



Carlotta Pribbenow, *1996 Elena Häring, *1995

Schulen:

Lise-Meitner-Schule, Berlin Heinz-Berggruen-Gymnasium, Berlin

Eingang der Arbeit: August 2013

Zur Veröffentlichung angenommen: Dezember 2013

Gesundheitsgefährdung durch falsche Lagerung?

Mikrobiologische Untersuchungen von Champignons, die unterschiedlich gelagert wurden

Mit mikrobiologischen Methoden und Aflatoxintests untersuchten wir Champignons nach zwei Tagen Lagerung in verschiedenen Verpackungen bei unterschiedlichen Temperaturen. Die Ergebnisse ergaben, dass man die Pilze am besten in der luftdurchlässigen Originalverpackung lagert.

1 Einleitung und Fragestellung

"... die Deutsche Gesellschaft für Mykologie hat mit einem Test nachgewiesen, dass 70 Prozent der Pfifferlinge für die Gesundheit der Konsumenten gefährlich sein können." [16] Nach diesem Radiobeitrag begann im Jahre 2010 unsere Arbeit über die Gesundheitsgefährdung durch Speisepilze. Doch auch wenn die Lebensmittelkontrollen funktionieren, kann der Verbraucher die Qualität der Lebensmittel noch nach dem Kauf erheblich beeinträchtigen: zum Beispiel durch falsche Lagerung von Champignons (Agaricus bisporus). Unsere Idee war es also, dem Verbraucher eine Empfehlung hinsichtlich der Art der Lagerung zu geben.

Bei unseren Versuchen lagerten wir Champignons zwei Tage in drei haushaltsüblichen Verpackungen bei unterschiedlichen Temperaturen und untersuchten sie anschließend mikrobiologisch. Das Vorkommen von Mikroorganismen, wie zum Beispiel Schimmeloder Hefepilzen in Lebensmitteln ist ein Kriterium für deren Qualität. Weil einige Schimmelpilzspezies das carcinogene Aflatoxin bilden, führten wir Aflatoxintests durch. Das Auszählen der Agarplatten bei mikrobiologischen Untersuchungen kostet immer sehr viel Zeit. Daher entwickelten wir ein Computerprogramm, das die Agarplatten für uns auszählt. Natürlich gibt es solche Programme schon, diese sind aber für uns unerschwinglich und kosten bis zu 149.000 € [17].

Wir stellten uns folgende Fragen:

Sind die untersuchten Champignons nach zwei Tagen Lagerung hygienisch einwandfrei oder möglicherweise gesundheitsgefährdend?

Ist die Temperatur bei der Lagerung relevant für die Qualität der Champignons?

Spielt die Art der Verpackung während der Lagerung eine Rolle für die Qualität der Champignons?

Steht die Anzahl der Schimmelpilze in den Proben in Korrelation zu der Aflatoxinkontamination?

Bietet ein Computerprogramm eine effiziente Möglichkeit, Kolonien auf Agarplatten zu zählen?

2 Schimmelpilze und Aflatoxine

"Auf Nahrungsmitteln ist das Wachstum von Schimmelpilzen [...] häufig mit der Bildung von Mykotoxinen [...] verbunden."[3] Es gibt "mehr als 300 verschiedene Mykotoxine" [26]. Doch "[...] nicht alle Schimmelpilze bilden Mykotoxine. Meist sind es nur bestimmte Arten, wobei sich das Toxinbildungsvermögen bei einer Art wiederum von Stamm zu Stamm stark unterscheiden kann." [26] Bereits in unserer letzten Jugend-Forscht-

Jugend forscht

Arbeit haben wir Champignons auf die Mykotoxine Aflatoxin und Deoxynivalenol (DON) getestet. Wir konnten jedoch nur Aflatoxin in den Proben nachweisen und testeten daher nur auf dieses. Als bekannteste Aflatoxinbildner gelten die Schimmelpilzarten Aspergillus flavus und Aspergillus parasiticus [3, 29].

