

6. Zusammenfassung

Der Einfluß von mit *Cladosporium herbarum* bzw. *Fusarium graminearum* verpilztem Heu auf die Fermentationsvorgänge im Pansen, insbesondere auf den Thiaminstoffwechsel, wurde mit Hilfe des Langzeitinkubationssystems RUSITEC untersucht.

Sechs Versuchsläufe mit einer Dauer von jeweils 25 Tagen wurden durchgeführt. Hierbei wurden die Fermenter während des sechstägigen Vorlaufs und der dreitägigen Kontrollphase mit Heu von einwandfreier Qualität beladen. In der fünftägigen Testphase I wurde eine Mischung von einwandfreiem und verschimmeltem Heu verfüttert, in der anschließenden fünftägigen Testphase II wurde zusätzlich eine Menge von 0,3 mg Thiamin pro Fermenter und Tag zugesetzt. In der abschließenden Nachlaufphase wurde erneut einwandfreies Heu eingesetzt.

Zur Kontrolle der Fermentation wurden die folgenden Parameter ermittelt: pH-Wert, Ammoniakgehalt, Gasproduktion und -zusammensetzung, Cellulaseaktivität, Proteingehalt der Bakterienfraktion, flüchtige Fettsäuren sowie Thiamin- und Thiaminderivatgehalt (in Fraktionen).

Einige mikrobielle Fermentationsparameter wurden weder durch *Cladosporium*- noch durch *Cladosporium*-/Thiamin-Inokulation beeinflusst: pH-Wert, Ammoniakkonzentration, Gasproduktion, Methanproduktion, CO₂-Produktion, Essigsäure, *i*-Buttersäure und *i*-Valeriansäure. Folgende Auswirkungen von *Cladosporium herbarum* bzw. *Cladosporium herbarum* plus Thiamin auf das Fermentationsgeschehen (s. Tab. 6.1) und den Thiaminstoffwechsel (s. Tab. 6.2) konnten beobachtet werden:

Tab. 6.1. Veränderungen ruminaler Fermentationsparameter unter *Cladosporium*- bzw. unter *Cladosporium*-/Thiamineinfluß (in % gegenüber Inokulation mit autoklaviertem Heu bzw. autoklaviertem Heu/Thiamin)

| Parameter | <i>Cladosporium</i> + gegen <i>Cladosporium</i> - | <i>Cladosporium</i> +/Thiamin + gegen <i>Cladosporium</i> -/Thiamin + |
|-------------------------|---|---|
| Cellulase- aktivität | ± 0 | bis zu - 17,0 |
| bakt Protein | bis zu - 4,24 (p < 0,05) | bis zu - 22,6 (p < 0,05) |
| Propionsäure | bis zu - 5,91 | ± 0 |
| <i>n</i> -Buttersäure | ± 0 | bis zu + 7,65 (p < 0,01) |
| <i>n</i> -Valeriansäure | bis zu - 3,60 (p < 0,05) | bis zu - 8,53 (p < 0,05) |
| Hexansäure | bis zu - 9,30 (p < 0,05) | ± 0 |
| Summe der FIFS | bis zu - 4,91 | bis zu + 4,03 (p < 0,05) |

Tab. 6.2: Veränderungen der in verschiedenen Pansenfraktionen gemessenen TDP-, TMP-, Thiamin- sowie Gesamthiaminkonzentrationen während der Inokulation von Cladosporium bzw. Cladosporium plus Thiamin (in % gegenüber Inokulation mit autoklaviertem Heu bzw. autoklaviertem Heu/Thiamin)

