

# Die gesundheitliche Unbedenklichkeit von *Penicillium caseicolum*, *P. camemberti* und *P. roqueforti*.

## II. Biologische Prüfung auf Toxinbildungsvermögen an Zellkulturen.

Von U. KRUSCH, A. LOMPE, G. ENGEL und K. E. v. MILCZEWSKI

### 1. Einleitung

Edelschimmelkäse wird unter Verwendung von *P. caseicolum*, *P. camemberti* und *P. roqueforti* als Reifungsorganismen in großem Umfange hergestellt. Da in der Literatur wiederholt über die Bildung toxischer Stoffwechselprodukte durch Schimmelpilze dieses Namens berichtet wurde (Hinweise bei [1]), sollten die genannten *Penicillium*-Arten auf ihre toxikologische Unbedenklichkeit geprüft werden. Wie bereits beschrieben wurde (1), ergaben chemisch-physikalische Untersuchungen an Extrakten aus Kulturmaterial, daß mit der Bildung von Aflatoxinen, Sterigmatocystin, Diacetoxyscirpenol, Patulin, Penicillinsäure, Ochratoxin A, Citrinin und Citreoviridin nicht zu rechnen ist. Dies schließt jedoch nicht aus, daß bisher unbekannte oder schlecht nachweisbare Schadstoffe gebildet werden, die derzeit nur auf der Basis ihrer biologischen Wirkung zu erfassen sind. Deshalb wurden Extrakte aus 36 Stämmen von *P. caseicolum*, 5 Stämmen von *P. camemberti* und 18 Stämmen von *P. roqueforti* mit einem früher beschriebenen Zellkulturtest (2) untersucht. Zusätzlich wurden Extrakte aus anderen Pilzstämmen in die Versuche einbezogen.

### 2. Material und Methoden

**Kulturen:** Neben den im vorhergegangenen Bericht (1) nach ihrer Herkunft aufgeführten 70 Pilzstämmen wurden bei dieser Untersuchung vier weitere berücksichtigt: *P. roqueforti* NRRL 849 (Stamm Nr. 6768) wurde uns freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. H. K. FRANK (Karlsruhe) überlassen; dieser Stamm bildet PR-Toxin (3, 4); der Penicillinsäurebildner *P. cyclopium* CBS 43473 (6759) und der Ochratoxinbildner *Aspergillus ochraceus* CBS 58968 (6514) wurden vom Centraalbureau voor Schimmelcultures (Baarn/Niederlande) bezogen; außerdem wurde ein weiterer Stamm von *Geotrichum* (Oospora, 6871) untersucht.

#### Biologische Prüfung

In Anlehnung an ein von uns erarbeitetes Verfahren (2) erfolgte die Prüfung der Extrakte an Kulturen von zwei Zell-Linien Flow 4000 C 2 (epithelähnlich) und Girardi Heart (ATCC-CCL 27). In Glaspetrischalen (20 cm<sup>2</sup>) wurden 2 x 10<sup>5</sup> (Flow 4000) bzw. 3 x 10<sup>5</sup> (Girardi Heart) Zellen eingesät, drei Tage vorgezchtet und anschließend nach Kulturmediumwechsel vier Tage mit extrakthaltigem Medium behandelt; zur Auswertung wurden die Zellen fixiert und mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt.

50 ml Kulturmaterial entsprechende Mengen der im Stickstoffstrom getrockneten Extrakte wurden in je 5 ml Dimethylsulfoxid gelöst, durch Filtration entkeimt, in Zellkulturmedium verdünnt und je 5 ml pro Kulturgefäß appliziert.

Pro Extrakt eines Pilzstammes wurden je 3 Kulturen der beiden Zell-Linien mit den Verdünnungen 1:100 und 1:1000 (bezogen auf den Gehalt an Extraktstoffen im Pilzkulturmaterial) behandelt. Auf Anwendung höherer Konzentrationen wurde verzichtet, um unspezifische, d. h. nicht eindeutig auf Toxinwirkung beruhende Beeinträchtigungen der Zellkulturen zu vermeiden. Die Auswertung der gefärbten Kulturen erfolgte a) durch Bestimmung der Populationsdichte (Zellzahl/Flächeneinheit) und zellmorphologischer Kriterien, b) Ermittlung von Mitosedaten (Anteil der einzelnen Mitosestadien an der Gesamtzahl

der erfaßten Mitosen) und c) des Anteils der Metaphasezellen mit Chromosomenquellung an der Zahl der bewerteten Metaphasen. Zu a) wurden wenigstens 3000 Zellen pro Kultur erfaßt, zu b) und c) wenigstens 200 Mitosestadien/Kultur. Die Daten der Parallelansätze wurden mit denen der entsprechenden Kontrollen verglichen ( $\chi^2$ -Test für b) und c), t-Test für a); signifikante Abweichungen von den Werten der Kontrollen wurden als »auffällig« bewertet.

