

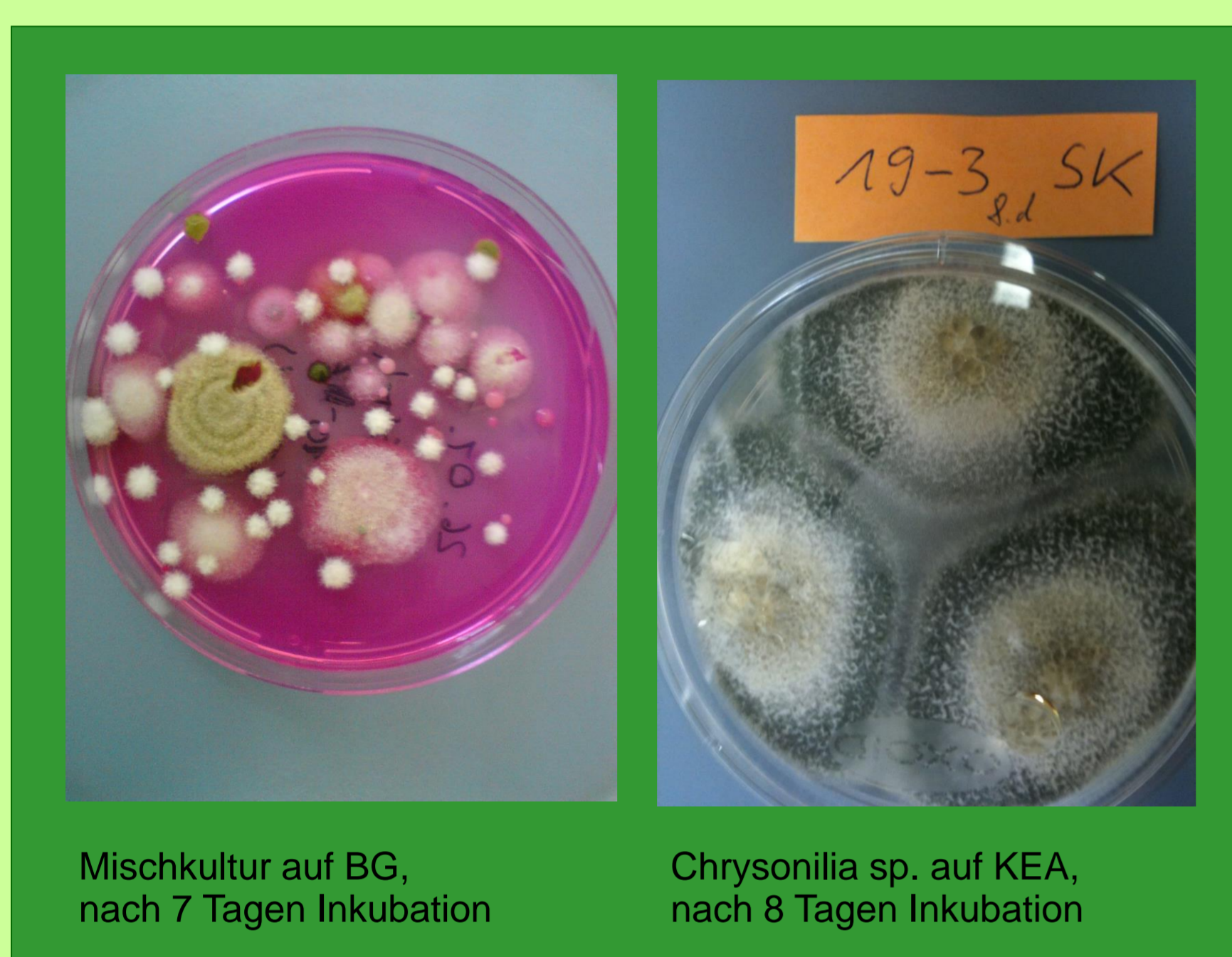
Qualitativer und quantitativer Nachweis von Feld- und Lagerpilzen in Futtermitteln sowie Differenzierung mittels MALDI-TOF MS

Claus Herrmann, Lukas Grammel, Wieland Schrödl, Monika Krüger

Institut für Bakteriologie und Mykologie der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Unter Feldpilzen versteht man natürliche Bewohner jeder wachsenden Pflanze. Die Dichte und Zusammensetzung dieser Mykoflora aus verschiedenen Gattungen und Arten, ist abhängig von Pflanzenart und -entwicklungsstadium, der agrotechnischen Bearbeitung und vor allem von der Witterung. Die wichtigste toxinogene Feldpilzgattung in unseren Breiten ist **Fusarium**, deren bedeutendste Mykotoxine sind Deoxynivalenol (DON) und Zearalenon (ZEA).