"[...] die optimale Wachstumstemperatur der [...] [aflatoxinbildenden Aspergillen liegt bei 25–40 °C und der optimale Temperaturbereich für die Mykotoxinbildung bei 20–30 °C [...]" [20]. Daher müsste sich ein Unterschied in der Aflatoxinkontamination der Champignons bei deutlich unterschiedlichen Lagerungstemperaturen ergeben. Des Weiteren breiten sich "Schimmelpilze [...] gerne im feucht-warmen Milieu aus." [26] Demnach müssten Lagerungsvarianten mit mehr Luftaustausch in den Tests besser abschneiden.

Aflatoxine sind hochgiftig und gesundheitsgefährdend. "Dabei ist aber zu beachten, dass nicht jedes der verschiedenen Aflatoxin-Typen die gleiche Toxizität besitzt. Als das toxikologisch relevanteste gilt das Aflatoxin B1." [11] "Aflatoxine sind stark lebertoxisch (Lebernekrosen) und Carcinogene." [1] Durch die schnelle Resorption im Darm kann das Aflatoxin B1 sehr schnell in die Blutbahn und

damit zu den Organen gelangen. Dort erfolgt eine Metabolisierung [11]. "Die giftige Wirkung ist auf ihre durch Leberenzyme katalysierte Umwandlung in ein Epoxid zurückzuführen. Dieses reagiert spezifisch mit den Guaninbasen [...] der DNA und führt so zu DNA-Schädigungen." [27] Das kann dazu führen, dass es bei der DNA-Replikation und –Transkription zu Fehlpaarungen kommt. Bei den betroffenen Zellen kann es wiederum zur Entartung der Zellen und zur Bildung von Tumoren kommen [11].

3 Methoden

Insgesamt führten wir drei Versuchsreihen mit Doppelbestimmungen durch. Bei Doppelbestimmungen führt man zum Beispiel bei Probe A den Aflatoxintest zweimal durch, je nach der Abweichung der Werte kann man dann eine Aussage zur Aussagekraft der Testergebnisse machen.

3.1 Durchführung der Lagerungsversuche

"Champignons [halten] ca. drei Tage" [15]. Einige Hersteller garantieren, dass die Champignons innerhalb von 24 Stunden beim Verbraucher im Supermarkt angelangt sind [13], demnach lagerten wir sie dann zu Hause zwei Tage in drei haushaltsüblichen Lagerungsarten: Erstens in der Originalverpackung,

zweitens in einer Tupperbox und drittens lose auf einem Teller. Außerdem lagerten wir sie jeweils bei unterschiedlichen Temperaturen: bei Zimmertemperatur sowie im Kühlschrank. Eine weitere Portion Champignons froren wir in einer Gefriertüte in einem handelsüblichen Tiefkühlschrank ein. Für unsere Untersuchungen haben wir Champignons von REWE verwendet, da diese in einer Plastikverpackung mit Löchern wenig gequetscht gelagert waren.

3.2 Herstellen der Agarplatten

Nach eingehender Recherche [9] und unseren Erfahrungen aus den letzten Jahren haben wir uns für Sabouraud-Agar entschieden. Auf diesem Nährboden vermehren sich einzelne Organismen, wie z.B. Pilze oder Bakterien stark, die sichtbar werdenden Kolonien können dann ausgezählt werden [7].

