

# Entwicklung einer elektronischen Nase zur Erkennung von Fusarienpilzen im Weizen

Jakob Eifler, Jens Wegener, Dieter v. Hörsten

Department für Nutzpflanzenwissenschaften, Abteilung Agrartechnik  
Georg-August-Universität Göttingen  
Gutenbergstr. 33  
37075 Göttingen  
jeifler@uni-goettingen.de

**Abstract:** Weizen hat weltweit die größte Anbaubedeutung und trägt massiv zur Ernährungssicherung bei. Fusarienpilze sind hierbei einer der wichtigsten pathogenen Pflanzenerreger, die bei Befall große ökonomische und toxikologisch bedenkliche Bedrohungen darstellen. Eine Möglichkeit Fusarien zu erkennen besteht in der Detektion ihrer volatilen Stoffwechselprodukte. Elektronische Nasen, ein Verbund aus Multigassensoren, sind in der Lage den olfaktorischen, pilzlichen Fingerabdruck zu erkennen und mit Referenzen zu vergleichen. Dadurch wird eine schnelle, präzise und zerstörungsfreie Identifikation der Schadpilze im Nacherntebereich möglich.

## 1 Einleitung

Fusarien gehören zu den wichtigsten pathogenen Pflanzenerregern weltweit [PJM95]. Sie sind ubiquitär und in allen großen europäischen Anbauregionen zu finden. Von besonderer Bedeutung sind dabei die Spezies *Fusarium graminearum* und *Fusarium culmorum*, die in Europa am häufigsten auftreten und aufgrund ihrer toxischen Sekundärmetaboliten eine Gefahr für die menschliche und tierische Gesundheit darstellen. Im Weizen sind das vor allem die Toxine Zearalenone (ZEA) und Deoxynivalenol (DON), die schon in kleinsten Mengen gesundheitsschädlich wirken. Untersuchungen in Deutschland belegen, dass nur 1,6% aller getreidebasierten Produkte komplett frei von Fusarientoxinen sind [Sc06]. Die FAO hat deshalb Grenzwerte für den Fusarien-Mykotoxingehalt in Lebens- und Futtermitteln festgelegt [VJ04]. In dessen Folge ist eine zeitige, schnelle und präzise Erkennung von infiziertem Getreide unbedingt erforderlich. Derzeitige Methoden zielen darauf ab, entweder den Mykotoxingehalt direkt oder den Pilzgehalt zu bestimmen. Dennoch sind alle benutzten Methoden laborbasiert und demnach zeitaufwändig und teuer. Ein interessanter Ansatz, der in den letzten Jahren an Bedeutung gewann, ist die Benutzung olfaktorischer Sensoren, die verschiedene, flüchtige Verbindungen detektieren können. Ziel der Arbeit ist es daher, mittels elektronischer Gassensoren die flüchtigen Bestandteile von Fusarienpilzen zu detektieren.

## 2 Flüchtige, pilzliche Verbindungen

Eine Methode pilzliche Schaderreger zu erkennen, ist die Analyse des Geruchs durch Testpersonen [Ev00]. Hervorgerufen wird dieser charakteristische Geruch durch die Zusammensetzung vieler verschiedener mikrobieller flüchtiger Verbindungen (MVOCs). Börjesson et al. [Bö89] haben dabei insbesondere Monoterpene, Sesquiterpene, 2,4-Dimethylhexan und 2,3,5-Trimethylhexan als spezifische MVOCs für *Fusarium culmorum* identifiziert. Dennoch verändert sich die Gaszusammensetzung in Abhängigkeit verschiedener Umweltparameter. So zeigten Pasanen et al. [PLP96], dass die Gaszusammensetzung nicht nur pilzlich bedingt ist, sondern auch von dem Substrat beeinflusst wird auf dem der Pilz wächst. Auch Börjesson et al. [Bö89] bemerkten eine veränderte MVOC-Zusammensetzung durch Benutzung eines anderen *Fusarium culmorum* Stammes. Diese Ergebnisse zeigen, dass flüchtige organische Verbindungen zur Identifikation von Pilzarten und Pilzstämmen genutzt werden können.

