme (siehe Anhang) sowie die Bestimmung von Unterschieden in verschiedenen Mahlgutfraktionen erfolgte mittels der Berechnung einer ONEWAY ANOVA mit dem Programm SPSS (Norusis & SPSS 1993).

Pilzkeimzahlen von Proben mit unterschiedlichen Aflatoxinkonzentrationen und unterschiedlich getrockneten Proben wurden annhand des χ^2 Anpassungstests überprüft. Die Berechnung erfolgte mit dem Programm STATISTICA (STATSOFT, Inc. 1998).

5. Ergebnisse

Wie bereits in Abschnitt 1.3 dargelegt wurde, gliedert sich der Ergebnisteil zu Vorkommen und Vermeidung von Aflatoxinen in *C. senna* in Indien in die Kapitel 5.1 bis 5.9. Um den jeweiligen Zusammenhang stets präsent zu haben, erschien es optimal, jedes Kapitel für sich in Einleitung, Methode, Ergebnissen und Diskussion zu untergliedern, ehe zum Abschluss (Kapitel 6) die Gesamtbetrachtung folgt.

5.1. Die Verteilung von Aflatoxinen in der Pflanze *Cassia senna*

5.1.1. Einleitung

Vor dieser Untersuchung gab es wenige Erkenntnisse über die Verteilung der Aflatoxine in der Arzneipflanze *C. senna*. Durch Feldsammlungen unterschiedlicher Pflanzenbestandteile wurde ermittelt, in welchen Pflanzenteilen Aflatoxine in *C. senna* vorkommen können. Zusätzlich wurde in einem Laborversuch das Aflatoxinbildungspotential der Substrate Sennesfrüchte und Sennesblätter verglichen.

Ein weiterer Schwerpunkt der Untersuchung bestand darin, die Verteilung der Mykotoxine innerhalb der Sennesfrüchte zu ermitteln. Es war von anderen Pflanzen wie Mais (BARRY et al. 1992), Erdnüssen (BOWEN & MACK 1991) und Baumwolle (COTTY & LEE 1989) bekannt, dass von Insekten beschädigte Früchte ein höheres Aflatoxinrisiko aufweisen als unbeschädigte. In frischen Früchten aus eigenen Feldsammlungen wurde dieser Zusammenhang zwischen Insektenbeschädigung und Aflatoxinkontamination überprüft.

Ein weiterer Versuch sollte die Frage klären, wie viele Früchte einer belasteten getrockneten Probe *C. senna* fructus mit Aflatoxinen kontaminiert sind. Es wurde versucht, äußerliche Merkmale, die auf eine Aflatoxinbelastung hindeuten, auch in getrockneten Früchten der *C. senna* zu ermitteln. Außerdem wurde untersucht, in welchen Fruchtbestandteilen sich die Aflatoxine befinden, ob sie mehr in den Samen oder im mehr Perikarp gebildet werden oder ob es andere Bestandteile in den Früchten gibt, in denen sie sich konzentrieren.

5.1.2. Material und Methode

5.1.2.1. Aflatoxine in unterschiedlichen Pflanzenteilen aus Feldsammlungen

Eigene Sammlungen von frischer *C. senna* wurden im Umkreis von 50 km der südindischen Stadt Tuticorin durchgeführt. Die gesammelten Proben wurden in Kühlboxen bei < 10 °C nicht länger als vier Stunden transportiert und anschließend bei – 18 °C eingefroren.

Es wurden von 30 Standorten jeweils 2 kg frische Blätter, Blüten, grüne Früchte und an der Pflanze getrocknete Früchte mittels des ELISA-Systems zur quantitativen Bestimmung von Aflatoxin B_1 untersucht.

5.1.2.2. Unterschiede im Aflatoxinbildungspotential von folia und fructus der C. senna

Um das unterschiedliche Potential der Aflatoxinbildung in Sennesblättern und Sennesfrüchten zu ermitteln, wurden von drei Pflanzen jeweils 12 g frische Sennesblätter sowie frische unbeschädigte Sennesfrüchte in geschlossenen Petrischalen (∅ 8 cm) drei Tage bei einer Temperatur von 30 °C bebrütet. Anschließend wurde der Aflatoxingehalt gemäß der Frischwarenbestimmung für Aflatoxin B_1, B_2, G_1, G_2 durchgeführt.

5.1.2.3. Verteilung der Aflatoxine in frischen Früchten von C. senna *in Abhängigkeit zur Größe von Insektenbeschädigungen*

Auf zehn Standorten wurden jeweils 5 kg frische Früchte gesammelt und vor der Aflatoxinbestimmung manuell auf Insektenbeschädigungen sortiert. Unterteilt wurden die Proben auf Grund der Größe der Beschädigungen, die sich äußerlich durch Nekrosen und Verfärbungen ausmachen ließen.

Eingeteilt wurde nach der Größe der Beschädigung in

- keine Beschädigung,
- etwa Streichholzkopfgröße,
- weniger als die Hälfte der Fruchtoberfläche,
- mehr als die Hälfte der Fruchtoberfläche.

Für die Aflatoxinbestimmung wurde das ELISA-System zur quantitativen Bestimmung von Aflatoxin B_1 eingesetzt.

5.1.2.4. Aflatoxine in frischen Früchten der C. senna *mit unterschiedlich gefärbtem Pilzbefall*

Es wurden drei Proben von jeweils fünf frischen von Insekten beschädigten Früchten (ca, 1,5 g), die beim Öffnen deutlich sichtbaren weißen, schwarzen oder gelben dominierenden Pilzbefall im Inneren auswiesen, selektiert und mittels des ELISA-Systems zur quantitativen Bestimmung von Aflatoxin B_1 analysiert.

5.1.2.5. Aflatoxinverteilung in getrockneten Früchten der C. senna *in Abhängigkeit zum mikroskopisch sichtbaren Mycelwachstum*

Um die Frage zu beantworten, wie hoch der Anteil von aflatoxinkontaminierten Früchten in getrockneten Früchten von *C. senna* ist, wurden aus drei unterschiedlich belasteten Handelsproben (16,5 µg/kg, 7,8 µg/kg und 2,8µg/kg Aflatoxine Σ B_1, B_2, G_1, G_2) jeweils 100 Früchte in Gruppen zu zehn Früchten aufgeteilt. Um äußerliche Merkmale zu ermitteln, wurden die Früchte einzeln unter dem Mikroskop auf allgemeinen Pilzbefall untersucht. Früchte mit dem geringsten äußerlich sichtbaren Pilzmycel kamen in Gruppe 1 und die mit dem stärksten Pilzmycelwuchs in Gruppe 10. Die Aflatoxinbestimmung wurde gemäß der Methode für getrocknete Senna durchgeführt, wobei die ca. 20 g Einwaage der Proben nicht gemahlen sondern ausschließlich mit Hilfe des Ultra-Turrax zerkleinert wurde.

5.1.2.6. Verteilung der Aflatoxine zwischen Samen und Perikarpanteilen getrockneter Früchte der C. senna

Bei der Trocknung von Sennesfrüchten fallen je nach Reifegrad und Frische des Erntegutes 5 % bis 15 % des Gesamtgewichtes an Samen aus den Früchten. Aus sieben Chargen von 1 bis 6 t wurden die bei der Trocknung herausgefallenen Samen mittels eines Trommelsiebes von den Früchten getrennt und die ausgefallenen Samen und übriggebliebenen Früchte daraufhin auf ihren Aflatoxingehalt untersucht.

Aus einer mit 82,2 µg/kg Aflatoxin belasteten Ware wurden drei 3 kg große Proben grob zerschnitten. Durch Windsichtung wurden die Samen- und Perikarpanteile vollständig voneinander getrennt. In den so erhaltenen 6 reinen Proben wurde eine Bestimmung der Aflatoxine durchgeführt.

5.1.2.7. Verteilung der Aflatoxine innerhalb von Mahlgutfraktionen getrockneter Früchte der C. senna

Aus einer mit 10,5 µg/kg Aflatoxin belasteten Ware wurde eine 2 kg große Stichprobe mit der Labormühle der Marke *RETSCH SM1* vollständig mit einem 2 mm Rundlochsieb zermahlen. Das gewonnene Pulver wurde mittels Laborsieben in vier Fraktionen, 2 bis 1 mm, 1 bis 0,8 mm, 0,5 bis 0,315 mm und < 0,315 mm getrennt. Die vier Fraktionen wurden mikroskopisch untersucht und die Anteile an Samenbestandteilen, Fasern mit Epidermis und freier Epidermis geschätzt. Von jedem der vier Siebfraktionen wurde eine dreifache Aflatoxinbestimmung durchgeführt.

5.1.3. Ergebnisse der Verteilung von Aflatoxinen in *C. senna*

5.1.3.1. Aflatoxine in unterschiedlichen Pflanzenteilen aus Feldsammlungen

Die Untersuchung unterschiedlicher Pflanzenteile von frischer *C. senna* südindischer Feldsammlungen auf Aflatoxin B_1 lieferte das in Tab.4 dargestellte Ergebnis.

Tab. 4: *Anteil in (%) Aflatoxin B1 belasteten und unbelasteten Proben von unterschiedlichen Pflanzenteilen frischer C. senna aus Feldsammlungen*

	n	belastete Proben	unbelastete Proben
Blätter	30	0 %	100 %
Blüten	30	0 %	100 %
grüne Früchte	30	23 %	77 %
an der Pflanze getrocknete Früchte	30	70 %	30 %

Alle Proben von Blättern und Blüten der *C. senna* aus Feldsammlungen erwiesen sich frei von Aflatoxin B_1. Bei den Fruchtproben hingegen waren Aflatoxine schon auf dem Feld nachweisbar. 23 % der Proben von frischen grünen Früchten wiesen auf deutliche Aflatoxinbelastungen hin. In 70 % der an der Pflanze getrockneten Früchten waren Aflatoxine schon auf dem Feld gebildet worden.

5.1.3.2. *Unterschiede im Aflatoxinbildungspotential von folia und fructus der C. senna*

Nach drei Tagen der Bebrütung von Sennesblättern und -früchten in Petrischalen hatte sich auf beiden Materialarten deutlich sichtbarer Pilzbewuchs gebildet. Äußerliche Unterschiede im Pilzbefall auf den unterschiedlichen Substraten konnten nicht festgestellt werden. Neben einem dominierenden schwarzen Pilz waren auf beiden Substraten gelbe Pilzsporen sichtbar, wie sie für den Aflatoxinbildner *Aspergillus flavus* charakteristisch sind.

Tab. 5: *Aflatoxinbildung in µg/kg S B_1, B_2, G_1, G_2 auf in Petrischalen bebrüteten frischen Sennesblättern und Sennesfrüchten*

Probe	*C. senna folia*	*C. senna fructus*
1	18,1	668,4
2	9,3	1124,5
3	6,1	2057,2
Mittel	***11,8***	***1283,4***

Bei diesem Versuch wurden unter gleichen Bedingungen deutlich mehr Aflatoxine auf Sennesfrüchten als auf Sennesblättern gebildet (Tab. 5). Die erreichten Aflatoxinkonzentrationen in den Sennesblättern war in etwa 100-mal geringer als die der Früchte.

5.1.3.3. Verteilung der Aflatoxine in frischen Früchten der C. senna in Abhängigkeit zur Größe von Insektenbeschädigungen

Auf den Feldern wiesen einige Früchte Insektenbeschädigungen sichtbar durch einen kleinen Lochfraß mit unterschiedlich großen Nekrosen um dieses Fraßloch auf. Diese beschädigten Früchte, in denen beim Öffnen häufig deutlicher Pilzbefall sichtbar war, wurden genauer auf Aflatoxinvorkommen untersucht. Die Aflatoxinbestimmung von zehn Proben die nach Größe ihrer Beschädigung sortiert wurden, lieferte folgendes Resultat (Tab. 6):

Tab. 6: *Aflatoxin B_1-Belastung in frischer Früchten der C. senna in Abhängigkeit zur Größe der Schädigung*

Schädigung	Anzahl der Proben n	belastete Proben	unbelastete Proben	mittlere Konzentration µg/kg
keine	10	0	10	n.n.
klein [1]	10	40	6	30
mittel [2]	9	7	2	117
groß [3]	8	8	0	410

[1]etwa Streichholzkopfgröße, [2]weniger als die Hälfte der Fruchtoberfläche, [3]mehr als die Hälfte der Fruchtoberfläche

Diese Ergebnisse zeigen für die Frischware einen sehr deutlichen Zusammenhang von Beschädigung und Aflatoxinvorkommen in Sennesfrüchten. In allen zehn unbeschädigten Proben konnte kein Aflatoxin nachgewiesen werden. Von den Proben mit streichholzkopfgroßen Beschädigungen waren noch 60 % der Proben aflatoxinfrei, bei den Proben mit mittelgroßer Beschädigung nur noch ca. 20 %. Die Proben aus Früchten mit Verfärbungen, die mehr als die Hälfte ihrer Fläche aufwiesen, waren zu 100 % aflatoxinkontaminiert. Die mittlere Aflatoxin B_1-Konzentration stieg von nicht nachweisbar in unbeschädigten auf 410 µg/kg in den stark beschädigten Früchten kontinuierlich an.

5.1.3.4. Aflatoxine in frischen Früchten der C. senna *mit unterschiedlich gefärbtem Pilzbefall*

Beim Öffnen beschädigter Früchte waren häufig Insektenlarven zu finden, die sich hauptsächlich von den Samen der Hülsenfrucht ernährten. In einigen dieser befallenen Früchte war deutliches Pilzwachstum mit Sporenbildung zu erkennen. In den Früchten dominierte in dieser Reihenfolge entweder ein weißlicher, schwarzer oder gelber Pilzbelag. Durch mikroskopische Untersuchung konnten die weißen Pilze als *Mucor* spp., die schwarzen als *Aspergillus niger* und die gelben als *Aspergillus flavus* identifiziert werden. Die Aflatoxinbestimmung von drei Proben von jeweils fünf frischen Früchten, die unterschiedlichen Pilzbefall im Inneren aufwiesen, ergab folgende Resultate (Tab. 7):

Tab. 7: *Aflatoxin B1 µg/kg in jeweils fünf frischen Früchten der C. senna mit unterschiedlich gefärbtem deutlichen Pilzbelag im Inneren.*

	gelber Pilz	schwarzer Pilz	weißer Pilz
Aflatoxin B_1 µg/kg	3375	497	52

Deutlich wurde, dass diese an der Pflanze durch Insektenbeschädigung stark verpilzten Früchte ein sehr hohes Aflatoxinpotential darstellen. In der Auswahl gelb verpilzter Früchte waren mehr als 3 mg/kg Aflatoxin B_1 nachweisbar, was ein Vielfaches der Durchschnittswerte ist. Auch in den völlig schwarz verpilzten Früchten wurden noch eine für die Arzneipflanze *C. senna* sehr hohe Aflatoxin B_1-Konzentration von 0,5 mg/kg festgestellt. Die weißlich verpilzten Früchte waren demgegenüber mit 52 µg/kg vergleichsweise gering belastet, jedoch enthielten auch diese immer noch Aflatoxine deutlich über den gesetzlichen Grenzwerten.

5.1.3.5. *Aflatoxinverteilung in getrockneten Früchten der* C. senna *in Abhängigkeit zum mikroskopisch sichtbaren Mycelwachstum*

In getrockneten Früchten der *C. senna* lassen sich Insektenbeschädigungen auf Grund der Verfärbung während der Trocknung nicht mehr so eindeutig wie in frischen Früchten identifizieren. Unter dem Mikroskop konnten zwar Insektenbefallsmerkmale nachgewiesen werden, jedoch nicht mehr unterschieden werden, ob der Insektenbefall vor oder nach der Trocknung aufgetreten ist. Da bei der mikroskopischen Untersuchung von getrockneten Einzelfrüchten unterschiedlich stark ausgeprägtes Mycelwachstum in den Früchten identifiziert werden konnte, wurden die 3 x 100 Einzelfrüchten anhand dieses Kriteriums in jeweils zehn Gruppen aufgeteilt. Die Analyse von jeweils zehn Proben aus zehn einzelnen Früchten von drei unterschiedlich hoch belasteten Mustern lieferte folgende Ergebnisse (Tab. 8):

Tab. 8: *Aflatoxingehalte in µg/kg S B_1, B_2, G_1, G_2 in jeweils 10 x 10 einzelnen Früchten von drei unterschiedlich stark belasteten Mustern*

	S **Aflatoxine (mg/kg) in Probe 16,5 µg/kg**	S **Aflatoxine (mg/kg) in Probe 7,8 µg/kg**	S **Aflatoxine (mg/kg) in Probe 2,8 µg/kg**
geringer Pilzbefall			
1	n.n.	n.n	n.n.
2	27,0	n.n.	n.n.
3	n.n.	n.n.	n.n.
4	n.n.	22,5.	n.n.
5	5,2	n.n.	n.n.
6	n.n.	n.n.	n.n.
7	n.n.	n.n.	n.n.
8	n.n.	n.n.	n.n.
9	n.n.	n.n.	n.n.
starker Pilzbefall 10	n.n.	n.n.	n.n.
S	100 Früchte	100 Früchte	100 Früchte

Von den 30 Proben konnte nur in drei Fällen Aflatoxine nachgewiesen werden. In dem mit 16,5 µg/kg am höchsten belasteten Muster wurden in zwei Proben 5,2 und 27,0 µg/kg Aflatoxin Σ B_1, B_2, G_1, G_2 nachgewiesen. In dem mit 2,8 µg/kg Σ B_1, B_2, G_1, G_2 am geringsten belasteten Muster wurde in keiner der 100 Früchte Aflatoxin nachgewiesen. Die vor der Analyse durchgeführte mikroskopische Betrachtung der Früchte führte zu keiner eindeutigen Identifizierung belasteter Früchte. In den Früchten, die unter dem Mikroskop das größte Pilzwachstum aufwiesen, wurden keine Aflatoxine nachgewiesen. Die Aflatoxine befanden sich in Früchten, in denen nur ein mittleres bis wenig mikroskopisch wahrnehmbares Pilzwachstum feststellbar war.

5.1.3.6. Verteilung der Aflatoxine zwischen Samen und Perikarpanteilen getrockneter Früchte der C. senna

Tab. 9 zeigt die Aflatoxinkonzentrationen der bei der Trocknung ausfallenden Samen im Vergleich zu den Früchten aus sieben Chargen.

Tab. 9: *Aflatoxin in µg/kg S B_1, B_2, G_1, G_2 in C. senna fructus und ihren bei der Trocknung ausgefallenen Samen*

Probe	Früchte	Samen
1	4,5	24,0
2	6,5	25,9
3	6,7	28,0
4	7,8	35,9
5	4,0	19,8
6	13,0	28,3
7	3,9	14,8
Mittelwert	***6,6***	***25,2***

Die Ergebnisse zeigen, dass sich in den bei der Trocknung ausfallenden Samen deutlich höhere Aflatoxinkonzentrationen befinden, als in der übrigen Ware. Die Aflatoxinkonzentrationen in den ausgefallenen Samen war in allen Proben deutlich höher als in den getrockneten Früchten. In den ausgefallenen Samen war die Aflatoxinkonzentration zwei- bis fünfmal höher als in den getrockneten Früchten zu finden.

Die Aflatoxinbestimmung in vollständig getrennten Samen und Perikapanteilen einer mit 82.2 µg/kg (Σ B1, B2, G1, G2) belasteten Probe ergab folgende Ergebnisse (Tab. 10).

Tab. 10: *Aflatoxin in µg/kg S B_1, B_2, G_1, G_2 in Perikarp- und Samenanteilen aus einem mit 82,2 µg/kg belasteten Muster*

Probe	Samen	Perikarp
1	89,1	79,8
2	82,9	72,6
3	110,6	71,0
Mittelwert	***94,2***	***75,5***

Es wurde auch bei diesem Versuch festgestellt, dass sowohl im Samen wie im Perikarpanteil der Früchte Aflatoxine zu finden sind. Die Aflatoxinkonzentration in den Samen liegt tendenziell leicht über denen des reinen Perikarpanteils. In den drei Samenproben wurden im Mittel 94,2 µg/kg gemessen, im Perikarp nur 75,5 µg/kg. Der Anteil der Samen in den Früchten be-

trug 40 % des gesamt Fruchtgewichtes. Der Unterschied der Aflatoxinbelastung zwischen Samen und Perikarp war deutlich geringer als der, der bei der Trocknung frei ausfallenden Samen gemessen wurde (Tab 9).

5.1.3.7. Verteilung der Aflatoxine innerhalb von Mahlgutfraktionen getrockneter Früchte der C. senna

Die Größensortierung des Mahlgutes mit Bestimmung der Fruchtbestandteile lieferte die in Abb. 14 dargestellten Ergebnisse.

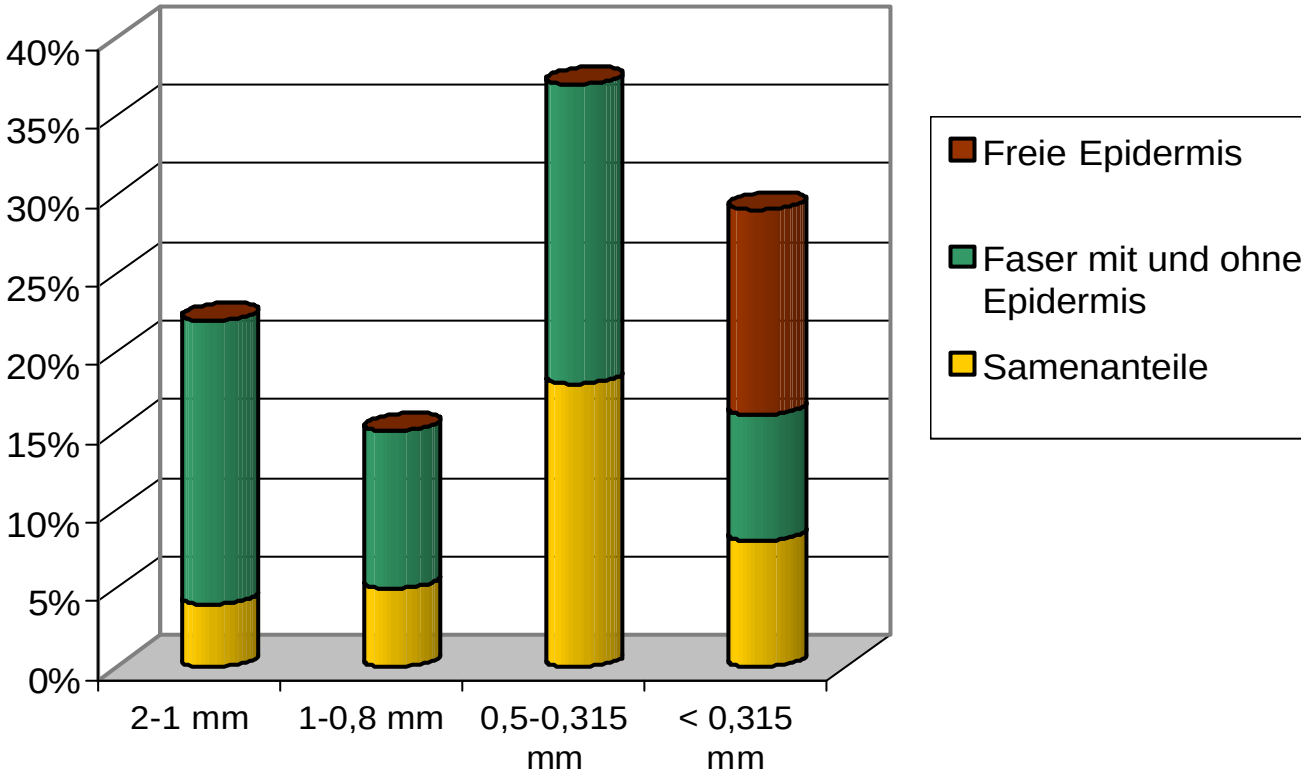


Abb. 14: *Gewichtsanteile der Fruchtbestandteile in unterschiedlichen Korngrößenfraktionen des Probenpulvers*

Die dreifache Aflatoxinbestimmung in den vier unterschiedlichen Siebfraktionen lieferte die in Tab. 11 dargestellten Ergebnisse.

Tab. 11: *Aflatoxine (S B_1, B_2, G_1, G_2) in den unterschiedlichen Fraktionen*

	Σ B_1, B_2, G_1, G_2 in µg/kg			
Korngröße	2-1 mm	1-0,8 mm	0,5-0,315 mm	< 0,315 mm
Mittel aus drei Wiederholungen	3,2	8,1	11,3	12,1

Es wurden eindeutige Unterschiede (Fver = 12,36 > Ftab(3/8) = 4,07) in den Aflatoxinkonzentrationen der unterschiedlichen Korngrößenfraktionen des Probenpulvers nachgewiesen. Je feiner die Fraktionen desto größer waren die Aflatoxinbelastungen. Die Aflatoxinkonzentration der gröbsten Fraktion (2 – 1 mm) betrug nur 3,2 µg/kg (Σ B_1, B_2, G_1, G_2) und stieg kontinuierlich bis auf 12,1 µg/kg (Σ B_1, B_2, G_1, G_2) Aflatoxin in der feinsten Fraktion (> 0,315 mm) an.

5.1.4. Diskussion

Die Ergebnisse zeigen, dass hohe Aflatoxinkonzentrationen in *C. senna* schon vor der Ernte auf dem Feld gebildet werden können. Aflatoxine sind auf dem Feld in grünen, noch an der Pflanze wachsenden Früchten sowie in an der Pflanze getrockneten Früchten nachweisbar, nicht aber in grünen Blättern oder den gelben Blüten der südindischen *C. senna*. Es konnte nachgewiesen werden, dass von Sennesblättern auch nach der Ernte ein deutlich geringeres Aflatoxinrisiko zu erwarten ist als in Sennesfrüchten. Es ist anzunehmen, dass die Sennesblätter als Substrat weniger gut für die Aflatoxinbildung des Pilzes genutzt werden können. Bislang ist noch keine grüne Blattware bekannt, die ein ernsthaftes Aflatoxinproblem aufweist.

Besonders anfällig für hohe Aflatoxinkonzentrationen sind Früchte, die schon vor der Ernte schwer durch Insekten beschädigt wurden. In einzelnen beschädigten Früchten, in denen *A. flavus* sich als dominierender Pilz durchsetzen kann, können Aflatoxinkonzentrationen gebildet werden, die mehr als das 1.000fache des europäischen Grenzwertes entsprechen. Eine Hülse kann somit eine Partie von über 1.000 anderen Früchten verunreinigen.

Die Ergebnisse aus den Untersuchungen über die Aflatoxinverteilung zwischen den Früchten der *C. senna* haben gezeigt, dass die Aflatoxinbelastung insgesamt in den Früchten sehr inhomogen verteilt ist. In frischen Früchten mit Insektenbeschädigungen sind Aflatoxine zwar besonders häufig zu finden, jedoch auch dort mit hohen Konzentrationsunterschieden. Da von den 30 untersuchten Proben zu zehn Früchten nur in drei Proben Aflatoxine nachgewiesen wurden, ist anzunehmen, dass bei den drei belasteten Proben nicht alle zehn Früchte Aflatoxine enthalten haben. Es ist also festzuhalten, dass nur sehr wenige Früchte der belasteten Char-

ge aflatoxinhaltig waren. Anhand der gefundenen Aflatoxinkonzentrationen ist zu schließen, dass die Hauptfracht an Aflatoxinen von noch weniger Früchten gebildet wird, in denen *A. flavus* hohe Toxinkonzentrationen bilden konnte. Daraus folgt, dass der überwiegende Anteil der Früchte einer belasteten Charge vollkommen aflatoxinfrei ist. Die Ergebnisse über die Verteilung von Aflatoxinen in *C. senna* fructus entsprechen somit denen der meisten anderen aflatoxinhaltigen Früchten. So stellte DICKENS (1986) fest, das einzelne Maiskörner der gleichen Probe zwischen 0 und 500 000 µg/ kg Aflatoxin enthalten können. Ähnlich extreme Verteilungen wurden auch bei Erdnüssen (WHITAKER et al. 1996), Feigen (STEINER et al. 1988) und Nüssen (GOMBOS 1987) gefunden.

Die Versuche, äußerliche Merkmale ausfindig zu machen, die Rückschlüsse auf den Aflatoxingehalt der Früchte von *C. senna* zulassen, ist in frischen und getrockneten Früchten unterschiedlich ausgefallen. In frischen Früchten sind aflatoxinfördernde Insektenbeschädigungen visuell eindeutig erkennbar, was in getrockneten Früchten nicht mehr der Fall ist. In frischen Früchten sind Pilzbefallsmerkmale, wie sie beim Öffnen von Früchten sichtbar werden, ein gutes Kriterium für den Aflatoxingehalt der Früchte, wobei Früchte mit gelbem Pilzbefall das höchste Aflatoxinpotential haben. In getrockneten Früchten ließen sich Insekten- und Pilzbefallsmerkmale nur noch mikroskopisch wahrnehmen. Die mikroskopischen Untersuchungen haben jedoch dokumentiert, dass Aflatoxine dort vor allem in Früchten nachgewiesen wurden, die kein starkes Mycelwachstum aufweisen. Getrocknete Früchte mit starkem Mycelwachstum zeigten keine nachweisbaren Aflatoxinkonzentrationen. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass nach der Trocknung die Bedingungen für die Aflatoxinbildung selbst bei guten Wachstumsbedingungen von Pilzen weniger gut sind als vor der Trocknung.

Die Resultate aus den Untersuchungen zur Aflatoxinverteilung zwischen Samen und Perikarpanteilen haben gezeigt, dass insgesamt von den Samen- und Perikarpanteilen ein etwa gleich großes Aflatoxinrisiko zu erwarten ist. Eine deutliche Aflatoxinreduktion durch Entfernung der pharmakologisch unbedeutenden Samenbestandteile in *C. senna* fructus ist somit nicht möglich. Die großen Konzentrationsunterschiede zwischen den bei der Trocknung ausfallenden Samen und den verbleibenden Hülsenfrüchten lassen Rückschlüsse auf die Aflatoxinbildung in der Hülsenfrucht zu. Bei der Trocknung geben vor allem überreife oder beschädigte Früchte ihre Samen frei. Solche überreifen und beschädigten Früchte haben ein erhöhtes Aflatoxinrisiko (SCOTT & ZUMMO 1994; LYNCH et al. 1991). Die bei der Trocknung ausfallenden Samen sollten deshalb nicht wieder den Früchten zugefügt werden.

Diese Ergebnisse aus den Untersuchungen in den unterschiedlichen Mahlgutfraktionen zeigen, dass neben den Samenbestandteilen die Epidermisanteile vorrangig aflatoxinhaltig sind. Der Faseranteil des Perikarps ist am geringsten mit Aflatoxinen belastet. Die Ergebnisse machen die Wichtigkeit der Homogenisierung des < 2mm gemahlenen Probenpulvers vor jeder Analyse deutlich.

5.2. Die Aflatoxinbildung in *Cassia senna* vor der Ernte

5.2.1. Einleitung

Aflatoxine werden nicht nur bei Trocknung und Lagerung von Pflanzenmaterialien gebildet, sondern die Infektion und Mycotoxinproduktion von *Aspergillus flavus* kann schon auf dem Feld im wachsenden Bestand stattfinden (WIDSTROM et al. 1990, SMITH & RILEY 1992). Nachdem in Kapitel 5.1 über die Verteilung von Aflatoxinen diese Tatsache auch für die Arzneipflanze *C. senna* bestätigt wurde, soll in diesem Abschnitt das Ausmaß der Aflatoxinbildung vor der Ernte dargestellt werden. Anschließend werden die Zusammenhänge von Aflatoxinkonzentration und Anteil von insektenbeschädigter sowie an der Pflanze getrockneter Früchte untersucht.