Den Agar haben wir in hitzebeständige Purexflaschen (250 ml) eingewogen und mit Aqua destillata aufgefüllt. Um den Agar zu sterilisieren, wurde er autoklaviert, wobei er über 100°C erhitzt wurde. Kurz vor dem Gießen gaben wir noch 250 µl des Antibiotikums Ampicillin (100 mg/ml) pro Purexflasche hinzu und gossen nach und nach die Platten. Dieses Antibiotikum haben wir verwendet, um das Wachstum der Bakterien zu un-

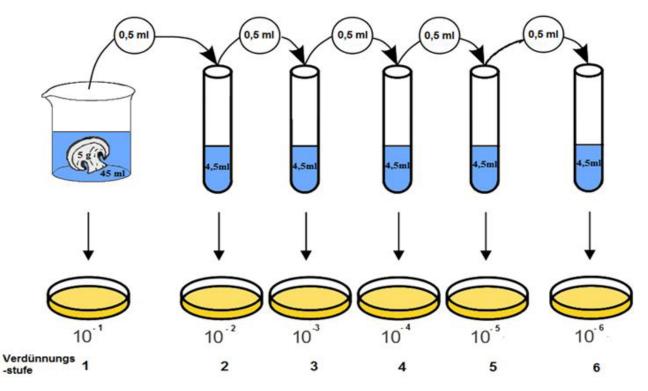


Abb. 1: Herstellen der Verdünnungsreihe. Zum Zerkleinern der Pilze verwendeten wir jedoch kein Becherglas sondern eine Plastiktüte.

terdrücken. So kann man die Schimmelpilze besser zählen, da insgesamt nicht so viele Kolonien auf den Agarplatten sind. Unter einer Clean Bench haben wir dann über einem Bunsenbrenner die Flaschenöffnungen abgeflammt und dann den Agar in eine – nur ein kleines Stück – geöffnete Agarplatte gegossen. Anschließend wurde die Platte kurz geschwenkt, damit sich die Flüssigkeit gleichmäßig verteilt.

3.3 Beimpfen der Agarplatten

Zunächst haben wir eine dekadische Verdünnungsreihe mit sechs Verdünnungsstufen hergestellt und dann alle Verdünnungsstufen ausplattiert. Hierfür verwendeten wir eine physiologische Kochsalzlösung (0,9 %ig; autoklaviert), damit die Zellen nicht durch Osmose zerstört werden.

Als erstes wurden 5 g Pilze abgewogen, in eine Plastiktüte gegeben, steril mit einem Hammer zerkleinert und danach mit 45 ml Kochsalzlösung verdünnt. Hier war das erste Abnehmen von Flüssigkeit möglich. Von dieser Flüssigkeit haben wir 0,5 ml abgenommen und mit 4,5 ml Kochsalzlösung verdünnt. So bekamen wir unsere zweite Verdünnungsstufe von 10⁻² (1:100). Für jede weitere Verdünnungsstufe haben wir jeweils 0,5 ml des vorherigen Ansatzes mit 4,5 ml Kochsalzlösung vermengt. So erhielten wir Verdünnungen von 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵ und 10⁻⁶ (Methode nach Süßmuth [10]).

Wir haben jeweils 100 µl Flüssigkeit der gewählten Verdünnung mit einem Drigalskispatel auf die Agarplatten ausplattiert (siehe Abb. 1, S. 37).

3.4 Bestimmung der Schimmelpilze

Zur Bestimmung der Schimmelpilze sind wir mit unseren Agarplatten ins Speziallabor für angewandte Mikrobiologie nach Berlin-Adlershof gefahren [23]. Hier wurden die Agarplatten geöffnet und Proben zum Mikroskopieren entnommen. Mit Hilfe der Bestimmungsliteratur wurden die Schimmelpilze bestimmt [4, 10].

3.5 Aflatoxintest

Um auf Mykotoxine zu testen, wird üblicherweise in der Lebensmittelindustrie die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) verwendet. Diese stand uns nicht zur Verfügung, dementspre-

chend verwendeten wir einen semiquantitativen Schnelltest, der zwar ungenauer, dafür aber wesentlich unkomplizierter in der Durchführung ist. Wir wählten den Schnelltest von R-Biopharm "RIDA® QUICK Aflatoxin" (Art. Nr.: R5204). Dieser Test ist eigentlich für Getreide, Datteln und Cashewkerne geeignet [8]. In [8] wird das Testprinzip wie folgt beschrieben: "Der immunchromatographische Test in Form eines Teststreifens basiert auf einer Antigen-Antikörper-Reaktion. Ein spezifischer anti-Aflatoxin Antikörper erkennt die Aflatoxinmoleküle in den Proben." [8]

