

6. Zusammenfassung

Mit der vorliegenden Untersuchung sollte geprüft werden, ob eine Belastung von Futtermitteln mit Schimmelpilzen der Gattungen *Aspergillus* und *Penicillium* anhand der von ihnen gebildeten extrazellulären Polysaccharide (EPS) mit Hilfe eines immunologischen Nachweisverfahrens erkannt und beurteilt werden kann. Hierzu wurde ein kommerziell erhältliches ELISA-System (RIDASCREEN® Mould A/P) verwendet, mit dem die hitzestabilen, wasserlöslichen und zwischen *Aspergillen* und *Penicillien* kreuzreagierenden EPS nachgewiesen werden können.

Für die vorliegende Arbeit standen Proben von insgesamt 237 Futtermitteln (Getreide, weitere Einzel- sowie Mischfuttermittel) aus dem Einsendungskollektiv des Instituts zur Verfügung. Daneben erstreckten sich die Untersuchungen auf 27 Proben von Futtermitteln aus experimentell induziertem Verderb. Generell wurden alle Futtermittel einer intensiven Sinnenprüfung unterzogen; in 72 Proben erfolgte parallel eine mykologische Untersuchung (kulturelles Verfahren).

Von den gemahlten Futterproben wurde 1 g in 50 ml PBS-T-Pufferlösung gegeben, die Suspension 1 h bei 80°C inkubiert, anschließend gemischt, filtriert und das EPS-haltige Filtrat je nach Belastung verdünnt. Die Kalkulation des EPS-Gehaltes erfolgte anhand des Vergleichs zur parallel mitbestimmten Standardkurve.

Im ersten Teil der Arbeit standen methodische Fragen hinsichtlich des ELISA-Systems (Wiederholbarkeit, Wiederfindung, Parallelität) sowie der Probenvorbereitung im Vordergrund, während es im zweiten Teil um die EPS-Gehalte in Abhängigkeit von Art und Qualität des Futtermittels ging. Schließlich interessierten mögliche Korrelationen zwischen den ermittelten EPS-Gehalten und parallel vorliegenden Befunden aus der Sinnenprüfung und mykologischen Untersuchung.

Die wesentlichen Ergebnisse können folgendermaßen zusammengefaßt werden:

- **Wiederholbarkeit**

Bei wiederholtem Einsatz unterschiedlich belasteter Proben auf einem Testkit waren die Abweichungen der EPS-Gehalte gering (Intraassay-Variationskoeffizient 7,3%); beim Vergleich von Proben mit unterschiedlichen Testkits variierte der EPS-Gehalt bis 15%, vereinzelt - besonders bei geringen EPS-Gehalten - auch bis zu 30%.

- **Wiederfindung**

Nach Zulagen (n = 30) definierter EPS-Mengen (4 - 50 mg EPS/kg) zu Einzel- sowie Mischfuttermitteln betrug die mittlere Wiederfindungsrate ca. 97% (bei Abweichungen von 66% bis 142%). Wurden zwei Futtermittel mit unterschiedlichen EPS-Gehalten gemischt, so ergaben sich in der Mischung die rechnerisch erwarteten EPS-Gehalte (d.h. additives Verhalten).

- Parallelität

Besonders bei stark belasteten Futtermitteln verliefen die Verdünnungsreihen von Standard und Probe nicht parallel, so daß in Abhängigkeit von der Verdünnungsstufe der EPS-Gehalt in der Probe anstieg. Obwohl sich in der Regel bei ausreichender Verdünnung ein gewisses Plateau einstellte, wurde aus Gründen der Praktikabilität und Kostenminimierung ein definiertes Verfahren mit Verdünnungsstufen von 1 : 100 und 1 : 500 gewählt, so daß die tatsächlichen Gehalte stark EPS-belasteter Proben vermutlich noch höher liegen als hier allgemein ausgewiesen.

- Vergleich mit Befunden aus der Sinnesprüfung

Für Getreide konnte zwischen der Beurteilung nach der Sinnesprüfung und dem EPS-Gehalt eine gute Übereinstimmung ermittelt werden; bei Mischfuttermitteln war diese weniger deutlich. In sensorisch unauffälligen Getreideproben lagen generell niedrige EPS-Gehalte ($< 3 \text{ mg/kg}$) vor, während in Proben mit deutlich erkennbaren Mängeln - bis auf 2 Ausnahmen - Werte von $> 20 \text{ mg/kg}$, bei hochgradigem Schimmelpilzbesatz (Getreidekörner rasenförmig mit Schimmel überdeckt) auch bis zu $1,7 \text{ g/kg}$ (setzte allerdings eine Verdünnung von 1 : 250.000 voraus) festgestellt wurden.

- Vergleich mit Ergebnissen aus der mykologischen Untersuchung

Mit steigender Zahl koloniebildender Einheiten von *Aspergillen* und *Penicillien* wurden allgemein auch höhere EPS-Gehalte nachgewiesen. Futterproben aus experimentell induziertem Verderb (Keimzahlen zwischen 10^6 und 10^9 pro g, überwiegend *Asp. spp.*) wiesen - bis auf 2 Ausnahmen - EPS-Gehalte von $> 20 \text{ mg/kg}$ (kalkuliert aus einer Verdünnung von 1 : 500) auf; in ca. 5% der Proben konnten trotz eines hohen Besatzes mit *Aspergillus spp.* und *Penicillium spp.* ($> 2 \times 10^5 \text{ KbE/g}$) nur EPS-Gehalte von weniger als 20 mg/kg ermittelt werden. In ca. 8% der Proben mit geringen Keimzahlen ($< 10^4 \text{ KbE/g}$) im kulturellen Nachweis wurden relativ hohe EPS-Gehalte ($> 20 \text{ mg/kg}$) festgestellt (nicht mehr vermehrungsfähige Pilze?).