5.2.2. Material und Methoden

Auf dem Sortier- und Trocknungsplatz in Tuticorin lieferten die Bauern in den frühen Nachmittags- und Abendstunden ihre Tagesernten ab. Aus diesen zumeist von jeweils einem Standort stammenden Tagesernten wurden über zwei Ernteperioden 65 Proben frischer Früchte untersucht. Dazu wurde aus einer Tagesernte eine 2,5 kg große Probe entnommen. Zur Überprüfung festgestellter Zusammenhänge zwischen Aflatoxinbelastung in der Frischware und Insektenbeschädigungen sowie an der Pflanze getrockneter Früchte der *C. senna* (vgl. 5.1.2) wurden jeweils 200 g dieser Proben manuell sortiert und der gewichtsmäßige Anteil an der Pflanze getrockneter Früchte sowie von Insekten beschädigter Früchte bestimmt. Der Rest der Früchte wurde bei – 18 °C eingefroren und im gefrorenen Zustand mit einem Wolf auf ≤ 3 mm zerkleinert. Die Aflatoxinbestimmung erfolgte mittels HPLC–Methode.

Die statistische Auswertung für die Abhängigkeit der Aflatoxinkonzentratioen von Insektenbeschädigungen und Anteil überreifer Früchte erfolgte durch Berechnung des Bestimmtheitsmaßes r^2 mit ln x+1 transformierten Aflatoxinwerten. Mit Hilfe des einseitigen F-Tests (α = 0 5 %) wurde die Signifikanz von $r \neq 0$ überprüft (KÖHLER et al. 1984).

5.2.3. Ergebnisse

Die Ergebnisse der Aflatoxinkonzentrationen in frischem Erntegut der *C. senna* südindischer Bauern ist in Abb. 15 dargestellt.

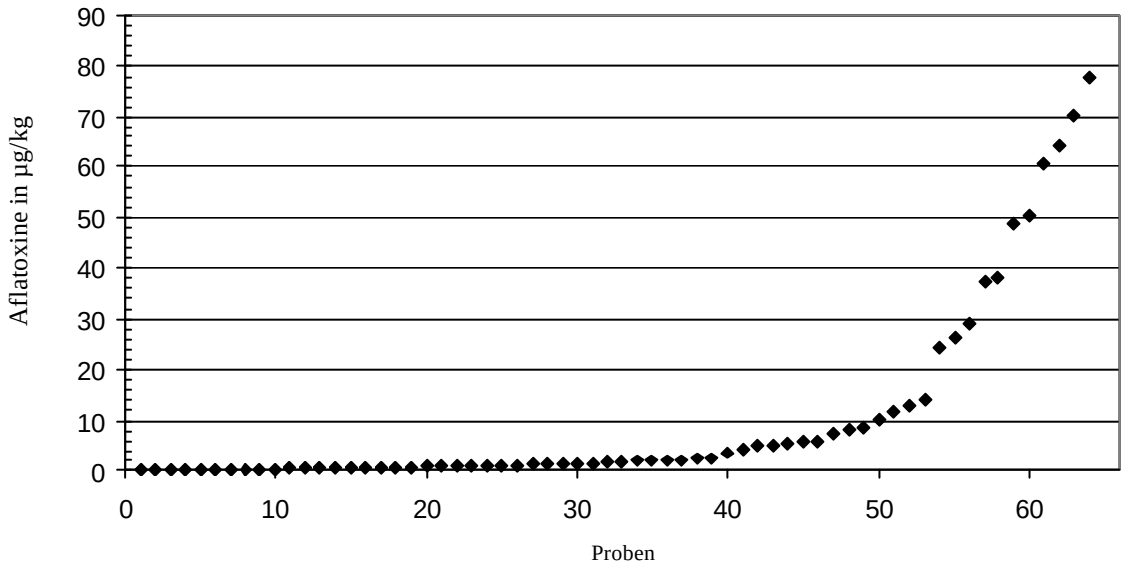


Abb. 15: Aflatoxine S B_1, B_2, G_1, G_2 in frischem Erntegut der C. senna fructus südindischer Bauern (n = 64)

Die Aflatoxinkonzentrationen in frischen Früchten der *C. senna* schwankten zwischen nicht nachweisbar und 255 µg/kg Σ B_1, B_2, G_1, G_2 (die Maximalkonzentration ist in Abb. 15 der Übersicht wegen nicht dargestellt). Die einzelnen Ergebnisse sind in Abb. 15 dargestellt. Das häufigste Messergebnis war nicht nachweisbar, was in 7 der 65 Proben der Fall war. 55 % der Proben hatten Aflatoxinbelastungen von weniger als 2 µg/kg Σ B_1, B_2, G_1, G_2, und 25 % der Proben waren mit mehr als 10 µg/kg Aflatoxinen belastet.

Aflatoxinkonzentrationen in 65 Proben frischer Sennesfrüchte südindischen Anbaus in Abhängigkeit vom Anteil an Früchten mit Insektenbeschädigungen sowie an der Pflanze getrockneten Früchten sind in Abb. 16 dargestellt.

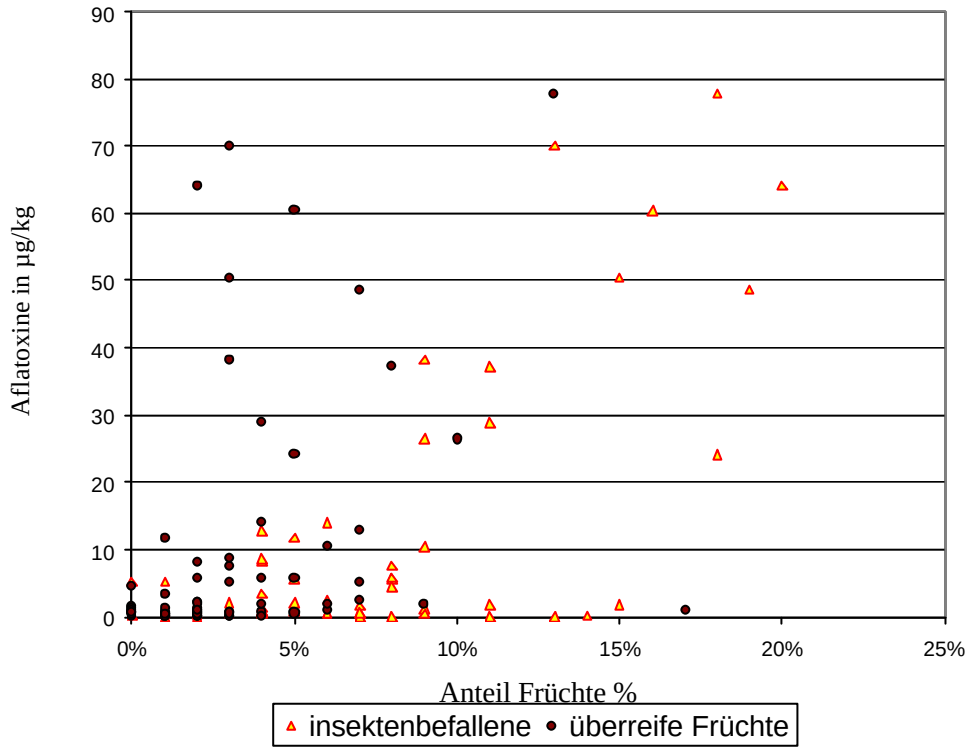


Abb. 16: *Aflatoxinkonzentrationen S B_1, B_2, G_1, G_2 frischer Früchte C. senna in Abhängigkeit zum Anteil an insektenbeschädigter Früchte und an der Pflanze getrockneter, überreifer Früchte in 65 Proben*

Die Ergebnisse zeigen eine Tendenz zu hohen Aflatoxinkonzentrationen bei einem hohen Anteil insektenbeschädigter Früchte. Frischproben mit Aflatoxinkonzentrationen von über 50 µg/kg wiesen alle einen hohen Anteil von meist über 10 % durch Insekten beschädigter Früchte auf. Beschädigungen durch Insekten ziehen jedoch nicht zwangsläufig Aflatoxinkontaminationen nach sich. So gab es auch zwei völlig aflatoxinfreie Proben mit einem hohen Anteil insektenbefallener Früchte von über 10 %. Die Regressionsanalyse ergab ein signifi-

kantes $r^2 = 0,46$ ($F_{vers}= 52,98 > F_{Tab}$ (5%) = 4,00). Das bedeutet, dass die Aflatoxinkonzentrationen in frischen Sennesfrüchten bei diesem Versuch zu ca. 50 % auf den Anteil der insektenbeschädigten Früchte zurückzuführen war.

Die Zusammenhänge zwischen dem Anteil überreifer Früchte und Aflatoxinkonzentrationen sind schwächer ausgeprägt, als die der Insektenbeschädigungen. Der Anteil überreifer Früchte hat zwar noch einen signifikanten Einfluss auf die Aflatoxinkonzentration in der Frischware ($F_{vers}= 11,97 > F_{Tab}$ (5%) = 4,00), jedoch ergab die Regressionsanalyse nur ein Bestimmtheitsmaß von $r^2 = 0,16$. Anders als die Feldsammlungen (Tab. 4) vermuten ließen, ist also der Einfluss des Anteils an der Pflanze getrockneter Früchte für den Aflatoxingehalt in der von Bauern geernteten Frischware nicht hoch.

5.2.4. Diskussion

Die Ergebnisse zeigen, dass in den meisten Proben schon Aflatoxine auf dem Feld gebildet wurden. Der überwiegende Anteil der frischen Proben wies dabei nur sehr geringe Aflatoxinbelastungen auf. Einige Proben hatten jedoch stark erhöhte Aflatoxinkonzentrationen schon auf dem Feld gebildet. Aflatoxine sind also nicht nur sehr inhomogen innerhalb der Fruchtproben verteilt (siehe Kapitel. 5.1), sondern auch zwischen unterschiedlichen Ernten auf verschiedenen Standorten.

Die Ergebnisse der Feldsammlungen haben zwar gezeigt, dass in den an der Pflanze getrockneten Früchten eine besonders hohe Wahrscheinlichkeit für Aflatoxinvorkommen besteht, die Untersuchungen der Frischproben von Bauern geernteter Früchte zeigte aber im Gegensatz dazu nur eine sehr geringe Korrelation zwischen der Aflatoxinkonzentration und dem Anteil an der Pflanze getrockneter Früchte auf. Dies ist dadurch zu erklären, dass der Anteil dieser Früchte sehr stark durch die Erntepraktik bestimmt wird. Da sich die überreifen Früchte immer am unteren Ende des Fruchtstandes befinden, können diese Früchte entweder mitgeerntet werden oder an der Pflanze verbleiben.

5.3. Identifizierung von Schädlingen, die Aflatoxinbildung in *C. senna* fructus auslösen können, und Ermittlung von Bekämpfungsmöglichkeiten

5.3.1. Einleitung

Ziel der Untersuchung war es, die Insekten, die für die in Kapitel 5.1 beschriebenen und untersuchten Beschädigungen verantwortlich waren, zu identifizieren. Es handelte sich hierbei um Larven, die durch einen kleinen Lochfraß in die Früchte eindrangen, um sich hauptsächlich von den Sennessamen zu ernähren. Es war nicht der schon bekannten Sennesblattschädling *Catopsilia pyranthe* Linn (DWIJENDRA SINGH et al.1984). Die Larve dieses Falters ernährt sich hauptsächlich von den Blättern und dringt nicht in die Früchte ein. Nachdem der Schädling identifiziert werden konnte, wurden zuerst im Labormaßstab Bekämpfungsmöglichkeiten überprüft. Dazu wurde ein Neem – Präparat ausgewählt, weil dieses sich als wirksames Mittel gegen eine große Anzahl von Schädlingen erwiesen haben (SCHMUTTERER 1995, BASEDOW et al. 2002) und weil der Neembaum *Azadirachta indica* A. Juss. in den Senna-Anbauregionen weit verbreitet ist.

5.3.2. Methode

Die Fruchtschädlinge konnten in großer Zahl auf dem zur Aflatoxinreduzierung eingerichteten Sortier- und Trocknungsplatz in Tuticorin gesammelt werden. Die sich in den Früchten befindlichen Larven verlassen bei der Trocknung die Sennesfrucht und können leicht aufgelesen werden. Zwecks Bestimmung wurden 100 Larven in 75 % Ethanol konserviert.

Adulte Tiere wurden gewonnen, indem maximal fünf Larven in Kunststoff-Petrischalen (Durchmesser 10 cm) mit acht Früchten der *C. senna* gezüchtet wurden. Die Petrischalen wurden bei ca. 30 °C Zimmertemperatur im Schatten bebrütet und täglich von verdorbenen Pflanzenresten gesäubert. Sobald eine Larve sich verpuppte, wurden die Puppen in eine weitere Petrischale überführt, in der nur noch ein feuchtes Wattestück für ausreichende Luftfeuchtigkeit sorgte. Nachdem die adulten Tiere geschlüpft waren, wurden sie mit Ethylenacetat getötet. Es wurden Larven und adulten Tiere sowohl an das Institut für Phytopathologie der Justus Liebig Universität Gießen als auch an die Biologische Bundesanstalt Berlin zur taxomomischen Bestimmung gesendet.

Zur Überprüfung der Wirksamkeit des von der Firma *EID Parry* zur Verfügung gestellten und auch in den Feldversuchen eingesetzten Präparates NeemAzal T/S® wurden zwei Versuche

durchgeführt. In einem Versuch wurde die Wirksamkeit von NeemAzal T/S® bei topikaler Applikation und in dem anderen als Fraßgift für die Fruchtschädlinge überprüft. Der Wirkstoff wurde in einer Konzentration von 3 ml pro Liter Wasser mit einem Handzerstäuber appliziert. Die Wirksamkeit topikaler Applikation wurde überprüft, indem 20 Larven aller Entwicklungsstadien direkt mit dem Wirkstoff behandelt wurden und dann in Petrischalen auf unbehandelten Sennesfrüchten weiter gezüchtet wurden.

Die Wirksamkeit als Fraßgift wurde überprüft, indem unbehandelte Larven auf besprühten Früchten gezüchtet wurden. Dieser Versuch wurde unterteilt in verschiedene Entwicklungsstadien. Einmal wurde er mit 20 Larven, die eine Körperlänge von > 7mm hatten, dann mit 20 Larven mit einer Körperlänge von 4 – 7 mm durchgeführt.

Ausgewertet wurden die Versuche, indem jeweils die Anzahl verpuppter Tiere und Imagines mit einer unbehandelten Kontrollgruppe von 20 Larven verglichen wurde.

5.3.3. Ergebnisse

Die auf dem Trocknungsplatz aufgelesenen Larven hatten alle eine grünliche bis violette Körperfärbung, eine maximale Körperlänge von 15 mm und eine maximale Kopfkapselbreite von 2,5 mm. Ausgewachsene Larven verpuppten sich in der Regel innerhalb von drei Tagen in den Petrischalen. Die Puppen waren nur teilweise in einen Kokon eingesponnen, der sich meistens zwischen zwei Früchten befand. Nach ca. sieben Tagen schlüpften die ersten Imagines aus den Puppen. Es wurden insgesamt mehrere hundert Larven eingesammelt, davon wurden etwa 200 zur Zucht eingesetzt und 60 adulte Tiere gewonnen. Keine der Larven oder adulten Tiere unterschied sich von den Exemplaren, die zur taxonomischen Bestimmung versandt worden waren. Die taxonomische Bestimmung der adulten Tiere sowohl von der Biologischen Bundesanstalt Berlin als auch vom Institut für Phytopathologie der Justus Liebig Universität Gießen führten zu folgendem Ergebnis.

Es handelte sich um die in Europa als Vorratsschädling bekannte Speichermotte:

***Ephestia elutella* (Hübner) (Lepidoptera; Pyralidae)**

Somit konnte *Ephestia elutella* als der lokale Schädling in Tamilnadu identifiziert werden, der hauptverantwortlich für Pilzinfektionen mit Aflatoxinbildung in *C. senna* fructus vor der Ernte ist.

Die Laborergebnisse der Wirksamkeitsuntersuchung des auch in den Feldversuchen eingesetzten Biopestizids NeemAzal T/S® auf den Schädling *Ephestia elutella* sind in den Tabellen 12 und 13 zusammengefasst.

Tab. 12: *Entwicklung mit* NeemAzal T/S® *behandelter Ephestia elutella Larven*

Varianten	Larven	Puppen	Imagines
unbehandelte	20	15	10
behandelte	20	(2)	0

Das zur Überprüfung der Wirksamkeit des Wirkstoffes durchgeführte direkte Besprühen der Ephestiarlarven mit der NeemAzal T/S® Emulsion führte zum Tod aller eingesetzten 20 Tiere. Auch ausgewachsene Larven konnten keine überlebensfähigen Puppenstadien bilden. Nach vier Tagen zeigte sich eindeutig, dass die Tiere, die im direkten Kontakt mit dem Wirkstoff standen, keine Entwicklungschance im Vergleich zu gesunden Imagines besaßen. In zwei Fällen kam es zwar noch zu so etwas wie einer Verpuppung, bei der jedoch die Umwandlung von Larve zur Imago gestört wurde. Die Larven sponnen sich ein, doch verwandelten sie sich nicht in eine bräunliche Puppe, sondern behielten die Form der Larve bei und änderten ihre Farbe ins Weißliche. In der Kontrollgruppe aus 20 Tieren einer Mischung aller Larvenstadien wurden hingegen 15 Puppen gezählt, aus denen 10 Imagines schlüpften.

Die Ergebnisse des Versuches mit NeemAzal T/S® als Fraßgift sind in Tab. 13 dargestellt.

Tab. 13: *Entwicklung von Ephestia elutella Larven unterschiedlicher Entwicklungsstufen auf mit NeemAzal T/S® behandelten und unbehandelten Früchten von C. senna*

Varianten	Larven	Puppen	Imagines
Larven > 7 mm, unbehandeltes Futter	20	16	14
Larven 4 – 7 mm unbehandeltes Futter	20	11	9
Larven > 7 mm mit NeemAzal T/S® behandeltem Futter	20	(6)	0
Larven 4 – 7 mm mit NeemAzal T/S® behandeltem Futter	20	0	0

Bei den ausgewachsenen Tieren, die auf unbehandelten Sennesfrüchten gezüchtet worden sind, erreichten 70 % die Geschlechtsreife. Von den 40 eingesetzten Tieren, die auf mit NeemAzal T/S® besprühten Sennesfrüchten gezüchtet wurden, erreichte keines dieses Stadium.

Von den ausgewachsenen Larven konnten sich zwar noch 6 einspinnen, jedoch behielten auch diese Tiere ihre Larvenform bei und wechselten nur ihre Farbe ins Weißliche.

Bei den noch nicht ausgewachsenen Larven mit 4 bis 7 mm Körperlänge auf unbehandeltem Pflanzenmaterial erreichten 45 % das Imaginalstadium. Die Verpuppung setzte nach zehn Tagen ein und war nach einer weiteren Woche abgeschlossen. Alle Larven, die auf mit NeemAzal T/S® besprühten Früchten gehalten wurden, waren dagegen nach einer Woche nicht mehr überlebensfähig.

5.3.4. Diskussion

Der Schädling, dessen Larvenstadium durch Auslösen von Pilzinfektionen Aflatoxinbelastungen von mehreren 1000 µg/kg in einer Sennesfrucht verursachen kann, konnte eindeutig als die gewöhnliche Speichermotte *Ephestia elutella* identifiziert werden.

Diese Larve ernährt sich vornehmlich von den Samen der Sennesfrüchte, indem sie sich durch einen Lochfraß durch das Pericarp Zugang zu diesen verschafft. Trotz dieses Fraßverhaltens der Larven konnte in den Laborversuchen dieser Schädling auch mit ausschließlich äußerlich auf Sennesfrüchten appliziertem NeemAzal T/S® erfolgreich bekämpft werden. Die Tatsache, dass auch ausgewachsene Larven noch so massiv in ihrer Weiterentwicklung gestört werden, zeigt, dass schon geringste Mengen des Wirkstoffes ausreichen, die Entwicklung dieses Insekts nachhaltig zu beeinflussen. In den Laborversuchen hat sich NeemAzal T/S® als ein sehr potentes Mittel zur Bekämpfung des Schädlings *Ephestia elutella* erwiesen. Dieses Ergebnis wurde von SCHROER ET AL. 2001 bestätigt.

5.4. Feldversuche zur Reduzierung von Aflatoxinen vor der Ernte

5.4.1. Einleitung

Neben Insektenbefall (SÉTAMOU et. al. 1997, BOWEN & MACK 1991) wird Trockenstress (STAHR et al. 1990, DAVIS et al. 1986) als Auslöser von hohen Aflatoxinkontaminationen diskutiert.

In einem Feldversuch wurde 1998 überprüft, ob Bewässerungsmaßnahmen und Schädlingsbekämpfungsmaßnahmen helfen können, die Aflatoxinproblematik vor der Ernte zu vermeiden. Als Wirkstoff für die Schädlingsbekämpfung wurde das Neem – Präparat NeemAzal T/S® gewählt, weil es sich in der vorangehenden Untersuchung als effektiv für den Haupt-

schädling *Ephestia elutella* erwiesen hat. Ein weiterer Grund für die Auswahl eines Neem – Päparates war die bereits von SINGH et al.(1980) sowie STEINHAUER (1996) diskutierte fungizide Wirkung der Pflanze sowie deren spezifische Wirkung auf die Aflatoxinsynthese der *Aspergillus* Pilze (BANKOLE 1997, ZERINGUE & BHATNAGAR 1990 UND 1994). Nach BATHNAGAR et al. (1988) üben Neem – Wirkstoffe eine hormonelle Wirkung auf den *Aspergillus* aus, die verhindert, dass der Pilz in den Sekundärstoffwechsel eintritt und Aflatoxine produzieren kann.

5.4.2. Versuchsaufbau

Die Feldversuche wurden auf einer 6000 m² großen Testfläche von *Incan Pharmaceuticals*, 20 km westlich der südindischen Stadt Tirunelveli durchgeführt. Der Boden der Versuchsfläche war ein ortsüblicher Black Cotton Soil (FAO Nomenklatur Vertisol). Dort wurden drei Varianten mit jeweils drei randomisierten Wiederholungen auf 20 x 20 m großen Testplots untersucht.

Bewässerungs-Variante:	Es wurde in 20tägigen Intervallen bei Ausbleiben von Niederschlägen bewässert, um so Trockenstress im Bestand auszuschließen.
NeemAzal T/S®-Variante*:*	Mit dem Einsetzen der Blüte wurde die Variante im wöchentlichen Rhythmus mit dem Neem – Päparat NeemAzal T/S® entsprechend 1000 l/ha behandelt.
Kontroll-Variante:	Weder regelmäßig bewässert noch mit Neem behandelt.

5.4.3. Versuchsdurchführung

Die Testfläche, auf der zuletzt Koriander kultiviert worden war, wurde gepflügt und gegrubbert. Mitte März wurden alle neun Plots mit entsprechend 250 kg/ha DAP (46 % Phosphor, 18 % Stickstoff) gedüngt sowie auf jedem Plot 15 kg/ha Sennessamen manuell ausgebracht. Alle Testplots wurden zur Gewährleistung einer ausreichenden Keimung zu Beginn des Versuchs einmal mit entsprechend 40 mm Niederschlag bewässert. Im Mai gab es genügend natürliche Niederschläge, so dass Bewässerungsmaßnahmen erspart blieben. Ab dem 25. Mai, mit dem Einsetzen der ersten Blüte, wurde auf den betreffenden Testflächen mit den wöchentlichen Neem – Spritzungen begonnen. Es wurde mit einer Handspritze der Wirkstoff NeemAzal T/S® in einer Konzentration von 3 ml/l H_2O und einer Ausbringungsmenge entsprechend 1000 l/ha wöchentlich auf drei der neun Testplots in den späten Nachmittagsstunden ausge-

bracht. Die Ernte erfolgte, indem die Früchte ohne die Rispen von den Pflanzen abgestreift wurden. Von jedem Plot wurden unmittelbar nach der Ernte 3 kg frische Sennesfrüchte für die Bestimmung des Anteils von Insekten beschädigter Früchte sowie der Aflatoxinkonzentration im Frischmaterial gewonnen. Die Aflatoxinbestimmung erfolgte nach der Standardmethode. Der Versuch wurde in dieser Weise bis zur dritten Ernte am 15. August weitergeführt. Die Ergebnisse sind deskriptiv ausgewertet, da weder Varianzhomogenität noch Normalverteilung gegeben war.

5.4.4. Ergebnisse der Bewässerungs– und Neem–feldversuche

Die Aflatoxinkonzentrationen der Früchte des Feldversuches sind in Abb. 17 dargestellt.

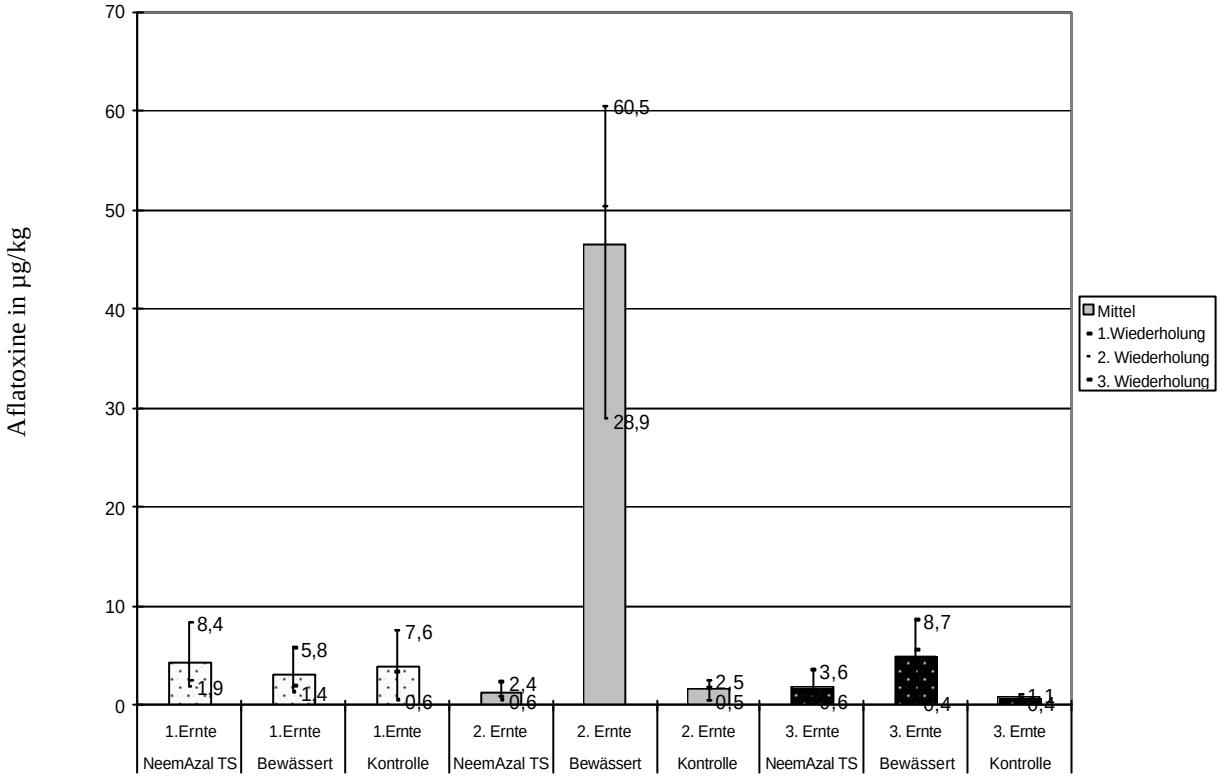


Abb. 17: *Aflatoxinkonzentration S B1, B2, G1, G2 in frischen Früchten C. senna auf mit NeemAzal T/S® behandelten Flächen, regelmäßig bewässerten Flächen und einer Kontrollvariante in drei Wiederholungen und drei Ernten.*

Die Aflatoxinkonzentrationen in der Frischware lagen bei diesem Versuch alle mit Ausnahme der zweiten Ernte der bewässerten Variante, unter 10 µg/kg. 15 der insgesamt 27 Konzentrationsbestimmungen ergaben Werte unter 2 µg/kg Σ B_1, B_2, G_1, G_2 . Die zweite Ernte der bewässerten Variante unterschied sich durch deutlich erhöhte Aflatoxinkonzentrationen von allen anderen (Abb. 17). In diesem Versuch konnte also keine Reduzierung der Aflatoxine durch Vermeidung von Trockenstress mittels regelmäßiger Bewässerungsmaßnahmen festgestellt werden. Die Bewässerungsmaßnahmen konnten nicht verhindern, dass aflatoxinbildende Pilze auf die Pflanzen gelangen. Die Bewässerung hatte jedoch positive Auswirkungen auf die Ernteerträge, vor allem bei der dritten Ernte. Die Gesamterträge der bewässerten Flächen waren etwa doppelt so hoch wie auf den unbewässerten Flächen.

Die Behandlung mit NeemAzal T/S® hat zu keiner eindeutigen Reduzierung der Aflatoxinkonzentrationen gegenüber der unbehandelten Kontrolle geführt; teilweise lagen die Aflatoxinkonzentrationen sogar über der unbehandelten Kontrolle. Es wurde in diesem Versuch

keine hemmende Wirkung des Neem – Präparates auf aflatoxinproduzierenden Pilze festgestellt.

Der Anteil von Insekten beschädigter Früchte der drei Versuchvarianten ist in Abb. 18 dargestellt.

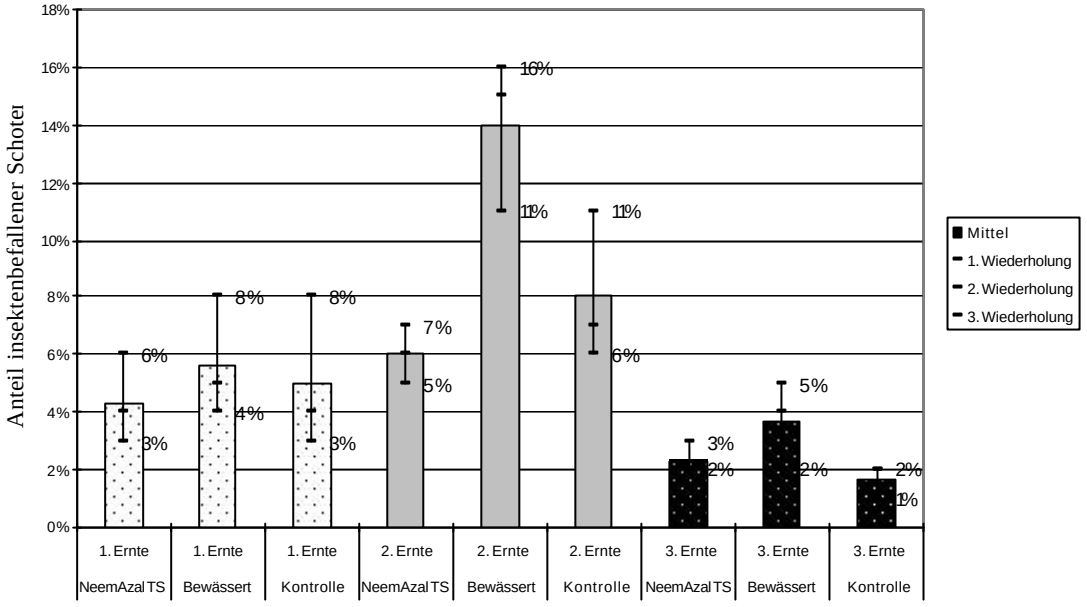


Abb. 12: Anteil der von Insekten befallenen Früchte der C. senna auf den mit NeemAzal T/S® behandelten Flächen, regelmäßig bewässerten Flächen und einer Kontrollvariante in drei Wiederholungen und drei Ernten.