Zur Durchführung zerkleinerten wir 5 g Champignons, gaben 10 ml Methanol (70 %) hinzu und schüttelten das verschlossene Röhrchen 4 Minuten lang mittels Vortexer. Daraufhin haben wir die Probe etwas sedimentieren lassen. damit wir 50 µl des klaren Überstandes mit 100 µl des Laufmittels mischen konnten. Davon haben wir 100 µl in den Teststreifen eingesetzt. Enthielt die Probe Aflatoxin, sahen wir nach kurzer Zeit eine rote Kontrollbande. Nach 4 min, 8 min beziehungsweise 16 min kontrollierten wir, ob sich eine zweite Bande zeigte. Je nachdem, wann und wie stark sich die Testbande zeigte, konnten wir den Aflatoxingehalt der Champignonprobe ablesen [8]. Wir führten bei jeder Pilzprobe den Aflatoxintest zweimal durch (Doppelbestimmung), um zu aussagekräftigen Ergebnissen zu kommen.

3.6 Computerprogramm zum Auszählen von Kolonien

Es gibt bereits Computerprogramme, die zum Auszählen von Kolonien verwendet werden, doch diese sind sehr teuer. Also beschlossen wir selber ein Programm zu schreiben.

Unser Computerprogramm arbeitet mit Ausschnitten von fotografierten Agarplatten. Wir haben es in der Programmiersprache "Java" geschrieben. Diese Ausschnitte müssen bislang noch mit einem Bildbearbeitungsprogramm bearbeitet werden, um die nötigen Kontraste zu erhalten. Wenn das Bild in das Computerprogramm geladen ist, muss der Nutzer einen Toleranzradius in Pixeln eingeben. Dieser Radius sollte in etwa dem Radius der Kolonien entsprechen.

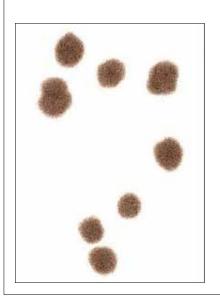
Das Computerprogramm gibt die berechnete Anzahl von Kolonien aus. In Abb. 2 ist es anhand der schwarzen Pixel möglich zu erkennen, wo die Kolonien auf der Agarplatte ursprünglich lagen. Der türkise Kreis zeigt den eingegebenen "Toleranzradius" an.

4 Ergebnisse und Auswertung

Tab. 1 zeigt die Zusammenfassung der Ergebnisse.

4.1 Verdünnungsreihe zur Keimzahlbestimmung

Die Ergebnisse beziehen sich auf den dritten Tag nach dem Ansetzen der Agar-





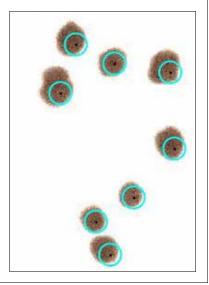


Abb. 2: Bearbeitete Darstellung des Fotos der Originalplatte (links) und Ausschnitt des Ergebnisses des Computerprogramms (rechts).

| Verpackung | Temperatur | KBE [%] | hochgerechnete Schimmelpilzanzahl [%] | Aflatoxingehalt [ppb] | |
|--------------------|-------------|---------|--|-----------------------|--|
| Originalverpackung | Kühlschrank | 44,80 | 24,8 | 2 | |
| Originalverpackung | Zimmer | 68,42 | 56,8 | 5 | |
| Tupperbox | Kühlschrank | 34,78 | 55,5 | 10 | |
| Tupperbox | Zimmer | 64,10 | 6,1 | 20 | |
| Lose | Kühlschrank | 11,01 | 5,4 | 12 | |
| Lose | Zimmer | 15,57 | 9,1 | 15 | |
| Gefrierbeutel | Tiefkühl | 8,69 | 1,9 | 20 | |

Tab. 1: Zusammenfassung der Ergebnisse / KBE: koloniebildende Einheiten pro ml Pilzsubstanz / Hochgerechnete Schimmelpilzanzahl: Anzahl der Schimmelpilze pro ml Pilzsubstanz.

