



Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten

Stellungnahme des Arbeitskreises (AK) Futtermittelmikrobiologie zur Vergleichbarkeit der CEN/DIN Methoden für den quantitativen Nachweis von probiotischen Futterzusatzstoffen

Dr. Henriette Mietke-Hofmann, BfUL Leipzig
Leiterin des AK Futtermittelmikrobiologie der Fachgruppe VI (FG VI) des VDLUFA

Inhalt

- 1 Einleitung
- 2 Gegenüberstellung der DIN EN - und der VDLUFA-Methoden anhand von vergleichenden Ringuntersuchungen
 - 2.1 *Saccharomyces cerevisiae*
 - 2.2 *Enterococcus faecium*
 - 2.3 Aerobe Sporenbildner
- 3 Vergleich der Leistungsdaten der DIN EN-Normen und der VDLUFA-Methoden
 - 3.1 *Saccharomyces cerevisiae*
 - 3.2 *Enterococcus faecium*
 - 3.3 Aerobe Sporenbildner
- 4 Anmerkung zum Leitfaden zur Kennzeichnung von Einzelfuttermitteln und Mischfuttermitteln des BMELV

1 Einleitung

Der Arbeitskreis Futtermittelmikrobiologie der FG VI des VDLUFA hat folgende VDLUFA-Methoden zum quantitativen Nachweis verschiedener probiotischer Futterzusatzstoffe entwickelt (Methodenbuch Band III):

- 28.1.2 Bestimmung von *B. cereus*
- 28.2.2 Bestimmung von *Bacillus licheniformis* und *Bacillus subtilis*
- 28.2.3 Bestimmung von *Enterococcus faecium*
- 28.2.4 Bestimmung von *Enterococcus faecium* und *Lactobacillus rhamnosus*
- 28.2.5 Bestimmung von *Pediococcus acidilactici*
- 28.2.6 Bestimmung von *Saccharomyces cerevisiae*

Unter dem Trivialbegriff „Probiotikum“ werden im Weiteren sämtliche Mikroorganismen verstanden, die als Zusatzstoff nach Richtlinie 70/524/EWG und Übergangsregelung Verordnung EG 1831/2003 als „Mikroorganismen“ sowie gemäß Bestimmungen der Verordnung EG 1831/2003 in nachfolgenden Vorordnungen unter den Rubriken „Darmflorastabilisatoren“, „Funktionsgruppe 4a-Verdauungsförderer“ und „Funktionsgruppe 4d „Sonstige zootechnische Zusatzstoffe“ zugelassen wurden. Silierhilfsmittel sind nicht Gegenstand dieser Stellungnahme.

Für Bifidobakterien und Lactobazillen existieren keine VDLUFA-Methoden, die Methode 28.2.4 könnte allerdings uneingeschränkt für einen probiotischen Zusatzstoff mit *Lactobacillus* allein angewendet werden. Die Methode ist dafür allerdings vom AK nicht validiert. Für beide Fälle bestand bisher kein Handlungsbedarf, da es zwar zahlreiche zugelassene Zusatzstoffe mit diesen probiotischen Zusatzstoffen gibt, diese aber auf dem deutschen Markt nicht präsent sind.



Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten

Sämtliche Methoden beinhalten Untersuchungsmöglichkeiten für Zusatzstoffe, Vormischungen, Mineralfuttermittel und Mischfuttermittel inkl. Milchaustauscher unter den jeweiligen spezifischen Bedingungen, z.B.

- hohe Kupfergehalte,
- extreme pH-Werte in Ausgangssuspensionen,
- Verkapselung von Probiotika mit Fetten/Ölen,
- starkes Schäumen von Ausgangssuspensionen auf Grund bestimmter Inhaltsstoffe dieser Matrices.

Im Rahmen der Methodenentwicklungen wurden zahlreiche Ringanalysen (sog. M- und Q-Enqueten) durchgeführt (Abb. 1). Jede dieser Ringanalysen enthielt verschiedene Matrices, vom Zusatzstoff bis zum pelletierten Futtermittel.

Aus dem entstandenen statistischen Datenmaterial wurden die **VDLUFA Analysenspielräume** für die Untersuchung von Zusatzstoffen, Vormischungen und Mineralfuttermitteln ($\pm 60\%$ R) sowie für Mischfuttermittel ($\pm 50\%$ R) ermittelt, welche die Grundlage der rechtlichen Beurteilung eines Laborbefundes und damit der amtlichen Futtermittelkontrolle in Deutschland sind.

Eine Mitarbeit an der methodischen Entwicklung der DIN EN Methoden (DIN EN 15784 bis DIN EN 15789) war dem Arbeitskreis seinerzeit nicht gewährt. Lediglich 2 Labore (Karlsruhe und Leipzig) konnten an dem vom Central Science Laboratory organisierten internationalen Ringversuch im Jahre 2002 teilnehmen, der zur Validierung der DIN EN-Methoden diente. Es bestand also damals keinerlei Möglichkeit, Einfluss auf die Methodentexte zu nehmen.

Erst mit der Etablierung des nationalen DIN Spiegelgremiums im Jahre 2005 zum CEN/TC 327 wurde es möglich, die Methodentexte im CEN/TC 327/Working Group (WG) 3 mitzugestalten, allerdings nur noch in redaktioneller Hinsicht. Inhaltliche (= technische) Änderungen waren, wegen der bereits durchgeführten Ringanalysen, kaum noch durchzusetzen.

Leider mussten wir im AK feststellen, dass die CEN Methodentexte zusammengefasst als „ungenügend“ zu bewerten sind: Es gibt sehr viele Ungenauigkeiten, sowie fehlerhafte Textstellen, die vollständig in die übersetzten DIN-Text übernommen wurden.

Zahlreiche Korrekturvorschläge der deutschen Experten wurden vom CEN/TC 327/WG 3 nicht akzeptiert. Selbst der Vorschlag, die VDLUFA-Methoden zumindest als bibliographische Angabe in die CEN- bzw. DIN EN-Methoden zur Konkretisierung einiger essentieller Details mit aufzunehmen, wurde auf massives Drängen der Projektleitung hin von der WG 3 abgelehnt.



Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten

Nummer	Art	Zustand	Analyse-Parameter Mikroorganismen			VDLUFA-Methode	Labore N°	Mittelwert GR	Vr abs.	Vr %	VR abs.	VR %	ASR
			Handels-Name	Bezeichnung Spezies	Bezeichnung Stamm								

*) bezogen auf Originalsubstanz

328 Q c	Mineralfutter für Ferkel	Mehl	BioPlus 2B	B. licheniformis + B. subtilis	DSM 5749 / DSM 5750	28.2.2	12	3,23E+10	3,03E+09	9,4	8,69E+09	26,9	60% rel
332 M a	Vormischung	Mehl	Yea-Sacc	S. cerevisiae	CBS 493.94	28.2.6	11	5,21E+11	5,83E+10	11,2	1,59E+11	30,5	60% rel
335 M a	Vormischung	Mehl	BioPlus 2B	B. licheniformis + B. subtilis	DSM 5749 / DSM 5750	28.2.2	14	5,54E+11	6,68E+10	12,1	1,88E+11	33,9	60% rel
335 M d	Zusatzstoff	Pellets	BioPlus 2B	B. licheniformis + B. subtilis	DSM 5749 / DSM 5750	28.2.2	12	4,45E+14	4,95E+13	11,1	1,24E+14	27,9	60% rel
337 M b	Vormischung	Mehl	Provita LE	E. faecium + L. rhamnosus	DSM 7134 + DSM 7133 im Verhältnis 7 : 3	28.2.4	14	1,24E+12	8,18E+10	6,6	3,96E+11	31,9	60% rel
337 M c	Milchtauscher	Mehl	Provita LE	E. faecium + L. rhamnosus	DSM 7134 + DSM 7133 im Verhältnis 7 : 3	28.2.4	14	2,02E+09	3,23E+08	16,0	4,25E+08	21,0	50% rel
338 M a	Zusatzstoff	Mehl	Bactocell PA 10 MD	P. acidilactici	CNCM MA 18/5M	28.2.5	10	7,70E+12	1,15E+12	14,9	1,29E+12	16,7	60% rel
339 M a	Mineralfutter für Rinder	Mehl	Levucell SC 10 ME	S. cerevisiae	CNCM I-1077	28.2.6	11	1,17E+11	1,36E+10	11,6	4,30E+10	36,7	60% rel
339 M b	Mischfutter für Rinder	Mehl	Levucell SC 20	S. cerevisiae	CNCM I-1077	28.2.6	11	1,87E+11	1,35E+10	7,2	2,90E+10	15,5	50% rel
340 Q a	Mineralfutter	Mehl	Provita LE	E. faecium + L. rhamnosus	DSM 7134 + DSM 7133 im Verhältnis 7 : 3	28.2.4	13	3,72E+10	4,01E+09	10,8	9,44E+09	25,4	60% rel
347 M a	Alleinfutter für Ferkel	Pellets	Cylactin ME 10	E. faecium	NCIMB 10415	Entwurf für 28.2.3	7	2,00E+09	3,96E+08	19,8	6,13E+08	30,6	**)
347 M b	Milchtauscher	Mehl	Cylactin ME 10	E. faecium	NCIMB 10415		3	3,85E+09	5,91E+08	15,4	6,10E+08	15,9	**)
347 M c	Milchtauscher	Mehl	Cylactin G 35	E. faecium	NCIMB 10415		4	1,39E+09	1,78E+08	12,8	2,13E+08	15,3	**)
347 M d	Mineralfutter für Schweine	Mehl	Cylactin ME 10	E. faecium	NCIMB 10415		4	2,07E+10	3,10E+09	15,0	2,84E+09	13,7	**)
348 Q a	Mischfutter	Mehl	Levucell SC 20	S. cerevisiae	CNCM I-1077	28.2.6	12	4,34E+09	7,07E+08	16,3	1,24E+09	28,6	50% rel
348 Q b	Mischfutter	Pellets	Levucell SC 10 ME	S. cerevisiae	CNCM I-1077	28.2.6	12	8,55E+08	1,41E+08	16,4	1,95E+08	22,8	50% rel
349 Q a	Mischfutter	Mehl	Bactocell PAL	P. acidilactici	CNCM MA 18/5M	28.2.5	10	6,43E+08	1,15E+08	17,9	2,35E+08	36,5	50% rel
349 Q b	Mischfutter	Pellets	Bactocell PA ME	P. acidilactici	CNCM MA 18/5M	28.2.5	10	2,98E+08	8,80E+07	29,5	8,98E+07	30,1	50% rel
352 Q a	Vormischung	Mehl	Oralin	E. faecium	DSM 10663 / NCIMB 10415	28.2.3	10	4,02E+10	5,56E+09	13,8	1,55E+10	38,6	60% rel
352 Q b	EGF für Kälber	Mehl	Oralin	E. faecium	DSM 10663 / NCIMB 10415	28.2.3	8	8,87E+10	1,43E+10	16,1	2,64E+10	29,8	50% rel
352 Q c	Milchtauscher	Mehl	Oralin	E. faecium	DSM 10663 / NCIMB 10415	28.2.3	10	1,43E+09	2,92E+08	20,4	4,10E+08	28,6	50% rel
352 Q d	Milchtauscher	Mehl	Oralin	E. faecium	DSM 10663 / NCIMB 10415	28.2.3	10	1,40E+09	3,59E+08	25,6	3,70E+08	26,4	50% rel
353 Q a	Vormischung	Mehl	BioPlus 2B	B. licheniformis + B. subtilis	DSM 5749 / DSM 5750	28.2.2	13	2,03E+12	3,98E+11	19,6	6,38E+11	31,4	60% rel
353 Q b	Alleinfutter für Puten	Mehl	BioPlus 2B	B. licheniformis + B. subtilis	DSM 5749 / DSM 5750	28.2.2	13	1,46E+09	2,06E+08	14,1	3,36E+08	23,0	50% rel
353 Q c	Alleinfutter für Puten	Pellets	BioPlus 2B	B. licheniformis + B. subtilis	DSM 5749 / DSM 5750	28.2.2	12	1,27E+09	1,93E+08	15,2	2,17E+08	17,1	50% rel
354 Q a	Konzentrat	Mehl	Toyocerin	B. cereus	NCIMB40112 / CNCM I-1012	28.2.1	11	7,17E+12	9,41E+11	13,1	2,52E+12	35,1	60% rel
354 Q b	Vormischung	Mehl	Toyocerin	B. cereus	NCIMB40112 / CNCM I-1012	28.2.1	12	4,19E+10	3,67E+09	8,8	1,01E+10	24,2	60% rel
354 Q c	Alleinfutter für Ferkel	Mehl	Toyocerin	B. cereus	NCIMB40112 / CNCM I-1012	28.2.1	12	8,69E+08	1,12E+08	12,9	1,21E+08	13,9	50% rel
354 Q d	Alleinfutter für Ferkel	Pellets	Toyocerin	B. cereus	NCIMB40112 / CNCM I-1012	28.2.1	12	5,42E+08	3,70E+07	6,8	7,98E+07	14,7	50% rel
360 Qc	Mineralfutter für Ferkel	Mehl	BioPlus 2B	B. licheniformis + B. subtilis	DSM 5749 / DSM 5750	28.2.2	13	3,62E+10	3,86E+09	10,6	7,12E+09	19,6	60% rel
364 Q a	Zusatzstoff	Mehl	Biosprint G	S. cerevisiae	BCCM / MUCL 39885	28.2.6	11	1,77E+13	1,93E+12	10,9	3,68E+12	20,8	60% rel