Während der Trocknung, Lagerung und Konservierung von Futtermitteln kommt es zu einer Verschiebung der Mykoflora zugunsten sogenannter Lagerpilze, welche einen deutlich geringeren Anspruch an die Feuchtigkeit des Substrates besitzen. Die wichtigsten Vertreter der Lagerpilze sind in unseren Breiten die Gattungen **Aspergillus** und **Penicillium** mit dem Mykotoxin Ochratoxin A (OTA).



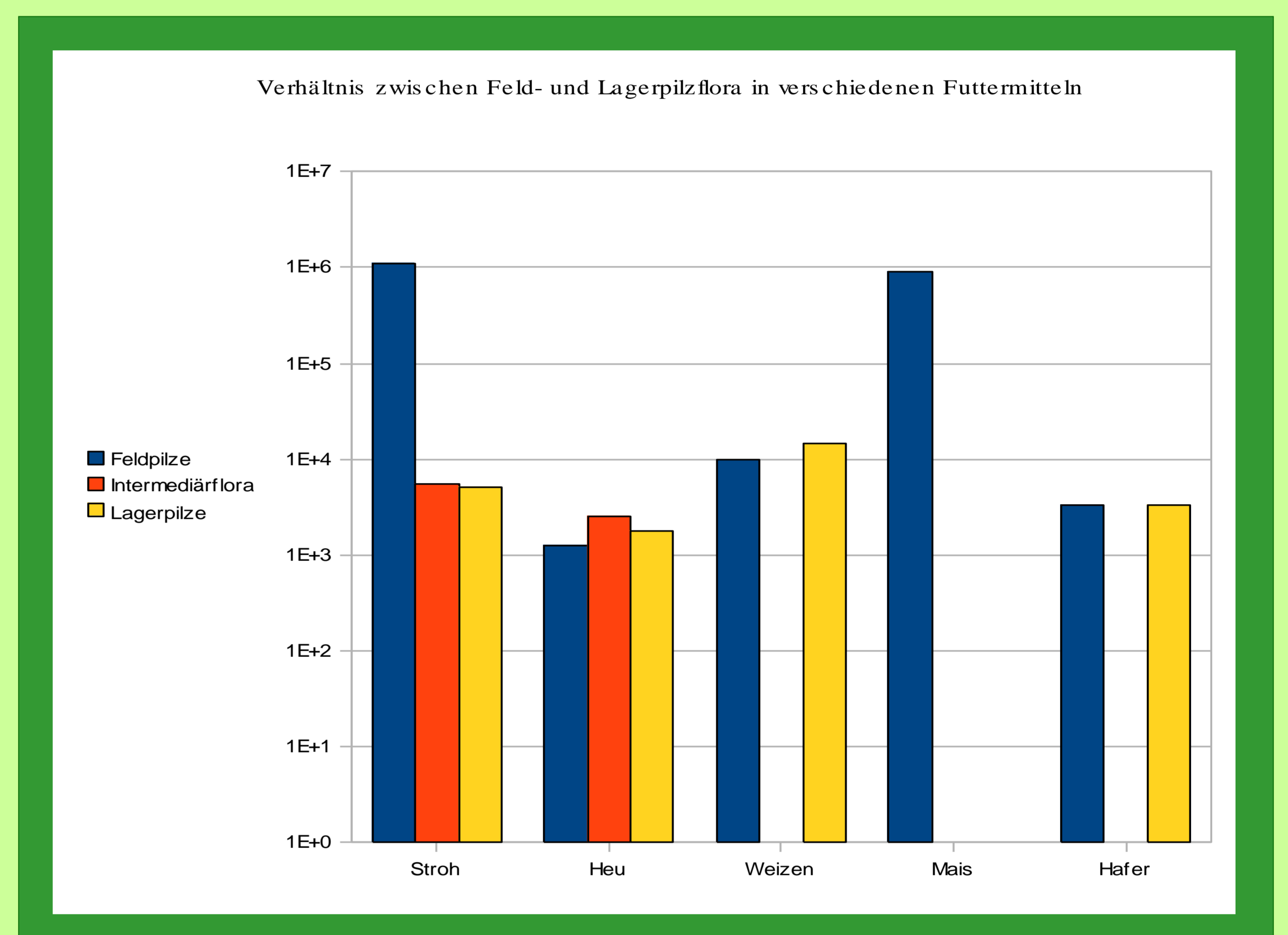
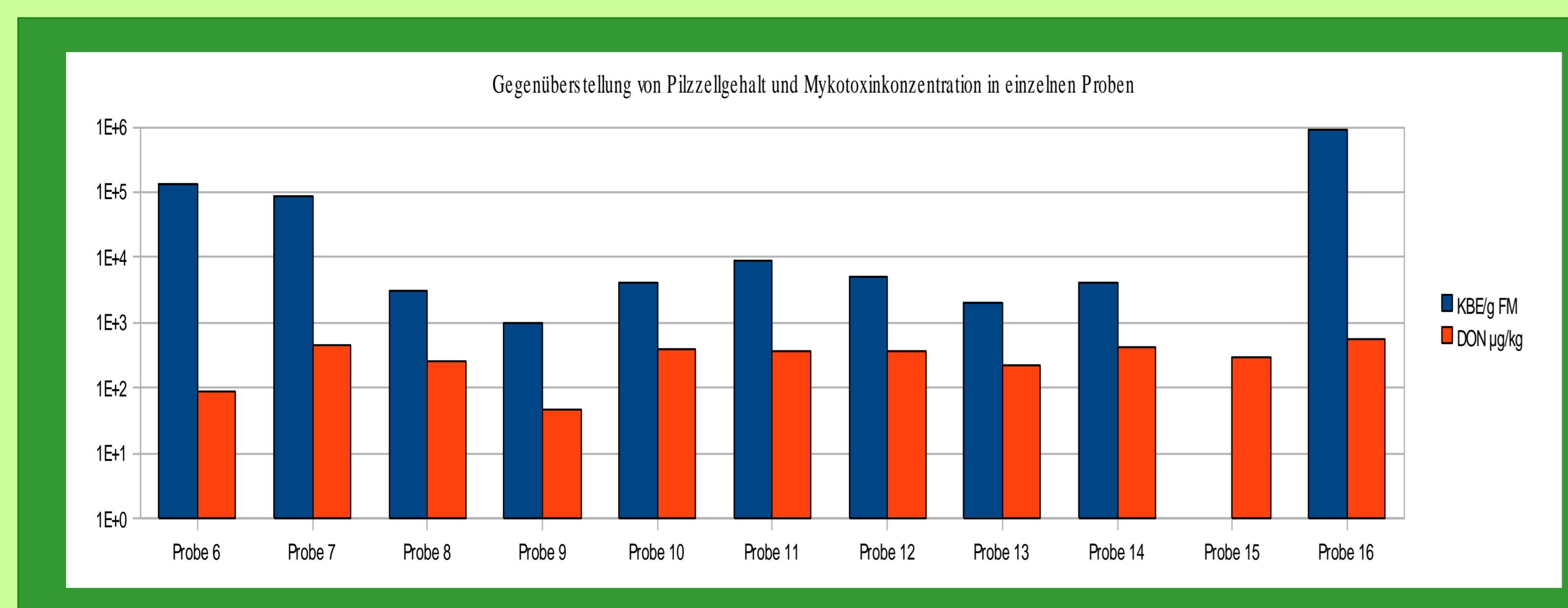
Ziel unserer Untersuchungen war es, die Ergebnisse der klassischen **Pilzdifferenzierung** mittels Makro- und Mikromorphologie durch den Einsatz des MALDI-TOF zu verifizieren. Weiterhin sollten die Ergebnisse der quantitativen Untersuchung mit den entsprechenden Mykotoxinkonzentrationen im Futtermittel in Relation gesetzt werden.