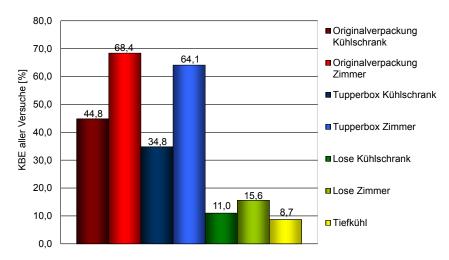


Abb. 3: Vergleich der Kolonie bildenden Einheiten (KBE) in % bei verschiedenen Lagerungsbedingungen.

platten. Wir bestimmten koloniebildende Einheiten (KBE) pro ml Pilzsubstanz nach einer in der Mikrobiologie gängigen Art. Dabei wurden die Verdünnungsstufen mit den Koloniezahlen, bei denen man den geringsten Fehler erwartet, am stärksten gewichtet [10].

Um das Problem der verschiedenen Anfangskeimzahlen beim jeweiligen Kauf der Pilze zu berücksichtigen und um die verschiedenen Versuchsreihen miteinander vergleichen zu können, haben wir für jede Versuchsreihe den höchsten hochgerechneten Wert gleich 100 % und die anderen Werte der Versuchsreihe ins Verhältnis zu diesem Grundwert gesetzt. Aus den drei Versuchsreihen haben wir dann den Mittelwert der Prozentsätze gebildet und grafisch dargestellt (s. Abb. 3 und Tab. 1).

In Abb. 3 fällt auf, dass im Kühlschrank gelagerte Champignons jeweils weniger mit Mikroorganismen kontaminiert sind als die bei Zimmertemperatur gelagerten. Die geringste Keimzahl wiesen die tiefgekühlten Champignons auf (8,7 %), wobei sie allerdings nicht mehr ansprechend aussahen. Im Gegensatz dazu waren die bei Zimmertemperatur in der Originalverpackung gelagerten Champignons am stärksten belastet (68,4 %). Zwar haben die Champignons, die in der Originalverpackung im Kühlschrank aufbewahrt wurden, prozentual eine geringere Keimzahl (44,8 %) als die Champignons, die in der Originalverpackung bei Zimmertemperatur (68,4 %) aufbewahrt wurden, jedoch haben sie insgesamt noch den schlechtesten Wert von den im Kühlschrank gelagerten Champignons. Bei den in der Tupperbox untergebrachten Pilzen verhält es sich ähnlich, die Werte sind nur etwas geringer: Die bei Zimmertemperatur gelagerten (64,1 %) schneiden schlechter ab als die im Kühlschrank gelagerten (34,8 %). Die geringste Keimzahl haben bei unseren Versuchen die lose aufbewahrten Champignons. Der Unterschied zwischen Kühlschrank (11 %) und Zimmertemperatur (15,6 %) ist hier nicht so hoch. Trotzdem ist die prozentuale Keimzahlbelastung bei den lose gelagerten Pilzen im Kühlschrank geringer.

4.2 Aflatoxintest

Die Ergebnisse der Aflatoxindoppelbestimmungen waren gleich, sodass wir hier keine Verfälschung der Tests erwarten. Uns haben die Aflatoxintests wichtige Informationen über die Gesundheitsgefährdung der getesteten Champignons geliefert. Der erlaubte Höchstgehalt für die Summe der Aflatoxine B1, B2, G1 und G2 beträgt laut der Kontaminanten-Verordnung 4 µg/kg (entspricht 4 ppb). Dieser Wert bezieht sich nicht speziell auf Champignons, sondern auf alle nicht extra aufgeführten Lebensmittel [5].