### 3. Ergebnisse und Diskussion

Untersucht wurden Pilzstämmen aus Sammlungen und von Starterkulturherstellern (Gruppen A<sub>1</sub> bis A<sub>4</sub> in Tab. 1) sowie Isolierungen von Käse (Gruppen B<sub>2</sub> bis B<sub>4</sub>). Extrakte aus 5 Stämmen von *P. camemberti* (A<sub>1</sub>) und aus 35 Stämmen von *P. caseicolum* (A<sub>2</sub>, B<sub>2</sub>) erwiesen sich im Zellkulturtest als unwirksam. Der zunächst bei zwei Stämmen von *P. caseicolum* bestehende Verdacht auf Toxinbildungsvermögen konnte im Wiederholungsversuch mit neuen Extrakten durch überzeugend negative Befunde beseitigt werden. Der von GIBEL *et al.* (5) als toxischen verdächtige Stamm 6769 von *P. caseicolum* (Gruppe A<sub>4</sub>) zeigte im Zellkulturtest keine Wirkung; dieses Ergebnis entspricht den von FRANK *et al.* (6) im Langzeitversuch an Ratten erhaltenen negativen Befunden.

Von 7 *P. roqueforti*-Stämmen aus Starterkulturen und Sammlungen (Gruppe A<sub>3</sub>) sowie von 10 aus Käse isolierten Stämmen der gleichen Art (B<sub>3</sub>) wurden Extrakte gewonnen, die im Zellkulturtest unwirksam waren. Jedoch Extrakt aus dem wegen seines PR-Toxin-Bildungsvermögens bekannten *P. roqueforti* NRRL 849 (6768, in Gruppe A<sub>4</sub>) verursachte in Kulturen beider Zell-Linien Chromosomenquellung.

*P. roqueforti*-Stämme bilden in Hefeextrakt/Saccharosemedium offensichtlich regelmäßig Roquefortin, das bei dem hier angewendeten Extraktionsverfahren in hoher Ausbeute gewonnen wird (1); auch ist gemäß Literatur (8, 9) zu unterstellen, daß PR-Toxin in Hefeextrakt/Saccharosemedium von einem Teil der Käserei-Stämme in erheblichen Mengen gebildet werden kann und mit dem von uns angewendeten Extraktionsverfahren erfaßt wird. Für beide Verbindungen fehlen in Ermangelung ausreichender Mengen an Reinsubstanz Detailuntersuchungen über die Wirksamkeit bei Zellkulturen. Nach früheren Untersuchungen (2) an anderen Mykotoxinen ist im Zellkulturtest mit einer Zytoxidie bei Konzentrationen zu rechnen, die größenordnungsmäßig denen der im Tierversuch ermittelten LD 50-Werte entsprechen. Da die LD 50 für Roquefortin 15–20 µg/g (i. p.; Maus) und für PR-Toxin 11 µg/g (i. p.; Ratte) beträgt (10, 3), ist damit für die Empfindlichkeit der Zellkulturen ein oberer Grenzwert gesetzt; ein unterer Grenzwert für Roquefortin ergibt sich aus eigenen Untersuchungen, gemäß denen eine Menge von 0,7 µg/ml Zellkulturmedium keine erkennbaren subletalen Wirkungen hervorruft.

Neben *P. camemberti*, *P. caseicolum* und *P. roqueforti* wurde eine Anzahl weiterer Pilzstämmen untersucht. Die