Auf allen Varianten ist der Schädlingsbefall von der ersten zur zweiten Ernte größer geworden. Bei der dritten Ernte hat der Schädlingsdruck wieder abgenommen, auf ein Niveau meist unterhalb der ersten Ernte. Besonders hoch war der Anteil der von Insekten beschädigten Früchte in der zweiten Ernte der bewässerten Flächen mit bis zu 16 % befallenen Früchte. Das erhöhte Wasserangebot sowie der kräftigere Wuchs der Pflanzen dieser Testflächen könnten für den höheren Schädlingsdruck verantwortlich sein.

Die aufwendige Behandlung mit NeemAzal T/S® hat gegenüber der unbehandelten Kontrolle nur zu einer geringen Dezimierung der von *Ephestia*-Larven befallenen Sennesfrüchte geführt.

5.4.5. Diskussion

Weder Düngung und Bewässerung noch die Behandlung mit konnte in diesem Versuch zu einer nachweisbaren Aflatoxinreduzierung vor der Ernte beitragen. Die Aflatoxinkonzentrationen der bewässerten Flächen lagen bei der zweiten Ernte sogar deutlich über den anderen

Varianten. Verursacht wurde diese wahrscheinlich durch die Erhöhung des Schädlingsdruckes. Der Schädlingsbefall auf den bewässerten Flächen war vor allem bei der zweiten und auch bei der dritten Ernte höher als auf den unbewässerten Flächen. Falls es einen aflatoxinreduzierenden Effekt durch die Vermeidung des Trockenstresses mittels der Bewässerungsmaßnahmen gegeben hat, so ist dieser durch den höheren Anteil von Insektenbeschädigungen wieder wettgemacht worden. Falls Bewässerungsmaßnahmen zur Aflatoxinvermeidung beitragen sollen, muss sichergestellt sein, dass sie zu keiner Erhöhung des Schädlingsbefalls führen.

Der Versuch konnte nicht nachweisen, dass eine Behandlung mit dem Präparat NeemAzal T/S® zu einer verminderten Aflatoxinproduktion in Sennesfrüchten vor der Ernte führt. Es konnte auch keine deutliche Reduzierung der Insektenschäden durch die Behandlung erreicht werden. Die Neem – Wirkstoffe werden vorwiegend oral aufgenommen (SCHMUTTERER 1995). Wenn die *Ephestia*-Larven sehr schnell das Perikarp durchdringen, um an die Samen zu gelangen, nehmen sie wahrscheinlich zu wenig Wirksubstanz auf, um geschädigt zu werden. Der Aufwand der Spritzungen mit NeemAzal T/S® stand in keinem Verhältnis zur Wirkung.

5.5. Die Aflatoxinbildung in *C. senna* bei unterschiedlichen Trocknungsverfahren

Nachdem das vorherige Kapitel gezeigt hat, dass die Infektion von Früchten der *C. senna* mit dem Aflatoxinbildner *A. flavus* und die Mycotoxinbildung schon auf dem Feld im wachsenden Bestand stattfinden kann, wird nun beschrieben, welchen Einfluss der Trocknungsprozess auf das Aflatoxinvorkommen hat. Durch die Untersuchung von Aflatoxinkonzentrationen vor und direkt nach der Trocknung wurde die Aflatoxinbildung während der Trocknung ermittelt.

Drei unterschiedliche Trocknungsmethoden wurden untersucht:

- Trocknung im Schatten,
- konventionelle Bodentrocknung in der Sonne sowie
- die Trocknung im Hohenheimer Solartrockner, einem belüfteten Tunneltrockner.

Ferner wurde ein Versuch durchgeführt, bei dem untersucht wurde, ob durch eine Behandlung mit Neem-Präparaten die Aflatoxinbildung während des Trocknungsprozesses beeinflusst werden kann.

5.5.1. Methode

Die Untersuchungen fanden auf dem zur Aflatoxinreduzierung eingerichteten Sortier- und Trocknungsplatz in Tuticorin statt. Dort wurden täglich bis zu 3 Tonnen frische Sennesfrüchte kontrolliert getrocknet, insektenbefallene Früchte manuell aussortiert und die jeweiligen Mengen erfasst. Die hier aufgeführten Versuche wurden getrennt mit unselektiertem Frischmaterial ausgeführt.

Unter konventioneller Bodentrocknung ist hier das Trocknen von Sennesfrüchten ohne Fruchtstände auf mit roten Ziegeln gekachelten Trocknungsflächen in der Sonne zu verstehen.

Die Trocknung im Schatten erfolgte in einem Lagerhaus auf 6 m² großen Trocknungsdarren. Versuche der Solartrocknung wurden mit dem von der Firma *Innotech* (Germany) importierten Hohenheimer Solartrockner durchgeführt.

Bei allen Versuchen wurde am ersten Trocknungstag eine Schüttdichte von 1 kg/m², was eine Einlagigkeit der Früchte bedeutet, eingehalten. Bei der konventionellen Bodentrocknung wurde die Trocknungsfläche am zweiten und dritten Trocknungstag jeweils halbiert. Das Trocknungsgut wurde ab dem zweiten Trocknungstag mindestens dreimal täglich gewendet.

Es wurden 47 Chargen zu 20 kg Frischware der konventionellen Bodentrocknung untersucht. Von jeder Charge wurden 2,5 kg bei –18 °C eingefroren und der Aflatoxingehalt in der Frischware bestimmt. Nach der Trocknung wurden ca. 5 kg getrocknete Früchte jeder Charge vollständig auf < 2 mm gemahlen und der Aflatoxingehalt in der Trockenware bestimmt. Ebenso wurden 21 Chargen zu 15 kg auf den Aflatoxingehalt vor und nach der Trocknung im Schatten untersucht.

23 Versuche wurden mit dem Hohenheimer Solartrockner durchgeführt. Dazu wurde der Solartrockner am Abend mit jeweils 75 kg Frischmaterial einer Tagesernte befüllt, und zur Kontrolle wurde gleichzeitig eine 20 kg große Probe des gleichen Frischmaterials einer konventionellen Bodentrocknung unterzogen. In einer 2 kg großen Probe wurde der Aflatoxingehalt des Ausgangsmaterials bestimmt. Für die Bestimmung des Aflatoxingehaltes nach der Trocknung wurden von der solargetrockneten Ware jeweils 2 kg des homogenisierten Trocknungsgutes auf < 2mm vermahlen.

Bei allen Versuchen wurde nach der Trocknung die Restfeuchte im Trocknungsgut bestimmt, und zwar mittels Trocknung bei 105 °C bis zur Gewichtkonstanz. Bei jeweils drei Trocknungsprozessen mit dem Hohenheimer Solartrockner und der konventionellen Bodentrocknung wurde alle sechs Stunden in einer 100 g großen Probe mittels Trocknung bei 105 °C bis

zur Gewichtkonstanz die Restfeuchte bestimmt, um den Trocknungsverlauf der beiden Methoden darzustellen und zu vergleichen.

Die Hemmwirkung der Aflatoxinsynthese von Neem – Extrakten während der Trocknung von *C. senna* wurde in folgenden Versuchen überprüft:

Untersucht wurden das kommerzielle Produkt NeemAzal T/S® sowie ein wässriger Extrakt aus frischen Neem – Blättern. Dieser Extrakt wurde aus 100 g frischen fein gehackten Neem – Blättern pro 1 l siedendheißem Wasser hergestellt. Der Extrakt wurde mehrmals gerührt, nach Abkühlung ca. zwei Stunden später abgesiebt und sofort verwendet.

Es wurden jeweils 12 g frische, völlig unbeschädigte Sennesfrüchte in einer geschlossenen Petrischale vier Tage dem Pilzbefall überlassen und danach getrocknet sowie die Aflatoxinkonzentration nach der Standardmethode bestimmt. Elf Proben wurden, bevor sie in die Petrischale überführt wurden, in eine 3 ml/l H_2O NeemAzal T/S®-Lösung getaucht und elf Proben in den Blattextrakt. Elf Proben dienten als unbehandelte Kontrolle.

5.5.2. Ergebnisse

Trocknung:

Die konventionelle Bodentrocknung dauerte in der Regel drei Tage. Die Restfeuchten lagen bei < 10 % H_20. Die Schattentrocknung dauerte 6 bis 7 Tage, wobei erst nach drei Tagen die Trocknungsfläche halbiert wurde. Die Restfeuchten in den nach dieser Methode getrockneten Früchten lag bei < 15 % H_20. Die Trocknung im Hohenheimer Solartrockner dauerte in der Regel nur einen Tag. Die Ware wurde einmal am frühen Nachmittag gewendet. Die Restfeuchten in den getrockneten Früchte betrugen < 8 % H_20. Der Trocknungsverlauf von *C. senna fructus* im Hohenheimer Solartrockner im Vergleich zur konventionellen Bodentrocknung ist in Abb. 19 dargestellt.

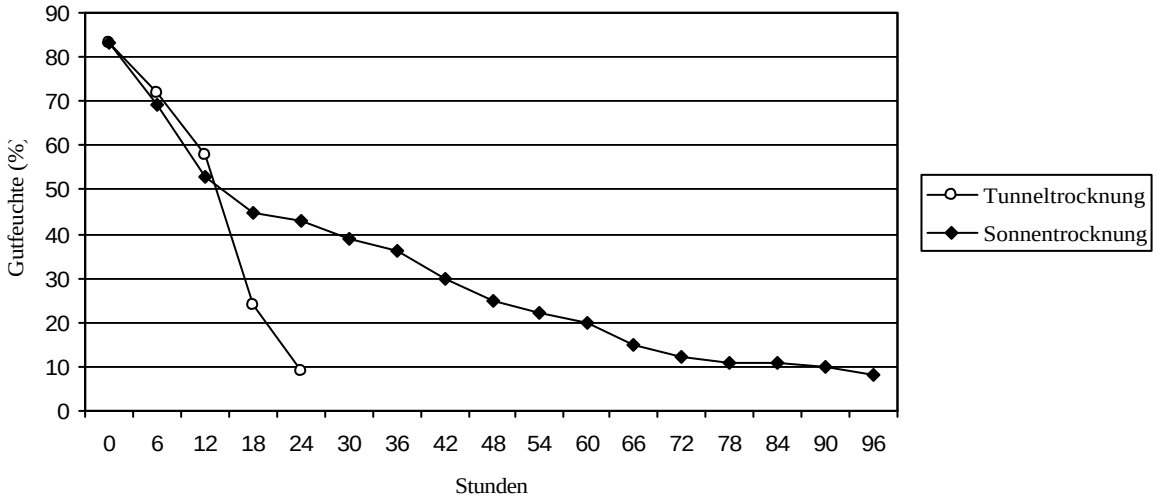


Abb. 19: *Trocknungsverlauf von C. senna fructus im Hohenheimer Solartrockner und der konventionellen Bodentrocknung, gemittelt aus jeweils drei Versuchen*

Die Versuche begannen jeweils um 19 Uhr. In den ersten zwölf Trocknungsstunden war die Bodentrocknung der Tunneltrocknung überlegen. Das frische Material trocknete nachts an der freien Luft besser, als in dem geschlossenen Tunneltrockner. Sobald aber die Sonne schien, zeigte der Tunneltrockner klare Vorteile. Die Trocknung im Tunneltrockner vollzog sich deutlich schneller, verursacht durch die erhöhte Trocknungstemperatur dieser ressourcenschonenden Methode. Während der Mittagszeit stiegen die Trocknungstemperaturen in dem Tunneltrockner auf bis zu 83 °C an. Die erhöhten Trocknungstemperaturen waren besonders effizient für die Reduzierung geringer Restfeuchten. Durch den Einsatz des in Hohenheim entwickelten Tunneltrockners konnte die Trocknungszeit auf ein Drittel der konventionellen Bodentrocknung verkürzt werden. An in der Regel sonnigen Tagen dauert die Trocknung nur noch 24 Stunden.

Weitere Vorteile des Hohenheimer Solartrockners:

- Das Trocknungsgut ist unter der Folie geschützt vor Verunreinigungen aller Art wie zum Beispiel Vogelkot und Stäube.
- Bei auftretenden Winden gibt es keine Verwehungen des Trocknungsmaterials.
- Bei Niederschlägen gibt es keine Befeuchtung und Wirkstoffverluste der Arzneipflanzen.

Aflatoxinentwicklung während der Trocknung:

Die Aflatoxinbestimmungen vor und nach der konventionellen Bodentrocknung und der Trocknung im Schatten sind in Abb. 20 dargestellten und in Tab. 14 zusammengefasst.

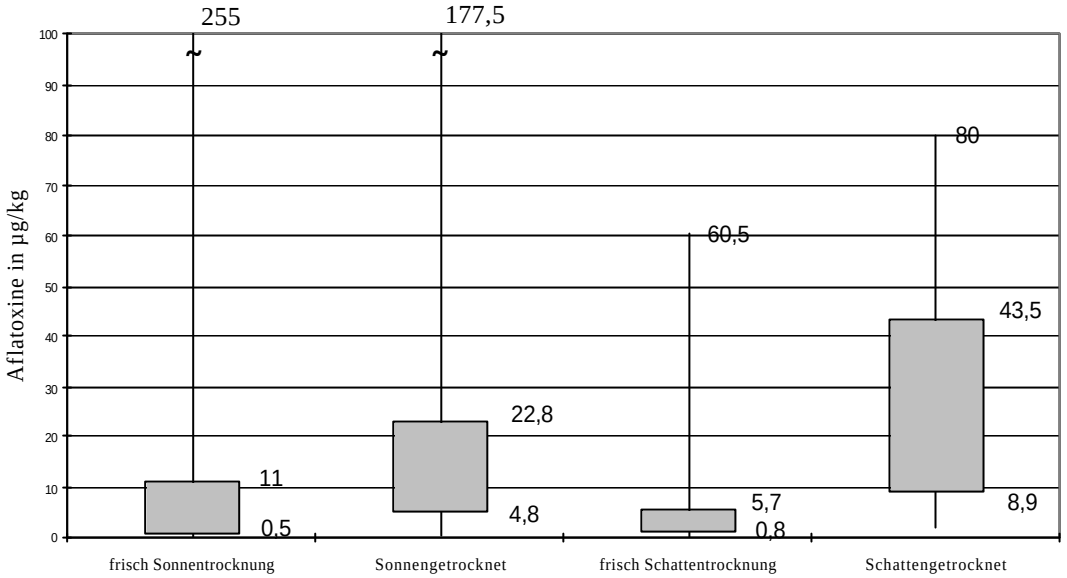


Abb. 20: *Aflatoxine S B_1, B_2, G_1, G_2 in C. senna fructus vor und nach der Trocknung in 47 Versuchen konventioneller Bodentrocknung und 21 Versuchen Schattentrocknung*

Tab. 14: *Median und Mittlere Konzentrationen Aflatoxine in µg/kg S B_1, B_2, G_1, G_2 vor und nach der Trocknung in C. senna fructus bei konventioneller Bodentrocknung und Trocknung im Schatten*

Trocknungsmethode	Materialart	n	Median	Mittelw.
Konventionelle Bodentrocknung	Frischware	47	1,2	15,9
	Trockenware	47	12,3	33,6
Trocknung im Schatten	Frischware	21	2,0	7,6
	Trockenware	21	19,4	28,0

Bis auf wenige Ausnahmen lagen die Aflatoxinkonzentrationen in der getrockneten Ware deutlich über der Frischware. Dies bedeutet, dass Aflatoxine noch während des Trocknungsprozesses gebildet werden.

In Abbildung 20 wird deutlich, dass die Trocknung in der Sonne der Schattentrocknung bezüglich der Aflatoxinbildung überlegen ist. Die Zunahmen der Aflatoxinkonzentrationen wa-

ren geringer als bei der Schattentrocknung. Die geringeren Maximalkonzentrationen bei der Schattentrocknung sind bedingt durch weniger belastetes Frischmaterial.

Auffällig bei dieser Untersuchung war, dass die relative Zunahme der Aflatoxinkonzentrationen von wenig belastetem Frischmaterial während der Trocknung sehr viel stärker war, als bei hohen Ausgangsbelastungen Tab. 15.

Tab. 15: *Mittlere Konzentrationen und relative Zunahme von Aflatoxinen während der Trocknung in der Sonne und im Schatten von niedrig und hoch belastetem Frischmaterial*

	Proben mit Aflatoxinkonzentrationen in der Frischware	Mittlere Konzentration in Frischware (µg/kg)	Mittlere Konzentration in Trockenware (µg/kg)	Relative Zunahme der mittleren Konzentration in %
Sonne	< Median = 1,2	0,5	7,8	1560
	> Median = 1,2	31,9	60,6	190
Schatten	< Median = 2,0	1,0	22,1	2210
	> Median = 2,0	14,6	34,4	236

Die Aflatoxinbelastung verdoppelten sich während der Trocknung bei den Proben, deren Frischware hoch belastet war, während die gering belasteten Proben während der Trocknung ihre Aflatoxinkonzentrationen vervielfachten. In diesen Versuchen nahmen die Aflatoxinkonzentrationen während der Trocknung des gering belasteten Frischmaterials im Mittel bei der Sonnentrocknung um das vierzehnfache und bei der Schattentrocknung um das zweiundzwanzigfache zu (Tab. 15).

Der Vergleich von der konventionellen Bodentrocknung und der Trocknung mittels Hohenheimer Solartrockners führte zu dem in Abb. 21 und Tab. 16 dargestellten Ergebnissen.

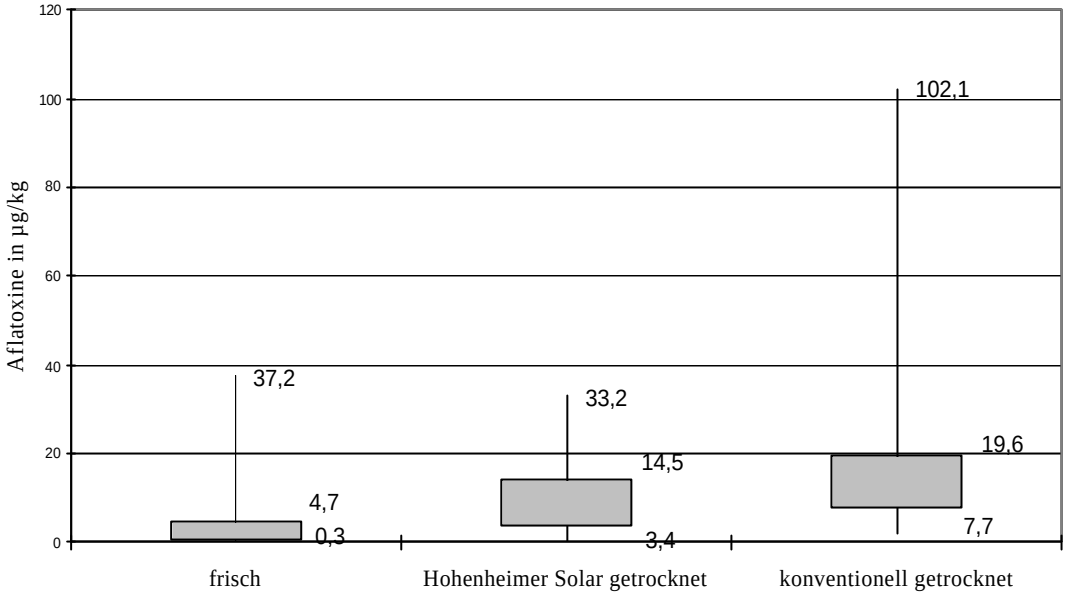


Abb. 21: Box Whisker Plots mit Maxima, Minima und Quartilen für Aflatoxine in der Frischware sowie nach der Trocknung mittels Hohenheimer Solartrockners und der konventionellen Bodentrocknung von 23 Proben

Tab. 16: *Median und Mittlere Konzentrationen Aflatoxine in µg/kg S B_1, B_2, G_1, G_2 vor und nach der Trocknung in C. senna fructus von 23 Versuchen mit dem Hohenheimer Solartrockner und der Kontrolle konventioneller Bodentrocknung*

	n	Median	Mittelw.
Aflatoxin in Frischware	23	0,8	4,0
Aflatoxin in solar getrockneter Ware	23	9,5	10,5
Aflatoxin in konv. getrockneter Ware	23	10,5	21,8

Auch bei diesem Versuch lagen die Aflatoxinkonzentrationen in der Regel bei beiden Trocknungsmethoden nach der Trocknung über denen in der Frischware. Die Trocknung von *C. senna* fructus mittels des Hohenheimer Solartrockners konnte die Aflatoxinbildung gegenüber konventionellen Trocknungen reduzieren, jedoch nicht völlig unterbinden. Durch den Hohenheimer Solartrockner konnten insbesonder hohe Aflatoxinkonzentrationen vermieden werden.

Aflatoxinreduktion während der Trocknung durch Neem – Produkte

Es konnte keine sichtbare Reduktion des Mycelwachstums durch die Behandlung mit Neem–Produkten festgestellt werden. Alle Proben in den Petrischalen waren nach drei Tagen sehr stark verpilzt. Bei den mit NeemAzal T/S® behandelten Proben war der Pilzwuchs sogar stärker als bei den beiden anderen Varianten.

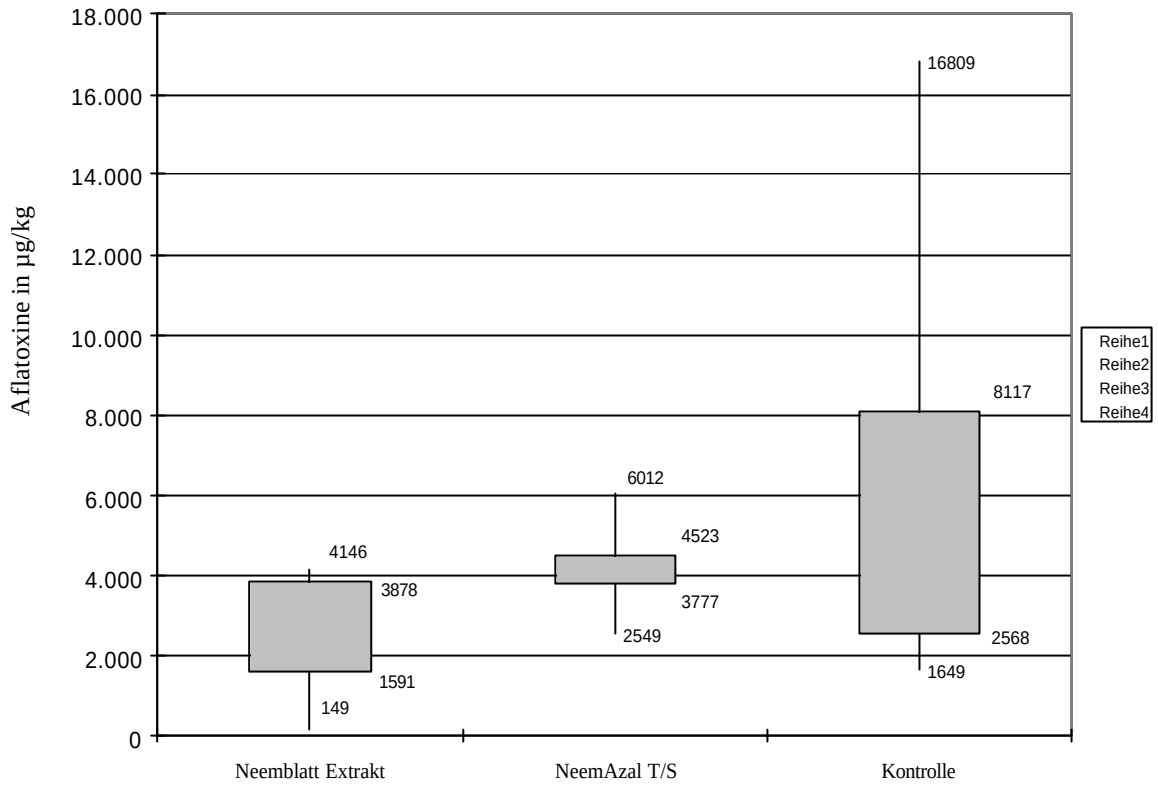


Abb. 22: *Box Whisker Plots mit Maxima-, Quartilen- und Minima-Konzentrationen Aflatoxin S B_1, B_2, G_1, G_2 von jeweils 11 Proben in Petrischalen bebrüteter Früchte der C. senna, die mit einem Neem–Blattextrakt oder mit NeemAzal T/S® behandelt wurden, sowie einer unbehandelten Kontrolle*

Die Ergebnisse der Aflatoxinbestimmung zeigt Abb. 22. Es konnte die Aflatoxinsynthese während der Trocknung durch die Neem–Behandlungen unterdrückt werden. Es wurde bei beiden Neem–Produkten niedrigere Aflatoxinkonzentrationen gemessen als bei der unbehandelten Kontrolle. Die Behandlung mit dem Neem–Blattextrakt hat die Aflatoxinsynthese stärker gehemmt als die mit NeemAzal T/S®. Trotz Neem–Behandung liegen die Aflatoxinkonzentrationen auf insgesamt sehr hohem Niveau.

5.5.3. Diskussion

Während der Trocknung wird ein bedeutender Teil der Aflatoxinbelastung südindischer *C. senna* fructus gebildet. Die Trocknung stellt somit nicht nur einen kritischen Punkt der Aflatoxinkontrolle dar, indem ausreichende Trocknung Vorraussetzung für die Aflatoxinvermeidung ist, sondern indem während des Trocknungsprozesses selbst große Aflatoxinmengen gebildet werden können. Es ist bekannt, dass Aflatoxine vermehrt in Pflanzen, die unter Trockenstress stehen, gebildet werden (JACOBSEN et al. 1993, HILL et al. 1983, STAHR et al. 1990,

SANDERS et al 1993). Diese Versuche legen den Schluss nahe, dass während einer regulären Trocknung des Erntegutes Bedingungen auftreten, die zu einer erhöhten Aflatoxinsynthese führen. Dies ist bislang wenig beachtet worden. Die Bedingungen während der Trocknung sind nach den hier vorgelegten Ergebnissen ein entscheidender Faktor für das Aflatoxinvorkommen in *C. senna* fructus.

Die Aflatoxinsynthese hemmenden Eigenschaften des Neembaums konnten bestätigt werden. Das Ausmaß dieser Hemmwirkung war jedoch nicht so stark wie bei ZERINGUE & BHATNAGAR (1990) oder BANKOLE (1997). Eine völlige Vermeidung der Aflatoxinsynthese konnte weder durch NeemAzal T/S® noch durch den Neem–Blattextrakt erreicht werden.

5.6. Die Aflatoxinentwicklung während der Lagerung von *C. senna* fructus in Indien

5.6.1. Einleitung

Von Früchten mit hohem Aflatoxinbildungspotenzial wie Erdnüssen (DIENER & DAVIS 1970) oder Mais (HELL 1997) ist bekannt, dass Aflatoxine während der Lagerung gebildet werden. Die Lagerung von *C. senna* fructus in Indien erfolgt entweder in 100 kg Jutesäcken oder in gepressten 180 kg Juteballen. In der Regel erfolgt die Pressung zu Ballen erst, wenn die Ware einen Käufer gefunden hat. Es ist nicht unüblich, dass Sennesfrüchte über mehrere Monate auch während der Regenzeit im ungepressten Zustand gelagert werden. Während dieser Lagerzeit sind relative Luftfeuchten > 85 % und Temperaturen > 25 °C häufig, Bedingungen also, die sowohl Wachstum als auch Aflatoxinproduktion von *Aspergillus flavus* ermöglichen (CUERO et al. 1987, LACEY & MANGAN 1991).

Im folgenden Kapitel werden die Auswirkungen der Lagerung auf das Aflatoxinvorkommen von *C. senna* fructus in Südindien untersucht:

- im ungepressten Zustand
- im gepressten Zustand
- während der Regenzeit
- während der Trockenzeit

5.6.2. Material und Methoden

Über vier Jahre hinweg wurden 100 Handelsproben unterschiedlicher Senna – Exporteure untersucht. Alle Proben stammten aus 2 bis 14 t großen Chargen von konventionellem Anbau und Trocknung in Tamilnadu. 81 Proben bestanden aus Früchten der jeweils aktuellen Anbausaison. 19 Proben waren mindestens eine Regenzeit in Tuticorin als Sackware gelagert. Alle

Proben wurden gemäß Standardmethode analysiert. Die Ergebnisse wurden mittels Box Plot Verfahrens (Maxima, Minima und Quartile) dargestellt und verglichen.

Um genauer zu ermitteln, welche Veränderungen der Aflatoxinkonzentrationen in Sennesfrüchten bei der Lagerung in Indien zu erwarten sind, wurden 33 Chargen vor und nach einer Lagerung untersucht. In acht Chargen von 7 bis 16 t zu Ballen gepresster Sennesfrüchte, sowie neun Chargen von 2 bis 5 t ungepresster Sennesfrüchte wurden jeweils vor der Regenzeit sowie nach der Regenzeit Proben gezogen und nach der Standartmethode der Aflatoxingehalt bestimmt.

In 16 Chargen wurde die Aflatoxinentwicklung während der Lagerung in der Trockenzeit von März bis Ende Oktober überprüft. Die 6 bis 9 t großen Chargen ungepresster Sackware Sennesfrüchte aktueller Handelsware wurden dazu in etwa vierwöchigen Abständen nach der Standardmethode untersucht.

Die Lagerung und Beprobung aller markierten Chargen fand immer in der gleichen Lagerhalle statt, sodass eine Verwechslung der Ware ausgeschlossen werden konnte. Die Ergebnisse wurden anhand der prozentualen Veränderung der Aflatoxingehalte vor und nach der Lagerung dargestellt.

5.6.3. Ergebnisse

Die Lagerung von Sennesfrüchten in Indien im ungepressten Zustand führt zu sensorisch wahrnehmbaren Qualitätsveränderungen. Mit zunehmender Lagerzeit verlieren die Früchte ihren Glanz und dunkeln deutlich nach. Früchte, die während der Regenzeit lose als Sackware gelagert wurden, haben fast immer einen leicht erdigen Geruch angenommen. Eine Unterscheidung in Früchte der aktuellen Saison und Früchte alter Handelsware ist mittels dieser Kriterien leicht möglich. Bei zu Ballen gepresster Ware bleiben Farbe und Geruch weitgehend konstant und eine eindeutige Unterscheidung ist nicht möglich.

Der Vergleich von Aflatoxinkonzentrationen in frischer Handelsware sowie alter lose gelagerter Ware von konventionell produzierten südindischen Sennesfrüchten führte zu folgendem Ergebnis (Abb. 23).