Nur die Champignons, die in der Originalverpackung im Kühlschrank gelagert wurden, weisen eine zugelassene Aflatoxinkontamination von nur 2 ppb auf. Bei allen anderen Proben lag die Aflatoxinkontamination über der zugelassenen Höchstmenge von 4 ppb (s. Tabelle 1 und Abb. 4). Mit einer relativ geringen Aflatoxinkontamination waren auch die in der Originalverpackung im Zimmer gelagerten Pilze belastet (5 ppb). Die lose gelagerten Champignons (kühl: 12 ppb; Zimmer: 15 ppb) sowie die kühl gelagerten Champignons in der Tupperbox (10 ppb) liegen im Vergleich unserer Proben im Mittelfeld. Im Gegensatz dazu hatten die Champignons in der Tupperbox bei Zimmertemperatur und die tiefgekühlten Champignons eine Aflatoxinkontamination von etwa 20 ppb. Insgesamt ist zu erkennen, dass der Verbraucher aufgrund der Aflatoxinkontamination seine Champignons lieber im Kühlschrank lagern sollte.

4.3 Bestimmung der Schimmelpilze 4.3.1 Quantitative Schimmelpilzbestimmung

Auch bei der Schimmelpilzanzahl haben wir die Schimmelpilze auf den Agarplatten auf 1 ml Pilzsubstanz hochgerechnet und dann die prozentuale Schimmelpilzanzahl berechnet (s. Tabelle 1 und Abb. 5).

Der höchste Wert liegt bei 56,8 % (Originalverpackung Zimmer) und der geringste bei 1,9 % (Tiefkühl). Ebenfalls sehr hoch ist die Schimmelpilzkontamination bei den in der Tupperbox im Kühlschrank gelagerten Champignons (55,5 %). Im Mittelfeld liegen die lose Zimmertemperatur gelagerten Champignons (9,1 %), während die im Kühlschrank in der Originalverpackung gelagerten Champignons deutlich darüber liegen (24,8 %). Die lose kühl gelagerten Pilze (5,4 %) sind etwa genauso stark belastet wie die Champignons, die in der Tupperbox im Zimmer (6,1 %) aufbewahrt wurden.

4.3.2 Qualitative Schimmelpilzbestimmung

Es gibt viele verschiedene Schimmelpilzgattungen, einige davon sind gesundheitsgefährdend. Zwar konnten wir Aflatoxine nachweisen, doch auch andere Schimmelpilze können giftige Stoffe bilden, auf die wir nicht getestet haben. Daher wollten wir alle Schimmelpilze bestimmen, damit wir Aussagen treffen können, ob eventuell weitere toxische Substanzen in unseren Champignons enthalten sein könnten. Es hätte die Möglichkeit bestanden, weitere Mykotoxin-Schnelltests durchzuführen, diese sind jedoch sehr teuer und nicht unbedingt für Champignons geeignet.

Bei der Bestimmung der Schimmelpilze haben wir fünf verschiedene Schimmelpilzgattungen gefunden und zwar die Gattungen *Penicillium, Cladosporium, Fusarium, Paecilomyces* und *Mucor*, jedoch keinen *Aspergillus*.

In der Tab. 2 ist die Gesamtanzahl der jeweiligen Schimmelpilze aus den Versuchen dargestellt.

Die wenigsten Schimmelpilzspezies konnten wir bei den kühl in der Originalverpackung gelagerten Champignons nachweisen. Hier wurden nur zwei *Cla*-

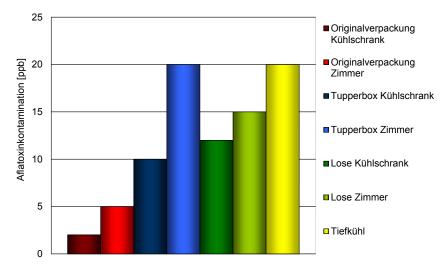


Abb. 4: Vergleich der Mittelwerte der Aflatoxinkontamination bei verschiedenen Lagerungsbedingungen. Der erlaubte Höchstwert liegt bei 4 ppb.