Tabelle 1 Ergebnisse der Prüfung von Pilzextrakten im Zellkulturtest

Gruppe	Bezeichnung	Stamm-Nr.	Befunde bei Zellkulturen*					
			Flow 4000 C 2			Girardi Heart		
			P	Q	M	P	Q	M
A <sub>1</sub>	<i>P. camemberti</i> Thom	6739, 6752, 6743 6852, 6807	-	-	-	-	-	-
A <sub>2</sub>	<i>P. caseicolum</i> Bainier	6722, 6754, 6732 6744, 6745, 6822 6823, 6824, 6825 6826, 6827, 6828 6853, 6854, 6851 6801, 6803, 6849	-	-	-	-	-	-
A <sub>3</sub>	<i>P. roqueforti</i> Thom	6753, 6800, 6821 6848, 6829, 6830 6850	-	-	-	-	-	-
A <sub>4</sub>	<i>Penicillium</i> sp. <i>Penicillium</i> sp. <i>Penicillium</i> sp. <i>Scopulariopsis</i> <i>P. caseicolum</i> Bainier <i>P. roqueforti</i> Thom	6802 6805 6770 6806 6769 6768	- - + - - + +	- - - - - ++ +	+ - - - - - -	- - + - - - -	- - + - - + -	- - - - - - -
B <sub>2</sub>	<i>P. caseicolum</i> Bainier	6832, 6833, 6834 6836, 6835, 6840 6808, 6809, 6856 6837, 6838, 6839 6810, 6812, 6831 6855, 6841	-	-	-	-	-	-
B <sub>3</sub>	<i>P. roqueforti</i> Thom	6746, 6747, 6815 6816, 6817, 6818 6813, 6845, 6814 6846	-	-	-	-	-	-
B <sub>4</sub>	<i>Penicillium</i> sp. <i>Penicillium</i> sp. <i>Penicillium</i> sp. <i>Penicillium</i> sp. <i>Geotrichum</i> sp. <i>Geotrichum</i> sp.	6844 6842 6843 6820 6804 6857, 6811 6819, 6871	- + - - - -	- - - ++ ++ -	- + - - +/- -	- - - + + -	- - - +++ + -	- - - + + -
	<i>P. cyclopium</i> West. <i>A. ochraceus</i> Wilh.	6759 6514	+ +	+ -	- -	+ ++	+++ +++	++ +

\* Merkmal: P = Populationsdichte; Q = Chromosomenquellung; M = Mitosedaten

+ = Wirkung schwach bei Testverdünnung  $1/100$   
++ = sehr deutliche Wirkung bei Testverdünnung  $1/100$   
+++ = sehr deutliche Wirkung bei Testverdünnung  $1/1000$

Prüfung der Extrakte zweier für französische Starterkulturen verwendeter Stämme (6805 und 6806 in Gruppe A<sub>4</sub>) ergab keine Hinweise auf Toxinbildungsvermögen. Unter vier weiteren aus Käse isolierten *Penicillium*-Stämmen (Gruppe B<sub>4</sub>) waren zwei, deren Extrakte auf Zellkulturen toxisch wirkten. Einer dieser Stämme (6820), wahrscheinlich eine Kontamination auf französischem Weichkäse mit Gewürzbelag (Verpackung in Weinlaub), bildete Patulin und Citrinin (1). Der andere (6842), von Gorgonzola isoliert, lieferte einen Extrakt mit nur schwacher Wirkung (Tab. 1). Von fünf aus *Geotrichum* (*Oospora*)-Stämmen gewonnenen Extrakten rief einer (St. Nr. 6804 in Gruppe B<sub>4</sub>) Schädigungen der Zellkultur hervor. Dieser Befund ließ sich mit einem weiteren analogen Extrakt reproduzieren.

Zwei zur Kontrolle mitgeführte bekannte Toxinbildner, *P. cyclopium* (6759) und *A. ochraceus* (6514), wurden im Test durch die Wirkung ihrer Extrakte eindeutig erfaßt;

dies bestätigt, daß zur Prüfung von Rohextrakten der Zellkulturtest geeignet ist. Seiner Brauchbarkeit zum Nachweis von Mykotoxinen sind an anderer Stelle umfangreiche Untersuchungen gewidmet (2); bekannte, wegen ihrer chronischen und/oder carcinogenen Wirkung gefürchtete Mykotoxine ließen sich mit außerordentlich hoher Empfindlichkeit nachweisen, die die chemischen Methoden z. T. übertraf (Tab. 2). Es ist zu erwarten, daß diese hohe Empfindlichkeit auch gegenüber anderen chronisch wirkenden Mykotoxinen besteht. Aufgrund chemisch-physikalischer Analysen konnten keine befriedigenden Aussagen über das Vorkommen von Rubratoxin B im Kulturmaterial von *P. caseicolum* und *P. roqueforti* gemacht werden (1). Aus den Befunden des Zellkulturtests ist abzuleiten, daß weniger als  $1 \mu\text{g/ml}$  im Kulturmaterial enthalten waren, d. h. bei den genannten Arten ist praktisch nicht mit einer Rubratoxinbildung zu rechnen.