| | | TDP | TMP | Thiamin | Gesamthiamin |
|--------------------------------------|--|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| Fermenterflüssigkeit | Cladosporium + gegen Cladosporium - | ± 0 | ± 0 | ± 0 | ± 0 |
| | Cladosporium +/-Thiamin + gegen Cladosporium -/Thiamin + | bis - 7,26 (p < 0,01) | ± 0 | bis + 8,26 | ± 0 |
| Pflanzen- u. Protezenfraktion | Cladosporium + gegen Cladosporium - | bis - 12,1 | bis - 6,90 | ± 0 | bis - 11,5 |
| | Cladosporium +/-Thiamin + gegen Cladosporium -/Thiamin + | bis - 22,5 (p < 0,01) | bis - 50,0 (p < 0,05) | bis - 16,6 (p < 0,01) | bis - 12,0 (p < 0,05) |
| Bakterienfreie Fraktion | Cladosporium + gegen Cladosporium - | bis - 11,8 | ± 0 | bis - 23,2 (p < 0,05) | bis - 16,8 |
| | Cladosporium +/-Thiamin + gegen Cladosporium -/Thiamin + | ± 0 | bis + 70,7 (p < 0,01) | bis + 7,31 | bis + 76,0 |
| Bakterienhaltige Fraktion | Cladosporium + gegen Cladosporium - | bis + 17,0 | bis + 4,00 | ± 0 | ± 0 |
| | Cladosporium +/-Thiamin + gegen Cladosporium -/Thiamin + | bis - 5,59 | bis + 18,0 | ± 0 | bis + 17,7 |
| Überstand | Cladosporium + gegen Cladosporium - | ± 0 | + 0 | ± 0 | ± 0 |
| | Cladosporium +/-Thiamin + gegen Cladosporium -/Thiamin + | bis - 6,00 | bis - 30,0 (p < 0,05) | bis + 7,24 | ± 0 |

Die folgenden mikrobiellen Fermentationsparameter wurden weder durch Fusarium- noch durch Fusarium-/Thiamin-Inokulation verändert. pH-Wert, Ammoniakkonzentration, Gasproduktion, Methanproduktion, CO₂-Produktion, Essigsäure, i-Buttersäure, i-Valeriansäure sowie Hexansäure. Unter Einfluß von Fusarium graminearum bzw. Fusarium graminearum mit Thiamin konnten die folgenden Veränderungen auf Fermentationsparameter (s. Tab. 6.3) und Thiaminhaushalt (s. Tab. 6.4) beobachtet werden:

Tab. 6.3: Veränderungen ruminaler Fermentationsparameter unter Fusarium- bzw. unter Fusarium-/Thiamineinfluß (in % gegenüber Inokulation mit autoklaviertem Heu bzw. autoklaviertem Heu/Thiamin)

| Parameter | Fusarium + gegen Fusarium - | Fusarium +/-Thiamin + gegen Fusarium -/Thiamin + |
|--------------------|-----------------------------|--|
| Cellulaseaktivität | bis zu + 10,0 (p < 0,05) | bis zu - 17,0 |

Tab 6.3: Fortsetzung

| | | |
|-----------------|--------------------------|---------------------------|
| bakt. Protein | bis zu - 13,5 (p < 0,05) | bis zu - 24,4 (p < 0,01) |
| Propionsäure | bis zu - 7,41 (p < 0,05) | bis zu - 7,30 (p < 0,001) |
| n-Buttersäure | ± 0 | bis zu + 12,9 |
| n-Valeriansäure | bis zu + 3,10 | bis zu - 8,48 |
| Summe der FIFS | ± 0 | bis zu + 5,41 (p < 0,05) |

Tab 6.4: Veränderungen der in verschiedenen Pansenstofffraktionen gemessenen TDP-, TMP-, Thiamin- sowie Gesamthiaminkonzentrationen während der Inokulation von Fusarium bzw. Fusarium plus Thiamin (in % gegenüber Inokulation mit autoklaviertem Heu bzw. autoklaviertem Heu/Thiamin)