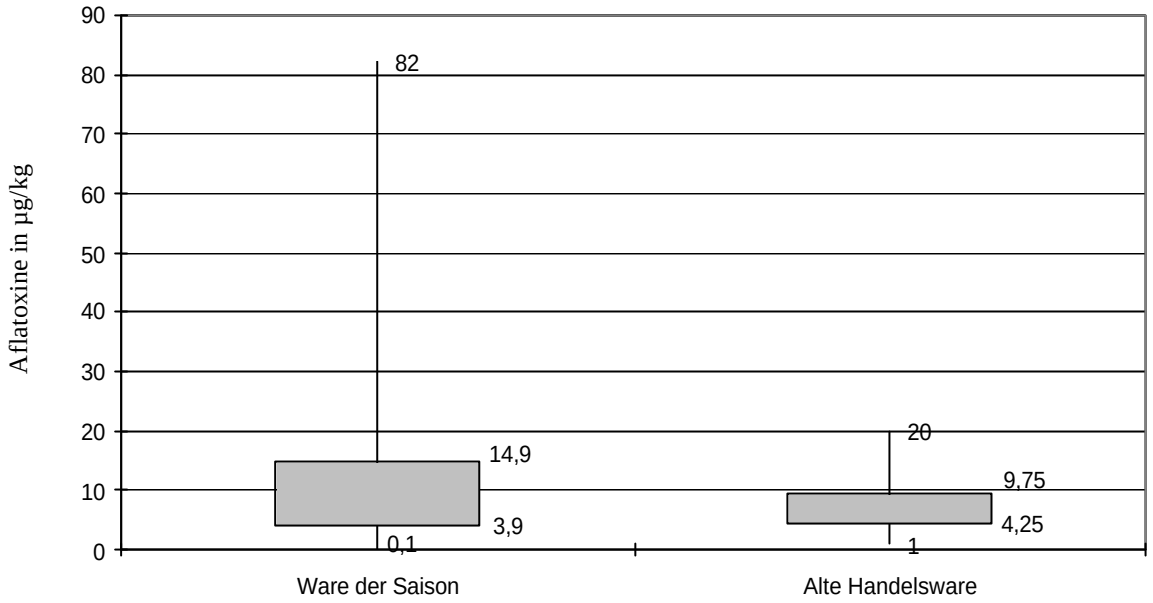


Abb. 23: *Box Whisker Plots mit Maxima, Quartilen und Minima von Aflatoxinen in µg/kg S B1, B2, G1, G2 in 81 Chargen Sennesfrüchten der Saison und 19 Chargen alter Handelsware mehrerer indischer Exporteure.*

Alte Lagerware war häufig mit weniger Aflatoxinen belastet als Ware der Saison. Bei alter Lagerware gab es deutlich weniger hoch belastete Chargen mit mehr als 10 µg/kg Σ B1, B2, G1, G2 als bei aktueller Handelsware. Ebenso lagen auch die Maximalkonzentrationen bei alter Ware deutlich niedriger.

Um zu überprüfen, ob bei der Lagerung von Sennesfrüchten in Indien mit einer Reduzierung von Aflatoxingehalten zu rechnen ist und die oben beschriebenen Differenzen nicht auf saisonale Unterschiede zurückzuführen sind, wurden mehrmals dieselben Chargen vor und nach einer Lagerung untersucht. Die Ergebnisse der zu Ballen gepressten Lagerung von Sennesfrüchten sowie der losen Lagerung während der Regenzeit im südindischen Bundesstaat Tamilnadu sind in Abb.en 24 und 25 dargestellt.

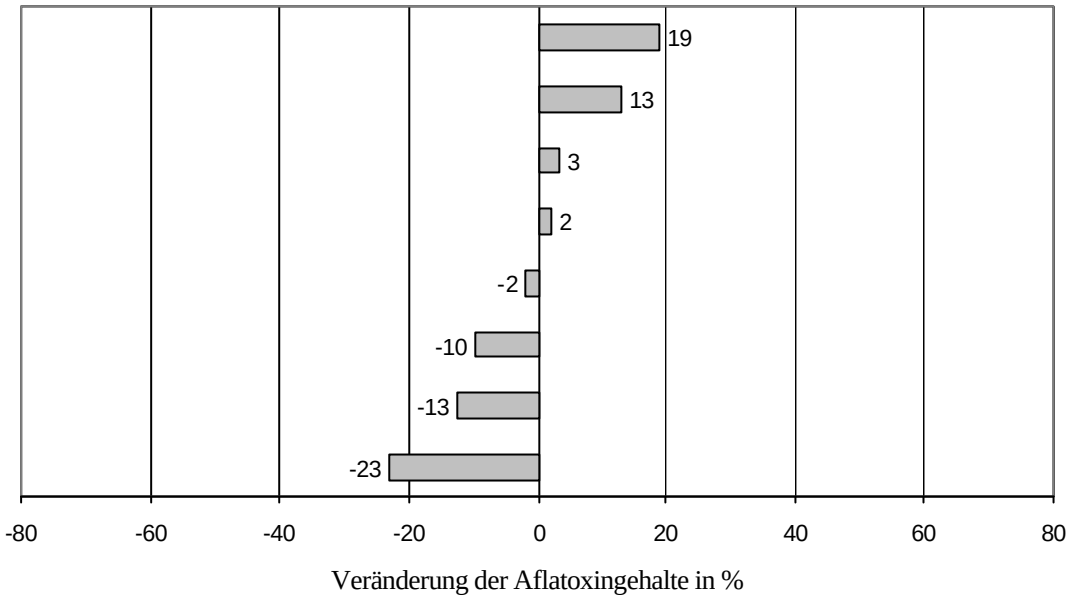


Abb. 24: *Prozentuale Veränderungen der Aflatoxingehalte S B1, B2, G1, G2 nach einer Lagerung in Pressballen von acht Chargen C. senna fructus in Indien während der Regenzeit*

Die Lagerung zu Ballen gepresster Sennesfrüchte während der Regenzeit in Indien führte zu Veränderungen der gemessenen Aflatoxinkonzentrationen. In vier der acht Chargen wurden nach der fünfmonatigen Lagerung etwas höhere Aflatoxinkonzentrationen gemessen und in vier Chargen niedrigere Konzentrationen. Die Aflatoxinabnahmen dominierten leicht gegenüber den Aflatoxinzunahmen. Die maximale Abnahme betrug 23 % und die maximale Zunahme 19 %.

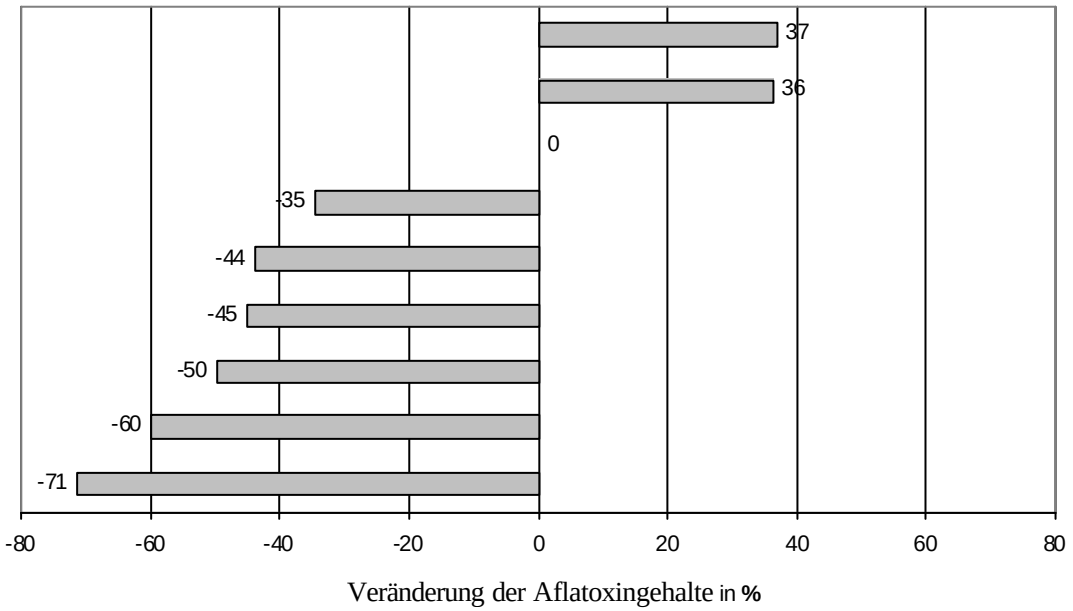


Abb. 25: *Prozentuale Veränderungen der Aflatoxingehalte S B1, B2, G1, G2 nach einer losen Lagerung von neun Chargen C. senna fructus in Indien während der Regenzeit*

Die Aflatoxinentwicklung während der fünfmonatigen Lagerung loser Sackware in der Regenzeit war ausgeprägter als bei der Lagerung gepresster Ware. In zwei Chargen wurden mehr Aflatoxine nachgewiesen und in sechs Chargen geringere Konzentrationen als vor der Regenzeit. Die Zunahmen betrugen 36 und 37 %, die Reduzierung machten 36 bis 71 % aus. In einer Charge wurde keine Veränderung des Aflatoxingehaltes gemessen. Die Abnahmen waren somit deutlich häufiger und stärker ausgeprägt als die Zunahmen der Aflatoxinkonzentrationen (Abb. 25).

Auch in einer nur vierwöchigen Lagerzeit während der Trockenzeit hat es große Veränderungen der Aflatoxingehalte in den ungepresst gelagerten Sennesfrüchten gegeben (Abb. 26).

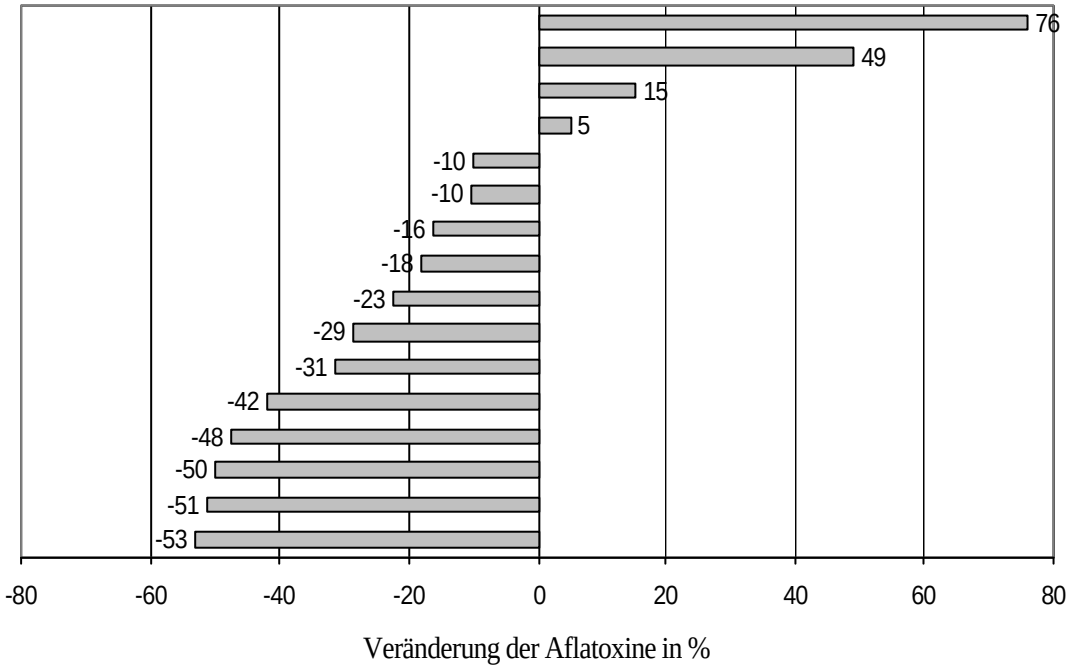


Abb. 26: Prozentuale Veränderungen der Aflatoxingehalte Σ B1, B2, G1, G2 nach einer vierwöchigen losen Lagerung von 16 Chargen C. senna fructus in Indien während der Trockenzeit

Nach vier Wochen wurden viermal bis zu 76 % mehr und zwölfmal bis zu 63 % weniger Aflatoxine nachgewiesen. Insgesamt wurden also auch während der Trockenzeit häufiger eine Aflatoxinreduzierung als Aflatoxinanreicherung während der Lagerung von *C. senna* fructus festgestellt.

5.6.4. Diskussion

Die Ergebnisse zeigen, dass die Aflatoxinkonzentrationen in gelagerten Sennesfrüchten nicht konstant sind. Es gibt sowohl Zunahmen als auch Abnahmen. Die hohe Luftfeuchtigkeit um 80 % und die Lagertemperatur um 30 °C in Tamilnadu lassen, wie zu erwarten war (DIAMANTE 1995, WEIDENBÖRNER 1998), auch in getrockneter *C. senna* fructus weitere mikrobiologische Aktivität zu. Auffallend ist jedoch, dass im Gegensatz zu klassischen aflatoxinproblematischen Früchten wie Mais (HELL 1997) oder Erdnüssen (FONSECA et al. 1995) nicht die Zunahme sondern die Abnahme der Aflatoxingehalte während der Lagerung überwiegt.

Dass Aflatoxine von *Aspergillus*-Pilzen (TSUBOUCHI, et al. 1983, DOYLE & MARTH 1978) und anderen Mikroorganismen (BOL & SMITH 1989, FARAJ et al. 1993) abgebaut werden können, ist bekannt. Wieso aber in *C. senna* der Abbau von Aflatoxin bei der Lagerung überwiegt, muss noch näher untersucht werden. Vorstellbar wäre, dass bei der Trocknung von *C. senna* fructus Stoffe gebildet werden, die die Aflatoxinsynthese hemmen. So besitzen nach *EL BALLAL* et al. (1989) Sennesfrüchte antimycotische Eigenschaften.

5.7. Regionale und saisonale Unterschiede im Aflatoxinvorkommen bei *C. senna* fructus

5.7.1. Einleitung

Wie in Kapitel 3 beschrieben, wird *C. senna* sowohl im südindischen Bundesstaat Tamilnadu als auch im nordindischen Bundesstaat Gujarat, auf der Halbinsel Kuch, nahe der pakistanischen Grenze angebaut. Während eines fünfjährigen Untersuchungszeitraumes wurde ebenfalls das nordindische Anbaugebiet regelmäßig besucht, um regionale Unterschiede der Senna Qualitäten zu untersuchen.

Saisonale Effekte des Aflatoxinvorkommens in landwirtschaftlichen Nutzpflanzen sind von Autoren wie CASTOR et al. (1987) festgestellt worden. Durch mehrjährige kontinuierliche Untersuchungen konnten wiederkehrende saisonale Schwankungen in dem Aflatoxinvorkommen in *C. senna fructus* festgestellt werden, die in den beiden Anbaugebieten unterschiedlich waren. Dieses Kapitel wird diese Unterschiede darstellen und zu erklären versuchen.

5.7.2. Methode

Die regionalen Unterschiede in den Aflatoxinvorkommen in *C. senna* der zwei indischen Hauptanbaugebiete in Tamilnadu und Gujarat wurden untersucht, indem die Aflatoxinkonzentrationen in Proben aus konventionell erzeugter Handelsware der jeweiligen Anbausaison über fünf Jahre verglichen wurden. Insgesamt waren es 74 Proben nordindischer Handelsware und 83 Proben südindischer Handelsware. Alle Proben wurden eigenhändig bei lokalen Händlern im jeweiligen Anbaugebiet genommen, um sicherzustellen, dass es sich um Ware der jeweiligen Region handelt. Die Probennahme und Aflatoxinanalyse erfolgte nach der HPLC-Standardmethode. Die Ergebnisse wurden der Übersicht halber kategorisieret in % Proben < 4 µg/kg, 4 bis 10 µg/kg und > 10 µg/kg Aflatoxine Σ B_1, B_2, G_1, G_2.

Für die Darstellung saisonaler Unterschiede in dem Aflatoxinvorkommen in *C. senna* fructus wurden insgesamt 296 Aflatoxinproben dieser Frucht aus fünf Untersuchungsjahren herangezogen. Es wurden nur Proben verwendet, bei denen eine genaue Zuordnung des Erntetermins möglich war und die weniger als acht Wochen gelagert waren. Dies waren 257 Proben aus dem südindischen und 40 Proben aus dem nordindischen Anbaugebiet. Die Auswertung erfolgte, indem die Ergebnisse von jeweils zwei Monaten zusammengefasst wurden und mittels Box Pot mit Maxima, Minima und Quartilen dargestellt wurden.

Ein Feldversuch wurde 1997 durchgeführt, um zu überprüfen, ob das unterschiedliche Ernte- und Trocknungsverfahren in Gujarat Auswirkungen auf das Aflatoxinvorkommen in *C. senna* hat. Dazu wurden in einem homogenen Senna - Bestand im Anbaugebiet in Tamilnadu sechs 150 m² große Versuchsflächen abgesteckt, von denen drei durch Zufall für die traditionelle südindische- und drei für die in Gujarat übliche Erntemethode ausgewählt wurden. Auf der südindischen Variante wurden jeweils die Früchte mit ihren Fruchtständen geerntet und in dieser Form auf dem Trocknungsplatz in Tuticorin getrocknet. Auf den Gujaratflächen wurde der ganze Sproßanteil der Pflanze abgeschnitten und als solche auf dem Trocknungsplatz getrocknet. Jede Versuchsfläche wurde zweimal geerntet. Aus der getrockneten Ware wurden jeweils die Früchte herausselektiert und deren Aflatoxinkontamination nach Standard-HPLC-Methode bestimmt.

5.7.3. Ergebnisse

Die regionalen Unterschiede in den Aflatoxinvorkommen nord- und südindischer Handelsware stellen sich wie folgt dar (Abb. 27).

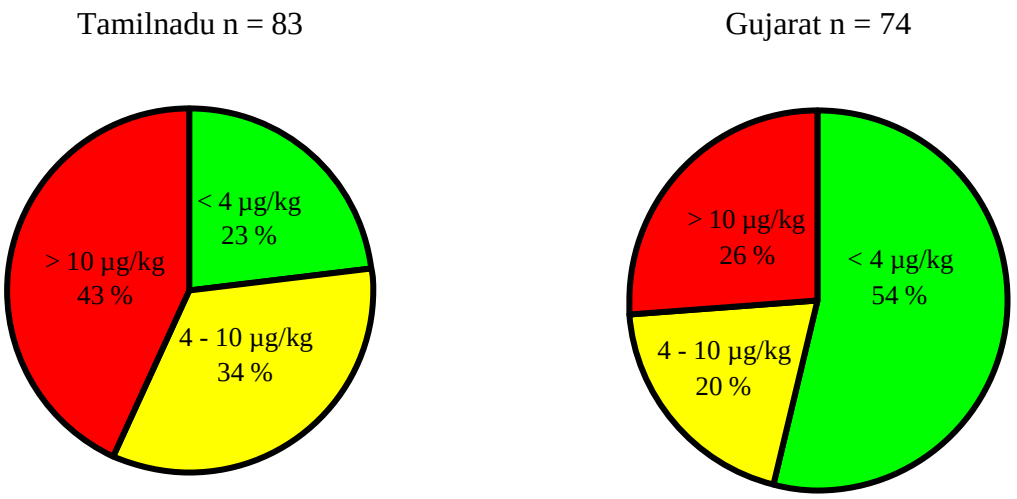


Abb. 27: *Weniger als 4, 4 bis 10 und mehr als 10 µg/kg Aflatoxine S B1, B2, G1, G2.belasteter Proben in % von 74 Kontrollen nordindischer Handelsware und 83 Kontrollen südindischer Handelsware C. senna fructus*

Die Ergebnisse zeigen, dass im nordindischen Anbaugebiet häufiger Sennesfrüchte mit geringer Aflatoxinbelastung produziert wurden als in der südindischen Anbauregion (Abb. 27). In Gujarat hatten 54 % von 74 Chargen Aflatoxinkonzentrationen unter 4 µg/kg. In Tamilnadu waren es nur 23 % der 83 untersuchten Chargen, die so geringe Aflatoxinwerte aufwiesen. Demgegenüber waren 43 % der in Tamilnadu erzeugten Chargen mit mehr als 10 µg/kg Aflatoxinen belastet und in Gujarat waren es nur 26 % der Proben. Insgesamt war also das Aflatoxinbildungspotential für *C. senna* im Anbaugebiet Gujarat (Kutch) deutlich niedriger als in der südindischen Anbauregion.

Die festgestellten saisonalen Schwankungen in den Aflatoxinvorkommen bei Früchten von *C. senna* in den beiden Anbaugebieten sind in den Abb. 28 und 29 zusammengefasst.

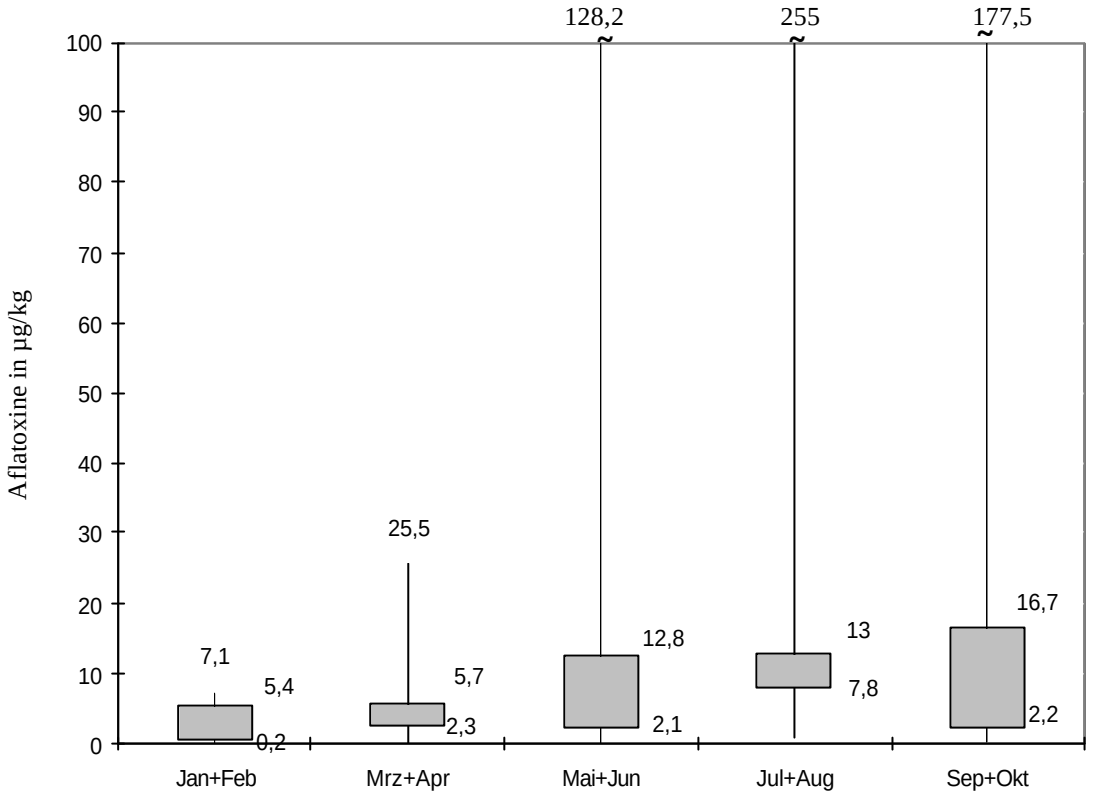


Abb. 28: *Box Whisker Plots mit Maxima, Quartilen und Minima der Aflatoxinvorkommen in 256 Proben von fünf Anbaujahren unterschiedlicher Erntezeitpunkte von C. senna fructus in Tamilnadu*

Die Ergebnisse zeigen in Tamilnadu mit fortschreitender Anbausaison ein bis zu den Monaten Juli/August stetig ansteigendes Potential der Bildung von Aflatoxinen und dann wieder eine leicht sinkende Tendenz.

Zu Beginn der Erntesaison, von Januar bis in den April, lagen die Aflatoxinkonzenrationen bei 75 % aller Proben unter 5,7 µg/kg Σ B_1, B_2, G_1, G_2. Die im Februar gemessene Maximalkonzentration lag bei nur 7 µg/kg und im April bei 25 µg/kg.

In der Haupterntezeit für Früchte der *C. senna* in Tamilnadu, im Mai/Juni, wo die meisten Pflanzen zum zweiten Mal geerntet werden, traten zum ersten Mal auf einigen Standorten sehr hohe Aflatoxinbelastungen auf. Der Maximalwert in dieser Ernteperiode betrug 128,2 µg/kg Aflatoxin Σ B_1, B_2, G_1, G_2. 25 % der Proben hatten Aflatoxinbelastungen von mehr als 12,8 µg/kg.

Im sehr trockenen, heißen und windigen Juli/August Monaten, wo häufig die dritte Ernte vollzogen wird, stiegen die Aflatoxinkonzentrationen weiter an. Es wurde kaum noch Ware mit geringen Aflatoxinkonzentrationen geerntet. Ausreißer nach oben wurden mit Spitzenwerten

bis 255 µg/kg noch extremer. 75 % der Proben hatten Aflatoxinkonzentrationen von mehr als 7,8 µg/kg Σ B_1, B_2, G_1, G_2 und waren somit für europäische Exportmärkte nicht verwendbar.

Im September/Oktober stieg der Anteil von Ware mit geringen Aflatoxinbelastungen wieder an. 37 % der Proben von September/Oktober waren mit weniger als 4 µg/kg Aflatoxinen belastet, ein ähnlich hoher Anteil wie zu Beginn der Anbausaison, als es 40 % der Proben waren und wieder mehr als doppelt so viele wie im Juli/August, als der Anteil bei nur 12 % lag. Es gab jedoch auch zum Ende der Saison weiterhin sehr hoch belastete Chargen, die gemessene Maximalkonzentrationen betrug 177,5 µg/kg Aflatoxin Σ B_1, B_2, G_1, G_2, doch waren nur noch 36 % der Proben mit mehr als 10 µg/kg Aflatoxin Σ B_1, B_2, G_1, G_2. belastet, im Gegensatz zu 63 % im Juli/August.

Die saisonalen Schwankungen des Aflatoxinvorkommens in *C. senna* des nordindischen Anbaugebietes ausgewertet aus 40 Proben sind in Abb. 29 dargestellt. Zur Erinnerung: In Gujarat wird *C. senna* mehrjährig kultiviert. Es wird ca. alle zehn Wochen die gesamte oberirdische Pflanze geerntet. Die Ernte beginnt im August nach der Regenzeit und endet im Mai vor dem Monsun.

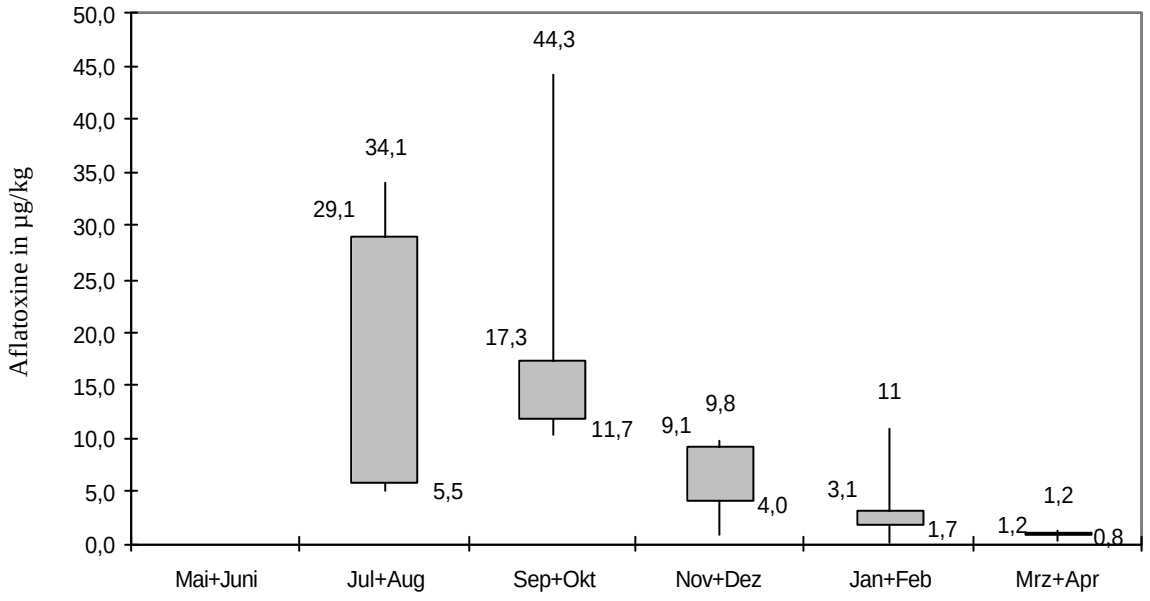


Abb. 29: *Box Whisker Plots mit Maxima, Quartilen und Minima für Aflatoxinvorkommen in 40 Proben von vier Anbaujahren unterschiedlicher Erntezeitpunkte von C. senna fructus in Gujarat (Kutch)*

In Gujarat gab es, im Gegensatz zu Tamilnadu, eine abnehmende Tendenz der Aflatoxinbildung im Laufe der dortigen Erntesaison auf insgesamt niedrigerem Niveau. Die ersten Ernten

nach der Regenzeit in den Monaten Juli bis Oktober waren in Gujarat relativ hoch mit Aflatoxinen belastet, in der Regel über 10 µg/kg Σ B_1, B_2, G_1, G_2.. Auch im September/Oktober wurde kaum Ware mit niedrigen Aflatoxinkonzentrationen geerntet und die Maximalkonzentration betrug 44,3 µg/kg Aflatoxin Σ B_1, B_2, G_1, G_2. Mit Beginn des Winters in Gujarat, der sich durch kühle Nächte (< 10ºC) und tagsüber sehr geringe relative Luftfeuchte auszeichnet, nehmen die Aflatoxinkonzentrationen in Früchten der *C. senna* kontinuierlich ab. Im Januar/Februar waren 75 % der Proben mit weniger als 3,1 µg/kg Σ B_1, B_2, G_1, G_2 belastet und im März/April waren es 100 % der Proben. Aflatoxine waren in diesen Monaten nur noch in kaum nachweisbaren Spuren vorhanden.

Insgesamt ist festzuhalten, dass die letzten Ernten in Gujarat und die erste Ernte in Tamilnadu die niedrigsten Aflatoxinkonzentrationen aufwiesen. Die höchsten Aflatoxinbelastungen traten in Gujarat nach der Regenzeit und in Tamilnadu während der trockenen windigen Sommermonate auf.

Die Übertragung der in Gujarat durchgeführten Ernte- und Trocknungsmethoden auf südindische Verhältnisse führte zu den in Tab. 17 dargestellten Aflatoxinresultaten. Die Trocknung der Sennesfrüchten an ganzen Strauchteilen der Gujaratmethode dauerte im Gegensatz zu der traditionellen südindischen Methode fünf anstatt drei Tage.