Material und Methoden

Die Futtermittelproben wurden zunächst in **Verdünnungslösung** aufgeschüttelt. Aus der so entstandenen Suspension wurde eine Verdünnungsreihe hergestellt und je Verdünnung 0,1ml auf Bengalrot-Agar-Platten aufgebracht. Nach einer Woche Inkubation erfolgte die **Keimzahlbestimmung** und die Erstellung von Reinkulturen auf **Kartoffelextrakt-Agar** (KEA). Nach erneuter Inkubation erfolgte die qualitative Untersuchung der **Pilzisolat** anhand der Makro- und Mikromorphologie. Gleichzeitig wurden die **Pilzisolat** für das MALDI-TOF-MS-Verfahren aufbereitet und entsprechend analysiert. Die mykotoxikologische Untersuchung auf DON wurde vom Bio-Check-Labor Leipzig mittels HPLC durchgeführt und uns zur Verfügung gestellt.

Ergebnisse

Als Feldpilze konnten wir in unseren Proben vielfach *Fusarium* spp., *Cladosporium* spp., *Alternaria* spp. und *Acremonium* spp. nachweisen. Als Lagerpilze identifizierten wir häufig *Aspergillus* spp. und *Penicillium* spp.. Außerdem bestimmten wir einige Gattungen bzw. Species, welche wir als Intermediärflora interpretierten. Die Untersuchung mittels MALDI-TOF hat auf Grund der kleinen **Pilzdatenbank** nur wenige unserer Ergebnisse bestätigen können. Bei den meisten Proben konnte das Verfahren kein Ergebnis mit hinreichend großer Wahrscheinlichkeit liefern. Jedoch war ein Vergleich der einzelnen Proben untereinander eine gute Möglichkeit die Ergebnisse der klassischen Differenzierung gegeneinander zu prüfen, und lieferte erhebliche Übereinstimmungen. Die unterschiedlichen Arten von Futtermitteln wiesen verschiedene Verhältnisse zwischen Feld- und Lagerpilzgehalten auf. Zwischen den Konzentrationen des Mykotoxins DON und der KBE konnte keine wesentliche Korrelation festgestellt werden.



Schlussfolgerungen

Für eine **Untersuchung von Schimmelpilzisolaten aus Futtermittelproben mittels MALDI-TOF-MS** ist eine **umfangreiche Erweiterung der Datenbank erforderlich**. Jedoch würde das Verfahren die mykologische Analytik von Futtermittelproben mit dem Ziel einer Speciesdiagnose deutlich beschleunigen. Auf Grund verschiedener agrotechnischer Maßnahmen im Rahmen der Ernte und Konservierung von Futtermitteln kommt es zu Verschiebungen der Mykoflora, **die unterschiedliche** Verhältnisse zwischen Feld- und Lagerpilzgehalten zur Folge haben. Aufgrund dieses Zusammenhangs besteht nicht die Möglichkeit anhand **der** aktuellen **Pilzkeimzahl** in einem bereits konservierten bzw. gelagerten Futtermittel auf die Mykotoxinbelastung zu schließen.

Zusammenfassung

- Durch die klassische **Pilzdifferenzierung** anhand von Makro- und Mikromorphologie konnten *Fusarium* spp., *Cladosporium* spp., *Alternaria* spp., *Aspergillus* spp. und *Penicillium* spp. in verschiedenen Futtermitteln identifiziert werden.
- Die Untersuchung der Proben mittels MALDI-TOF-MS hat aufgrund der hohen Sensitivität und Spezifität des Verfahrens nur wenige Ergebnisse mit hinreichend großer Wahrscheinlichkeit geliefert, sodass sich die vorhandene Datenbank des Systems als unzureichend erwies. Eine erhebliche Erweiterung der Datenbank wäre Voraussetzung, das Verfahren für die mykologische Analytik zu etablieren und würde zu einer deutlichen Beschleunigung bei der Erstellung von Speciesdiagnosen führen.
- Die quantitative Analyse hat gezeigt, dass sich die Mykoflora in verschiedenen Futtermitteln während der Verarbeitung und Konservierung nicht statisch verhält. Vielmehr offenbarten sich variable Verhältnisse zwischen Feld- und Lagerpilzpopulationen.
- Ein wesentlicher Zusammenhang zwischen Pilzellgehalt und Mykotoxinkonzentration im Futtermittel konnte nicht gezeigt werden.