| | | TDP | TMP | Thiamin | Gesamthiamin |
|---------------------------------------|---|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| Fermenterflüssigkeit | Fusarium + gegen Fusarium - | ± 0 | ± 0 | ± 0 | ± 0 |
| | Fusarium +/Thiamin + gegen Fusarium -/Thiamin + | bis - 8,06 | ± 0 | bis - 10,4 | ± 0 |
| Pflanzen- u. Protozoenfraktion | Fusarium + gegen Fusarium - | bis - 9,10 | bis - 12,7 | ± 0 | bis - 14,7 |
| | Fusarium +/Thiamin + gegen Fusarium -/Thiamin + | bis - 11,2 (p < 0,05) | bis + 65,0 (p < 0,05) | bis - 25,8 (p < 0,01) | bis - 15,0 (p < 0,05) |
| Bakterienfreie Fraktion | Fusarium + gegen Fusarium - | bis - 14,2 | ± 0 | ± 0 | bis - 11,0 (p < 0,01) |
| | Fusarium +/Thiamin + gegen Fusarium -/Thiamin + | bis + 17,0 (p < 0,01) | bis + 56,2 | ± 0 | bis + 19,0 |
| Bakterienhaltige Fraktion | Fusarium + gegen Fusarium - | bis + 17,7 | bis + 15,8 | ± 0 | ± 0 |
| | Fusarium +/Thiamin + gegen Fusarium -/Thiamin + | bis - 9,60 | bis + 27,3 | ± 0 | bis + 10,1 |
| Überstand | Fusarium + gegen Fusarium - | ± 0 | ± 0 | ± 0 | ± 0 |
| | Fusarium +/Thiamin + gegen Fusarium -/Thiamin + | bis - 3,80 (p < 0,05) | bis - 36,0 | bis + 6,30 | ± 0 |

Während der Nachlaufphasen erfolgte eine weitgehende Rückkehr auf die Ausgangswerte

Beide Schimmelpilze bewirkten einen zahlenmäßigen Rückgang der Bakterienpopulation (Rückgang der bakteriellen Proteinkonzentrationen) bzw. eine selektive Schädigung bestimmter Bakteriengruppen (Rückgang Propionsäurekonzentrationen als Indiz einer selektiven Schädigung stärkeverwertender Bakterien) bei gesteigerter Stoffwechselleistung der verbleibenden Bakterien (erhöhte Gesamthiaminkonzentrationen in der Bakterienfraktion). Ein starker Protozoenrückgang wird aufgrund der rückgängigen

Tendenzen der Thiaminderivatkonzentrationen in der Protozoenfraktion angenommen, genaue Untersuchungen der Protozoenzahlen fehlen jedoch.

Der Anstieg der Cellulaseaktivität unter *Fusarium*-Einfluß ist wahrscheinlich auf eine cellulolytische Eigenwirkung von *Fusarium graminearum* zurückzuführen. Der anschließende Aktivitätsrückgang bei kombinierter Schimmelpilz-/Thiamin-Inokulation läßt sich durch eine Anhäufung primärer Celluloseabbauprodukte (z.B. Glucose, Cellobiose) und eine Hemmung der Cellulaseaktivität durch negatives Feed-back erklären.

Eine thiaminolytische Wirkung von *Cladosporium herbarum* oder *Fusarium graminearum* konnte nicht beobachtet werden. Insgesamt reichen die Auswirkungen beider Schimmelpilze auf Fermentationsvorgänge und Thiaminstoffwechsel nicht aus, um für eine Auslösung einer CCN verantwortlich zu sein.

Janson, C. (2001): Influence of with *Cladosporium herbarum* and *Fusarium graminearum*, respectively, artificially contaminated hay on fermentation and thiamine metabolism in the rumen of cattle (in vitro).

7. SUMMARY

The influence of hay, treated with *Cladosporium herbarum* and *Fusarium graminearum*, respectively, on the in-vitro-fermentation especially on the thiamine metabolism of bovine rumen content was investigated using the long term rumen simulation technique (RUSITEC). Six investigation periods 25 days long each were carried out. A nine days feeding period with normal hay was followed by the testphase one (five days) with a mixture of normal and mouldy hay and testphase two (five days) with additive 0,3 mg thiamine per day. The last four days served as regeneration time with normal hay.