***) Ergebnisse nicht zur Ableitung von ASR verwendet, weil Anzahl der teilnehmenden Labore zu gering

Abbildung 1: Durchgeführte Ringanalysen zur Bestimmung probiotischer Futterzusatzstoffe mit VDLUFA-Methoden durch den AK Futtermittelmikrobiologie des VDLUFA



Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten

2 Gegenüberstellung der DIN EN Normen und der VDLUFA-Methoden anhand von vergleichenden Ringuntersuchungen

2.1 *Saccharomyces cerevisiae*

Für einen Vergleich der DIN EN-Methode mit der VDLUFA-Methode wurde der Ringversuch 376Q „Keimzahlbestimmung von *Saccharomyces cerevisiae* CNCM I-1077 Levucell Sc in einem Ergänzungsfuttermittel für Ferkel gemäß Verbandsmethode 28.2.6 und DIN EN 15789“ durchgeführt. Das Probiotikum lag in fettverkapselter Form vor. Die Ringanalyse wurde von 14 Laboren ausgeführt.

Folgende vergleichende Ergebnisse konnten ermittelt werden (Abb.2):

	VDLUFA n = 14 1 Ausreißer	CEN n = 13 3 Ausreißer
Wiederhol-STD	0,117 E+9 KBE/kg	0,054 E+9 KBE/kg
Vergleichs-STD	0,235 E+9 KBE/kg	0,122 E+9 KBE/kg
Rel.Wiederhol-STD	18,22 %	32,09 %
Rel. Vergleichs-STD	36,52 %	73,25%
Mittelwert	0,642 E+9 KBE/kg	0,167 E+9 KBE/kg (= 26 % von VDLUFA!)

Abbildung 2: Vergleichende statistische Daten aus der Ringanalyse 376Q *S.cerevisiae*

Abgesehen von sehr hohen relativen Wiederhol- und Vergleichsstandardabweichungen wurden bei der CEN-Methode - berechnet über alle teilnehmenden Labore - lediglich 26 % der Hefen im Vergleich zur VDLUFA-Methode nachgewiesen. Bezogen auf die einzelnen Laboratorien ergibt sich folgendes Bild (Abb. 3):



Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten

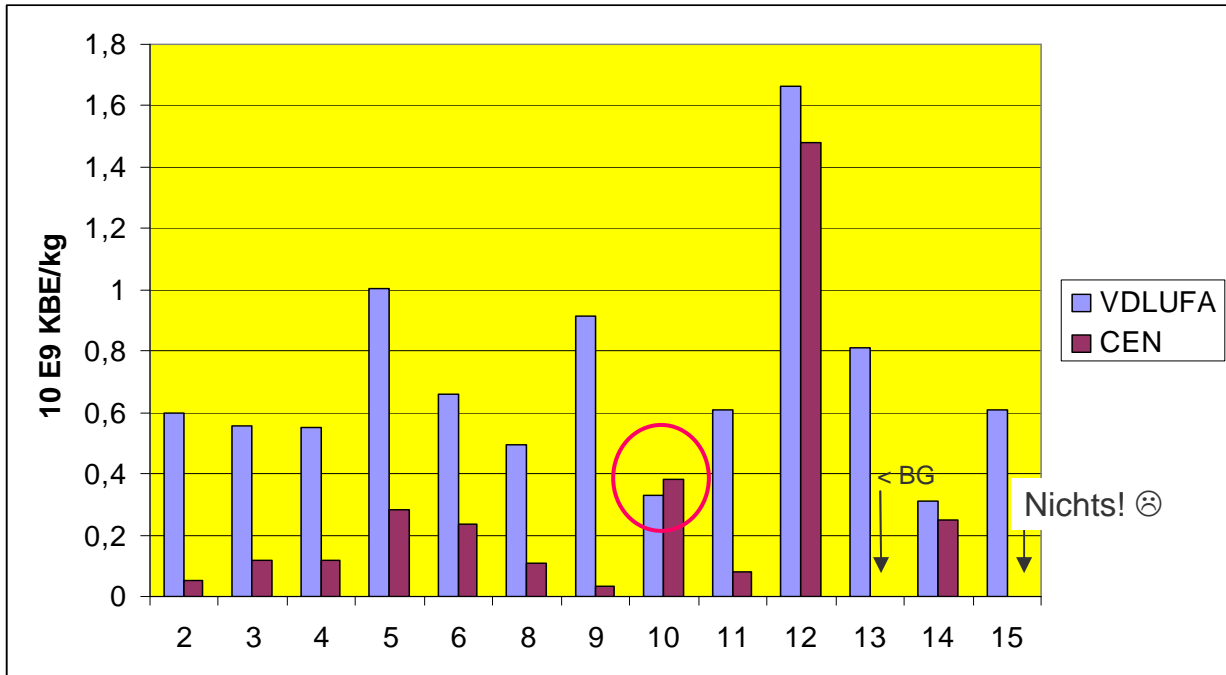


Abbildung 3: Labormittelwerte der Ringanalyse 376Q für die VDLUFA- und DIN EN-Methode