Tabelle 2 Nachweisgrenzen für Mykotoxine im Zellkulturtest (zitiert nach [2])

Mykotoxin	Wirkungsmerkmal im Tierversuch <sup>2)</sup>	Zytozidie		Grenzkonzentration <sup>1)</sup> der Wirkung nachgewiesen durch		Chromosomenquellung	
		a <sup>3)</sup>	b <sup>3)</sup>	Mitosedaten a	b	a	b
Aflatoxin B <sub>1</sub>	C, H	3 x 10 <sup>-6</sup>	1 x 10 <sup>-5</sup>	3 x 10 <sup>-8</sup>	(1 x 10 <sup>-10</sup> ) <sup>4)</sup>	3 x 10 <sup>-10</sup>	≤ 1 x 10 <sup>-11</sup>
G <sub>1</sub>	C, H	1 x 10 <sup>-5</sup>	> 3 x 10 <sup>-5</sup>	1 x 10 <sup>-7</sup>	1 x 10 <sup>-7</sup>	1 x 10 <sup>-8</sup>	≤ 3 x 10 <sup>-7</sup>
G <sub>2</sub>	C, H	3 x 10 <sup>-5</sup>	> 3 x 10 <sup>-5</sup>	1 x 10 <sup>-6</sup>	1 x 10 <sup>-6</sup>	1 x 10 <sup>-8</sup>	n. t. <sup>5)</sup>
Sterigmatocystin	C, H	3 x 10 <sup>-6</sup>	3 x 10 <sup>-6</sup>	1 x 10 <sup>-7</sup>	(3 x 10 <sup>-9</sup> )	3 x 10 <sup>-9</sup>	≤ 1 x 10 <sup>-10</sup>
Patulin	C	1 x 10 <sup>-6</sup>	3 x 10 <sup>-7</sup>	≤ 3 x 10 <sup>-9</sup>	1 x 10 <sup>-7</sup>	1 x 10 <sup>-8</sup>	1 x 10 <sup>-8</sup>
Penicillinsäure	C	6 x 10 <sup>-5</sup>	6 x 10 <sup>-5</sup>	2 x 10 <sup>-6</sup>	(6 x 10 <sup>-8</sup> )	6 x 10 <sup>-8</sup>	≤ 2 x 10 <sup>-8</sup>
Diacetoxyscirpenol		1 x 10 <sup>-8</sup>	3 x 10 <sup>-8</sup>	3 x 10 <sup>-10</sup>	(1 x 10 <sup>-10</sup> )	1 x 10 <sup>-10</sup>	1 x 10 <sup>-10</sup>
Ochratoxin A	N+H	3 x 10 <sup>-5</sup>	3 x 10 <sup>-5</sup>	≤ 1 x 10 <sup>-7</sup>	(1 x 10 <sup>-7</sup> )	n. t.	n. t.
Rubratocin B	H, N, T	3 x 10 <sup>-5</sup>	> 3 x 10 <sup>-5</sup>	3 x 10 <sup>-7</sup>	3 x 10 <sup>-6</sup>	≤ 1 x 10 <sup>-8</sup>	3 x 10 <sup>-8</sup>
Citrinin	N	2 x 10 <sup>-4</sup>	2 x 10 <sup>-4</sup>	6 x 10 <sup>-6</sup>	(2 x 10 <sup>-5</sup> )	6 x 10 <sup>-6</sup>	≤ 2 x 10 <sup>-8</sup>
Citreoviridin			4 x 10 <sup>-5</sup>		4 x 10 <sup>-6</sup>		4 x 10 <sup>-6</sup>

<sup>1)</sup> Konzentrationsangaben in g/ml Zellkulturmedium

<sup>2)</sup> C = Carcinogen; H = Hepatotoxin; N = Nephrotoxin; T = Teratogen

<sup>3)</sup> Versuchsdaten ermittelt an a = Girardi Heart, b = Flow 4000

<sup>4)</sup> Werte in Klammern = nur sporadisch beobachtete Auffälligkeiten

<sup>5)</sup> n. t. = nicht geprüft

Diese Untersuchung wurde durch Gewährung zusätzlicher Mittel des Bundesministeriums für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten ermöglicht.