For fermentation control, the following parameters were measured: pH, ammonia, gas production and content, cellulase activity, bacterial protein, volatile fatty acids and thiamine and its derivatives (in fractions)

Neither pH, ammonia, gas production, methane production, CO₂ production, acetate, i-butyrate nor i-valerate were influenced by *Cladosporium* or *Cladosporium* plus thiamine. On the other hand, *Cladosporium herbarum* and *Cladosporium herbarum* plus thiamine, respectively, influenced the fermentation patterns as follows (Table 7.1 and 7.2)

Table 7.1: Changes of ruminal fermentation patterns influenced by *Cladosporium* and *Cladosporium* plus thiamine, respectively (in % versus autoclaved hay and autoclaved hay plus thiamine, respectively)

| parameter | <i>Cladosporium</i> + versus <i>Cladosporium</i> - | <i>Cladosporium</i> +/thiamine + versus <i>Cladosporium</i> -/thiamine + |
|----------------------------|--|--|
| cellulase activity | ± 0 | decrease: - 17,0 |
| bacterial protein | decrease: - 4,24 (p < 0,05) | decrease: - 22,6 (p < 0,05) |
| propionate | decrease: - 5,91 | ± 0 |
| n-butyrate | ± 0 | increase: + 7,65 (p < 0,01) |
| n-valerate | decrease: - 3,60 (p < 0,05) | decrease: - 8,53 (p < 0,05) |
| hexanoic acid | decrease: - 9,30 (p < 0,05) | ± 0 |
| total volatile fatty acids | decrease: - 4,91 | increase: + 4,03 (p < 0,05) |

Table 7.2. Changes in different rumen fractions concerning TDP, TMP, thiamine and total thiamine during the inoculation of *Cladosporium* and *Cladosporium* plus thiamine, respectively (in % versus autoclaved hay and autoclaved hay plus thiamine, respectively)

| | | TDP | TMP | thiamine | total thiamine |
|-----------------------------|--|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| vessel | Cladosporium + versus Cladosporium - | ± 0 | ± 0 | ± 0 | ± 0 |
| | Cladosporium +/thiamine + versus Cladosporium -/thiamine + | up to - 7,26 (p < 0,01) | ± 0 | up to + 8,26 | ± 0 |
| plant and protozoa fraction | Cladosporium + versus Cladosporium - | up to - 12,1 | up to - 6,90 | ± 0 | up to - 11,5 |
| | Cladosporium +/thiamine + versus Cladosporium -/thiamine + | up to - 22,5 (p < 0,01) | up to - 50,0 (p < 0,05) | up to - 16,6 (p < 0,01) | up to - 12,0 (p < 0,05) |
| bacteria free fraction | Cladosporium + versus Cladosporium - | up to - 11,8 | ± 0 | up to - 23,2 (p < 0,05) | up to - 16,8 |
| | Cladosporium +/thiamine + versus Cladosporium -/thiamine + | ± 0 | up to + 70,7 (p < 0,01) | up to + 7,31 | up to + 76,0 |
| bacteria fraction | Cladosporium + versus Cladosporium - | up to + 17,0 | up to + 4,00 | ± 0 | ± 0 |
| | Cladosporium +/thiamine + versus Cladosporium -/thiamine + | up to - 5,59 | up to + 18,0 | ± 0 | up to + 17,7 |
| super-natant | Cladosporium + versus Cladosporium - | ± 0 | ± 0 | ± 0 | ± 0 |
| | Cladosporium +/thiamine + versus Cladosporium -/thiamine + | up to - 6,00 | up to - 30,0 (p < 0,05) | up to + 7,24 | ± 0 |

Fusarium or *Fusarium* plus thiamine did not influence pH, ammonia, gas production, methane production, CO₂ production, acetate, i-butyrate, i-valerate and hexanoic acid at all, while *Fusarium graminearum* and *Fusarium graminearum* plus thiamine, respectively, affected ruminal fermentation patterns (Table 7.3) and thiamine metabolism (Table 7.4):