Wegen der besonderen Bedeutung der Schimmelpilze der Gattungen *Aspergillus* und *Penicillium* für den Verderb von Futtermitteln und für eine mögliche Kontamination mit Mykotoxinen dürfte das hier geprüfte diagnostische Verfahren eine wertvolle Ergänzung etablierter Methoden zur Charakterisierung des Hygienestatus von Futtermitteln darstellen, wobei als besondere Vorteile der geringe Zeitaufwand und die Erfassung nicht mehr vermehrungsfähiger Pilze Erwähnung verdienen.

7. Summary

Susanne Jaeckel Studies on the detection of *Aspergillus sp.* and *Penicillium sp.* in feedstuffs by their extracellulare polysaccharides with a sandwich-enzyme-immunoassay.

In the present study, it was tested whether the load by moulds of the genera *Aspergillus* and *Penicillium* in feedstuffs could be determined by their extracellulare polysaccharides (EPS) they produce using immunological methods. A commercially available ELISA-system (RIDASCREEN® Mould A/P) was used, which is able to detect a heat-stable and watersoluble EPS that crossreacts between *Aspergillus* and *Penicillium*.

A total of 237 samples of feedstuffs (grain, further ingredients, complete feeds and supplements) collected from samples sent to the institute were investigated. In addition, 27 samples of experimentally induced spoilage were examined. In general, all of the feedstuffs were subjected to intensive sensoric examinations and 72 samples were also examined mycologically (cultural method).

The samples were ground and 1 g was suspended in 50 ml PBS-T-buffer. After an incubation for 1 h at 80°C, the suspension was remixed and filtrated. The EPS-containing filtrate was diluted according to its load by moulds. The quantity of EPS in the sample was then calculated by comparing the extinction with an also determined standard curve.

In the first part of the study, mainly methodological questions regarding the ELISA-system (repeatability, rate of recovery, parallelism) and the method of sample preparation were considered. On the other hand, the EPS-content in feedstuffs according to their type and quality was determined in the second part of the study. Finally, possible correlations between the determined EPS-contents and the results from sensoric and mycologic examinations were of interest.

The main results of the study can be summarized as follows:

- Repeatability

If samples of varying content of moulds were tested repeatedly in one testkit, the variation of EPS-contents were low (intraassay variation coefficient 7.3%). If different testkits were compared, the EPS-content varied up to 15% and occasionally, especially in samples with low EPS-content, up to 30%.

- Rate of recovery

The average recovery rate after adding defined amounts of EPS (4 - 50 mg EPS /kg) to ingredients and complete feeds (n = 30) was 97% (with a range from 66 to 142%). If mixing two sorts of feeds with different EPS-contents, the EPS-content of the mixture was identical with the content expected from calculation (additive behaviour).

- **Parallelism**

Especially in feedstuffs with high mould burdens, the dilution curves of standard and samples were not parallel which resulted in an increase of EPS-content in the sample when increasing the dilution. Even so a certain plateau could be found if the sample was diluted sufficiently, a defined method with dilutions of 1 : 100 and 1 : 500 was chosen for reasons of practicability and minimizing of costs. Therefore, the actual EPS-content of samples with high loads by moulds are greater than identified here.

- **Comparison with results of sensoric examinations**

The results of sensoric examinations and EPS-contents were corresponding well for grain. This was less obvious for mixed feeds. Generally, sensorically good grain samples had low EPS-contents (< 3 mg/kg), whereas samples with easily recognizable inadequacies (with 2 exceptions) had EPS-values > 20 mg/kg. In samples with extremely high loads by moulds (grain seeds completely covered with moulds) EPS-contents up to 1.7 g/kg were found (this required a dilution of 1 : 250,000).

- **Comparison with results of mycologic examinations**

With increasing numbers of colony forming units of *Aspergillus* and *Penicillium spp.*, in general, rising EPS-contents could be detected. Samples of experimentally induced spoilage (microbial counts of 10^6 to 10^9 per g, predominantly *Aspergillus spp.*) had - with 2 exceptions - EPS-contents > 20 mg/kg (calculated on a basis of a dilution of 1 : 500). In about 5% of the samples EPS-contents < 20 mg/kg were found despite high infestations with *Aspergillus* and *Penicillium spp.* (> 2×10^5 CFU/g). In about 8% of the samples high EPS-contents (> 20 mg/kg) were determined even though the microbial count (< 10^4 CFU/g) was low (non-viable fungi?).

Because of the particular importance of moulds of the genera *Aspergillus* and *Penicillium* concerning the spoilage of feedstuffs and possible contaminations with mycotoxins, the diagnostic procedure tested here can be a valuable addition to established methods for characterizing the hygienic status of feedstuffs. As particular advantages, the possibility to obtain fast results and the detection of non-viable fungi has to be mentioned.