Bis auf das Labor 10, das fälschlicherweise für die DIN EN-Methode die Suspensionslösung aus der VLUFA-Methode angewendet hatte, (und dessen Ergebnis daher eigentlich keine Berücksichtigung finden sollte) ermittelten alle Labore mit der VDLUFA-Methode höhere Keimzahlen als bei der DIN EN Methode. Zwei Labore konnten gar keine Hefen bzw. nur Keimzahlen unterhalb der Bestimmbarkeitsgrenze mit der DIN EN Methode detektieren.

Für dieses schlechte Ergebnis sind zwei Ursachen wesentlich:

a)
 Die DIN EN-Methode schreibt eine **phosphatgepufferte Salzlösung** für die Erstverdünnung vor, die nur ungenügend in der Lage ist, fettverkapselte Produkte aufzulösen. Die Methode gibt zwar einen Hinweis auf die mögliche Anwendung anderer geeigneter Lösungen, allerdings sehr oberflächlich, so dass ein unerfahrenes Labor damit nicht arbeiten kann. Der bibliographische Hinweis auf die VDLUFA-Methode an dieser Stelle wäre hilfreich gewesen, wurde aber, wie oben erwähnt, abgelehnt: „Bei verkapselten Produkten sind geeignete Zusätze (z.B. Polyoxyethylensorbitanmonooleat oder gleichwertiges) mit angemessenen Temperaturen (z.B. 40 °C) zu verwenden.“ Die VDLUFA-Methode schreibt generell eine Tris-Tween-Tryptose Lösung (pH 8,1) vor, die auf 40 °C temperiert der Einwaage zugesetzt wird. Dadurch sind die deutlich höheren Mittelwerte, die mit der VDLUFA-Methode erreicht werden, erklärbar.

Laut DIN EN-Methode soll das **Rühren der Suspension** bei einer geforderten Drehzahl von 18 000 bis 22 000 Umdrehungen pro Minute den gleichen Effekt haben: Es ist allerdings kein geeignetes Gerät (außer Ultra-Turrax) auf dem Markt, das diese Leistung aufweist. Auf wiederholte Anfrage hierzu bei den Autoren der CEN Methode erhielt der AK keine Antwort. Den Einsatz eines Ultra-Turrax lehnt der AK ab: Es liegen zahlreiche Untersuchungsergebnisse vor, die belegen,



Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten

dass das Gerät in der Lage ist, lebende Zellen zu zerschlagen. Bei Anwendung dieses Gerätes kann es somit zu Unterbefunden kommen.

b)

Als **Kultivierungszeit** werden in der DIN EN-Methode **48 Stunden bei 35 °C** für das Plattengussverfahren mit YGC-Agar gefordert: Dies ist absolut zu kurz!

Die VDLUFA Methode fordert eine Kultivierungszeit von mindestens 4 Tagen. Vergleichende Untersuchungen von 2 Laboratorien aus dieser Ringanalyse (Posiéux und Linz) zur Kultivierungszeit erbrachten bis zu 295 % höhere Keimzahlen bei 96 Stunden Kultivierung gegenüber einer Kultivierungszeit von 48 Stunden.

Generell sei zu der DIN EN-Methode noch anzumerken, dass sie vorgibt, eine Methode zur Isolierung und Zählung von probiotischen Hefestämmen zu sein:

Der Methodentext bezüglich der phänotypischen und biochemischen Charakterisierung bezieht sich allerdings ausschließlich auf *Saccharomyces cerevisiae*. Über die Eignung der Methode zur Bestimmung von *Kluyveromyces marxianus* und anderen Hefen ist nichts bekannt. Die Methode kann somit keinesfalls auf die Quantifizierung anderer probiotischer Hefen ohne vorherige Validierung übertragen werden.

Auch ist die Untersuchung von Mineralfuttermitteln mit der Methode nicht geprüft bzw. nicht validiert worden.

2.2 *Enterococcus faecium*

Für einen Vergleich der DIN EN-Methode mit der VDLUFA-Methode wurden die Ringanalysen 377Q „Keimzahlbestimmung von *Enterococcus faecium* DSM 7134 Bonvital in einem Ergänzungsfuttermittel für Ferkel gemäß Verbandsmethode 28.2.4 und DIN EN 15788“ sowie 390Q „Keimzahlbestimmung von *Enterococcus faecium* NCIMB 10415 in einem Diät-Ergänzungsfuttermittel für Kälber“ gemäß der beiden Methoden durchgeführt. Das Probiotikum in der Ringanalyse 390Q lag in fettverkapselter Form vor. Beide Ringanalysen wurden von 13 Laboren durchgeführt.



Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten

Folgende vergleichende Ergebnisse konnten in der Ringanalyse 377Q ermittelt werden (Abb.4):

	VDLUFA n = 13 Kein Ausreißer	CEN n = 13 kein Ausreißer
Wiederhol-STD	0,545 E+9 KBE/kg	0,325 E+9 KBE/kg
Vergleichs-STD	0,702 E+9 KBE/kg	0,64 E+9 KBE/kg
Rel.Wiederhol-STD	21,92 %	16,95 %
Rel. Vergleichs-STD	28,27 %	33,41 %
Mittelwert	2,485 E+9 KBE/kg	1,917 E+9 KBE/kg (= 77 % von VDLUFA)

Abbildung 4: Vergleichende statistische Daten aus der Ringanalyse 377Q E. faecium

Bei der DIN EN Methode - berechnet über alle teilnehmenden Labore – wurden 77 % der Enterokokken im Vergleich zur VDLUFA-Methode nachgewiesen. Die Darstellung der laborbezogenen Ergebnisse dieser Ringanalyse zeigt Abb. 5.