Table 7.3: Changes of ruminal fermentation patterns influenced by *Fusarium* and *Fusarium* plus thiamine, respectively (in % versus autoclaved hay and autoclaved hay plus thiamine, respectively)

| parameter | <i>Fusarium</i> + versus <i>Fusarium</i> - | <i>Fusarium</i> +/thiamine + versus <i>Fusarium</i> -/thiamine + |
|----------------------------|--|--|
| cellulase activity | increase: + 10,0 (p < 0,05) | decrease: - 17,0 |
| bacterial protein | decrease: - 13,5 (p < 0,05) | decrease: - 24,4 (p < 0,01) |
| propionate | decrease: - 7,41 (p < 0,05) | decrease: - 7,30 (p < 0,001) |
| n-butyrate | ± 0 | increase: + 12,9 |
| n-valerate | increase: + 3,10 | decrease: - 8,48 |
| total volatile fatty acids | ± 0 | increase: + 5,41 (p < 0,05) |

Table 7.4: Changes in different rumen fractions concerning TDP, TMP, thiamine and total thiamine during the inoculation of *Fusarium* and *Fusarium* plus thiamine, respectively (in % versus autoclaved hay and autoclaved hay plus thiamine, respectively)

| | | TDP | TMP | thiamine | total thiamine |
|-----------------------------|--|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| vessel | <i>Fusarium</i> + versus <i>Fusarium</i> - | ± 0 | ± 0 | ± 0 | ± 0 |
| | <i>Fusarium</i> +/thiamine + versus <i>Fusarium</i> -/thiamine + | up to - 8,06 | ± 0 | up to - 10,4 | ± 0 |
| plant and protozoa fraction | <i>Fusarium</i> + versus <i>Fusarium</i> - | up to - 9,10 | up to - 12,7 | ± 0 | up to - 14,7 |
| | <i>Fusarium</i> +/thiamine + versus <i>Fusarium</i> -/thiamine + | up to - 11,2 (p < 0,05) | up to + 65,0 (p < 0,05) | up to - 25,8 (p < 0,01) | up to - 15,0 (p < 0,05) |
| bacteria free fraction | <i>Fusarium</i> + versus <i>Fusarium</i> - | up to - 14,2 | ± 0 | ± 0 | up to - 11,0 (p < 0,01) |
| | <i>Fusarium</i> +/thiamine + versus <i>Fusarium</i> -/thiamine + | up to + 17,0 (p < 0,01) | up to + 56,2 | ± 0 | up to + 19,0 |
| bacteria fraction | <i>Fusarium</i> + versus <i>Fusarium</i> - | up to + 17,7 | up to + 15,8 | ± 0 | ± 0 |
| | <i>Fusarium</i> +/thiamine + versus <i>Fusarium</i> -/thiamine + | up to - 9,60 | up to + 27,3 | ± 0 | up to + 10,1 |

Table 7.4: Continuation

| | | | | | |
|-----------------|--|-------------------------------|-----------------|-----------------|-----|
| super- stant | Fusarium + versus Fusarium - | ± 0 | ± 0 | ± 0 | ± 0 |
| | Fusarium +/thiamine + versus Fusarium -/thiamine + | up to - 3,80 (p < 0,05) | up to - 36,0 | up to + 6,30 | ± 0 |

After switching to normal hay, the ruminal fermentation reestablished soon.

Both moulds had a negative effect on the bacterial number (decrease of the bacterial protein concentrations) or damaged specific groups of bacteria selectively (with a decrease of the starch fermenting bacteria) supporting the metabolism of the remaining bacteria (increase of the total thiamine concentrations in the bacteria fraction). A large decrease of the protozoal number is assumed due to decreasing tendency of the thiamine derivatives in the protozoa fraction. Exact investigations on the protozoal numbers are lacking.

The increase of the cellulase activity during the phase of *Fusarium* inoculation is probably caused by an cellulolytic effect of *Fusarium graminearum* itself. The activity decrease during mould plus thiamine inoculation could be explained by an accumulation of primary products of cellulose breakdown (for example glucose or cellobiose). These products are suspected to cause a negative feed-back on the enzyme activity.

There was no thiaminolytic effect of *Cladosporium herbarum* or *Fusarium graminearum* to be observed. The noted effects on rumen fermentation and thiamine metabolism were not severe enough to be responsible for a CCN.