Tab. 17: *Aflatoxinkonzentrationen (µg/kg S B_1, B_2, G_1, G_2) in getrockneten Sennesfrüchten bei regional unterschiedlichen Ernte- und Trocknungsmethoden*

erste Ernte		
Wiederholung	Gujarat – Methode	südindische Methode
I	0,8	1,4
II	0,6	0,9
III	n.n.	1,1
Mittel	*0,7*	*1,1*

	zweite Ernte	
Wiederholung	Gujarat – Methode	südindische Methode
I	5,4	28,2
II	3,9	5,4
III	5,4	3,4
Mittel	*4,9*	*12,3*

Die Konzentrationen in den Früchten der ersten Ernte liegen durchweg unterhalb der Konzentrationen aus der zweiten Ernte. In der ersten Ernte liegen die nach der Gujarat–Methode geernteten und getrockneten Proben alle unterhalb der Aflatoxinkonzentrationen der südindischen Variante. In der zweiten Ernte sind zwar auch in der Gujaratvariante deutliche Aflatoxinkonzentrationen nachweisbar, jedoch liegen sie deutlich niedriger als die erste Probe der zweiten südindischen Ernte. Diese hatte mit 28,2 µg/kg Σ B_1, B_2, G_1, G_2 eine mehr als fünffach höhere Konzentration als alle anderen Proben. Dieser Versuch bestätigt somit die These, dass die Gefahr der Aflatoxinbildung bei der in Gujarat praktizierten Ernte- und Trocknungsmethode geringer ist als bei der südindischen Methode. Der Nachteil bestand jedoch darin, dass während der traditionellen südindischen Methode noch eine dritte Fruchternte auf der Testfläche durchgeführt werden konnte, während die Vegetationszeit bei der Gujarat – Methode nur für zwei Ernten ausgereicht hat.

5.7.4. Diskussion

Die Faktoren, die für die Unterschiede der Aflatoxinvorkommen in den beiden indischen Anbaugebieten für *C. angustifolia* verantwortlich sind, sind vielfältig. Die in Gujarat angewandte Erntepraxis, bei der jeweils die gesamte oberirdische Pflanze abgeschnitten und als solche getrocknet wird hat den Vorteil, dass

- weniger Früchte während der Ernte verletzt werden,
- immer wieder neue Triebe gebildet werden und nicht alte durch die Ernte geschwächte Triebe zurückbleiben,
- Schädlingspopulationen, wie z. B. von *Ephestia elutella,* geringere Entwicklungschancen bekommen,
- während der Trocknung die Früchte einzeln an der Pflanze hängen und Pilzinfektionen weniger gut von einer auf die andere Frucht übertragen werden können.

Der in Südindien durchgeführte Versuch des direkten Vergleichs beider Ernte- und Trocknungsmethoden hat diese These unterstützt. Interessant dabei ist, dass sich die längere Trocknungsdauer der Früchte bei der Trocknung ganzer Strauchteile nicht nachteilig ausgewirkt hat. Vor allem die zu erwarteten geringeren Flächenerträge als auch der erhöhte Reinigungs- und Sortieraufwand nach der Trocknung führen jedoch noch dazu, dass südindische Bauern dieser Methode noch skeptisch gegenüber stehen.

Neben diesen agronomischen Faktoren haben die klimatischen Faktoren in den Anbaugebieten eine entscheidende Bedeutung auf die Aflatoxinbildung, wie man an den saisonalen

Schwankungen des Aflatoxinvorkommens erkennen kann. Aflatoxine werden vermehrt in Pflanzen gebildet, die unter Trockenstress leiden in Verbindung mit hohen Luftfeuchtigkeiten und hohen Temperaturen (JACOBSEN et al. 1993). Diese Bedingungen sind während der Sommermonate in Tamilnadu die Regel und in Gujarat nur während und kurz nach der Regenzeit gegeben. In Tamilnadu ist die Luftfeuchtigkeit ganzjährig hoch und in Gujarat nur während der Regenzeit. Neben der geringen Luftfeuchtigkeit, vor allem in der Trockenzeit in Gujarat, sind die geringen Temperaturen ein weiterer Faktor, welcher die Entwicklung und Aflatoxinsynthese durch *A. flavus* senkt (WIDSTROM et al. 1990). Diese beiden Faktoren, geringe Luftfeuchtigkeit und relativ niedrige Temperaturen sind wahrscheinlich dafür verantwortlich, dass in Gujarat die Frühjahrsernte von Senna so gut wie 100 % frei von Aflatoxinen ist.

5.8. Versuche in Indien mit (Sudan Senna) *Cassia senna acutifolia*

5.8.1. Einleitung

Aus dem Sudan stammende Sennesfrüchte sind nach Angaben von *roha arzneimittel* GmbH weitgehend frei von Aflatoxinen. Durch Anbauversuche mit aus sudanesischem Saatgut der *C. acutifolia* in Indien sollte überprüft werden, ob die Kultivierung der *C. acutifolia* auch in den südindischen Anbaugebieten möglich ist und ob die Varietät Resistenzfaktoren für die Aflatoxinbildung besitzt.

5.8.2. Methode

In Tamilnadu wurden an drei Standorten aus dem Sudan stammendes Saatgut der Varietät *C. senna acutifolia* angebaut. Die ca. 100 m² großen Versuchsflächen waren bewässerbar und hatten unterschiedliche Böden. Auf der Farm von *Incan Parmaceuticals* war es ein Black Cotton Soil, auf der Testfläche in Tuticorin ein Sandy Soil, und auf der Fläche in der Nähe von Covilpatti wurde ein Red Soil ausgesucht. Auf der Hälfte der Flächen wurde ortsübliches Saatgut von *C. senna* als Vergleich angebaut. Die Aussaat erfolgte Mitte März. Alle vier Wochen wurden die Pflanzen bewässert, um optimales Wachstum bei dem späten Aussaattermin zu gewährleisten. Einmal pro Woche wurden die Flächen inspiziert. Von jedem Standort gab es nur eine Ernte von *C. acutifolia*, die nach der Standardmethode untersucht wurde. Als Vergleich zu der Aflatoxinkonzentration in den Früchten der *C. senna acutifolia* wurde die zeitlich nächste Ernte des südindischen Saatgutes herangezogen. Eine Aflatoxinbestimmung wurde in 50 g von Insekten beschädigter Frischware durchgeführt.

Mögliche Unterschiede im Aflatoxinbildungspotential von *C. senna angustifolia* und *C. senna acutifolia* fructus wurden ermittelt, indem in jeweils drei Wiederholungen 12 g unbeschädigte frische Früchte beider Varietäten von einer Versuchsfläche in geschlossenen Petrischalen bei ca. 30 °C Zimmertemperatur bebrütet wurden. Anschließend wurden sie in der Sonne getrocknet und nach der Standardmethode der Aflatoxingehalt bestimmt.

5.8.3. Ergebnisse

Die Pflanzen der Varietät *C. senna acutifolia* hatten ein dem lokalen Saatgut in etwa entsprechendes vegetatives Wachstum mit jedoch etwas größeren und rundlicheren Fiederblättern.

Deutlichere Unterschiede zeigten sich bei dem generativen Wachstum auf allen Standorten. Die Blütenbildung und Fruchtproduktion war bei der in Südindien angebauten sudanesischen Senna bis zum Ende der Saison gehemmt. Erst im August setzte eine Blüte ein, die zu einer geringen Ernte im September führte. Das lokale Saatgut hatte in dem gleichen Zeitraum drei volle Fruchternten hervorgebracht.

Die Aflatoxinkonzentrationen in getrockneten Früchten beider Varietäten unterschieden sich wie folgt (Tab. 18).

Tab. 18: *Aflatoxin S B_1, B_2, G_1, G_2 in µg/kg konventionell getrockneten Früchten von C. senna angustifolia und C. senna acutifolia auf drei südindischen Standorten*

	Black Soil	Sandy Soil	Red Soil
C. senna. angustifolia	9,2	5,4	15,7
C. senna. acutifolia	1,6	0,7	6,9

Die Aflatoxinkonzentrationen in den Früchten der Varietät *C. senna acutifolia* waren auf allen Versuchsflächen niedriger als die des ortsüblichen Saatgutes. In den Früchten, die auf dem Red Soil geerntet wurden, lag die Aflatoxinkonzentration bei grenzwertüberschreitenden 6,9 µg/kg. Über solche Konzentrationen wurde bisher von aus dem Sudan stammender Ware nicht berichtet.

Die Früchte der Varietät *acutifolia* wurden in Südindien ebenso von dem Schädling *Ephestia elutella* befallen wie die des ortsüblichen Saatgutes. In der Probe 50 g frischer Früchte mit Insektenbeschädigung wurden 92,6 µg/kg Aflatoxin Σ B_1, B_2, G_1, G_2 gemessen. Die Problematik von Insektenschäden und Aflatoxinkontamination ist also auch bei der sudanesischen Varietät gegeben.

Die Ergebnisse aus den Versuchen, in denen die Früchte beider Varietäten in Petrischalen bebrütet wurden, zeigten eine deutlich erhöhte Pilzresistenz der Früchte von *C. senna acutifolia* gegenüber Früchten von *C. senna angustifolia*. Nach drei Tagen im erntefeuchten Zustand in geschlossenen Petrischale waren die Früchte des sudanesischen Saatgutes noch grün und nur vereinzelt mit sichtbaren Pilzkolonien besiedelt, während sich die Früchte des indischen Saatgutes bei gleicher Behandlung fast gänzlich verfärbt hatten und von Pilzmycel vollständig überwuchert waren. Die Bestimmung der Aflatoxinkonzentrationen in diesen Früchten bestätigte das sichtbare Ergebnis (Tab.19).

Tab. 19: *Aflatoxin S B1, B2, G1, G2 in µg/kg von jeweils drei Proben C. senna angustifolia und acutifolia, die in Petrischalen bebrütet wurden*

Wiederholung	*C. senna angustifolia*	*C. senna acutifolia*
1	506,2	8,7
2	789,6	35,2
3	2503,4	10,4

Die Früchte der in Südindien angebauten und in Petrischalen bebrüteten sudanesischen Senna haben deutlich niedrigere Aflatoxinkonzentrationen als die Früchte des ortsüblichen Saatgutes. Die erhöhte Resistenz gegen Pilzwachstum dieser Varietät bewirkte somit auch niedrigere Aflatoxingehalte in den Früchten der *C. senna acutifolia*.

5.8.4. Diskussion

Der Versuch hat gezeigt, dass hinsichtlich der Aflatoxinproblematik die aus dem Sudan stammende Varietät *acutifolia* deutliche genetische Vorteile gegenüber der indischen *angustifolia* besitzt. Grund für die deutlich höhere Pilzresistenz könnte der höhere Harzgehalt in den sudanesischen Früchten sein. Eine vollständige Resistenz gegen *A. flavus* ist jedoch auch bei *C. acutifolia* nicht gegeben. Eine vollständige Resistenz wäre auch eher unwahrscheinlich, da man diese trotz intensiver Suche weder bei Mais noch Erdnüssen gefunden hat (KANG et al. 1990, LILLEHOJ et al. 1980). Da das sudanesische Saatgut beim Anbau in Indien nur sehr geringe Fruchterträge geliefert hat, müssen züchterische Maßnahmen helfen, die Pilzresistenzen auf indische Senna zu übertragen.

Das weitgehende Fehlen von Aflatoxinen in sudanesischen Sennesfrüchten wird durch diese Ergebnisse also nur zum Teil erklärt. Die Problematik von Insektenbeschädigung und Aflato-

xinkontamination ist zumindest bei der in Indien angebauten afrikanischen Senna gegeben. Die *Ephestia*-Larve befällt ebenfalls gerne Früchte dieser Sennapflanzen und in ihnen werden dann auch Aflatoxine gebildet. Neben den genetischen Unterschieden sind also auch noch andere Faktoren dafür verantwortlich, dass aus dem Sudan stammende Sennesfrüchte weitgehend frei von Aflatoxinen sind.

5.9. Mikrobiologische Untersuchungen von pulverisierten Früchten der *C. senna*

5.9.1. Einleitung

Durch die quantitative und qualitative Bestimmung von Pilzen in unterschiedlich hoch belasteten Probenpulvern wurde versucht, Zusammenhänge zwischen Pilzkeimzahlen und Aflatoxinen festzustellen.

5.9.2. Methode

Die Untersuchungen wurden am Institut für Phytophatologie und Angewandte Zoologie der Justus-Liebig-Universität Gießen durchgeführt. Insgesamt wurden 54 Probenpulver < 2 mm untersucht. 25 Proben stammten aus aktuellen Probenmustern und wurden anhand ihrer Aflatoxingehalte ausgewählt, um eine große Bandbereite an unterschiedlichen Belastungen zu untersuchen. Die Aflatoxingehalte der Proben lagen zwischen 0,4 µg/kg bis 177,5 µg/kg. 27 Proben waren im Schatten getrocknet worden und hatten Aflatoxingehalte zwischen 1,9 µg/kg und 80,0 µg/kg.

Als Nährmedium wurde der Bengalrosa-Glucose-Hefeextrakt Agar benutzt (Rote Platte).

Der Bengalrosa-Glucose-Hefeextrakt Agar bestand aus:

Glucose	10 g
Hefeextrakt	2 g
Agar	17 g
Entionisiertes Wasser	1000 ml
Streptomycinsulfat	125 mg
Bengalrosa	25 mg

Vorgehensweise:

Nährmedium:

Die Glucose, der Hefeextrakt und das Agar wurden im entionisierten Wasser gemischt und anschließend autoklaviert. Das Streptomycinsulfat und Bengalrosa wurden nach dem Autoklavieren in das auf etwa 41 °C abgekühlte Medium gegeben. Das fertige Nährmedium wurde in Petrischalen überführt.

Herstellung der Probenlösung:

Jeweils 5 g homogenisiertes Probenpulver wurden in 500 ml abgekochtem Wasser vermengt und durch Schütteln gut durchmischt. 5 ml dieser Suspension wurden nochmals in 495 ml abgekochtem Wasser verdünnt. Für jede Probe wurden fünf Wiederholungen mit jeweils 1 ml dieser 10.000fach verdünnten Suspension auf das Nährmedium mittels Pipette aufgebracht. Durch Kreisbewegungen der Petrischalen wurde für eine gleichmäßige Verteilung gesorgt. Bei sehr keimreichen Proben wurde die Verdünnung nochmals um den Faktor 10 erhöht, bei sehr keimarmen Proben wurde sie um Faktor 10 gesenkt.

Anzucht:

Die beimpften geschlossenen Petrischalen wurden 48 Stunden bei 32 °C bebrütet und anschließend zwölf Stunden mit UV–Licht bestrahlt.

Auswertung:

Die Auswertung erfolgte durch Auszählen der gewachsenen Kolonien und durch mikroskopische Klassifizierung der Pilze (KLICH & PITT 1988). Eine Unterscheidung zwischen den Aflatoxinbildnern *A. flavus* und *A. parasiticus* wurde nicht vorgenommen. Beide Pilze wurden unter *A. flavus* zusammengefasst.

Die Ergebnisse sind dargestellt in Abbildungen mit logarithmierten Aflatoxinwerten. Für die Vergleiche hoch belasteter mit niedrig belasteten Proben sowie in der Sonne und im Schatten getrockneter Proben wurde der χ^2-Test durchgeführt. Für die Berechnung der Korrelationskoeffizienten wurden die Aflatoxinwerte mit ln x+1 transformiert und die Pilzkeimzahlen mit ln, um eine Normalverteilung zu erreichen.

5.9.3. Ergebnisse

Die Ergebnisse der Aflatoxinkonzentration in Abhängigkeit zur Gesamtzahl gekeimter Pilzsporen sind in Abb. 30 und der Vergleich von Sonnen- und Schattentrocknung in Tab. 20 dargestellt.

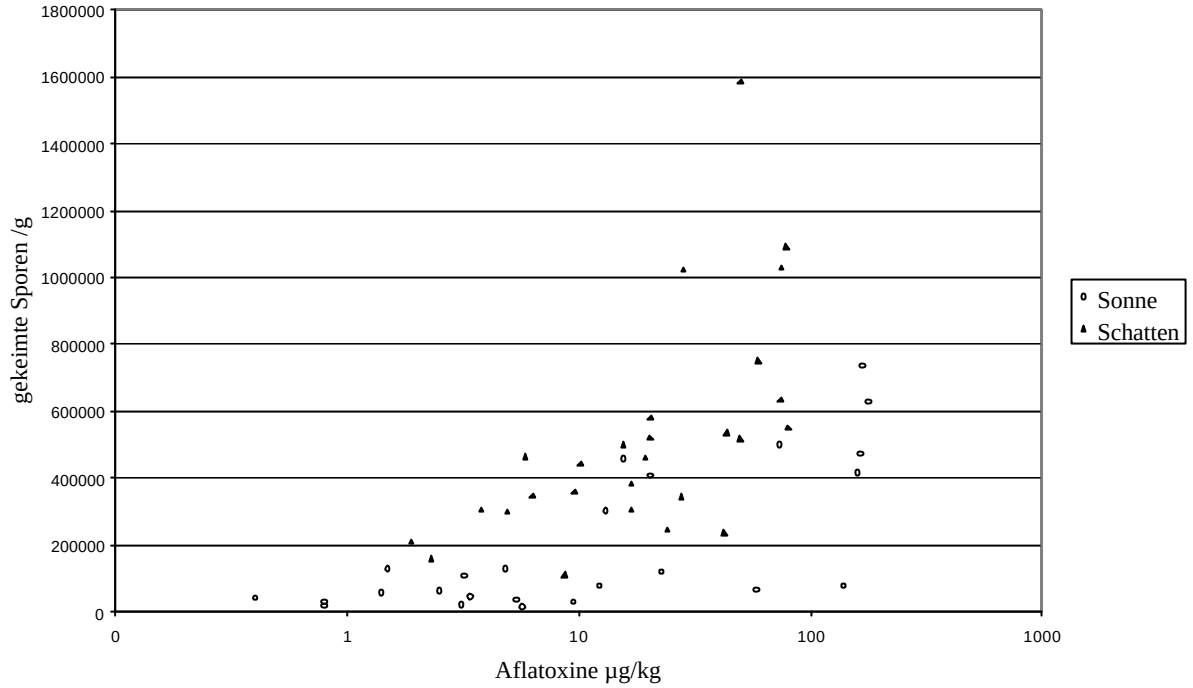


Abb. 30: *Anzahl aller gekeimten Pilzsporen/g Pulver in Abhängigkeit zur Aflatoxinkonzentration in der Sonne und im Schatten getrockneter Proben von C. senna fructus*

Tab. 20: *Anzahl/g aller gekeimten Pilzsporen von im Schatten und in der Sonnen getrockneter C. senna fructus*

	Max. Keimzahl /g	Min. Keimzahl /g	Median	Mittlere Keimzahl /g
sonnengetrocknete Proben	736.000	14.000	78.000	199.000
schattengetrocknete Proben	1.585.000	110.000	442.000	518.000

Im Schatten getrocknete Proben haben mehr Pilzkeime. Die mittlere Keimzahl ist mehr als doppelt so hoch wie die der in der Sonne getrockneten Früchte (Tab. 20). Hohe Pilzkeimzahlen führten auch zu hohen Belastungen mit Aflatoxinen, d. h., es gab keine Probe mit hoher Pilzkeimzahl und niedriger Aflatoxinkonzentration. Proben mit geringen Keimzahlen konnten jedoch auch hohe Aflatoxinkonzentrationen aufweisen (Abb. 30).

Zusammenhänge zwischen der Anzahl gekeimter Sporen von *A. niger* und den Aflatoxinkonzentrationen sind in Abb. 31 sowie der Vergleich von Sonnen- und Schattentrocknung in Tab. 21 dargestellt.

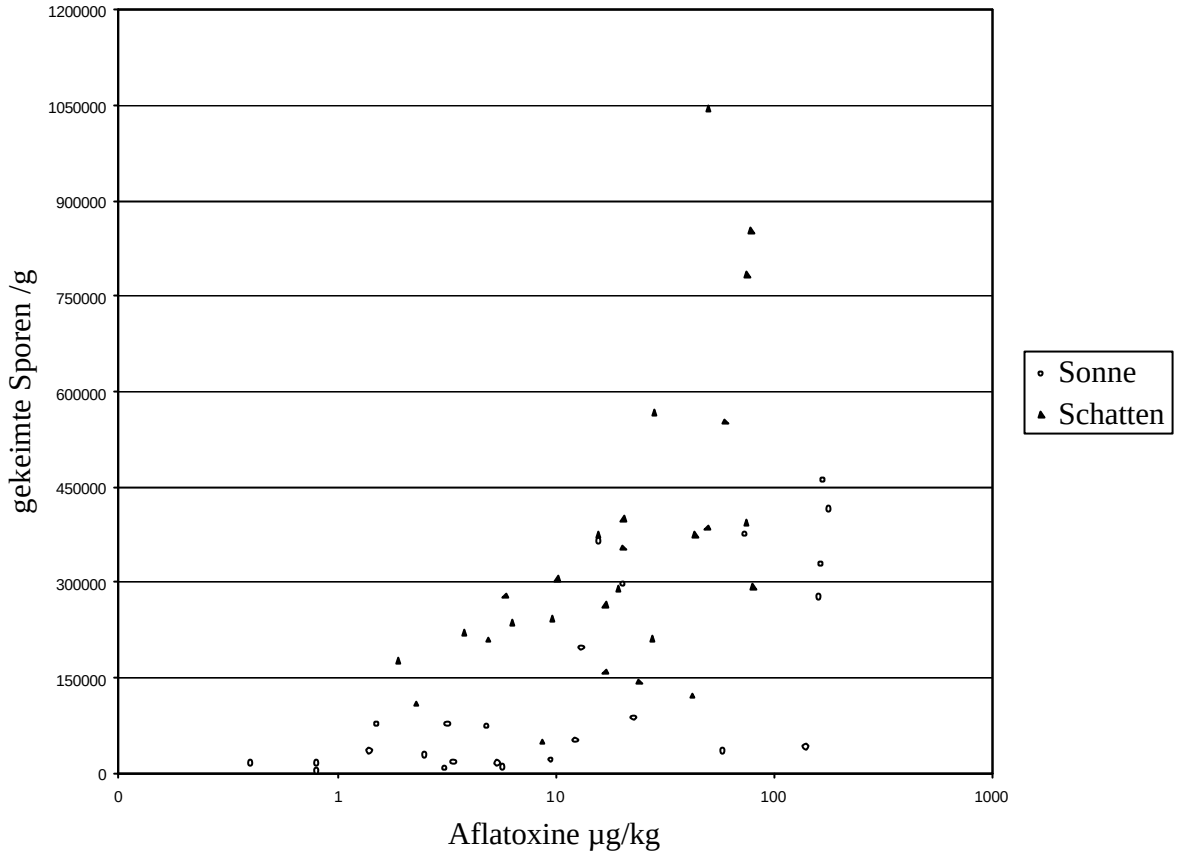


Abb. 31: *Anzahl gekeimter A. niger-Sporen/g Pulver in Abhängigkeit zur Aflatoxinkonzentration bei in der Sonne und im Schatten getrockneten Proben von C. senna fructus*

Tab.21: *Anzahl/g gekeimter A. niger-Sporen von im Schatten und in der Sonne getrockneter C. senna fructus*

	Max. Keimzahl /g	Min. Keimzahl /g	Median	Mittlere Keimzahl /g
sonnengetrocknete Proben	462.000	4.000	52.000	134.000
schattengetrocknete Proben	1.045.000	50.000	280.000	349.000

Aspergillus niger ist in allen Proben der dominierende Pilz. Über 60 % der gekeimten Sporen sind auf *A. niger* zurückzuführen. Durch die Schattentrocknung ist der Anteil von *A. niger* weiter erhöht worden (Tab. 21). Proben mit hohen Keimzahlen von *A. niger* hatten ebenfalls

hohe Aflatoxinwerte, jedoch gab es auch Proben mit niedrigen *A. niger*-Keimzahlen und hohen Aflatoxinkonzentrationen (Abb. 31).

Zusammenhänge zwischen der Anzahl gekeimter *A. flavus*-Sporen und den Aflatoxinkonzentrationen sind in Abb. 32 sowie der Vergleich von Sonnen und Schattentrocknung in Tab. 22 dargestellt.

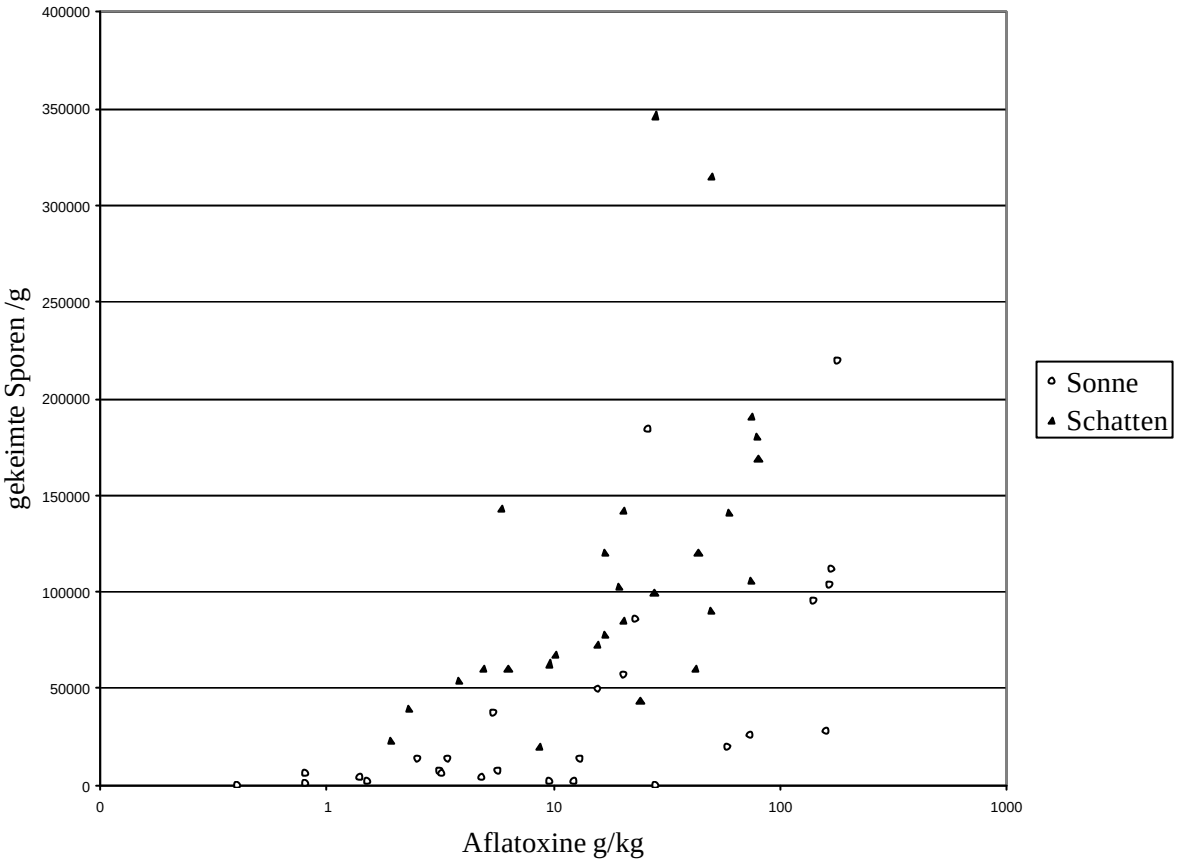


Abb. 32: *Anzahl gekeimter A. flavus-Sporen/g Pulver in Abhängigkeit zur Aflatoxinkonzentration bei in der Sonne und im Schatten getrockneten Proben von C. senna fructus*

Tab. 22: *Anzahl/g gekeimter A. flavus–Sporen von im Schatten und in der Sonne getrockneter C. senna fructus*

	Max. Keimzahl /g	Min. Keimzahl /g	Median	Mittlere Keimzahl /g
sonnengetrocknete Proben	220.000	1.000	14.000	44.000
schattengetrocknet Proben	315.000	20.000	85.000	111.000

Der zweithäufigste Pilz in den Proben ist *A. flavus.* Ca. 20 % der Gesamtkeimzahlen gehören zu *A. flavus*. Die Schattentrocknung hat ebenfalls das Vorkommen von *A. flavus* begünstigt (Tab. 22). Proben mit hohen Keimzahlen von *A. flavus* hatten auch hohe Aflatoxinkonzentrationen. Proben mit mehr als 15.000/g gekeimter *A. flavus*-Sporen hatten Konzentrationen von über 25 µg/kg Aflatoxin (Σ B_1, B_2, G_1, G_2). Niedrige Keimzahlen von *A. flavus* bedeuteten aber nicht zwangsläufig auch niedrige Aflatoxinkonzentrationen. Es gab Proben mit weniger als 5000 gekeimten Sporen/g, die Aflatoxinkonzentrationen von über 80 µg/kg (Σ B_1, B_2, G_1, G_2) aufwiesen (Abb. 32).

Zusammenhänge zwischen der Anzahl gekeimter anderer als *Aspergilli* Pilzsporen und den Aflatoxinkonzentrationen sind in Abb. 33 sowie der Vergleich von Sonnen und Schattentrocknung in Tab. 23 dargestellt.

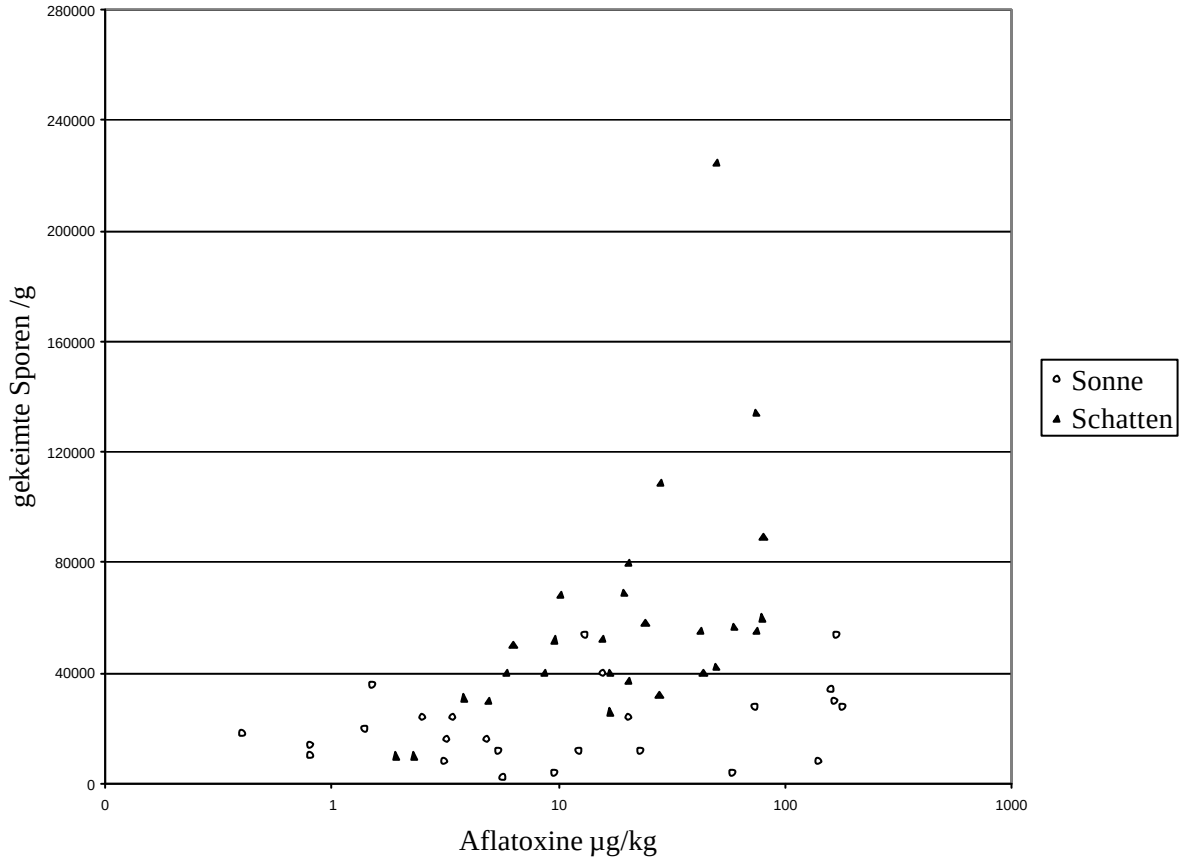


Abb. 33: *Anzahl gekeimter andere als Aspergilli Pilzsporen /g Pulver in Abhängigkeit zur Aflatoxinkonzentration bei in der Sonne und i m Schatten getrockneten Proben von C. senna fructus*

Tab. 23: *Anzahl/g gekeimter anderer Pilzsporen von im Schatten und in der Sonne getrockneter C. senna fructus*

	Max. Keimzahl/g	Min. Keimzahl/g	Median	Mittlere Keimzahl/g
sonnengetrocknete Proben	54.000	2.000	18.000	21.000
schattengetrocknet Proben	225.000	10.000	50.000	59.000

Die Keimzahlen aller anderen Pilze wie *Mucor, Penizillium, Rhizopus* und Hefen waren in dieser Reihenfolge in den untersuchten Proben am geringsten vertreten. Der Anteil anderer Pilze war, gemessen an der Gesamtkeimzahl, in den sonnengetrockneten Früchten größer als bei den im Schatten getrockneten (Tab. 23).