Bis auf zwei Labore (= Labor 4 und Labor 8) fanden alle Einrichtungen mehr Enterokokken bei Anwendung der VDLUFA-Methode als bei Nutzung der DIN EN Methode. Auch Labor 10, das irrtümlicherweise die Suspensionslösung der VDLUFA-Methode angewendet hat, fand höhere Keimzahlen mit der VDLUFA-Methode.

Es bestehen zwei wesentliche Unterschiede zwischen der VDLUFA- und der DIN EN-Methode, die Einfluss auf das Analyseergebnis erwarten lassen:

- a) Die Suspensionslösung zur Herstellung der Ausgangssuspension ist bei der DIN EN Methode analog zur Hefemethode eine **phosphatgepufferte Salzlösung** (siehe 2.1). Diese Lösung ermöglicht nur für unverkapselte Produkte (wie im Falle der Ringanalyse 377 Q) eine ausreichende Vereinzlung und homogene Verteilung der lyophilisierten Zellen, keinesfalls aber für fettverkapselte Produkte.
- b) Die Kultivierung erfolgt bei der DIN EN-Methode im **Oberflächenverfahren** auf **Galle Aesculin-Agar**, bei der VDLUFA im **Plattengussverfahren** auf **Slanez Bartley Agar**. In Vorversuchen



Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten

wurden im AK Nährbodenvergleiche durchgeführt, die belegen, dass die Nachweisrate an Enterokokken auf Slanez Bartley-Agar höher liegt als bei Galle-Aesculin-Agar.

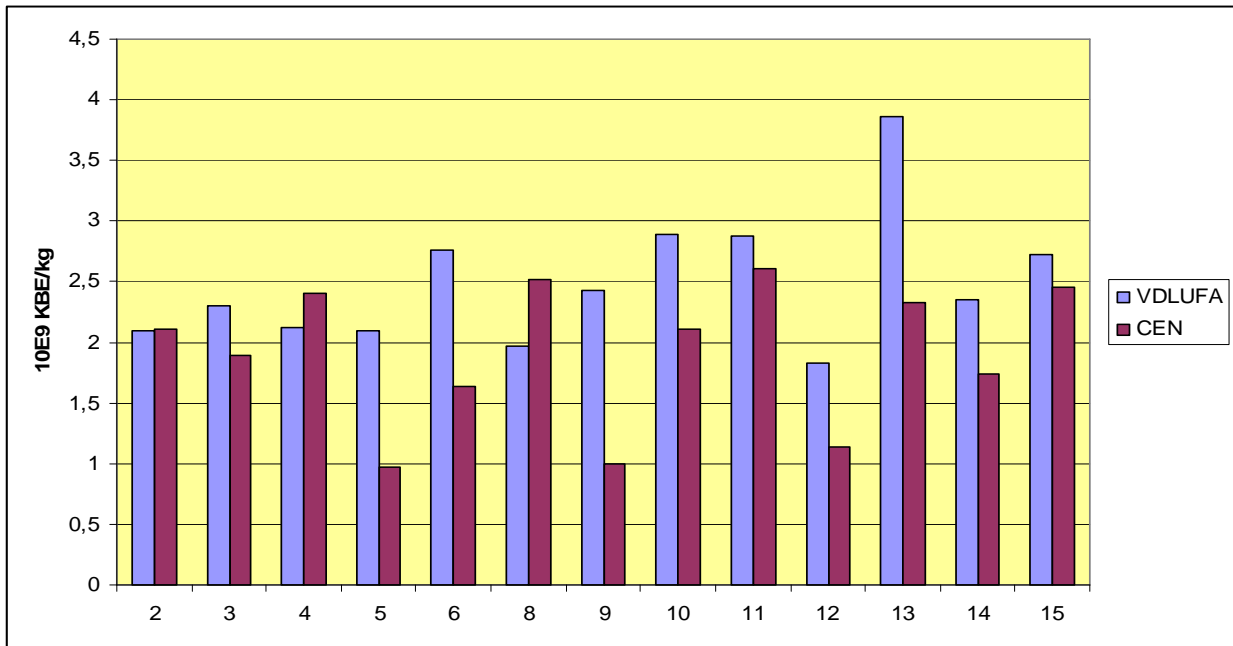


Abbildung 5: Labormittelwerte der Ringanalyse 377 Q für die VDLUFA- und DIN EN-Methode

Um die Einflussgrößen Suspendierungslösung und Nährboden deutlicher erfassen zu können, wurden in der Ringanalyse 390Q die Proben mit beiden Suspendierungslösungen und beiden Kultivierungsbedingungen bearbeitet (Abb. 6). Bei der DIN EN-Methode (phosphatgepufferte Salzlösung + Galle-Aesculin-Agar im Oberflächenverfahren) wurden 81,9 % der Enterokokken im Vergleich zur VDLUFA-Methode (Tris-Tween-Lösung + Slanez Bartley-Agar im Plattengussverfahren) nachgewiesen. Sowohl die Suspendierungslösung als auch die Kultivierungsbedingungen hatten Einfluss auf das Ergebnis.

	VDLUFA Slanez Bartley Agar	VDLUFA Galle Aesculin Agar	CEN Slanez Bartley Agar	CEN Galle Aesculin Agar
Mittelwerte KBE/g	1,38	1,27	1,21	1,13
Wiederfindung in % zur VDLUFA Methode	100	92	87,7	81,9

Abbildung 6: Vergleich der Analysenergebnisse der Ringanalyse 390Q bei unterschiedlichen Suspendierungslösungen und Kultivierungsbedingungen



Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten

2.3 Aerobe Sporenbildner

Für einen Vergleich der DIN EN Methode mit der VDLUFA-Methode wurden die Ringanalysen 381Q „Keimzahlbestimmung von *Bacillus subtilis* C-3102 DSM 15544 Calsporin im Zusatzstoff gemäß Verbandsmethode 28.2.2 und DIN EN 15784“ sowie 384Q „Keimzahlbestimmung von *Bacillus subtilis* DSM 5750 und *Bacillus licheniformis* DSM 5749 Bioplus 2B in einem Ferkelaufzuchtfutter (pelletiert)“ gemäß der beiden Methoden durchgeführt.

