



---

**MEDIZINISCHE UNIVERSITÄT WIEN**  
**UNIVERSITÄTSKLINIK FÜR INNERE MEDIZIN I**  
**Abteilung für Infektionen und Chemotherapie**  
**Mikrobiologische Laboratorien 3P**

Univ. Prof. DDr. A. Georgopoulos  
Währinger Gürtel 18 - 20, A - 1090 Wien, Austria  
Tel.: +43 1 40400 5139 Fax: +43 1 40400 5167  
e-mail: [apostolos.georgopoulos@meduniwien.ac.at](mailto:apostolos.georgopoulos@meduniwien.ac.at)



---

**WIRKSAMKEIT VON AKAZID UND AKAZID PLUS**  
**GEGENÜBER SCHIMMELPILZEN**

**Einleitung**

Pilze sind im allgemeinen für Menschen unter folgenden Aspekten von großer Bedeutung:

1. als Erreger von Pilzkrankungen, sogenannte Mykosen
2. als Produzenten von Giftstoffen (den Mykotoxine wie z.B. das Aflatoxin) und verschiedenen Antibiotika wie Penicillin
3. als Auslöser von allergischen Reaktionen.

Pilze sind heterotrophe Organismen, die organische Kohlenstoffverbindungen durch saprophytäre oder parasitäre Lebensweise aufnehmen und gehören zu den Eukaryonten. Es gibt kosmopolitische Species, die potentiell überall sein können und die Fähigkeit besitzen, sich auch unter extremen physiologischen Bedingungen (PH-Bereich, Temperatur, Luftfeuchtigkeit) in Stunden oder Tagen zu vermehren.

Aufgrund der Fortpflanzungsart und der Strukturelemente werden die Pilze in Sprosspilze (Hefen) und Schimmelpilze eingeteilt. Die Schimmelpilze bilden für die Fortpflanzung Sporen oder Konidien, die sich aerogen verbreiten können. Sie können daher unter geeigneten Bedingungen Menschen, Tiere und Pflanzen befallen und somit direkt oder indirekt (Bildung von Mykotoxinen) große gesundheitliche Probleme verursachen.

Aflatoxine sind die giftigsten Stoffwechselprodukte, die Pilze in der menschlichen Nahrung und im Tierfutter bilden. Aflatoxine gehören zu jenen Mykotoxinen, die von verschiedenen

Forschungsgruppen weltweit am meisten untersucht wurden. Sie wurden mit verschiedenen Erkrankungen in Zusammenhang gebracht (Aflatoxicosis gibt es weltweit in der Tierzucht, bei Haustieren und Menschen). Das Auftreten von Aflatoxinen wird durch bestimmte Umweltfaktoren bestimmt, d.h. das Ausmaß der Kontaminierung variiert aufgrund der geographischen Lage, der landwirtschaftlichen Praxis und Anfälligkeit für Pilzbefall bei den landwirtschaftlichen Erzeugnissen während der Ernte, Lagerung oder der Verarbeitung. Aflatoxine haben mehr Aufmerksamkeit erregt als andere Mykotoxine, weil man anhand von Tierversuchen nachweisen konnte, dass sie eine stark krebserregende Wirkung haben und eine akute toxikologische Wirkung beim Menschen. Da man erkannte, dass absolute Sicherheit nicht gewährleistet werden kann, haben viele Länder versucht, den Befall von Schimmelpilz mit einer Verordnung einzudämmen, die eine bestimmte Ablauffrist von jenen landwirtschaftlichen Produkten verlangt, die den Menschen oder Tieren als Nahrungsmittel dienen. Aflatoxine konnten in Milch, Käse, Getreide, Erdnüssen, Baumwollsamensamen, Nüssen, Mandeln, Pistazien, Feigen, Gewürzen und anderen Nahrungsmitteln und im Tierfutter nachgewiesen werden. Vor allem sind Getreide, Erdnüsse und Baumwollsamensamen am meisten davon betroffen.

Bereits 1960 gab es Spekulationen über das Wesen dieses Toxins. Das Toxin, das von *Aspergillus flavus* produziert wird, wurde im Jahr 1961 identifiziert und bekam die heutige Bezeichnung Aflatoxin. Aus verschiedenen Studien ist eindeutig zu entnehmen, dass in erster Linie *A. flavus*-Stämme Aflatoxin produzieren. Es wurde jedoch auch bei anderen Pilzspecies wie *A. parasiticus*, *A. nomius* und *A. niger* Aflatoxinproduktion beobachtet. In einschlägigen Studien wurden 4 wichtige Aflatoxine isoliert, nämlich B1, B2, G1, G2 und zwei andere Produkte, M1 und M2, die eine wichtige Rolle bei der direkten Kontaminierung von menschlicher Nahrung und Tierfutter spielen.