#### 4. Literatur

- (1) ENGEL, G., v. MILCZEWSKI, K. E.: *Milchwissenschaft* **32**, 517–520 (1977).
- (2) v. MILCZEWSKI, K. E., KRUSCH, U.: *Kieler Milchw. Forschungsber.* **28**, 391–457 (1976).
- (3) WEI, R.-D., STILL, P. E., SMALLEY, E. B., SCHNOES, H. K., STRONG, E. M.: *Appl. Microbiol.* **25**, 111–114 (1973).
- (4) ORTH, R.: *Z. Lebensmittel-Unters.-Forsch.* **160**, 131–136 (1976).
- (5) GIBEL, W., WEGNER, K., WILDNER, G. P.: *Arch. Geschwulstforsch.* **38**, 1–6 (1971).
- (6) FRANK, H. K., ORTH, R., IVANKOVIC, S., KUHLMANN, M., SCHMÄHL, D.: *Experientia* **33**, 515–520 (1977).
- (7) SAITO, M., OHTSUBO, K., UMEDA, M., ENOMOTO, M., KURATA, H., UDAGAWA, S., SAKABE, F., ICHINOE, M.: *Japan. J. Exp. Med.* **41**, 1–20 (1971).
- (8) PIVA, M. Th., GUIRAUD, J., CROUZET, J., GALZY, P.: *Le Lait* No. 557, 397–406 (1976).
- (9) SCOTT, P. M., KENNEDY, B. P. C., HARNIG, J., BLANCHFIELD, B. J.: *Appl. Environm. Microbiol.* **33**, 249–253 (1977).
- (10) FRAYSSINET, G., FRAYSSINET, Ch.: cit. SCOTT, P. M., MERRIEN, M. A., POLONSKY, J.: *Experientia* **32**, 140–142 (1976).

#### 5. Zusammenfassung

KRUSCH, U., LOMPE, A., ENGEL, G., v. MILCZEWSKI, K. E.: **Die gesundheitliche Unbedenklichkeit von *Penicillium caseicola*, *P. camemberti* und *P. roqueforti*. II. Biologische Prüfung auf Toxinbildungsvermögen an Zellkulturen.** *Milchwissenschaft* **32**, (12) 713–715 (1977).

##### 56 *Penicillium* (Mycotoxinbildung).

36 Stämme von *P. caseicola*, 5 von *P. camemberti* und 18 von *P. roqueforti* wurden auf ihre Fähigkeit zur Bildung von Toxinen mittels eines biologischen Tests untersucht: Nach Vorzucht der *Penicillien* bei 27° C auf Hefeextrakt/Saccharose wurde das Kulturmaterial extrahiert; mit den Extrakten wurden Zellkulturen menschlicher Herkunft für die Dauer von 4 Tagen behandelt und histologisch bewertet. Dabei ergaben sich keine Hinweise auf ein

Toxinbildungsvermögen von *P. caseicola* und *P. camemberti*. Bei *P. roqueforti* erwies sich einer von 18 Stämmen als toxisch; es handelt sich um einen Stamm, über dessen PR-Toxin-Bildungsvermögen in der Literatur berichtet wird. Dok.-Ref.

KRUSCH, U., LOMPE, A., ENGEL, G., v. MILCZEWSKI, K. E.: ***Penicillium caseicola*, *P. camemberti* and *P. roqueforti* and their harmlessness to human health. II. Biological testing of toxin formation ability on cell cultures.** *Milchwissenschaft* **32**, (12) 713–715 (1977).

##### 56 *Penicillium* (mycotoxin formation).

36 strains of *P. caseicola*, 5 of *P. camemberti* and 18 of *P. roqueforti* were examined by biological tests for their ability to form toxins. The microorganisms were cultivated on a yeast-extract-sucrose medium at 27° C. Human cells were treated with culture extract for four days and then examined histologically. No toxin formation by *P. caseicola* or *P. camemberti* was detected. One of the 18 strains *P. roqueforti* was toxigenic. The formation of PR toxin by the latter strain has been reported in the literature.

KRUSCH, U., LOMPE, A., ENGEL, G., v. MILCZEWSKI, K. E.: **L'innocuité pour la santé humaine de *Penicillium caseicola*, *P. camemberti* et *P. roqueforti*. II. Examen biologique quant à leur pouvoir de former des toxines dans des cultures cellulaires.** *Milchwissenschaft* **32**, (12) 713–715 (1977).

##### 56 *Penicillium* (formation de mycotoxines).

KRUSCH, U., LOMPE, A., ENGEL, G., v. MILCZEWSKI, K. E.: **I inocuidad para la salud humana de *Penicillium caseicola*, *P. camemberti* y *P. roqueforti*. II. Examen biológico de su poder de producir toxinas en culturas de células.** *Milchwissenschaft* **32**, (12) 713–715 (1977).

##### 56 *Penicillium* (producción de micotoxinas).