## 3 Aufbau und Prinzip der elektronischen Nase

Nach Gardner und Bartlett [GB99] ist eine "Elektronische Nase" eine Anordnung elektro-chemischer Sensoren mit partieller Spezifität und einem Mustererkennungssystem, welches einfache und komplexe Gerüche erkennen kann. Demnach kann solch ein Ensemble von Sensoren zwischen verschiedenen qualitativen und quantitativen Gasmischungen unterscheiden. Der Aufbau einer elektronischen Nase imitiert den natürlichen Aufbau einer Säugetiernase. Um Geruch wahrzunehmen, werden die Geruchsmoleküle in der natürlichen Nase zunächst inhaliert und interagieren dann mit den Rezeptorzellen in der Schleimhaut. Durch die Interaktion entsteht ein elektrisches Signal, welches über Nervenzellen vorverarbeitet und ans Gehirn weitergeleitet wird. In der elektronischen Nase werden die Gasmoleküle über eine Pumpe angesaugt. Das zentrale Element ist ein Verbund aus verschiedenen Sensoren, die als Rezeptor und Signalumwandler fungieren. Jeder Sensor ist dabei jeweils auf andere Gasmoleküle sensitiv. Durch die Interaktion der Sensoroberfläche mit dem Gasmolekül wird eine Änderung ihrer physikalischen Eigenschaft hervorgerufen. Diese Änderung ist letztlich in einem elektrischen Signal messbar, verstärkbar und durch eine Auswertungseinheit analysierbar. Durch die technische Anpassbarkeit der Sensoroberfläche ist es ebenfalls möglich diese für Nicht-Geruchsstoffe, wie beispielweise Kohlenmonoxid, sensitiv zu gestalten und damit spezifischer auszulegen, als das biologische Duplikat. Allerdings ist es aufgrund der hohen Rezeptor Anzahl und dem schnellen Umsatz dennoch technisch kaum möglich eine biologische Nase korrekt nachzuempfinden.

Für die Signalumwandlung wurden mehrere Prinzipien entwickelt. Der am weitesten verbreitete und älteste Typ ist der Metalloxidsensor (MOS). Dieser basiert auf einer Metalloxidoberfläche die ihren Widerstand ändert sobald Gasmoleküle mit ihr in Interaktion treten. Häufig werden Oxide ( $\text{SnO}_2$ ,  $\text{ZnO}$ ,  $\text{TiO}_2$ ,  $\text{F}_2\text{O}_3$ ) verwendet die mit katalytischen Metallen wie Palladium oder Platin versetzt sind.

Wird die Metalloxidschicht stark erhitzt (200-500°C), so werden an der Oberfläche Sauerstoffmoleküle ionisiert ( $\text{O}_2^-$ ). Die dabei absorbierten Elektronen verringern den elektri-

schen Widerstand. Sobald andere Gasmoleküle an die Oberfläche gelangen, reagieren die hochreaktiven Sauerstoffionen ( $O_2^-$ ) mit diesen und geben Elektronen ab. Der Widerstand sinkt. Vorteile dieses Sensortyps sind die Robustheit und die geringe Feuchteabhängigkeit [HK98].

Eine weitere Möglichkeit der Gaserkennung erfolgt über Schwingquarzsensoren (QCM). Diese bestehen aus einem Monokristallquarz, der mit Elektroden versehen ist. Eine Änderung der Masse auf der Quarzoberfläche verändert nun die mechanischen Eigenschaften des Quarzes und ruft eine Änderung der elektrischen Resonanzfrequenz in Abhängigkeit der anhaftenden Masse hervor. Dabei kann schon eine geringe Massenänderung von wenigen Nanogramm zu einer messbaren Frequenzänderung führen. Wird die Quarzoberfläche mit einer selektiven Beschichtung versehen, können sich an der Oberfläche selektiv Gasmoleküle anlagern und eine Frequenzänderung hervorrufen. Oftmals besteht diese Beschichtung aus Palladium, Platin, Gold oder verschiedenen Polymeren. Dabei lässt sich durch die Art der Beschichtung die Selektivität präzise einstellen. Außerdem arbeiten QCM-Sensoren optimal bei Raumtemperatur, wodurch Oxydationseffekte vermieden werden [Ba97]. Neben den genannten Sensorprinzipien sind noch eine Reihe anderer Typen (u.a. CP, MOSFET, SAW) verfügbar, die allerdings bislang nicht in kommerziellen Systemen eingesetzt werden.

Im getesteten Versuchsaufbau gibt es neben dem MOS-Sensorarray eine Vakuumpumpe am Ende des Systems, um den Luftstrom zu gewährleisten und Kontamination durch die Pumpe selbst auszuschließen. Am Eingang zum Sensorarray ist eine Leitung mit der Probenkammer verbunden, in der sich die zu untersuchende Probe befindet. Der Geruch kann sich hier zunächst anreichern. Von da aus werden die Gase abgesaugt und zum Sensorarray geleitet. Durch das Nachströmen gereinigter Umgebungsluft bzw. Carrier Gases in die Probenkammer wird ein Unterdruck im System vermieden. Das elektrische Signal eines jeden Sensors ist abhängig von verschiedenen Kriterien. So spielen neben der Zeit, das Carrier Gas, das Sensormaterial und die Charakteristik der einwirkenden Gasmoleküle eine Rolle. Deshalb werden die Signale zunächst normalisiert und skaliert um das Hintergrundrauschen zu unterdrücken. Aus dem bereinigten Signal wird dann das entscheidende Merkmal, welches die Information zur Gaskonzentration bzw. -zusammensetzung trägt, extrahiert. All diese nunmehr zeitunabhängigen Signale ergeben ein elektronisches Profil der Gaskomposition. Vergleich man dieses Profil mit Referenzstandards kann man die Probe identifizieren.