Mykotoxine werden beim Kochen nicht zerstört. Eine Inaktivierung der Toxine durch Einwirkung chemischer Substanzen z.B. Chlorgas, Natriumhypochlorit, Ammoniak wird versucht. Es ist absolut notwendig, den Schimmelpilzbefall von Nahrungsmitteln zu verhindern. Aus diesem Grund wurde die Wirkung von Akazid bei verschiedenen Schimmelpilzstämmen untersucht.

## **Material und Methode**

**Teststämme:**            *Aspergillus flavus* ATCC 64025  
                                 *Aspergillus flavus* CH-6641  
                                 *Aspergillus fumigatus* ATCC 14110  
                                 *Aspergillus fumigatus* CH-1032  
                                 *Aspergillus fumigatus* CH-1112  
                                 *Aspergillus fumigatus* CH-109  
                                 *Aspergillus niger* ATCC 16404

**Testsubstanz:**        Akazid-Nr.: 44/170502  
                                 Akazid plus-Nr. Ch.: 1007

Als Stammlösung wurde Akazid und Akazid plus in einer 25% wässrigen Lösung verwendet. Diese wurde mit hartem Wasser (nach OENORM) bis zur jeweiligen gebrauchsfertigen Konzentration verdünnt. Die Aufbewahrung der Testsubstanz erfolgte bei Zimmertemperatur.

### **Bestimmung der Minimalen Hemmkonzentration (MHK)**

Die Aktivität der beiden getesteten Substanzen wurde mittels Mikrodilutionsmethode in Sabouraud-Bouillon nach NCCLS-Vorschriften bestimmt. Das Inokulum betrug  $1 \times 10^5$  KBE/ml, die Inkubation wurde an fünf bzw. sieben Tagen bei 28°C / ambient air durchgeführt. Die Substanzen wurden in Konzentrationen von 1000 mg/L bis 0,001 mg/L verwendet. Die niedrigste Wirkstoffkonzentration, bei der kein Pilzwachstum sichtbar war, wurde als MHK definiert. Sämtliche Experimente wurden dreimal wiederholt.

### **Quantitativer Suspensions-Test (Zeit- und konzentrationsabhängige Pilzabtötung)**

Um das fungizide Potential der getesteten Substanzen quantitativ zu erfassen, wurde die Geschwindigkeit der Abtötung der Pilzsuspension von *A. flavus* und *A. niger* in einer Konzentration von  $1 \times 10^7$  –  $1 \times 10^8$  KBE/ml nach einer Einwirkzeit von 15 Minuten überprüft. Als Prüfverfahren wurde die fungizide Wirkung nach der ÖNORM EN 1650 verwendet. Folgende Konzentrationen der beiden Substanzen wurden getestet: 0,5%, 1%, 2% und 4%.

### **Plattentest – qualitative Wirkung**

Akazid plus wurde in Maltextraktagar (MEA) eingegossen. In den Agar wurden Löcher gestanzt und mit Sporen von *A. flavus* ATCC6402  $1 \times 10^5$  KBE/ml gefüllt. Zusätzlich wurde *A. flavus* auf akazidhaltigen Platten auf der Oberfläche beimpft, im Vergleich zu normalen MEA Platten ohne Akazid. Nach Bebrütung bei 30°C im Brutschrank wurde das Wachstum von *Aspergillus* 3 bzw. 10 Tage lang beurteilt.

### **Wirkung von Akazid plus als Spray**

Auf Kunststoffbrettchen (Fa. Fackelmann) wurden 100 µl einer *A. flavus* Sporensuspension von  $1 \times 10^6$  KBE/ml verteilt. Nach dem Trocknen der Keimsuspension wurden die Oberfläche mit der Testsubstanz in 0,25%, 0,5%, 1% und 2%iger Konzentration besprüht. Die Kontrollplatten wurden mit physiologischer Kochsalzlösung besprüht. Nach einer Einwirkzeit von 10, 30, 60 und 240 Minuten wurde anhand der Abklatschmethode mit TSA-Platten + Neutralizer (Saponin, Polysorbat 80, Cystein, Histidin) die qualitative Wirkung (Pilzsporen) von Akazid evaluiert.