Abb. 7 gibt einen Überblick über die vergleichenden Untersuchungen des Zusatzstoffes „Calsporin“ mit einem deklarierten Gehalt von 1×10^{10} KBE/g (1×10^{13} KBE/kg).

Die statistischen Daten für die Wiederholbarkeit und Vergleichbarkeit bei Durchführung der DIN EN-Methode lagen trotz zehnfacher Einwaage (20 g) höher als bei der VDLUFA-Methode (Einwaage 2 g). Demgegenüber erbrachte die CEN-Methode eine höhere Nachweisrate (117 %) als die VDLUFA-Methode.

	VDLUFA n = 13 Kein Ausreißer	CEN n = 12 1 Ausreißer
Wiederhol-STD	0,136 E+13 KBE/kg	0,199 E+13 KBE/kg
Vergleichs-STD	0,206 E+13 KBE/kg	0,259 E+13 KBE/kg
Rel.Wiederhol-STD	14,86 %	18,54 %
Rel. Vergleichs-STD	22,48 %	24,05 %
Mittelwert	0,916E+13 KBE/kg	1,075 E+13KBE/kg (= 117% von VDLUFA)

Abbildung 7: Vergleichende statistische Daten der Ringanalyse 381Q *B. subtilis*
Grund dafür ist die unterschiedliche Behandlung der Ausgangssuspension:

Als Suspendierungs- und Verdünnungslösung dient in der VDLUFA-Methode generell für alle Matrices eine **0,2 %-ige NaOH-Lösung**, d.h. der Zusatzstoff wird genauso behandelt wie die daraus hergestellten Produkte (Mineralfuttermittel, Vormischungen, Mischfuttermittel).

Die DIN EN Methode macht bei der Behandlung der Ausgangssuspension Unterschiede in Abhängigkeit von der untersuchten Matrix: Zusatzstoffe werden mit der bereits genannten **phosphatgepufferten Salzlösung** suspendiert, die zweite Verdünnung gelangt in eine Pepton-Salz-



Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten

Lösung und wird für **10 Minuten bei 80 °C erhitzt**. Vormischungen und Futtermittel hingegen werden in einer **0,2 %-igen NaOH-Lösung** suspendiert, die zweite Verdünnung in Pepton-Salzlösung **erhitzt**.

Die Behandlung von Futtermitteln und Vormischungen ist somit „härter“ als die Behandlung des Zusatzstoffes.

Diese Vorgehensweise der DIN EN-Methode kann in der Praxis zu Problemen führen. Während im Zusatzstoff eine ausreichende Keimzahl bestimmt wird, läßt sich diese Keimzahl nach dem Einmischen in das Mischfuttermittel durch die härtere Behandlungsmethode unter Umständen nicht bestätigen.

Die Ringanalyse 384Q (pelletiertes Mischfuttermittel) bestätigt diese Annahme (Abb.8)

	VDLUFA n = 13 1 Ausreißer	CEN n = 12 2 Ausreißer
Wiederhol-STD	0,082E+9KBE/kg	0,057 E+9KBE/kg
Vergleichs-STD	0,167E+9KBE/kg	0,089 E+9KBE/kg
Rel.Wiederhol-STD	9,14 %	7,25 %
Rel. Vergleichs-STD	18,54 %	11,34 %
Mittelwert	0,901 E+9KBE/kg	0,789 E+9KBE/kg (= 87,6% von VDLUFA)

Abbildung 8: Vergleichende statistische Daten aus der Ringanalyse 384Q *B. subtilis*/*B. licheniformis*

Bei Untersuchung des pelletierten Mischfuttermittels findet die DIN EN Methode lediglich 87,6 % der Sporenbildner gegenüber der VDLUFA-Methode: Hier sollte in der DIN EN-Methode unbedingt eine Harmonisierung der Bedingungen bei der Behandlung der Ausgangssuspension erfolgen.

Generell muss zur DIN EN 15784 angemerkt werden, dass sie sehr viele Fehler enthält, die zu Verwirrungen führen können:

- Zum Beispiel erfolgen Angaben zu den Einheiten in [g] statt in [ml], „Polysorbat 80“ statt Pepton-Salz-Lösung usw.
- Die Methode heißt im deutschen Text: „Keimzählung von *Bacillus* spp.“, in der englischen Fassung „Isolation and enumeration of presumptive *Bacillus* spp.“

Die Bezeichnung „presumptiv“ ist ohnehin falsch und überflüssig, sie wurde ohne inhaltlichen Sinn einfach nur aus bestehenden Methodentexten der *B. cereus*-Diagnostik übernommen.



Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten

Die DIN EN Methode beschreibt kulturmorphologisch *B. subtilis*, *cereus*, *coagulans* und licheniformis. Andere Bazillen, wie *B. amyloliquefaciens* sind nicht beschrieben. Eine einfache Übernahme der Methode zur Quantifizierung weiterer Bazillen ohne Validierung ist immer fragwürdig und riskant. In Abhängigkeit von der Koloniegroße muss in der DIN EN Methode auch unbedingt eine Differenzierung bei der Auszählbarkeit der Platten erfolgen (9.4). Keimzählplatten von bis zu 300 Kolonien sind für einige Species - besonders *B. licheniformis* nicht mehr auswertbar. Des Weiteren müsste in der DIN EN Methode unbedingt beschrieben werden, dass sich *B. subtilis*-Stämme in unterschiedlicher Koloniemorphologie auf den Platten entwickeln (Bioplus 2B, Calsporin, GalliPro u.a.).

Bei Nichtbeachtung bzw. Unwissenheit kann diese Tatsache zu Fehlinterpretationen und falschen Analyseergebnissen führen.

3 Vergleich der Leistungsdaten der DIN EN Normen und der VDLUFA-Methoden

Die Ergebnisse der vom Central Science Laboratory (UK) durchgeführten internationalen Ringanalysen wurden in logarithmischer Form bezogen auf KBE/g dargestellt und im Journal Sys. Appl Microbiol., sowie als Anhang A im jeweiligen Methodentext, veröffentlicht. Abgesehen von der völligen mathematischen Verzerrung und Fehlerhaftigkeit bei der Berechnung der relativen Werte (in Prozent) aus logarithmierten Daten, suggerieren die Zahlen eine hohe Genauigkeit.