Auffällig war, dass die Pilzkeimzahlen der anderen Pilze bei den in der Sonne getrockneten Früchten unabhängig von der Aflatoxinkonzentration waren (Tab. 25). Sie zeigten, anders als die *Aspergilli* und die Gesamtkeimzahl, keine steigende Tendenz bei höheren Aflatoxinkonzentrationen (Abb. 33). So hatten hoch und wenig aflatoxinbelastete Proben eine signifikant unterschiedliche Zusammensetzung der Pilzkeimzahlen (Tab. 24). Der Median der Aflatoxinkonzentrationen betrug 15,6 µg/kg.

Tab. 24: *Mittlerer %-Anteil gekeimter Pilzsporen/g in mit <15 µg/kg und >15 µg/kg Aflatoxin (S B_1, B_2, G_1, G_2) belasteten sonnengetrockneten Proben*

	A. niger %	*A. flavus* %	andere Pilze %
<15µg/kg	55	15	31
>15µg/kg	68	25	7

$\chi^2_{Vers} = 19{,}03 > \chi^2_{Tab}\,(1;5\%) = 3{,}85$

Der Anteil der anderen Pilze an der Gesamtkeimzahl betrug in den wenig belasteten Früchten 31 % und in den hoch belasteten Proben jedoch nur 7 %. Die Dominanz der *Aspergilli* Pilze war in hoch belasteten Proben also deutlich größer.

Der Vergleich von Schattentrocknung mit Sonnentrocknung zeigte ein ähnliches, jedoch bei a 5 % nicht signifikantes Ergebnis (Tab. 25).

Tab. 25: *Mittlerer % Anteil gekeimter Pilzsporen im Schatten und in der Sonnen getrockneter der C. senna fructus*

	A niger %	A. flavus %	andere %
sonnengetrocknete Proben	60	18	22
schattengetrocknete Proben	66	21	13

$\chi^2_{Vers} = 2,83 < \chi^2_{Tab}\,(1;5\%) = 3,85$

Die Trocknung im Schatten führte zu einer noch stärkeren Dominanz des *Aspergillus*. Der Anteil der Pilzkeime von *A. niger* stieg von 60 % auf 66 %, der von *A. flavus* von 18 % auf 21 %, während der Anteil anderer Pilze von 22 % auf 13 % zurückging.

Die Korrelationsanalyse von Pilzkeimzahlen und Aflatoxinkonzentrationen lieferte die in Tab. 26 zusammengefassten Resultate.

Tab. 26: *Korrelationskoeffizienten zwischen Anzahl gekeimter Sporen und Aflatoxinkonzentration von in Sonne und Schatten getrockneten Proben C. senna fructus*

	A. niger		*A. flavus*		andere Pilze		gesamt Pilze	
	r	t_{Vers}	r	t_{Vers}	r	t_{Vers}	r	t_{Vers}
sonnengetrocknete Proben	0,72	4,975	0,81	6,624	0,20	0,979	0,71	4,248
schattengetrocknete Proben	0,57	3,468	0,63	4,056	0,67	4,513	0,65	4,277

t_{Tab} sonnengetrocknet (23/5%) = 2,069 t_{Tab} schattengetrocknet (25/5%) = 2,060

Die stärkste Korrelation wurde mit einem Koeffizienten von r = 0,81 zwischen der Aflatoxinkonzentration und der Anzahl gekeimter Sporen bei *A. flavus* von in der Sonne getrockneten Proben gemessen. Auch die gekeimten *A. niger*- sowie die Gesamtpilzkeimzahlen korrelierten signifikant positiv mit den Aflatoxinkonzentrationen in den Proben. Es bestand lediglich keine nachweisbare Korrelation zwischen der Anzahl anderer Pilzen von in der Sonne getrockneter Früchte und ihren Aflatoxinkonzentrationen.

5.9.4. Diskussion

Die Ergebnisse der Bestimmung von Pilzkeimzahlen in unterschiedlich getrockneten Proben von *C. senna* fructus zeigen deutlich, dass bezüglich des Besatzes an Pilzkeimzahlen die Sonnentrocknung deutliche Vorteile besitzt. In erster Linie werden durch die Sonnentrocknung die Anzahl keimender Sporen reduziert. Zusätzlich ist der Anteil an Pilzen der Gattung *Aspergillus* in sonnengetrockneten Proben niedriger als bei denen der Schattentrocknung. Der

vermutete Zusammenhang zwischen der Anzahl an Pilzsporen des Aflatoxinbildners *A. flavus* und der Aflatoxinkonzentration konnte mit dem Koeffizienten von r = 0,81 bei *A. flavus* von in der Sonne getrockneten Proben belegt werden. Dass andere Faktoren als die Anzahl *A. flavus*-Sporen in einer Probe für die Aflatoxinkonzentration ebenfalls von großer Bedeutung sind, ist ebenfalls deutlich geworden. So liegt der Korrelationskoeffizient zwischen *A. flavus*-Pilzsporen und der Toxinkonzentration bei den im Schatten getrockneten Proben bei r = 0,63. Keinen zwangsläufig direkten Zusammenhang zwischen der Keimzahl von *A. flavus* und *A. prasiticus* und dem Aflatoxingehalt haben auch BASERL & SCHMIDT-LORENZ (1981) festgestellt. Entscheidender als die bloße Keimzahl sind die spezifischen Aflatoxinbildungspotentiale der einzelnen *A. flavus*-Stämme, die Mikroklimate und Nährstoffversorgung der Aflatoxinbildner sowie die Konkurrenzbedingungen zu anderen Mikroorganismen.

Eine Aflatoxinvermeidung oder Reduzierung durch die Konkurrenz von *A. niger* konnte im Gegensatz zu AZIZ & SHAHIN (1997) FARAJ et al. (1993) und WICKLOW et al. (1987) nicht bestätigt werden.

6. Gesamtbetrachtung der Aflatoxinproblematik von *C. senna* in Indien

Von den pharmakologisch verwerteten Bestandteilen der *C. senna* werden fast ausschließlich nur in den Früchten Aflatoxine nachgewiesen (Kapitel 5.1.3.1.). Blätter der *C. senna* haben selbst bei hoher Infektion mit *A. flavus* kaum nachweisbare Aflatoxinkonzentrationen (Kapitel 5.1.3.2.). Sennesprodukte der Firma *roha arzneimittel* wurden von Früchten auf Blätter der *C. senna angustifolia* umgestellt. Insgesammt stellen die Früchte der *C. senna* jedoch im Vergleich zu klassischen anderen aflatoxinhaltigen Früchten wie Erdnüssen oder Mais ein für die Aflatoxinbildung weniger geeignetes Substrat dar. Die Konzentrationen in indischer Handelsware der *C. senna* fructus liegen überwiegend im unteren bis mittleren µg/kg-Bereich (Abb. 34). Etwa 25 % der 257 untersuchten Proben indischer Handelsware entsprachen der strengen europäischen Aflatoxin-Qualitätsanforderungen. 75 % der Proben hatten Aflatoxinbelastungen von weniger als 11 µg/kg (Σ B1, B2, G1, G2). Die Maximalkonzentration in indischer Handelsware betrug 82 µg/kg Aflatoxine (Abb. 34).

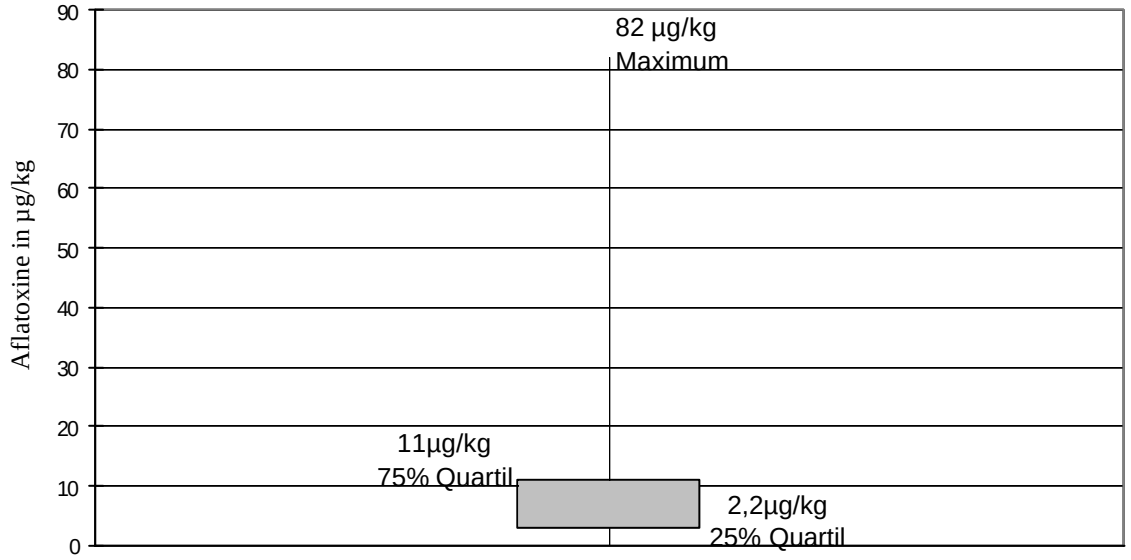


Abb. 34: *Box Whisker Plot mit Maxima, Quartilen und Minima für Aflatoxinvorkommen (S B_1, B_2, G_1, G_2) in n = 257 Proben indischer Handelsware C. senna fructus*

Die Verteilung der Aflatoxine ist generell sehr inhomogen. Zum einen gibt es große standort- und saisonalbedingte Unterschiede in der Aflatoxinbelastung von Sennesfrüchten. So variierten in Frischmaterial unterschiedlicher Standorte und Erntezeitpunkten südindischer Bauern

die gefundenen Aflatoxinkonzentrationen zwischen 0 und 255 µg/kg Aflatoxine (Kapitel. 5.2.3.). Noch größere Unterschiede der Aflatoxinkonzentrationen bestanden hingegen in den einzelnen Früchten einer belasteten Probe. In einzelnen Früchten waren Aflatoxinkonzentrationen bis zu 16.800 µg/kg Aflatoxin (Σ B1, B2, G1, G2) möglich (Kapitel 5.5.3). Innerhalb einer normal belasteten Probe waren jedoch immer nur wenige Früchte aflatoxinhaltig, der überwiegende Anteil der Früchte war vollkommen aflatoxinfrei (Kapitel 5.1.3.5.). Die Aflatoxine in den belasteten Früchten konzentrierten sich vor allem in den Samen- und Epidermisanteilen (Kapitel 5.1.3.7.).

Beschädigungen durch Insekten sind keine zwingende Vorraussetzung für die Bildung von Aflatoxinen in *C. senna*. Dennoch sind sie ein bedeutsamer Wegbereiter für *A. flavus*-Infektionen mit Aflatoxinbildung. Der Anteil von beschädigten Früchten in der Frischware hatte signifikante Auswirkungen auf die Aflatoxingehalte (Kapitel 5.1.3.3 und 5.2.3). Die Schädigungen wurden hauptsächlich durch den in Indien auf dem Feld auftretenden Fruchtschädling *Epestia elutella* verursacht. Der Anteil an von Insekten beschädigter Früchte der *C. senna* ist allerdings in der Regel nur sehr gering (Abb. 35).

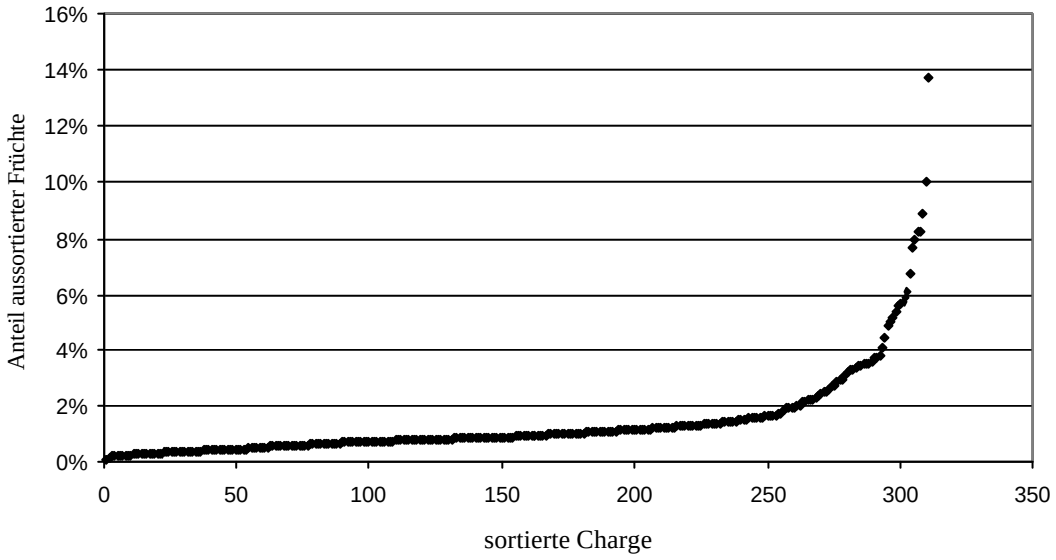


***Abb. 35**: Anteil Aufgrund von Insektenschäden aussortierten frischen Früchten der C. senna in 311 südindischen Chargen mehrerer Anbaujahre auf dem Sortier- und Trocknungsplatz in Tuticorin*

In 262 oder 84 % der Chargen lag der Anteil aussortierter Früchte bei weniger als 2 %. Nur in 14 oder 5 % der Chargen wurden mehr als 5 % der Früchte aufgrund von Insektenbeschädigingen aussortiert (Abb. 35).

Es ist also festzustellen, dass der Anteil insektenbeschädigter Früchte im südindischen Senna-Anbau in der Regel so gering ist, dass eine generelle Schädlingsbekämpfung zur Vermeidung von Aflatoxinkontaminationen wenig erfolgversprechend ist. Dies belegen auch die durchgeführten Feldversuche (Kapitel 5.4.). Die Vermeidung von Trockenstress mittels Bewässerung alleine führte zu keiner Dezimierung der Aflatoxinkonzentrationen. Auf den bewässerten Flächen traten vermehrt die als Wegbereiter für *A. flavus* bedeutsamen Insektenbeschädigungen auf. Die Behandlung mit dem Neem – Präparat (NeemAzal T/S®) führte ebensowenig zu der gewünschten Vermeidung von Aflatoxinen.

Insgesamt stellt die Aflatoxinkontrolle vor der Ernte ein komplexes Problem dar, bei dem das Zusammenspiel von Pflanze, Pilz, Insekten und abiotischen Faktoren zu berücksichtigen ist. Da ein nicht unbedeutender Teil der Aflatoxine in *C. senna* schon auf dem Feld im wachsenden Bestand gebildet und dort Grundlagen für weitere Aflatoxinbildung nach der Ernte geschaffen werden, ist es von großer Wichtigkeit, Maßnahmen zu ergreifen, die die Infektionen mit aflatoxinbildenen Pilzen auf dem Feld vermeiden.

Weiterzuführende oder noch zu untersuchende Ansätze zur Vermeidung der Aflatoxinbildung vor der Ernte sind:

- Züchtung resistenter Sorten (Kapitel 5.8)
- Entwicklung spezifischer fungizider Wirkstoffe
- Entwicklung Aflatoxinsynthese hemmender Wirkstoffe (Kapitel 5.4. und 5.5.)
- Verdrängung aflatoxinbildender *A. flavus*-Pilzen durch Ausbringung atoxigener *A. flavus* Pilze (BROWN & COTTY 1991, COTTY 1994)

Die Trocknung ist ein entscheidender Faktor für den Aflatoxingehalt in Sennesfrüchten. Ein Großteil der in Indien nachgewiesenen Aflatoxinen in *C. senna* fructus wurde während der Trocknung der Früchte gebildet (Kapitel 5.5.). Durch Verbesserung des Trocknungsverfahren konnte die Aflatoxinkonzentrationen gesenkt werden. Die kontrollierte Trocknung auf dem Sortier- und Trocknungsplatz in Tuticorin, bei der im Gegensatz zu der Trocknung in den Dörfern eine vollständige und schnelle Trocknung auf Restfeuchten > 10 % gewährleistet war, führte zu einer deutlichen Reduzierung der Aflatoxinkonzentrationen gegenüber der herkömmlichen Ware der Region des gleichen Zeitraumes (Abb. 36).

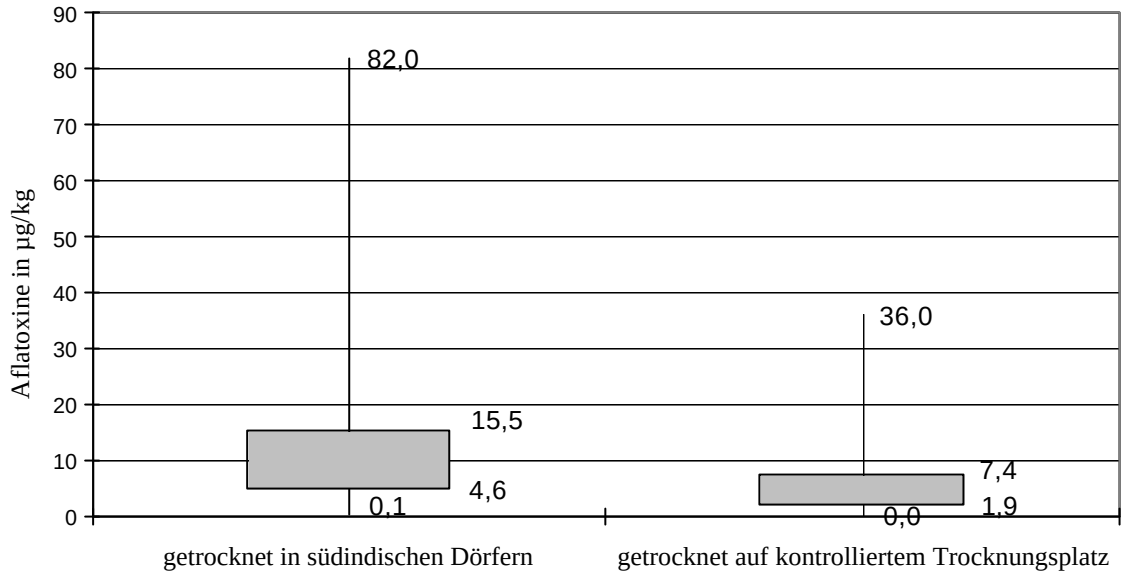


Abb. 36: *Box Whisker Plot mit Maxima, Quartilen und Minima für Aflatoxinvorkommen (S B_1, B_2, G_1, G_2) in südindischen Dörfern der Region getrockneten (n = 82), sowie auf dem Sortier und Trocknungsplatz in Tuticorin (n = 84) getrockneten Früchten der C. senna*

Durch die kontrollierte Trocknung auf dem Trocknungsplatz in Tuticorin (siehe auch Kapitel 5.5.) konnten die Aflatoxinkonzentrationen auf mehr als die Hälfte reduziert werden. Bei den kontrolliert getrockneten Früchten liegen sowohl das Maximum als auch das 75 % und 25 %-Quartil um jeweils mehr als die Hälfte unterhalb des zum gleichen Zeitraum in den Dörfern der Region getrockneten Proben. Von den auf dem Trocknungsplatz produzierten Chargen entsprachen 40 % den europäischen Aflatoxinrichtlinien, während es bei den in den Dörfern getrockneten Chargen des gleichen Zeitraumes nur 17 % waren. Die kontrollierte Bodentrocknung führt zwar zu einer Reduzierung der Aflatoxinbildung während der Trocknung, jedoch war diese Reduktion alleine nicht ausreichend, um eine vollständige Unbedenklichkeit und Gewährleistung europäischer Qualitätsstandards zu gewährleisten. Aus diesem Grund wurde das Trocknungsverfahren mittels des Hohenheimer Solartrockners, mit dem die Trocknungszeit nochmals von drei auf einen Tag verkürzt werden konnte, weiter verbessert (Kapitel 5.5.3.). Durch die Trocknung mit dem Hohenheimer Solartrockner konnte die Aflatoxinbildung während der Trocknung noch einmal um etwa die Hälfte der kontrollierten Trocknung reduziert werden. Eine komplette Unterdrückung der Aflatoxinsynthese während der Trocknung ist jedoch auch mit diesem Trocknungsverfahren noch nicht erreicht.

Die mycologischen Untersuchungen von Pilzkeimzahlen haben die Vorteile einer guten Trocknung von *C. senna* belegen können. Die schnellere Sonnentrocknung führte zu einer geringeren Anzahl keimender Pilzsporen, die Schattentrocknung zu einer höheren Anzahl Pilzsporen. Die Reduktion der Pilzsporen wirkte sich auf die dominierenden Pilze der Gattung *Aspergillus* stärker aus als auf andere Pilzgattungen. Die Untersuchungen konnten die große Bedeutung der spezifischen Aflatoxinbildungspotenziale einzelner *Aspergillus flavus*-Stämmen sowie deren Konkurrenzbedingungen zu anderen Mikroorganismen belegen. So bedeutete eine geringe Sporenanzahl von *A. flavus* nicht zwangsläufig eine geringe Aflatoxinbelastung.

Die Lagerung von *C. senna* in Indien findet in der Regel unter Bedingungen statt, die weitere mikrobiologische Aktivität nicht ausschließen können. Die Lagertemperatur lag in den meisten Fällen sehr hoch, und zwar bei Werten um 30 °C. In den südindischen Lagerhäusern ist zusätzlich die Luftfeuchtigkeit so hoch, dass eine Wiederbefeuchtung selbst von ausreichend getrockneten Früchten über kritische a_w-Werte nicht auszuschließen ist. Die Konstruktion der meisten Lagerräume kann Wasserschäden während der Regenzeit nicht ausschließen. Dies erklärt, warum während der Lagerung von *C. senna* in Indien sowohl Zu- als auch Abnahmen der Aflatoxingehalte in den Früchten festgestellt wurden. Auffällig war, dass in gelagerter Ware der *C. senna* fructus die Abnahmen der Aflatoxingehalte gegenüber den Zunahmen den überwiegen (Kapitel 5.6.). Es ist somit anzunehmen, dass einmal getrocknete *C. senna* fructus Eigenschaften besitz, die die Aflatoxinbildung unterdrücken. Mikrobiologische und biochemische Untersuchungen zu diesem Sachverhalt stehen noch aus.

Durch die großräumig angelegte und mehrjährig durchgeführte Untersuchung konnten sowohl regionale als auch saisonale Unterschiede der Anbau- und Verarbeitungsbedingungen mit Auswirkungen auf die Aflatoxinbildung in *C. senna* festgestellt werden (Kapitel 5.7). Die wichtigsten Unterschiede sind in Tab. 27 zusammengefasst.

Tab. 27: *Regionale und saisonale Unterschiede des Anbaus von C. senna in Indien*

	Tamilnadu	**Gujarat**
Anbau	einjährig	mehrjährig
Ernte	nur Früchte oder Blätter	gesamte oberirdische Pflanze
Trocknung	Früchte und Blätter getrennt	ganze Strauchteile
Klima		
Regenzeit	Oktober – Dezember	Juli – August
Temperaturen	ganzjährig Temperaturen um 30 °C	Kühle Wintermonate, Nachttemperaturen < 10 °C, sehr heiße Sommer > 40 °C
Luftfeuchtigkeit	ständig hoch > 70 %	in Trockenzeit < 50 %
Aflatoxine		
hohes Aflatoxinpotenzial	Juni – September (Pflanzen unter Trockenstress bei hoher Luftfeuchtigkeit)	Juli – September (überreife Pflanzen bei hoher Luftfeuchtigkeit)
geringes Aflatoxinpotenzial	Februar – April (juvenile Pflanzen ohne Trockenstress)	Dezember – April (kühle Temperaturen und geringe Luftfeuchtigkeit)

Die in Gujarat praktizierte Ernte der ganzen überirdischen Pflanze und nachfolgender Trocknung ganzer Strauchteile erwies sich als Vorteil bezüglich der Aflatoxinbildung in *C. senna* (Kap. 5.7.). Weitgehende Aflatoxinfreiheit konnte in Gujarat jedoch nur bei saisonal vorkommender geringer Luftfeuchtigkeit und niedrigeren Temperaturen erreicht werden.

In Tamilnadu war die erste Ernte der Sennespflanzen am geringsten mit Aflatoxinen belastet, selbst wenn die Trocknungsbedingungen teilweise weniger gut waren als bei den späteren Ernten. Bei der ersten Ernte handelt es sich dort um junge, vitale Pflanzen, die noch nicht durch vorherige Blatternten allgemein geschwächt wurden und in der Regel noch mit ausreichend Bodenfeuchtigkeit versorgt sind. Dies führt zu einer geringeren Aflatoxinbildung vor der Ernte, die bei guter Trocknung erhalten bleibt.

Die Konzentrierung der Fruchternten auf die klimatisch und anbaubedingt bevorzugten Ernteperioden der einzelnen Anbaugebiete ist eine kostensparende Methode der Erzeugung europäischer Qualitätsstandards entsprechender *C. senna* fructus. Der Versuch, den Anbau von Senna auch im Bundesstaat Rajasthan zu etablieren, könnte sich aufgrund ähnlicher klimatischer Bedingungen und Anbautechniken wie in Gujarat (Kutch) vorteilhaft auf das Aflatoxinvorkommen in indischen Sennesfrüchten auswirken. Der Nachteil dieser Methode besteht jedoch

darin, dass nur ein Teil der Gesamternte den Qualitätsmaßstäben entspricht, die ständig überwacht werden muß. Aus diesem Grund ist es wichtig, Verfahren zur Vermeidung und Reduzierung von Aflatoxinen in *C. senna* fructus weiter zu entwickeln.

Die Vermeidung der Aflatoxinbildung vor und nach der Ernte durch Neem – Präparate und der Vermeidung von zu großer Trockenheit vor der Ernte mittels Bewässerung hat nicht zu den erhofften Ergebnissen geführt. Einen vielversprechenden Ansatz zur Reduzierung der Aflatoxine vor der Ernte lieferte hingegen der Versuch mit afrikanischer *C. senna acutifolia* (Kapitel 4.10). Diese Pflanze, mit weitgehend gleichen pharmakologischen Wirkstoffen, besitzt eine genetisch bedingte erhöhte Resistenz gegen Pilzinfektionen. Es steht noch aus, die Ursachen dieser Resistenz zu klären und die positiven Eigenschaften auf indische *C. senna angustifolia* zu übertragen.

Die Aflatoxinbildung nach der Ernte konnte durch Verbesserungen der Trocknungsverfahren deutlich reduziert werden. Um die Aflatoxinbildung nach der Ernte vollständig zu verhindern müssen jedoch noch weitere Maßnahmen folgen. Diese könnten sein, dass frisches Erntegut nur noch Temperaturen ausgesetzt wird, bei der keine Aflatoxinbildung mehr möglich ist, also Temperaturen von entweder < 10 °C oder > 45 °C. Mittels der Trocknung im Hohenheimer Solartrockner war dies erst 24 Stunden nach der Ernte der Fall. Der Vorteil einer solchen Methode gegenüber der Applizierung fungizider Wirkstoffe besteht in der Vermeidung von Rückstandsproblematiken.

Solange die Aflatoxinbildung nicht vollständig verhindert werden kann, sind Detoxifizierungsverfahren häufig die einzige Möglichkeit, strenge Qualitätsstandards für Aflatoxine einhalten zu können. Eine zumindest partielle Methode der Detoxifizierung von Aflatoxinen in *C. senna* war häufig durch einfache Lagerung in ungepresster Form gegeben. Im Gegensatz zu vielen anderen Früchten wurden in *C. senna* bei der Lagerung in Indien (Kapitel 5.6.) vermehrt Aflatoxine abgebaut. Diese Art der Detoxifizierung ist jedoch sehr unsicher und führt zudem zu generellem Qualitätsverlust der sensorischen Eigenschaften der Ware. Da bei dieser Methode auch andere nachteilige mikrobiologische Aktivitäten nicht auszuschließen sind, ist von dieser Methode der Detoxifizierung abzusehen.

Der Umstand, dass die Aflatoxine sehr ungleich in belasteter Ware verteilt sind und immer nur sehr wenige Früchte aflatoxinhaltig sind, macht Sortierungsverfahren zur Detoxifizierung möglich. Die Sortierung von frischen Früchten hat den Vorteil, dass Früchte mit erhöhtem Aflatoxinpotenzial, wie die von Insekten beschädigten oder überreifen Früchte, leichter visuell erkennbar sind. Der Nachteil der Sortierung frischer Früchte besteht jedoch darin, dass der

Trocknungsprozess durch die Sortierung verzögert wird, was zu mikrobiologisch verursachten Qualitätsminderungen führt. Optimal wäre eine hoch selektive Sortierung der wenigen aflatoxinhaltigen Früchte nach einer bestmöglichen Trocknung. Durch eine Detoxifizierung durch Selektion gegenüber chemischen oder physikalischen Verfahren wird die Qualität der Ware nicht nachteilig beeinflusst. Geeignete Selektierkriterien und -methoden zur Aflatoxinreduktion von getrockneter *C. senna* fructus müssen jedoch noch gefunden werden.