Wenige Arbeiten zur Fusarienerkennung sind in der Literatur verfügbar. So zeigen Keshri und Magan [KM00], dass die qualitative Unterscheidung von verschiedenen *Fusarium verticilloides* Isolaten auf Weizenmehl untereinander, sowie die Abgrenzung zu nicht-befallenen Proben möglich ist. Dennoch konnte der Befallsgrad nicht ermittelt werden. Tognon et al. [To05] versuchte diesbezüglich den DON-Gehalt ganzer Weizenkörner mit einer elektronischen Nase zu bestimmen. Das Ergebnis waren Cluster mit verschiedenen DON-Bereichen, einer mit weniger als  $1 \mu\text{g DON/kg}$ , einer mit  $0,035$  bis  $1330 \text{ mg DON/kg}$  und ein Cluster, der alle Proben größer  $2130 \text{ mg DON/kg}$  enthielt.

Demnach konnte zwar zwischen DON-kontaminiert und nicht-kontaminiert unterschieden, der interessanteste Bereich zwischen 0,035 und 1330 mg DON/kg, indem sich der gesetzliche Grenzwert befindet, aber nicht genauer aufgelöst werden.

## 4 Schlussfolgerungen und Ausblick

Für die Entwicklung einer elektronischen Nase zur Fusarienerkennung ist es notwendig die Sensoren und Sensortypen zielgerichtet auf die Endanwendung abzustimmen. Dazu ist das Wissen um die analytischen Daten und die abgesonderten Gase von Fusarienpilzen unabdingbar. Eine Identifizierung und Unterscheidung der Pilze, bis hin zu verschiedenen Pilzstämmen scheint möglich. Durch die zerstörungsfreie und kontaktlose Analyse ist eine online Messung ganzer Getreidekörner in Echtzeit denkbar. Dennoch ist die Quantifizierung des Befallsgrades sehr schwierig und die Verbesserung der Sensoren hinsichtlich Selektivität und Sensitivität und eine umfangreichere Charakterisierung, besonders im Hinblick auf *F. culmorum* und *F. graminearum* notwendig. Es ist für die weitere Forschung geplant zunächst unter kontrollierten Bedingungen spezifische Fusariengase zu identifizieren um anschließend gezielt entsprechende Sensoren auszuwählen.

## Literaturverzeichnis

- [Ba97] Ballantine, D.S. et al.: Acoustic wave sensors: theory, design and physico-chemical applications. Academic Press, 1997.
- [Bö89] Börjesson, T. et al.: Analysis of Volatile Compounds for Detection of Molds in Stored Cereals. Cereal Chemistry, 66(4), 1989, S. 300 – 304.
- [Ev00] Evans, P. et al.: A Dedicated Wheat Odour Quality Measurement System. In (Gardner, J.W.; Persaud K.C. Hrsg.): Electronic Noses and Olfaction 2000, Institute of Physics Publishing Bristol and Philadelphia, 2000, S.211-216
- [GB99] Gardner, J.W.; Bartlett, P.N.: Electronic Noses: Principles and Applications. Oxford: Oxford University Press, 1999.
- [HK98] Haugen, J.; Kvaal, K.: Electronic Nose and Artificial Neural Network. Meat Science, 49, 1998, S. 273 – 286.
- [KM00] Keshri, G.; Magan, N.: Detection and differentiation between mycotoxigenic and non-mycotoxigenic strains of two *Fusarium* spp. using volatile production profiles and hydrolytic enzymes. Journal of Applied Microbiology, 89, 2000, S. 825 – 833.
- [PJM95] Parry, D.W.; Jenkinson P.; McLeod, L.: Fusarium ear blight (scab) in small grain cereals; a review. Plant Pathology, 44, 1995, S. 207-238.
- [PLP96] Pasanen, A.; Lappalainen, S.; Pasanen, P.: Volatile Organic Metabolites Associated With Some Toxic Fungi and Their Mycotoxins. The Analyst, 121, 1996, S. 1949 – 1953.
- [Sc06] Schollenberger, M. et al.: Natural Occurrence of 16 Fusarium Toxins in Grains and Feedstuffs of Plant Origin from Germany. Mycopathologia, 161, 2006, S. 43-52.
- [To05] Tognon, G. et al.: Implementation of the Electronic Nose for the Identification of Mycotoxins in Durum Wheat (*Triticum durum*). Veterinary Research Communications, 29, 2005, S. 391 – 393.
- [VJ04] Van Egmond, H.P.; Jonker, M.A.: Worldwide Regulations for Mycotoxins in Food and Feed in 2003. FAO Food and Nutrition Paper, 81, 2004.