## Ergebnisse

### Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration

Tabelle 1. MHK von Schimmelpilzen

Keim	n	MHK (mg/L)		
		Akazid plus 5 Tage	Akazid plus 7 Tage	Akazid 7 Tage
A. flavus	2	8 – 32	8 – 32	16 – 64
A. fumigatus	4	4 – 32	4 – 32	8 – 32
A. niger	1	16	16	32

Wie aus der Tabelle ersichtlich, sind beide Substanzen gegenüber den getesteten Schimmelpilzen mit einer MHK von 4 - 32 mg/L hochwirksam, wobei Akazid plus um ein bis zwei Verdünnungsstufen wirksamer ist als Akazid.

### Prüfung der fungiziden Wirkung (quantitativ)

Akazid plus in folgenden Konzentrationen: 0,5%, 1%, 2%, 4%, Einwirkdauer: 15 Minuten, Zugabe von 0,3% Rinderalbumin.

Tabelle 2. Fungizide Wirkung bei A. flavus ATCC 64025

Pilzsuspension (KBE/ml) N	4%	2%	1%	0,5%
$1 \times 10^7$	$< 1,5 \times 10^2$	$9,7 \times 10^2$	$> 1,5 \times 10^4$	$> 1,5 \times 10^4$

Tabelle 3. Fungizide Wirkung bei A. niger ATCC 16404

Pilzsuspension (KBE/ml) N	4%	2%	1%	0,5%
$2,2 \times 10^7$	$< 1,5 \times 10^2$	$4 \times 10^2$	$> 1,5 \times 10^4$	$> 1,5 \times 10^4$

Sporensuspension für die Validierung  $N_v$ :  $128 + 150/2 \cdot 10^{-1} = 1,4 \cdot 10^3$  KBE/ml

Toxizität des Neutralisationsmediums B:  $120 + 136/2 \cdot 10^{-1} = 1,3 \times 10^3$  KBE/ml

Validierung C: 0,3% Rinderalbumin:  $1,1 \cdot 10^2$  KBE/ml

Validierung der experimentellen Bedingungen A:

0,3% Runderalbumin  $1,4 \times 10^3$  KBE/ml

$N = 1,5 \cdot 10^7 - 5 \cdot 10^7$  KBE/ml

$N_v = 6 \cdot 10^2 - 1,5 \cdot 10^3$  KBE/ml

$B \geq 0,05 \times N_v$

$C \geq 0,05 \times N_v$

$A \geq 0,05 \times N_v$

Wie aus den Tabellen 2 und 3 ersichtlich, zeigt Akazid plus bereits nach 15 Minuten eine fungizide Wirkung.

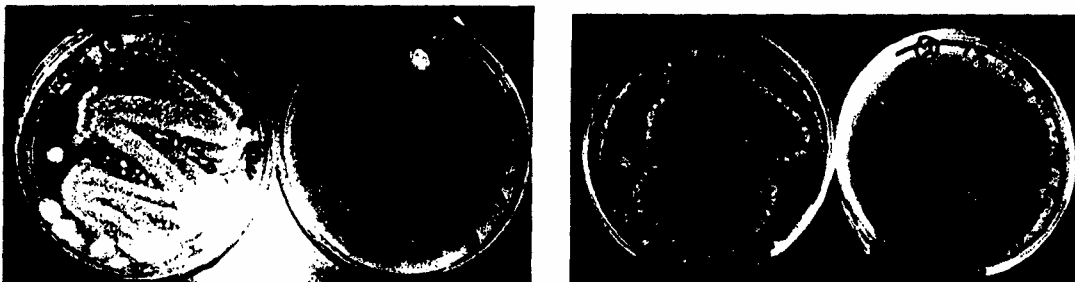


**Wirkung im Plattentest (qualitativ)**

**Tabelle 4. Qualitative Wirkung bei A. flavus ATCC 64025**

Konzentration in % (Akazid plus)	Wachstum von A. flavus nach	
	5 Tagen	10 Tagen
0,1	+	+
0,5	-	+
1	-	-
2	-	-
Kontrolle	+	+