7. Zusammenfassung

Die Arzneipflanze *Cassia senna* L. ist aufgrund der verlässlichen Wirkung und der guten Verträglichkeit eines der meistgenutzten pflanzlichen Laxanzien mit einer weltweit steigenden Nachfrage. Indien ist seit vielen Jahrzehnten das wichtigste Anbau- und Exportland dieser Pflanze. Da *C. senna* keine hohen Ansprüche an Bodenqualität stellt und zusätzlich sehr trockenheits- und salzresistent ist, kann sie auf Standorten produziert werden, die für die Produktion von Nahrungsmitteln nicht geeignet sind. Aus diesem Grunde erfolgt der Anbau in Indien sowohl in der besonders trockenen südöstlichen Region des indischen Bundesstaates Tamilnadu, als auch auf der Halbinsel Kutch im nördlich gelegenen Bundesstaat Gujarat. Für dort ansässige Bauern ist *C. senna* eine wichtige Einkommensquelle, vor allem in den Trockenperioden. In jüngster Vergangenheit gab es Exportschwierigkeiten von indischen Sennesfrüchten vor allem nach Europa aufgrund von Kontaminationen mit Aflatoxinen. Aflatoxine sind hochgiftige Mykotoxine, die hauptsächlich von den Pilzen *Aspergillus flavus* und *Aspergillus parasiticus* gebildet werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde das Vorkommen von Aflatoxinen in der Arzneipflanze *C. senna* in Indien untersucht. Es wurden Konzepte zur Vermeidung von Aflatoxinen in *C. senna* vorgestellt, mit dem Ziel der Einhaltung europäischer Qualitätsstandards. Dazu wurden Feld-, Trocknungs- und Lagerungsversuche durchgeführt. Insekten, die in *Cassia senna* Aflatoxinbelastungen auslösen können wurden bestimmt und deren Bekämpfungsmöglichkeiten überprüft. In pulverisierten Proben wurden Pilzkeimzahlen in Abhängigkeit zur Aflatoxinbelastung untersucht. Die Konzentrationsbestimmung von Aflatoxinen in ca. 1000 Proben erfolgte durch eine HPLC-Methode mit vorheriger Anreicherung über Immunoaffinitätssäulen und einer Detektion nach Derivatisierung mittels *KOBRA*-Zelle und Fluoreszenzmessung.

Die Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen:

<u>Aflatoxine in *C. senna:*</u>

Mit der angewandten HPLC - Methode konnten AFB_1, AFB_2, AFG_1 und AFG_2 nachgewiesen werden. Der weit überwiegende Teil der Aflatoxine bestand aus Aflatoxin B_1. Die anderen Aflatoxine wurden, wenn überhaupt, in abnehmender Reihenfolge AFB_2, AFG_1 und AFG_2 nur in unbedeutenden Konzentrationen nachgewiesen.

<u>Vorwiegend betroffene Pflanzenbestandteile</u>

Grenzwertüberschreitende Aflatoxinbelastungen indischer Handelsware betrafen ausschließlich *C. senna* fructus. Blattdrogen der Pflanze waren weitgehend frei von Afla-

toxinen. In einem Laborversuch erwiesen sich die Blätter als ein Substrat mit 100fach geringerem Aflatoxinbildungspotentzial als die Früchte indischer *C. senna*. In belasteten Proben wurden Aflatoxine nur in ca. 1% der untersuchten Früchte nachgewiesen. Der überwiegende Teil der Früchte, auch bei hoch belasteten Chargen, war frei von Aflatoxinen. Innerhalb der Früchte befinden sich die Aflatoxine vor allem in den Samen- sowie den Epidermisanteilen des Perikarps.

Merkmale aflatoxinbelasteter Früchte:

Schädlinge können die pflanzeneigene Abwehr gegen Pilzinfektionen schwächen und fungieren als Vektoren. So wurden Fraßschäden in frischen Früchten durch Larven des entdeckten Sennes-Schädlinges *Ephestia elutella* (Hübner) (Lepidoptera; Pyralidae) als ein Indiz für mögliche Aflatoxinbelastungen ermittelt. In 65 untersuchten Proben konnte der Aflatoxingehalt zu ca. 50 % auf den Anteil der von diesem Insekt beschädigten Früchte zurückgeführt werden. Ein weiteres Merkmal war der Reifegrad. Überreife Früchte zeigten bei Feldsammlungen eine erhöhte Aflatoxinbelastung. In getrockneten Früchten konnten noch keine geeigneten Kriterien gefunden werden, die auf Aflatoxinbelastungen hindeuten.

Die Aflatoxinbildung vor der Ernte:

Die Aflatoxinbelastungen in Frischware betrugen zwischen nicht nachweisbar und 255 µg/kg. Von 65 Proben waren 55 % mit weniger als 2 µg/kg und 25 % der Proben waren mit mehr als 10 µg/kg Aflatoxinen belastet. Etwa die Hälfte der südindischen Fruchternte von *C. senna* überschreitet europäische Aflatoxingrenzwerte schon vor der Ernte.

Behandlung von *C. senna* fructus mit Neem – Präparaten:

In Petrischalenversuchen erwies sich NeemAzal T/S® als wirksames Präparat für die Bekämpfung der Larven des Schädling *Ephestia elutella*. In Feldversuchen konnte die Wirkung von NeemAzal T/S® auf den Schädling redoch nicht mehr nachgewiesen werden. Der Anteil Früchte, die aufgrund deutlicher Fraßschäden manuell ausselektiert werden konnten, lag im südindischen Anbau in der Regel bei weniger als 2 %.

In Laborversuchen bewirkten Neem – Präparate eine Verminderung der Aflatoxinsynthese von *A. flavus*. Die Reduzierung der Aflatoxinbildung war bei Neemblatt-Wasser-Extrakt stärker als bei NeemAzal T/S® ausgeprägt. Die verwendeten Neem – Präparate konnten jedoch die Aflatoxinsynthese nicht unter kritische Werte drücken.

In Feldversuchen waren die Auswirkungen von NeemAzal T/S® auf die Aflatoxinsynthese nicht mehr nachweisbar.

Einfluss der Trocknung auf die Aflatoxinkontamination:

Es wurde festgestellt, dass sich bei der Trocknung die Aflatoxinkonzentrationen in der Regel mehr als verdoppeln. Bei gering belastetem Ausgangsmaterial und schlechtem Trocknungsverfahren stieg die Aflatoxinkonzentrationen während der Trocknung um ein Vielfaches. Die Trocknungsbedingungen waren wesentlicher Faktor der Aflatoxinbildung. Die meisten Aflatoxine wurden bei der Trocknung im Schatten gebildet, gefolgt von der Trocknung in den Dörfern und der kontrollierten Sonnentrocknung. Am geringsten war die Aflatoxinbildung während der Trocknung im Hohenheimer Solartrockner.

Einfluss der Lagerung auf den Aflatoxingehalt:

In 33 mehrfach untersuchten Chargen wurden nach einer mindestens vierwöchigen Lagerung in Indien doppelt so häufig Konzentrationsabnahmen wie Konzentrationszunahmen festgestellt. *C. senna* unterscheidet sich so von vielen anderen Früchten mit Aflatoxinproblemen, bei denen unter vergleichbaren Lagerungsbedingungen die Konzentrationen eher zunehmen. Es ist anzunehmen, dass bei der Trocknung von *C. senna* Stoffe gebildet werden, die die Aflatoxinbildung von *A. flavus* erschweren.

Regionale und saisonale Unterschiede:

Es wurde kontinuierlich Ware aus den beiden Hauptanbaugebiete in Tamilnadu und in Gujarat (Kutch) über mehrere Jahre untersucht. Sennesfrüchte aus Gujarat waren weniger belastet als Früchte aus Tamilnadu. In Tamilnadu waren 23 % von 83 Proben mit weniger als 4 µg/kg belastetet, in Gujarat waren es 54 % von 74 Proben. Proben mit mehr als 10 µg/kg kamen in Tamilnadu (43 %) häufiger als in Gujarat (26 %) vor. Geringe Aflatoxinbelastungen wurden in Tamilnadu in erster Line bei der ersten Ernte erzielt. In Gujarat waren vor allem die Ernten in den kühleren und durch geringe Luftfeuchtigkeit ausgezeichneten Wintermonaten kaum aflatoxinbelastet. Neben den klimatischen Unterschieden hatte auch die in Gujarat praktizierte Ernte und Trocknung ganzer Strauchteile Vorteile bezüglich der Aflatoxinbildung gegenüber der in Tamilnadu praktizierten getrennten Frucht- und Blatternte.

Herkunftspezifischen Unterschiede:

Es wurden aus dem Sudan stammendes Saatgut der *C. senna acutifolia* in Indien kultiviert und Unterschiede bezüglich der Pilzresistenz und Aflatoxinbildung gegenüber

indischer *C. senna angustifolia* ermittelt. In Indien geerntete Früchte afrikanischen Saatguts zeigten bei der Bebrütung in Petrischalen deutlich geringeren Pilzbefall und geringere Aflatoxinbelastungen. Die Maximalkonzentration betrug 35,2 µg/kg gegenüber 2.503,4 µg/kg in Früchten indischen Saatguts.

In drei Feldversuchen mit Saatgut beider Herkünfte in Indien betrug die Maximalkonzentration 15,7 µg/kg in *C. senna angustifolia* gegenüber 6,9 µg/kg in Früchten der *C. senna acutifolia*. Pflanzen des afrikanischen Saatguts hatten unter südindischen Wachstumsbedingungen jedoch eine deutlich reduzierte Blüteninduktion und Fruchtbildung gegenüber den Pflanzen aus lokalem Saatgut.

Zusammenhänge zwischen Pilzkeimzahlen und Aflatoxinkonzentrationen:

In 52 Probenpulvern aus Sonnen- und Schattentrocknung mit Aflatoxinbelastungen zwischen 0,4 µg/kg bis 177,5 µg/kg wurden Pilzkeimzahlen von 14.000 bis 1.585.000/g ermittelt. Die Pilzkeimzahlen in schattengetrockneten Proben waren in der Regel höher als in sonnengetrockneten Proben. Die Gattung *Aspergillus* dominierte in allen untersuchten Proben. Dabei überwogen keimbildende Sporen von *Aspergillus niger* (ca. 60 %) die der *Aspergillus flavus*-Gruppe (ca. 20 %). Pilze, die nicht zur Gattung *Aspergillus* zählen, wie *Mucor, Penicillium, Rhizopus* und Hefen, waren mit insgesamt ca. 20 % deutlich geringer vertreten. Es gab signifikante Korrelationen zwischen Aflatoxinkonzentrationen und der Anzahl gekeimter Pilzsporen. Die Korrelation zwischen Pilzkeimzahlen von *A. flavus* und Aflatoxinkonzentrationen in sonnengetrockneten Proben betrug r = 0,81. Die Komplexität von unterschiedlichen Aflatoxinbildungspotenzialen einzelner Pilzstämme und deren spezifischen Wachstums- und Konkurrenzbedingungen wurde deutlich, indem auch bei sehr geringer Keimzahl von *A .flavus* hohe Aflatoxinbelastungen auftreten konnten. Es konnte kein Pilz identifiziert werden, der eine signifikante Reduktion von Aflatoxinen bewirkte.

Um die Produktion von *C. senna* fructus in Indien gemäß europäischer Qualitätsrichtlinien weiterhin zu gewährleisten und ggf. mengenmäßig auszubauen, müssen Konzepte zur Vermeidung der Aflatoxinbildung vor der Ernte und während der Trocknung weiter betrieben und weiter entwickelt werden bzw. effektive Detoxifizierungverfahren gefunden werden.

Schwerpunkte zukünftiger Arbeiten sollten sein:

- Die Übertragung der positiven Eigenschaften von *C. senna acutifolia* afrikanischer Herkunft auf indische *C. senna angustifolia* mit Beibehaltung oder Erhöhung des Ertragspotenzials;
- Die Entwicklung geeigneter Selektierverfahren zur Detoxifizierung;
- Die weitere Verbesserung der Nacherntekonzepte;
- Die Vermeidung von Aflatoxinen durch Verdrängung aflatoxinproduzierender Pilze mittels atoxigener Pilzstämme;
- Die Vermeidung von Aflatoxinen mit Hilfe von fungizieden Substanzen, die Entwicklung oder Toxinproduktion toxigener Pilze unterbinden.

8. Summary

Studies on occurrence and avoidance of aflatoxin and insect damage in *Cassia senna* L. in India

Senna (*Cassia senna* L., *Caesalpiniaceae*) is known since centuries as a highly effective and safe laxative. It is worldwide one of the most important medicinal plants with a rising demand. India is for many decades the most important country for cultivation and export of this plant with third highest export volume after *Papaver somniferum* L. and *Plantago psyllium* L.. Since *C. senna* is adapted to drought and saline conditions and does not require high soil quality, it is usually produced at locations, which are not suitable for production of food crops. In India most of the cultivation of *C. senna* is done in the particularly dry south-eastern region (Federal State of Tamilnadu) and on the peninsula Kutch in Federal State of Gujarat. Attempts are undertaken to establish the production of senna also in desert areas of Rajasthan. For farmer *C. senna* is an important source of income, especially during dry seasons. Recently, the export of senna pods, especially into European markets, has been seriously affected by aflatoxin problems. Aflatoxins are highly toxic substances produced of the fungi *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus*.

The following study was undertaken to collect data on the occurrence of aflatoxins and to develop an appropriate production method in order to meet European quality standards in Indian senna production. In a five year study samples of senna production from two main regions of cultivation (Tamilnadu, Gujarat/Kutch) have been taken continuously, and special laboratory test, drying and field trials where undertaken. More than 1000 samples have been analysed for aflatoxin content by HLPC method with previous enrichment of toxins by immuno-affinity-colums and detection after derivatisation in *KOBRA*-cell.

In particular the main objectives of this study were:

- to identify which parts of the plant are contaminated with aflatoxin,
- to see if there are visible characteristics of an aflatoxin contamination,
- to determine the pre-harvest aflatoxin production,
- to assess the impact of insect pests on aflatoxin content,
- to study the effect of neem applications on *Ephestia elutella* (Lepidoptera; Pyralidae) and on aflatoxin production,

- to determine the influence of various drying procedures on aflatoxin content,
- to determine the impact of different storage methods on the aflatoxin production,
- to identify seasonal and regional differences of aflatoxin production,
- to identify resistances in different varieties of *C. senna* to fungus infections,
- to find correlations between fungus counts and amount of aflatoxin produced

The results can bee summarised as follows:

Aflatoxine in *C senna*:

With the applied HPLC-method AFB1, AFB2, AFG1 and AFG2 were identified. The far outweighing part of aflatoxin consisted of the highly toxic AFB_1. The other toxins AFB_2, AFG_1 and AFG_2 were only found at minor concentrations.

Contaminated parts of the plant:

Only in fruits of *C. senna* aflatoxin concentrations were found to exceed critical limits. In contrast, leaves of Indian *C. senna* were to a large extent free of aflatoxin. If found, concentrations were 100 times less than in pods.

Usually, within a sample only a few fruits (approx. <1%) contained aflatoxins. Most of the aflatoxin load came from even less fruits with very high contamination. Within the fruits aflatoxins were concentrated mainly in the seeds and in the epidermis.

Visible characteristics of an aflatoxin contamination:

Visible characteristics of an aflatoxin contamination has been found in fresh fruits damaged by larvae of the insect *Ephestia elutella* (Huebner) (Lepidoptera; Pyralidae). In 65 examined samples the aflatoxin content could lead back too approx. 50 % on the portion of fruits that damaged by this insect. The insect weaken the resistance of the plants against fungi and can act as a vector of aflatoxigenic fungi. In single pod that had been damaged by *Ephestia elutella* aflatoxin up to 3,375 µg/kg was detected. A further characteristic of aflatoxin concentration of pods before harvest was the status of maturity. Overripe fruits from field collections mostly showed increased aflatoxin content. In dried fruits still no suitable criteria was found, which point to aflatoxin.

Pre-harvest aflatoxin production:

In 65 fresh samples of senna pods, collected in Tamilnadu at different times of seasons during several years, the content of aflatoxins varied between not detectable and 255 µg/kg. 55 % of the samples were loaded with less as 2 µg/kg and 25 % of samples loaded with more than 10 µg/kg aflatoxin. More than half of south-Indian senna production exceeded European aflatoxin limits already before harvest.

Effect of neem treatments:

NeemAzal T/S® has proven to be effective against *Ephestia elutella* in petridishes. In field trails NeemAzal T/S® treatment did not lead to a detectable reduction of insect damages. Visual detectable infestation by *Ephestia elutella* in south Indian senna was usually found in less than 2 % of fruits.

Neem preparations where reducing aflatoxin formation by *Aspergillus* strains under laboratory conditions. Neem-leaf-water-extract was more effective than NeemAzal T/S®. The reduction of aflatoxin produktion did not reach critical limits and was not detectable in field trails.

Influences of the drying procedure:

The production of aflatoxins was studied in drying processes in villages and under controlled condition on an own drying place, as well as drying by the Hohenheim solar dryer. During the process of drying large amounts of aflatoxins were produced. Under normal conditions, concentrations of aflatoxin doubled during process of drying. Bad drying procedure like shade drying or drying in to big heaps allowed aflatoxin concentrations to multiple during the process of drying. Aflatoxin formation had been highest in shade drying, followed by drying in villages and controlled sun-drying. Drying with the Hohenheim solar dryer led to the lowest aflatoxin production during drying.

Influences of storage:

Concerning the aflatoxin development during storage, *C. senna* differs from many other fruit having aflatoxin problems. The storage of *C. senna* pods in India led more frequently to decreases than to increases of aflatoxin contaminations. In 33 lots examined several times there as been twice as much decreases of aflatoxin than increases after a minimum of four week storage. It is accepted that during the drying process of *C senna*, chemicals are formed that avoid or make the synthesis of aflatoxin for toxigenic strains of *A. flavus* more difficult. Biochemical bases of this phenomenon is not clear.

Regional and seasonal differences:

The observation of the two main cultivation areas in Tamilandu and in Gujarat (Kutch) over several years lead to the result that the area of Gujarat (Kutch) is less affected by aflatoxin than the area in Tamilnadu. In Tamilnadu, only 23 % of 83 samples had less than 4 µg/kg aflatoxins whereas in Gujarat this were 54 % of 74 samples. Samples with aflatoxin loads above 10 µg/kg had been in Tamilnadu 43% and in Gujarat only 26%. Variances can bee explained by different method of cultivation and diverse climatic conditions. Harvesting and drying of senna in whole branches like in Gujarat leads to lower aflatoxin production in pods than the separate harvest of leaves and pods, as it is practiced in Tamilnadu. In winter and spring season in Gujarat low humidity (< 50 %) and cool temperatures (< 20 °C) nearly inhibit aflatoxin production during that period. Highest aflatoxin contaminations occurred during summer season in Tamilnadu, where drought conditions occur combined with high humidity of the air (> 70 %) and temperatures above 25 °C.

Differences between *C. s. angustifolia* and *C. s. acutifolia*:

Fruits of senna plants from seeds of Sudanese origin, *C. s. acutifolia* harvested in India, showed in petridishes clearly a lower fungal attack than pods of *C. s. angustifolia*. Also aflatoxin concentrations were far lower in those pods. The maximum concentration in *C. s. acutifolia* from petridishes has been 35.2 µg/kg where as 2,503.4 µg/kg in *C. s. angustifolia* .

In three field tests in south India with both varieties the maximum aflatoxin concentration in pods had been 6.9 µg/kg in *C. s. acutifolia* and 15.7 µg/kg in *C. s. angustifolia*. *C. s. acutifolia* of African origin had a higher resistance against aflatoxin formation but showed a clearly reduced bloom induction and fruit formation under south Indian growing conditions as compared to plants from local seeds.

Correlations between fungus counts and aflatoxin content:

52 sample powders from sun and shade drying processes and aflatoxin concentrations between 0.4 µg/kg to 177.5 µg/kg had, when cultivated on bengal-rose-agar, total fungus counts from 14,000 to 1,585,000/g. Fungus counts in shade-dried samples were usually higher than in sun-dried samples. The genus *Aspergillus* dominated in all examined samples. Germinated spores of *Aspergillus niger* had been approx. 60 %, those the *Aspergillus flavus* group approx. 20 % and others like *Mucor*, *Penicillium*, *Rhizopus* and yeasts with together approx. 20 % of all germinated spores of samples. There were significant correlations between aflatoxin concentrations and number of germinated spores. The highest correlation was observed between number of germinated *A. flavus* spores and aflatoxin content in sun-dried samples (r = 0,81). The complexity of different aflatoxin potentials of individual fungus strains and their specific

growth and competition conditions became clear by the observation, that also samples with very small number of *A flavus* spores could have high aflatoxin contaminations. No fungus could be identified which caused a significant reduction of aflatoxins.

To ensure and quantitatively improve the production of *C. senna* fructus in accordance with European quality guideline concepts of pre- and post-harvest control and effective detoxifying methods for aflatoxin has to be continued and further developed.

Emphasis of future work should be:

- development of suitable detoxifying selecting procedures,
- the further improvement of the post-harvest concepts,
- the transmission of resistance properties to fungi from *C. senna acutifolia* African origin to Indian *C. senna angustifolia* with retention or increase of yield potentials,
- avoidance of aflatoxin by displacement of aflatoxin producing fungi by means of atoxigener *A. flavus* strains or with specific fungicide substances.

9. Literaturverzeichnis

AINSWORTH, G. C.; JAMES, P. W.; HAWKSWORTH, D. L. 1971. Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi. 6th. ed. Kew, Surrey, CAB International

AL-YAHYA, M. A., MOSSA, J. S., AL-BADAR, A. A., TARIQ, M. AND AL-MESHAI, I. A. 1987. Phytochemical and Biological Studies on Saudi Medicinal Plants: Part 12. A Study on Saudi Plants of Family "Leguminosae". Int. J. Crude Drug. Res., 25: 65 – 71.

AYOUB, A. T. 1977. Some primary features of salt tolerance in senna. J. Exptl. Bot. 28. p. 484-492.

AZIZ, N. H., SHAHIN, A. A. M. 1997. Influence of other fungi on aflatoxin production by *Aspergillus flavus* in maize kernels. Journal of food safety v 17 (2) p. 113-123.

ATZRON, R., WEILER, E. W. & ZENK, M.H. 1981. Formation and Distribution of Sennosides in *Cassia senna L.*, as Determined by a Sensitive and Specific Radioimmunoassay. Journal of Medicinal Plant Research, 41. 1-14.

BANKOLE, S. A. 1997. Effect of essential oils from two Nigerian medicinal plants (*Azadirachta indica* and *Morinda lucida*) on growth and aflatoxin B1 production in maize grain by a toxigenic Aspergillus flavus. Letters in Applied Microbiology.Volume 24 Issue 3 Page 190.

BARRY, D., WIDSTROM, N. W., DARRAH, L. L., MCMILLIAN, W. W., RILEY, T. J., SCOTT, G. E., LILLEHOJ, E. B. 1992. Maize ear damage by insects in relation to genotype and aflatoxin contamination in preharvest maize grain. Journal of Economic Entomology 85:6, 2492-2495.

BASEDOW T., OSSIEWATSCH H. R., BERNAL VEGA J. A., KOLLMANN S., EL SHAFIE H. A. F., NICOL C. M. Y. 2002. Control of aphids and whiteflies (Homoptera: Aphidiae and Aleyrodidae) with different Neem preparations in laboratory, greenhouse and field: effects and limitations. Journal of Plant Diseases and Protection 109 (6), p. 612-623.

BASERL P., SCHMIDT-LORENZ W. 1981. Aspergillus flavus Kontamination von Nüssen Mandeln und Mais mit bekannten Aflatoxingehalten. Lebensmittel Wiss. Technol. 14, p 252-259.

BETT, W. R. 1952. Senna in Medicine - Past and Present. The Export Review of British Drug & Chemical Industries, 42.

BEUCHAT, L. R., ed. 1978. Food and Beverage Mycology. AVI Publishers Co, Inc., Westport.

BHAT, R. V. & MILLER, J. D., 1991: "Mycotoxins and food supply", http://www.fao.org/docrep/U3550t/u3550t0e.htm, 14.12.2001.

BHATIA, R. K. & CHAWAN, D. D. 1983. Effect of Sowing Depths on Seeding Emergence and Growth Performance in Senna. Indian Forester, p. 212-215.

BHATNAGAR, D., COTTY, P. J. AND CLEVELAND, T. E. 1993. Preharvest Aflatoxin Contamination. Molecular Strategies for Its Control. ACS-Symposium-Series (USA), 528: 272-292.

BHATNAGAR, D., MCCORMIICK, S. P. 1988. The inhibitory effect of neem (*Azadirachta indica*) leaf extracts on aflatoxin biosynthesis in *Aspergillus parasiticus*. Journal of the American Oil Chemists Society 65:7. 1166-1168.

BOL, J. & SMITH, J. E. 1989. Biotransformation of Aflatoxin. Food Biotechnology, 3(2): 127-144.

BORGEMEISTER, C., ADDA, C., DJOMAMOU, B., DEGBEY, P., AGBAKA, A., DJOSSOU, F., MEIKLE, W. G., MARKHAM, R. H. 1994. The effect of maize cob selection and the impact of field infestation on stored maize losses be the larger grain borer (Prostephanus truncatus (Horn) Col., Bostrichidae) and assorted storage pests. Proceedings of the 6th International Working Conference on stored Product Protection. pp. 906-909.

BOWEN, K. L., MACK, T. P. 1991. Lesser cornstalk borer and aflatoxins: double trouble for peanut growers. Highlights of Agricultural Research, Alabama Agricultural Experiment Station 38:4, 3.

BILGRAMI, K. S., RANJAN, K. S., SINHA, A. K. 1992. Impact of crop damage on occurrence of *Aspergillus* flavus and aflatoxin in rainy-season maize (Zea mays). Indian Journal Of Agricultural Sciences 62: 10, 704-709.

BROWN, R. L., COTTY P. J., CLEVELAND T. E. 1991. Reduction in aflatoxin content of maize by atoxigenic strains of *Aspergillus flavus* . J. Food Prot., 54, 623 626.

BRUNETON, J. 1995. Pharmacognosy, Phytochemistry, Medicinal Plants. Paris Lavoisier Publishing.

CASTOR, L. L., MIROCHA, C. J., CHANG, H. L. 1987. Aflatoxin occurrence in maize samples collected in Haitian markets. Plant Disease 71:11, 969 - 971.

CHANG, H. G., MARKAKIS, P. 1981. Effect of moisture content on aflatoxin production in barley. Cereal Chemistry, 58: 89 - 92.

COKER, R. D., JONES, B. D., NAGLER, M. J. 1984. Mycotoxin Training Manual. Tropical Development and Research Institute. 109 pp.

COTTY, P. J. 1994. Influence of field application of an atoxigenic strain of *Aspergillus flavus* on the population of *A. flavus* infecting cotton bolls and on the aflatoxin content of cottonseed. Phytopathology 84: 11, 1270-1277.

COTTY, P. J., LEE, L. S. 1989. Aflatoxin contamination of cottonseed: comparison of pink bollworm damage and undamaged bolls. Tropical Science 29: 4, 273-277.

COTTY, P. J. & D. BHATNAGAR 1994 Variability among atoxigenic Aspergillus flavus strains in ability to prevent aflatoxin contamination and production of aflatoxin biosynthetic pathway enzymes. Appl. Environ. Microbiol., 60, 2248 2251

CUERO, R. G., SMITH, J. E., LACEY, J. 1987. Interaction of water activity, temperature and substrate in mycotoxin production by *Aspergillus flavus*, *Penicillium viridicatum* and *Fusarium graminearum* in irradiated grains. Transactions of the British Mycological Society 85, 322-328.

DAVIS, N. D. 1981. Sterigmatocystin and other mycotoxins produced by Aspergillus species. J. Food Prot., 44, 711-714.

DAVIS, N. D., CURRIER, C. G., DIENER, U. L. 1986. Aflatoxin contamination of corn hybrids in Alabama. Cereal Chem. 63, 467-70.

DER MARDEROSIAN, A. (ed.).1999. The review of Natural Products. ST. Louis: Facts and Comparisons.

DHIR, R. P., JAIN, N. K. 1982. Morphology, Genesis and Classification of Red and Laterite Soils. In Review of Soil Research in India, Part II, S 498-507. 12th International Congress of Soil Science, New Delhi.

DIAMANTE, L. M. 1995. Moisture Adsorption Isotherms of Copra at Different Temperatures. Annals of Tropical Research, 17(1-4): 35-44.

DICKENS, J.W. 1986. Sampling and Detection Technique in Aflatoxin in Maize. In:Aflatoxin in Maize, CIMMYT,Lisboa, Mexico, pp.92-109.

DIENER, U. L., DAVIS, N. D. 1970. Limiting temperature and relative humidity for aflatoxin production by *Aspergillus flavus* in stored peanuts. Journal of the American Oil Chemists Society. 47, 347 - 351.

DIENER, U. L., COLE, R. J., SANDERS, T. H., PAYNE, G. A., LEE, L. S. & KLICH, M. A. 1987. Epidemiology of Aflatoxin Formation by *Aspergillus flavus*. Ann. Rev. Phytophathol. 25: 249-270.

DIRHEIMER, G. 2000. A review of recent advances in the genotoxicity of carcinogenic mycotoxins. In: Carcinogenic and Anticarcinogenic Factors in Food, DFG-Symposium, Wiley-VCH-Verlag GmbH, Weinheim, S.180-204.

DOYLE, M. P. & MARTH, E. H. 1978. Aflatoxin in Degraded at Different Temperatures and pH Values by Mycella of *Aspergillus* parasiticus. European J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 6: 95-100.

DWIJENDRA SINGH, TRIPATHI, A. K. & RAO, S. M. 1984. Sowing Time of Indian Senna in Relation to the Management of the Larvae of Catopsilia pyranthe Linn. Indian J. Agri. Sci. 54(12): 1073-1075.

EL-BALLAL, A. S. I., MOHAWED S. M., EL-SAYED O. E., ABD EL-MONGI N. 1989. Basis for breeding senna against soilborne fungi. Planta Medica 55, p 689.

EL-GENGAIHI, S., AGIZA, A. H. & EL-HAMIDI, A. 1975. Distribution of Anthraquinones in Senna Plants. Planta Medica, 27: 349-353.

ELLIS, W. O., SMITH, J. P., SIMPSON, B. K. 1991. Aflatoxin in food: occurrence, biosynthesis, effects on organisms, detection, and methods of control. Critical Review in Food Science and Nutrition 30, 403-439.

ELLIS, W. O., SMITH, J. P., SIMPSON, B. K., RAMASWAMY, H. & DOYON, G. 1994. Growth of and Aflatoxin Production by *Aspergillus flavus* in Peanuts Stored under Modified Atmosphere Packaging (MAP) Conditions. International Journal of Food Microbiology, 22: 173-187.

EL SAYED, N. Y., ABDELBARI, E. M., MAHMOUD, O. M. & ADAM, S. E. I. 1983. The Toxicity of *Cassia senna* to Nubian Goats. The Veterinary Quarterly, 5(2): 80-85.

EATON, D. L., GALLAGHER, E. P. 1994. Mechanisms of aflatoxin carcinogenesis. Annual Review of Pharmacology and Toxicology 34, 135-172.

FACHBEREICH LOEL DER HOCHSCHULE ANHALT, 1999. Zusammenfassung von Schadwirkungen durch Aflatoxine bei landwirtschaftlichen Nutztieren. http://www-proj.loel.hs-anhalt.de/oeko/mykotoxine/afla.html, 17.12.01

FARAJ, M. K., SMITH, J. E., HARRAN, G. 1993. Aflatoxin biodegradation: effects of temperature and microbes. Mycological-Research (United Kinfdom v. 97 (11) p. 1388-1392.

FONSECA, H., CLLORI-DOMINGUES, M. A., GLORIA, E. M., LUIZ NETO M., ZAMBELLO, I. V. 1995. Influenc of bag materials on moisture loss and final aflatoxin content of in-shell peanuts stored miost. First studies. Food Add. Cont. 12, p. 337-341.