Die Daten aus den VDLUFA-Ringversuchen wurden - vergleichsweise - deshalb ebenfalls logarithmiert.

3.1 *Saccharomyces cerevisiae*

Die Ergebnisse der VDLUFA-Ringanalyse 376Q (vgl. 2.1) mussten mit dem Datenmaterial eines Futtermittels des CEN-Ringversuchs mit 2×10^7 KBE/g („geringe Hefekonzentration“) aus dem internationalen Ringversuch verglichen werden (Abb. 9).

2×10^7 KBE/g (= 2×10^{10} KBE/kg) ist ein recht hoher Gehalt und entspricht nicht den gängigen Gehalten in kommerziell gehandeltem Mischfuttermittels. Der Vergleich mit dem Futtermittel der VDLUFA-Ringanalyse 376Q ist daher nicht sehr glücklich, es stehen aber keine geeigneteren Zahlen aus der DIN EN-Methode zur Verfügung. Von 20 Laboren aus 12 europäischen Ländern konnten die Ergebnisse von 9 Laboren (45 %) nicht in die Auswertung einbezogen werden.



Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten

	VDLUFA n = 14 1 Ausreißer	CEN n = 13 2 Ausreißer	Ringversuch CEN *) n = 11
Wiederhol-STD in log ₁₀ KBE/g	0,087	0,131	0,17
Vergleichs-STD in log ₁₀ KBE/g	0,165	0,469	0,55
Rel. Wiederhol-STD	1,50 %	2,52 %	2,38 %
Rel. Vergleichs-STD	2,86 %	9,01 %	7,68 %
Mittelwert in log ₁₀ KBE/g	5,773	5,200	7,13

*) 20 Labore aus 12 europäischen Ländern; 9 Ausreißer

Abbildung 9: Vergleich der statistischen Daten zwischen der VDLUFA-Ringanalyse 376Q und der internationalen Ringanalyse zu *S.cerevisiae* in logarithmischer Form

3.2 *Enterococcus faecium*

Die Ergebnisse der VDLUFA-Ringanalyse 377Q wurden mit dem Datenmaterial eines Futtermittels mit 4×10^5 KBE/g (geringe Konzentration) aus dem internationalen Ringversuch verglichen. (Abb. 10).

Trotz der Logarithmierung fallen die wesentlich höheren Wiederhol- und Vergleichsstandardabweichungen bei der DIN EN-Methode sowie die sehr hohe Ausreißerquote auf.



Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten

	VDLUFA n = 13 Kein Ausreißer	CEN n = 13 kein Ausreißer	Ringversuch CEN *) n = 14
Wiederhol-STD in log ₁₀ KBE/g	0,133	0,076	0,20
Vergleichs-STD in log ₁₀ KBE/g	0,150	0,167	0,41
Rel. Wiederhol-STD	2,08 %	1,22 %	3,60 %
Rel. Vergleichs-STD	2,36 %	2,66 %	7,37 %
Mittelwert in log ₁₀ KBE/g	6,368	6,255	5,52

*) 20 Labore aus 12 europäischen Ländern; 6 Ausreißer

Abbildung 10: Vergleich der statistischen Daten zwischen der VDLUFA-Ringanalyse 377Q und dem internationalen Ringversuch zu *E. faecium* in logarithmischer Form.

Die Ergebnisse der VDLUFA-Ringanalyse 390 Q mussten mit dem Datenmaterial eines Futtermittels mit 4×10^7 KBE/g (höhere Konzentration) in Kombination mit Lactobazillen und Hefen in gleicher Anzahl aus dem internationalen Ringversuch verglichen werden. (Abb. 11).

	VDLUFA n = 13 2 Ausreißer	CEN n = 13 1 Ausreißer	Ringversuch CEN *) n = 12
Wiederhol-STD in log ₁₀ KBE/g	0,06	0,10	0,12
Vergleichs-STD in log ₁₀ KBE/g	0,13	0,23	0,23
Rel. Wiederhol-STD	0,61 %	1,15 %	1,49 %
Rel. Vergleichs-STD	1,38 %	2,58 %	2,91 %
Mittelwert in log ₁₀ KBE/g	9,12	9,07	7,57

*) 20 Labore aus 12 europäischen Ländern; 8 Ausreißer

Abbildung 11: Vergleich der statistischen Daten zwischen der VDLUFA-Ringanalyse 390Q und der internationalen Ringanalyse zu *E. faecium* in logarithmischer Form



Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten

Der Vergleich der statistischen Daten dieser internationalen Ringanalyse (relativ niedrige Keimzahl) mit den Daten eines relativ hoch dotierten Ergänzungsfuttermittels aus dem VDLUFA-Ringversuch ist ungünstig. Es stehen aber keine geeigneteren Zahlen zur Verfügung. Auch bei dieser Ringversuchsauswertung fällt die extrem hohe Ausreißerrate in dem internationalen Vergleich auf.

3.3 Aerobe Sporenbildner

Die Ergebnisse der VDLUFA-Ringanalyse 381Q wurden mit dem Datenmaterial einer Vormischung mit ca. 10^9 KBE/g (hohe Konzentration) aus dem internationalen Ringversuch verglichen, die neben *Bacillus* spp (keine Stammbezeichnung!) als Begleitflora Pediokokken und Hefen enthielt.

Auch in diesem Fall sind die Leistungsdaten für beide durchgeführte Methoden aus der Ringanalyse 381Q wesentlich besser als die des internationalen Ringversuches. Von 17 Laboratorien aus 12 europäischen Ländern konnten die Ergebnisse von 6 Labore (35 %) nicht in die Auswertung einbezogen werden (Abb. 12)

Ein ähnliches Bild ergibt die Gegenüberstellung der Daten aus der Ringanalyse 384Q mit den Werten aus dem internationalen Ringversuch: Hier wurde ein Futtermittel untersucht, das ausschließlich *Bacillus* spp. (keine Stammbezeichnung!) in einer Konzentration von ca. 10^6 KBE/g enthielt. Sowohl die Leistungsdaten als auch die Ausreißerquote liegen im internationalen Ringversuch wesentlich schlechter als im VDLUFA-Ringversuch (Abb. 13).