**Abbildung 1. Wirkung von Akazid auf Oberflächenwachstum von A. flavus ATCC 64025**



**Wirkung von Akazid als Spray**

**Tabelle 5. Qualitative Wirkung bei A. flavus ATCC 64025 als Spray (Kolonien)**

Inkubationszeit (min)	Kontrolle	Akazid-Spray Konzentration in %			
		0,25	0,5	1	2
0	ZR	-	-	-	-
10	ZR	44	22	12	5
30	ZR	24	13	12	0
60	ZR	24	10	10	0
240	ZR	14	5	5	0

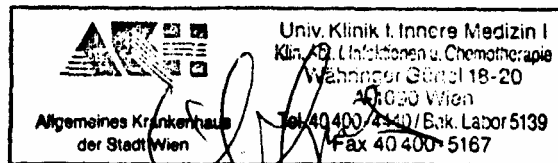
ZR Zellrasen



## Gesamtbeurteilung

Im Rahmen der durchgeführten Untersuchungen zeigte sich, dass beide getesteten Substanzen (Akazid und Akazid plus) eine ausgezeichnete Wirksamkeit gegenüber Schimmelpilzen besitzen. Im Pilzsporen-Suspensionstest konnte nach 15 Minuten eine log-Reduktion von mehr als vier 10er-Potenzen festgestellt werden. Somit ist bewiesen, dass Akazid plus eine fungizide Wirkung aufweist. Ebenso zeigt Akazid plus in den qualitativen Tests (Plattentest und Spray-Test, somit Untersuchungen, die anwendungsnahe Bedingungen darstellen) eine ausgezeichnete fungizide Wirkung in Konzentration von 0,5% bis 2%. Aus diesem Grund wäre eine Anwendungskonzentration von 0,5% - 2% für die Behandlung von Schimmelpilzkontaminationen (Pflanzen oder Produkte, die mit *A. flavus* kontaminiert sind) zu empfehlen.

Die Anwendung von Akazid an Produkten oder Pflanzen, die gegenüber *A. flavus* exponiert sind, könnte dazu beitragen, die Produktion von Aflatoxinen zu unterbinden und eine prophylaktische Lösung in der Aflatoxinproblematik herbeizuführen.



Wien, 28. 7. 2004

Univ.-Prof. DDr. A. Georgopoulos





B.R.Z. 1207/2004

Die Echtheit der vorstehenden Unterschrift des Herrn Univ.Prof. DDR. Apostolos GEORGOPOULOS, geboren am 18.6.1941 (achtzehnten Juni neunzehnhundert-einundvierzig), Arzt, 1090 Wien, Währinger Gürtel 18-20, wird bestätigt.-----  
W i e n , am 29.7.2004 (neunundzwanzigsten Juli zweitausendvier).-----

Gebühr € 13,- entrichtet.



*[Signature]*  
Dr. Harald Festl  
Substitut des Öffentlichen Notars  
Dr. Bernhard Kirchl  
in Wien-Döbling

*Jv 19932/04*

Die Echtheit der vorstehenden Unterschrift  
des Herrn *Dr. Harald Festl*  
bestellten Substituten des öffentlichen Notars  
*Dr. Bernhard Kirchl*  
im Sprengel dieses Gerichtshofes wird beurkundet.  
Der Präsident des Landesgerichtes für ZRS Wien  
1040 Wien, Schwarzenbergplatz 11  
Wien, am *29. Juli 2004*

Gebühr € *10,-*  
entrichtet

Landesgericht für ZRS Wien  
1040 Wien, Schwarzenbergplatz 11

*29. Juli 2004*



Für den/Präsidenten:

*[Signature]*  
FOI Fabsits

BUNDESMINISTERIUM

AUSWÄRTIGE ANGELEGENHEITEN

Die Echtheit der vorstehenden  
Unterschrift und des Amtsstempels  
wird bestätigt.

Wien, am *29. JULI 2004*

*[Signature]*  
Johann SCHWANDA  
Oberkontrolleur



Bundesministerium für  
auswärtige Angelegenheiten

Gebühr in der Höhe von Euro *16,20*  
unter Prof. Nr. *5781704* eingehoben.

*29. JULI 2004*

Unterschrift







سفارت جمهوری اسلامی ایران در لندن جهت  
 مهر و امضای وزیر امور خارجه  
 راکه در سفر این برگ بهلاست (x) مشخص  
 شده بدون توجه به تدریجات متن گواهی میکند.  
 شماره ۲۵۷ تاریخ ۸ مرداد ۵۷

محمد رضا انتظامی - ایران در بیک  
 M. R. Entezari  
 First Counsellor