GARCIA-VILLA, R., LENG-PESCHLOW, E., RUCKEBUSCH, Y. 1980. Effect of anthraquinone derivates on canine and rat intestinal motility. J. Pharmacy Pharmacol. 32, 323-329.

GÄRTNER, G., KOCHENDÖRFER, G., KOLBUSCH, P. 1982. Nutzungsmöglichkeiten ausgewählter Trockenzonenpflanzen in Entwicklungsländern, Forschungsbericht des Bundesministeriums für wirtschaftliche Zusammenarbeit, Weltforum Verlag, Köln, Germany.

GOLDBLATT, L. A. & DOLLEAR, F. G. 1977. Review of Prevention, Elimination and Detoxification of Aflatoxins. Archives de Institut Pasteur de Tunis, 54: 411-422.

GOODMAN L. S., & GILMAN A. 1970. The Pharmacological Basis of Therapeutics. Fourth Edition, 1024.

GOMBOS, J. 1987. Remarks on the Food Sampling Plan and Detection Methods for Aflatoxins in Legislation. Ernährung, 11(2): p. 110.

GOURAMA, H. & BULLERMAN, L. B. 1995 Aspergillus flavus and Aspergillus parasiticus: aflatoxigenic fungi of concern in foods and feeds: a review . J. Food Prot., 58, 1395 1404.

GUPTA, R. 1974. Wild Occurring Senna (*Cassia senna L.* Vahl.) from Kutch, Gujarat. Curr. Sci. 43(3): 89.

GUPTA, R. 1984. Senna cultivation in India. Indian Hortic. 28 (4) 19-21, 48.

HANSEN, T. J. 1993. Quantitative testing for mycotoxins. Am. Assoc. Cereal Chem., 38, 346 348.

HARNISCHFEGER, G. & STOLZE, H. 1983. Bewährte Pflanzendroge in Wissenschaft und Medizin, Notamed Verlag, Bad Homburg/Melsungen, S 51-61.

HAWSKSWORTH, D. L.; KIRK, P. M.; SUTTON, B. C.; PEGLER, D. N. 1995. Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi. 8th ed. Wallingford: CAB International.

HEGNAUER, R. 1996. Chemotaxonomie der Pflanzen, Band XIb-1, Birkhäuser Verlag Berlin.

HELL, K. 1997. Factors contributing to the distribution and incidence of aflatoxin producing fungi in stored maize in Benin, Dissertation des Fachbereiches Gartenbau der Universität Hannover.

HENDRICKSE, R. G. 1984. The influence of aflatoxins on child health in the tropics with particular reference to Kwashiorkor. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 78:4, 427 - 435.

HILL, R. A., BLANKENSHIP, P. D., COLE, R. J., SANDERS, T. H. 1983. Effects of soil-moisture and temperature on preharvest invasion of peanuts by the *Aspergillus* flavus group and subsequent aflatoxin development. Applied and Environmental Microbiology 45, 628-633.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 1993: Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Lyon, France, Vol.56, http://www.iarc.fr/, 10.12.01.

ISMAIL, A. M. A. & BABIKIR, A. A. A. 1986. Structural Pattern of *Cassia acutifolia* collected in the Gezira, Sudan. Fitoterapia, 57(4): 263-266.

IWU, M. M. 1990. Handbook of African Medicinal Plants. Boca Raton: CRC Press. p. 143-144.

JACOBSEN B. J., BOWEN K. L., SHELBY R. A., DIENER U. L., KEMPPAINEN B. W., FLOYD J. 1993. Mycotoxins and Mycotoxicoses. Auburn University, Auburn Alabama Circular ANR-767.

JONES, R. K., DUNCAN, H. E. 1981. Effect of nitrogen fertilizer, planting date, and harvest date on the aflatoxin production in corn inoculated with *Aspergillus flavus*. Plant Dis. 65,741-744.

KALYANASUNDARAM, N. N., AMIN, D. R., PATEL, A. I. & DALAL, K. C. 1981. Effect of Nitrogen and Phosphorus on Yield and Quality of Senna Leaflets. Indian Journal of Pharmaceuticals Sciences, p.100-102.

KANG, M. S., LILLEHOJ, E. B., WIDSTROM, N. W. 1990. Field aflatoxin contamination of maize genotypes of broad genetic base. Euphytica 51: 1, 19 - 23.

KARUNAKARA, P. S., JANAKIRAMAN, M., KRISHNAMOORTHY, K., MAHALINGAM P. K. 1991. Soils of V.O. Chidambaranar District Tamilnadu. Soil Survey And Land Use Organisation Palayamkottai-627007.

KAPUR, B. M. & ATAL, C. K. 1977. Cultivation and Utilization of Senna in India. Medicinal & Aromatic Plants, p.124-131.

KLICH, M. A., PITT, J. I. 1988. A laboratory guide to the common *Aspergillus* species and their teleomorphs. Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation, Division of Food Processing. 116 pp.

KOBASHI, K. NISHIMURA, T., KUSAKA, M., HATTORI, M., NAMBA, T. 1980. Metabolism of sennosides by human intestinal bacteria. Planta Med. 40, 227-236.

KÖHLER, W., SCHACHTEL, G., VOLESKE, P. 1984. Biometrie: Einführung in die Statistik für Biologen und Agrarwissenschaftler, Springer-Verlag.

KURTZMAN, C. P., HORN B. W., HESSESLTINE, C. W. 1987. *Aspergillus nomius*, a new aflatoxin producing species related to *Aspergillus flavus* and *Aspergillus tamarii*. Antonie van Leeuwenhoek 53, 147-158.

KRISHANAMACHARI, K. A. V. R., BHAT, R. V., NAGARAJAN, V., TILAK, T. B. G. 1975. Hepatitis due to aflatoxicosis – An outbreak in Western India. Lancet I, 1061-1063.

LACEY, J., MAGAN, N. 1984. Effectsof gas composition and water activity on growth of field and storage fungi and their interactions. Trans Br. Mycol.Soc. 82, 305-314.

LACEY, J., MAGAN, N. 1991. Fungi in Cereal Grains: their occurrence and water and temperature relationships. In Cereal Grain Mycotoxins, Fungi and Quality in Drying and Storage. ed. Chelkowski, J. Elsevier, Amsterdam. pp. 77-118.

LEMLI, J. 1986. The Chemistry of Senna. Fitoterapia, 57(1): 33-40.

LEMLI, J., CUVEELE, J. 1978. Umwandlung der Anthronderivate während des Trocknens der Blätter von *Cassia angustifolia* und *Rhamunus frangula*. Planta Med. 33, 293.

LEMLI, J., CUVEELE, J. & VERHAEREN, E. 1983. Chemical Identification of Alexandrian and Tinnevelly Senna. Planta Medica, 49: 36-37.

LENG-PESCHLOW, E. 1980. Inhibition of intestinal water and electrolyte absorption by senna derivates in rats. J. Pharmacy Pharmacol. 32, 330-335.

LILLEHOJ, E. B., KWOLEK, W. F., ZUBER, M. S., BOCKHOLT, A. J., CALVERT, O. H., FINDLEY, W. R., GUTHRIE, W. D. 1980. Aflatoxin in corn before harvest: Interaction of hybrids and locations. Crop Science 20, 731 - 734.

LILLEHOJ, E. B. 1983. Effect of environmental and cultural factors on aflatoxin contamination of developing corn kernels. In: Proceedings of the 1982 Symposium on aflatoxin and *Aspergillus flavus* in corn. p. 27 - 34.

LOHAR, D. R., BHATIA, R. K., GARG, S. P. & CHAWAN, D. D. 1979. Seasonal Variation in the Content of Sennoside in Senna Leaves. Pharmaceutisch Weekblad Scientific Edition, 1: 30-32.

LYNCH, R. E., DICKO, I. O., SOME, S. A., OUEDRAOGO, A. P. 1991. Effect of harvest date on termite damage, yield, and aflatoxin contamination in groundnut in Burkina Faso. International Arachis Newsletter No. 10, 24.

MADAUS, G. 1979. Lehrbuch der biologischen Heilmittel, Georg Olms Verlag.

MAHMOUD, A. 1985. Germination of *Cassia senna* from Saudi Arabia. Journal of Arid Environments, 9: 39-49.

MICHELI, P. A. 1729. Nova plantarum genera. Florentiae.

MÜLLER, G., WEBER, H. 1996. Mikrobiologie der Lebensmittel – Grundlagen. Hamburg, Behr's Verlag.

NESCI, A., ETCHEVERRY, M. 2002. Aspergillus section Flavi populations from field maize in Argentina. Letters in Applied Microbiology Volume 34 Issue 5 p. 343

NORTHOLT, M. D., VAN EGMONT, H. P., PAULSCH, W. E. 1977. Differences between *Aspergillus flavus* strains in growth and aflatoxin B1 production in relation to water activity and temperature. J. Food Prot. 40 p. 778-781.

NORUSIS, M. G., SPSS Inc. 1993. SPSS for Windows: Advanced Statistics, Release 6.0. Chicago: SPSS Inc..

ONG, T.-M. 1975. Aflatoxin mutagenesis. Mutat. Res., 32, 35-53.

PAREEK, S. K., SRIVASTAVA, V. K., MAHESHWARI, M. L., MANDAL, S., GUPTA, R. 1983. Investigation in Agronomic Parameters of Senna (*Cassia senna L.* Vahl.) as grown in Northwestern India. Intern. J. Trop. Agri. 1(2): 139-144.

PAREEK, S. K., SRIVASTAVA, V. K., MANDAL, S., MAHESHWARI, M. L. & GUPTA, R. 1984. Accumulation of Antracene Compounds and Yield of Senna under Different Picking Schedules. South Indian Horticulture, p. 219-222.

PAYNE, G. A., KAMPRATH, E., ADKINS, C. R. 1989. Increased aflatoxin contamination in nitrogen – stressed corn. Plant Disease 73:7, 556-559.

PILARCZYK, W. 1962. Über die Handelsklassen der indischen Senna; Deutsche Apotheker-Zeitung 19, Deutscher Apotheker Verlag, Stuttgart.

PUSHPA SINGH, MOHAN RAO, M. 1982 a. Crude Drug and Anthraquinone Yield of Discarded Parts of the Senna Plant (*Cassia senna L.* Vahl.). Current Science, 51(3): 146.

PUSHPA SINGH, MOHAN RAO, M. 1982 b. Optimum Stage of Harvest of Leaflets and Pods of Senna *Cassia angustifolia* Vahl, in Relation to Yield of Crude Drug and Anthraquinone. Indian Journal of Pharmaceutical Sciences, p.12-13.

SANDER, K. W., BARRETT, M., WITT, W. W. 1985. Physiological investigations of differential corn Hybrid responses to imazaquin. Proceedings North Central Weed Control Conference. Vol.40, 120-121.

SANDERS, T. H., COLE, R. J., BLANKENSHIP, P. D. & DORNER, J. W. 1993. Aflatoxin Contamination of Peanuts from Plants Drought Stressed in Pod or Root Zones. Peanut Science, 20: 5-8.

SASAKI, H., YAURAUCH, K., KUWANO, S. 1979 Metabolic activation of sennosides in mice. Planta Med. 37, 370-378.

SCHMUTTERER, H. 1995. The Neem Tree *Azadirachta indica* A. Juss. and other meliaceous plants. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim.

SCHROER, S., SERMAN, H., REICHMUT, C., BUTTNER C. 2001. Effectivness of different emulsifiers for neem oil against the western flower thrip (Thysanoptera, Thripidae) and the warehouse moth (Lepidotera, Pyralidae). Meded Rijksuniv Gent Fak Landbouwkd Toegep Biol Wet. 66 (2a), 463-471.

SCOTT, G. E., ZUMMO, N. 1994. Kernel infection and aflatoxin production in maize by *Aspergillus flavus* relative to inoculation and harvest dates. Plant Disease, 78: 2, 123-125.

SELVARAJ, Y. & SUBHAS CHANDER, M. 1978. Senna – Its Chemistry, Distribution and Pharmaceutical Value. J. Indian Inst. Sci. 60(8). 179-196.

SÉTAMOU, M., CARDWELL, K. F., SCHULTHESS, F., HELL, K. 1997. *Aspergillus flavus* infection and aflatoxin contamination of preharvest maize in Benin. Plant Disease 81: 1323-1328.

SÉTAMOU, M., CARDWELL K. F., SCHULTHESS, F. & HELL, K. 1998. Effect of insect damage to maize ears, with special reference to *Mussidia nigrivenella* (Lepidoptera: Pyralidae), on *Aspergillus flavus* (Deuteromycetes: Monoliales) infection and aflatoxin production in maize before harvest in the Republic of Benin. Journal of Economic Entomology 91: 433-438.

SHAH, R. R., KALYANASUNDARAM, N. K., AMIN, D. R., PATEL, D. H., PATEL, P. B., DALA, K. C., GUPTA, R. 1981. Cultivation of Senna. Indian Drugs, p. 314-316.

SHARMA, H. K., DAIYA, K. S., CHAWAN, D. D. 1980. Effect of Different Soil Types on Plant Growth, Lead Pigments and Sennoside Content in *Cassia* Species. Pharmaceutisch Weekblad, Scientific Edition, 2: 573-575.

SHARMA, H. K., DAIYA, K. S., CHAWAN, D. D. 1982. Sennosides and Carbohydrates in Developing Pods of *Cassia* species. Pharmaceutisch Weekblad Sceintific Edition, 4: 83-84.

SHIRAH, H., KAGEI, K. 1985. Studies on the Cultivation of Senna *Cassia senna L.* (1). The Germination of Seed Growth Flowering and Podding. Shoyakugaku Zasshi, 39(2): 111-117.

SINGH, U. P., SINGH, H. B. & SINGH, R. B. 1980. The fungicidal effect of neem (*Azadirachta indica*) extracts on some soil-borne pathogenes of gram (Cicer arietinum) Mycologia 72:1077-1093.

SMITH, M. S., RILEY, T. 1992. Direct and interactive effects of planting date, irrigation, and corn earworm (Lepidoptera: Noctuidae) damage on aflatoxin production in preharvest field corn. Journal of Economic Entomology 85: 3, 998-1006.

SOIL SURVEY STAFF 1975. Soil Taxonomy. A Basic System of Soil Classification for making and interpreting Soil Surveys. Agricultural Handbook Nr. 436. Washington, D.C.; US Government Printing Office (U.S.D.A. Soil Conservation Service).

STAHR, H. M., PFEIFFER, R. L., IMERMAN, P. J., BORK, B. & HURBURGH, C. 1990. Aflatoxins – The 1988 Outbreak. Diary, Food and Environmental Sanitation, 10(1): 15-17.

STATSOFT, Inc. (1998). STATISTICA für Windows [Computer-Programm-Handbuch]. Tulsa, OK: StatSoft, Inc., 2300 East 14th Street, Tulsa, OK 74104, Tel. 001 918 749-1119, Fax: 001 918 749-2217, E-Mail: info@statsoft.com, WEB: http://www.statsoft.com.

STEINER, W. E., RIEKER, R. H., BATTAGLIA, R. 1988, Aflatoxin contamination in dried figs: Distribution and association with fluorescence. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 36 (1) 88-91.

STEINHAUER, B. 1996. Möglichkeiten zur Nutzung von Neem für die Bekämpfung von Phytopathogenen Pilzen. Gießener Beiträge zur Entwicklungsforschung Reihe I, Band 22, 89-98.

STOLL, A. & BECKER, B. 1950. Sennosides A and B, the active principle of senna. Fortsch. Chem. org. Naturst. 7, 248.

TAUCHMANN, F.1972. Schutzmaßnahmen beim Umgang mit Mykotoxinen, Alimenta 11, Seiten 85 bis 89.

THOMAS, A. R. 1977. The genus Aspergillus and biodeterioration. In J.E. Smith and J.A. Patemann (ed.), Genetics and physiology of aspergillum. Academic Press, London

TRENK, H. L., HARTMAN, P. A. 1970. Effects of moisture content and temperature on aflatoxin production. Applied Microbiology 19, 781 - 784.

TSUBOUCHI, H., YAMAMOTO, K., HISADA, K. & SAKABE, Y. 1983. Degradation of Aflatoxins by *Aspergillus niger* and Aflatoxin Non-producing *Aspergillus flavus*. Journal of the Food Hygienic Society of Japan (Shokuhin Eiseigaku Zasshi), 24(2): 113-119.

UPADHYAYA, S.K. & SINGH, V. 1989. Phytochemical Identity of *Cassia senna* L. Vahl and C. *acutifolia* Del. Nat. Acad. Sci. Letters, 12(6): 181-182.

WALTER, H. & LIETH, H. 1960. Klimadiagrammweltatlas. VEB Gustav Fischer Verlag Jena.

WANG, Y., LAN, L., YE B., XU, Y., LIU, Y., LI, W. 1983. Relation between geographical distribution of liver cancer and climate-aflatoxin B1 in China. Scientia - Sinica. 26:11, 1166-1175.

WEIDENBÖRNER, M. 1998. Lebensmittel-Mykologie, B. Behr's Verlag GmbH & Co., D-22085 Hamburg.

WEIDENBÖRNER, M. 2001. Encyclopedia of Food Mycotoxins. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.

WHEELER, K. A., HURDMAN, B. F., PITT, J. I. 1991. Influence of pH on the growth of some toxigenic species of *Aspergillus*, Penicillium and Fusarium. International Journal of Food Microbiology 12, 141-150.

WHITAKER, T., GIESBRECHT, F. & WU, J. 1996. Suitability of Several Statistical Models to Simulate Observed Distribution of Sample Test Results in Inspections of Aflatoxin-Contaminated Lots. Journal of AOAC International. 79(4): 981-988.

WICKLOW, D. T., HORN, B. W., & SHOTWELL, O. L. 1987. Aflatoxin formation in preharvest maize ears co-inoculated with *Aspergillus flavus* and *Aspergillus niger*. Mycologia 79:679.

WIDSTROM, N. W., MCMILLIAN, W. W., BEAVER, R. W. & WILSON, D. M. 1990. Weather Associated Changes in Aflatoxin Contamination of Preharvest Maize. J. Prod. Agric., 3(2): 196-199.

WILSON, D. M., ABRAMSON, D. 1992. Mycotoxins. In SAUER, D. B. (Ed.): Sorage of Cereal Grains. 4th Edition, St. Paul, American Association of Cereal Chemists, 341-391.

ZERINGUE JR. H. J., BHATNAGAR, D. 1994. Effects of Neem Leaf Volatiles on Submerged Cultures of Aflatoxigenic *Aspergillus parasiticus*. Applied and Environmental Microbiology, 60(10): 3543-3547.

ZERINGUE, JR. H. J & BHATNAGAR, D. 1990 . Inhibition of Aflatoxin Production in *Aspergillus flavus* Infected Cotton Bolls After Treatment With Neem (*Azadirachta indica*) Leaf Extracts. Journal of the American Oil Chemists' Society, 67(4): 215-216.

Danksagung

Gedankt sei allen, die an dieser Arbeit beteiligt waren und mich unterstützt haben. Namentlich möchte ich erwähnen Herrn Berghöfer und Dr. Hubbert, den Geschäftsführer sowie den Qualitätskontrollleiter der Firma *roha arzneimittel GmbH*, die dieses Projekt ermöglicht haben. Herrn Prof. Basedow vom Institut für Phytopathologie und Angewandte Zoologie der Justus-Liebig-Universität Gießen sei gedankt für die wissenschaftliche Begleitung und seine große Geduld, vor allem bei den Schwierigkeiten, die sich nach meiner Rückkehr aus Indien ergaben. Herrn Prof. Schlösser danke ich für die Hilfestellungen bei der Durchführung der mykologischen Versuche. Herrn Dr. Pons-Kühnemann vom Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung, II Biometrie und Populationsgenetik der Justus-Liebig-Universität Gießen sei für seine statistische Beratung gedankt.

In Indien geht mein Dank vor allem an Ratinavelu Chettiar und der Firma *G. Das*, einem Unternehmen der Kothari Gruppe sowie Mr. Venkatesh und Narasimharao und der Firma *Rankar Agro Industries* in Gujarat. Ohne ihre kompetente Unterstützung hätten eine Vielzahl der Untersuchungen nicht durchgeführt werden können. Für die Durchführung der Feldversuche sei besonders der Firma *Incan Pharmaceutical* gedankt, die Flächen und Mitarbeiter zur Verfügung stellte, sowie der Firma *EID Parry*, die das Präparat NeemAzal T/S® beisteuerte.

Für die Breitstellung von Informationen und Daten sei der Tamil Nadu Agricultural University, dem AC&RI-Killikulam, der Soil Survey and Land use Organisation Palayamcottai sowie dem Hafen Tuticorin gedankt.

Des Weiteren geht der Dank an die vielen indischen Bauern und Exporteure, die mir ihre Ware zur Beprobung zu Verfügung stellten.

Meiner Familie möchte ich dafür danken, dass sich mich hat gehen lassen diese Arbeit zu vollenden.

10. Curriculum Vitae

Name:	Philip Müller
Geb.:	05.02.1969 in Tübingen
Familienstand:	eheähnliche Lebensgemeinschaft, 1 Kind

Berufliche Erfahrungen:

Seit 06/04	**Beratend für die FAO** Arzneipflanzenanbau in Nordafrika
Seit 09/01	**Beschäftigt auf einem antroposophisch-sozialtherapeutischen Demeterbetrieb** Marketing und Qualitätssicherung von biodynamischen Milchprodukten
02/00 - 06/01	**Mitarbeit in der Organisation Ärzte ohne Grenzen** Projekteinsatz auf einem Kala Azar Projekt im Nord Sudan
02/95 - 05/99	**Projektleiter Qualitätssicherung in Indien** roha arzneimittel GmbH, Bremen/Tuticorin, Tamil Nadu/Indien Optimierung einer Arzneipflanzenproduktion
08/92 - 09/92	**Aufbau eines Naturresevates** Intsu Game Reserve Thaba Tholo, Thabazimbi (RSA)
07/91 - 09/91	**Landwirtschaftliches Praktikum** Bauer Hans-Georg Döhne, Weimar/Marburg
12/90 - 02/91	**Flächennutzungsplanung** Büro für Landschaftsökologie Thüringen, Holzdorf/Weimar

Akademische Ausbildung:

04/91 - 04/96	**Studium der Agrarwissenschaften** Justus-Liebig-Universität, Gießen Fachrichtung Umweltsicherung und Entwicklung Ländlicher Räume Diplomarbeit: Feld- und Laborversuche zur Trinkwassersicherung Abschluß: Dipl.-Ing. agr. (Note: 1,4)

Ersatzdienst:

	Individuelle Schwerstbehinderten Betreuung
04/90 - 11/90	Verein zur Integration Behinderter, Marburg
05/89 - 03/90	South Africa Foundation, Bonn

Sonstige Aktivitäten:

Vorsitzender der Interessengemeinschaft Universitäts-Kindergarten e.V. (seit 03/04)

IMPULS, Internationale technische und kulturelle Zusammenarbeit e.V.
Mitgründer des Vereins; Planung, Mitarbeit und Betreuung von folgenden Projekten:

- Zwei Gewächshausprojekte in Südostanatolien, Türkei (1989, 1991)
- Projekt zur dezentralen Abwasserklärung in Ahravi, Nordosttürkei (1993)
- Projekt eines Heißwassersystems in Zonguldak, Zentrale Nordtürkei (1995)

Freiwillige Mitarbeit auf Entwicklungshilfe-Projekten in Bolivien

- Kartoffelanbauprojekt des DED, Altiplano (07/90)
- Kaffeecooperativen-Projekt der GTZ, Nord Yungas (08/90)

Schulausbildung:

06/85 - 05/89	Schule Schloß Salem, Überlingen Abitur (Note: 2,6)
06/82 - 06/85	Altes Humanistisches Gymnasium, Bremen

11. Anhang

11.1. Validierung der Probennahme für die Aflatoxinbestimmung in *C. senna* fructus

Aus einer 180 kg großen, gut durchmischten Menge Sennesfrüchte wurden drei Proben á 1 kg, drei Proben á 2 kg und drei Proben á 5 kg gezogen. Diese wurden auf < 2 mm vermahlen. Die gewonnenen neun Pulver wurden in einer Trommel homogenisiert, und von jedem Pulver wurden drei Aflatoxinbestimmungen durchgeführt. Anschließend wurde eine einfaktorielle Varianzanalyse durchgeführt.

Tab. 28: *Aflatoxinkonzentration (S B_1, B_2, G_1, G_2) in den unterschiedlichen Probengrößen*

	1 kg Mischprobe			**2 kg Mischprobe**			**5 kg Mischprobe**		
	Pulver 1	Pulver 2	Pulver 3	Pulver 1	Pulver 2	Pulver 3	Pulver 1	Pulver 2	Pulver 3
1.	7,4	6,1	4,9	7,3	5,6	6,9	7,0	6,55	7,6
2.	10,0	6,3	6,3	7,3	7,3	7,6	–	10,5	7,4
3.	10,4	6,4	5,2	11,1	6,2	8,1	12,3	8,55	8,7
Mittelw.	*9,3*	*6,3*	*5,55*	*8,6*	*6,4*	*7,5*	*9,7*	*8,5*	*7,9*
	Statistik								
	Mittelw. 1 kg = 7,0			Mittelw. 5 kg = 6,1			Mittelw. 10 kg = 8,68		
	SQT = 30,520			SQT = 19,109			SQT = 26,510		
	SQZ = 24,080			SQZ = 7,269			SQZ = 3,69		
	SQI = 6,440			SQI = 11,840			SQI = 23,03		
	Fvers = 11,217			Fvers = 1,842			Fvers = 0,401		
	Ftab (2/6) = 5,14			Ftab (2/6) = 5,14			Ftab (2/5) = 5,79		

Durch die Vergrößerung der Mischprobe von 1 kg auf 5 kg ist die Streuung der Aflatoxinresultate innerhalb der Wiederholungen der unterschiedlichen Probengrößen verringert worden. Die Streuung zwischen den drei Wiederholungen der 1 kg-Proben betrug SQZ=24,08 während sie bei den drei 5 kg-Proben bis auf SQZ=3,69 zurückgegangen ist. Die Varianzanalyse

führte zu dem Ergebnis, dass die zu vermahlende Mischprobe aus mindestens 2 kg Früchten bestehen muss, um ein repräsentatives Aflatoxinresultat zu erhalten.

11.2. Geräte der HPLC-Analyse

Probenmühlen mit 2 mm Sieb
Wolf mit 3 mm Lochscheibe
Trocknungsschrank
Jodzahlkolben oder Erlenmeyerkolben; 200 oder 300 ml
Braun-Mixer 4142
Ultra-Turrax
Messzylinder 250 ml
Spritzen
Zentrifuge mit Zubehör
Pipetten, diverse
Vac-Elut Einheit mit Zubehör
Ultraschallbad
KOBRA-Zelle
HPLC-Niederdruckanlage bestehend aus: Probengeber Merck 655A-40, Säulenofen Merck, Niederdruck-Pumpe Merck L-6200, Fluoreszenzdetektor Merck F-1050, Datensystem zur Auswertung.

11.3. Chemikalien der HPLC-Analyse

Bidestwasser
Methanol HPLC-Qualität
Methanol R[1]
Aceton R
Wasser, gereinigtes R
Kaliumbromid R
Natriumchlorid R
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat R
Natriummonohydrogenphosphat, wasserfreies R
Salpetersäure 65 % R

Pufferlösung pH 7: 1,25 g Na_2HPO_4, 0,18 g $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ und 8,59 g NaCl in 1 Liter Wasser gelöst

Acetonitril HPLC-Qualität

AFLAPREP-Immunoaffinitätssäulen Fa. Coring Art.-Nr.: RPD MYC555

Aflatoxin Standard Mix M, Supelco 4-6304

11.4. Validierungprotokoll der HPLC-Analyse für Aflatoxine in *C. senna fructus*

11.4.1. Spezifität

Die Spezifität der Methode bedarf keiner gesonderten Daten. Sie ist durch die selektive Reinigung der Probenmatrix mittels Immunoaffinitätschromatographie, anschließender HPLC-Trennung, Nachsäulenderivatisierung und spezifischer Fluoreszenzdetektion gegeben.

11.4.2. Präzision

Für die Bestimmung der Präzision des Analysenverfahrens wird die Wiederholstandardabweichung herangezogen. Das ist die Standardabweichung, ermittelt bei der Wiederholung der gleichen Messung aus derselben Probe von dem selben Bearbeiter.

Tab 29: *6 Proben C. senna fructus*

n	µg/kg Aflatoxin B_1	µg/kg Aflatoxin B_2	µg/kg Aflatoxin G_1	µg/kg Aflatoxin G_2
1	21,6	0,6	n.n.	n.n.
2	17,5	0,5	n.n.	n.n.
3	16,1	0,4	n.n.	n.n.
4	20,1	0,5	n.n.	n.n.
5	19,8	0,5	n.n.	n.n.
6	18,5	0,5	n.n.	n.n.
Mittelwert	18,9	0,5	n.n.	n.n.
Srel	10,5 %	13,8 %		

Bewertung: Die gefundenen relativen Standardabweichungen von 10,5 % (B1) und 13,8 % (B2) werden als akzeptabel angesehen. Für die nicht nachweisbaren Aflatoxine G1 und G2 ließen sich folglich keine Varianzen ermitteln.

11.4.3. Richtigkeit

Zur Validierung der Richtigkeit des beschriebenen Verfahrens steht kein unabhängiges zweites Verfahren zur Verfügung. Aufgrund der komplexen Matrix kann auf eine chromatographische Trennung nicht verzichtet werden. Die Richtigkeit wird deshalb durch Aufstocken bekannter Mengen Aflatoxine auf die Probe ermittelt. Die Richtigkeit gibt die Abweichung des gefundenen aufgestockten Wertes (x) vom theoretischen (wahren) Wert (µ) in % an.

Tab. 30: 6 Proben *C. senna fructus* aufgestockt um ca. 50 % B1, B2 ,G1 ,G2 und nach Standardmethode aufgearbeitet

n	Wiederfindung B_1	Wiederfindung B_2	Wiederfindung G_1	Wiederfindung G_2
1	62,6 %	45,2 %	94,9 %	14,6 %
2	66,6 %	44,4 %	98,5 %	15,1 %
3	83,2 %	39,3 %	95,7 %	14,2 %
4	106,6 %	44,0 %	97,3 %	15,2 %
5	98,5 %	43,0 %	95,4 %	15,3 %
6	77,1 %	40,0 %	97,5 %	13,8 %
Mittelwert	70,8 %	43,0 %	96,4 %	14,7 %
Srel	15,4 %	7,5 %	1,9 %	2,8 %

Bewertung: Eine Wiederfindung zwischen 50 und 100 %, bei der Bestimmung der Aflatoxine in pflanzlichen Drogen im µg/kg-Bereich ist als ausreichend anzusehen. Die o. a. Tabelle weist für B1 71 % und G1 96% eine gute, für B2 eine noch akzeptable Wiederfindung aus. Knapp 15 % für G2 ist nicht ausreichend. Der Grund dürfte in dem unterschiedlichen Rückhaltevermögen für die verschiedenen Aflatoxine in der Immunoaffinitätssäule liegen.

Eidesstattliche Erklärung

Die vorliegende Arbeit wurde vom Verfasser selbst verfasst. Es wurden keine Anderen als angegebenen Hilfsmittel verwendet

Zitate und Äußerungen, die anderen Werken im Wortlaut oder sinngemäß entnommen wurden, sind durch Quellenangaben kenntlich gemacht.

Marburg, Februar 2005