	VDLUFA n = 13 Kein Ausreißer	CEN n = 12 1 Ausreißer	Ringversuch CEN *) n = 11
Wiederhol-STD	0,06	0,073	0,09
Vergleichs-STD	0,10	0,093	0,32
Rel. Wiederhol-STD	0,47 %	0,56 %	0,99 %
Rel. Vergleichs-STD	0,77 %	0,72 %	3,40 %
Mittelwert	12,95	13,021	12,53

*) 17 Labore aus 12 europäischen Ländern; 6 Ausreißer

Abbildung 12: Vergleich der statistischen Daten zwischen der VDLUFA-Ringanalyse 381Q und der internationalen Ringanalyse zu *Bacillus* spp.in logarithmischer Form



Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten

	VDLUFA n = 13 1 Ausreißer	CEN n = 13 1 Ausreißer	Ringversuch CEN *) n = 11
Wiederhol-STD	0,043	0,028	0,07
Vergleichs-STD	0,088	0,066	0,35
Rel. Wiederhol-STD	0,48 %	0,32 %	1,13 %
Rel. Vergleichs-STD	0,98 %	0,74 %	5,80 %
Mittelwert	8,946	8,911	8,950

*) 17 Labore aus 12 europäischen Ländern; 6 Ausreißer

Abbildung 13: Vergleich der statistischen Daten zwischen der VDLUFA-Ringanalyse 384Q und der internationalen Ringanalyse zu *Bacillus* spp.in logarithmischer Form

4. Anmerkung zum Leitfaden zur Kennzeichnung von Einzelfuttermitteln und Mischfuttermitteln des BMELV

Der Anhang IV mit den Toleranzen in Teil B - 'Toleranzen für angegebene Zusatzstoffe und deren stoffgleiche Inhaltsstoffe (analytische Bestandteile)' - des Leitfadens zur Kennzeichnung von Einzelfuttermitteln und Mischfuttermitteln des BMELV regelt die Verfahrensweise zur Beurteilung der Richtigkeit von Gehaltsangaben an Zusatzstoffen an Hand der technischen Toleranzen unter Berücksichtigung eventueller Analysenspielräume.

Die Gehaltsangabe zur Bestimmung der prozentual möglichen Abweichung erfolgt in definierten Einheiten: Für Probiotika entspricht eine Einheit 1×10^9 KBE/kg. Dies ist die gängige und etablierte Größeneinheit zur Angabe deklarerter Probiotika-Gehalte in einem Mischfuttermittel. Auf dieser Basis der Berechnung und unter Einbeziehung der vom VDLUFA erarbeiteten Analysenspielräume für Probiotika ist eine plausible, mathematisch nachvollziehbare und mit deklarierten Werten kompatible Form der Bewertung entstanden, die mit natürlichen Zahlen und nicht mit Logarithmen arbeitet.

Die in den DIN EN-Methoden erarbeiteten logarithmierten Leistungsdaten haben international einen hohen Stellenwert. Sie werden z.B. bei jeder Evaluierung eines neu zuzulassenden probiotischen Zusatzstoffes durch das EURL als ermittelte Leistungsdaten der anzuwendenden CEN-Methode zitiert.



Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten

Der Gebrauch dieser Leistungskenndaten ist allerdings aus verschiedener Sicht problematisch:

1. Die Ringanalysen wurden vor der Übernahme wesentlicher (= technischer) Korrekturen des jeweiligen Methodentextes durch das CEN/TC 327 durchgeführt. Streng betrachtet haben diese Ringanalysen also lediglich den Stellenwert von Enqueten zur Methodenentwicklung (M-Enqueten) und nicht zur Evaluierung der Leistungskenndaten (Q-Enqueten).
2. Die gewählten Ringversuchsmatrizes genügen nicht, um die Leistungsmerkmale der jeweiligen Methode umfassend zu beschreiben.
3. Das logarithmierte Zahlenmaterial lässt keinen mathematisch sinnvollen Vergleich zu den deklarierten Gehaltsangaben zu, eine Ableitung von Analysenspierräumen mit amtlichem Charakter ist aus diesem Datenmaterial unmöglich.
4. Die ermittelten Leistungskenndaten sind zusammengefasst so „schlecht“, dass sie keinesfalls als Grundlage für die amtliche Beurteilung von Untersuchungsergebnissen taugen. Von daher sollten diese CEN Methoden auch gar nicht erst die Grundlage für analytische Arbeiten in einem akkreditierten mikrobiologischen Labor sein.

Zusammenfassung

Die Ergebnisse der durchgeführten vergleichenden Ringanalysen legen die Forderung nahe, die bestehenden, in zahlreichen Ringanalysen validierten und in allen mit der Analytik im Rahmen der amtlichen Futtermittelüberwachung beauftragten Einrichtungen etablierten VDLUFA-Methoden zur Bestimmung probiotischer Futtermittelzusatzstoffe beizubehalten.

Die Anwendung dieser VDLUFA Methoden ist für Mineralfuttermittel sowieso immer notwendig.

Nachgewiesener Maßen sind die DIN EN Methoden für fettverkapselte Produkte nicht ausreichend beschrieben.

Im Zuge der 5-jährigen Revision der momentan veröffentlichten DIN EN Methoden müssen die vielen skizzierten technischen und redaktionellen Fehler unbedingt korrigiert und die Methoden im Bezug auf neue Produkte aktualisiert und erneut in Ringanalysen geprüft werden. Vor allem die Bearbeitung der Matrix Mineralfutter muss in die jeweilige Vorschrift ergänzt und eine entsprechende Evaluierung durchgeführt werden.

Insgesamt scheint es unbedingt notwendig, durch neue EU Ringanalysen solche Validierungsdaten zu erheben, die die CEN Methoden treffender charakterisieren.