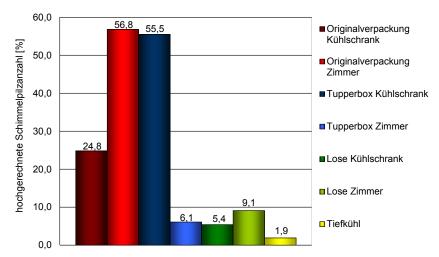


Abb. 5: Vergleich der hochgerechneten Schimmelpilzanzahlen in % bei verschiedenen Lagerungsbedingungen.

dosporien (siehe Abb. 7) bestimmt. Hingegen fanden wir bei den Champignons der Originalverpackung im Zimmer die meisten Schimmelpilze (insgesamt 154 Schimmelpilze). Davon waren alleine 140 Paecilomyces auf den Agarplatten gewachsen. Zudem noch 8 Cladosporien, 1 Penicillium (siehe Abb. 6) und 5 Mucor (siehe Abb. 8 und 9). Auch die in der Tupperbox im Kühlschrank aufbewahrten Champignons wiesen mit 30 Fusarien (siehe Abb. 10) und 14 Cladosporien eine hohe Anzahl Schimmelpilze (insgesamt 43 Schimmelpilze) auf. Mit 16 Schimmelpilzen (1 Fusarium, 13 Paecilomyces, 1 Cladosporium und 1 Mucor) liegen die Champignons der Tupperbox bei Zimmertemperatur im Mittelfeld. Bei den lose im Kühlschrank aufbewahrten Champignons haben wir nur Cladosporien (21) gefunden. Fast jede Schimmelpilzgattung (2 Penicillien, 2 Cladosporien, 3 Paecilomyces, 2 Mucor)

Abbildungen rechte Seite:

Abb. 6: Konidienträger eines Schimmelpilzes der Gattung *Penicillium* durch ein Mikroskop fotografiert (400fach vergrößert), Foto: SLM GmbH.

Abb. 7: Konidienträger eines Schimmelpilzes der Gattung *Cladosporium* durch ein Mikroskop fotografiert (400fach vergrößert). Foto: SLM GmbH.

Abb. 8: Konidienträger eines Schimmelpilzes der Gattung *Mucor* durch ein Mikroskop fotografiert (400fach vergrößert). Foto: SLM GmbH.

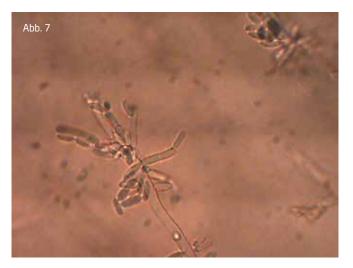
Abb. 9: Luftmycel eines Schimmelpilzes der Gattung *Mucor* durch ein Mikroskop fotografiert (100 fach vergrößert). Foto: SLM GmbH.

Abb. 10: Makrokonidien eines Schimmelpilzes der Gattung *Fusarium* durch ein Mikroskop fotografiert (400fach vergrößert). Foto: SLM GmbH.

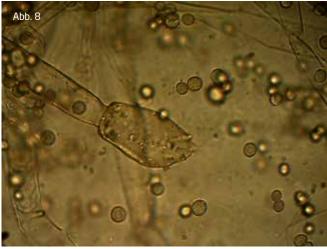
| Verpackung | Temperatur | Penicillium | Cladosporium | Fusarium | Paecilomyces | Mucor | Aspergillus |
|--------------------|-------------|-------------|--------------|----------|--------------|-------|-------------|
| Originalverpackung | Kühlschrank | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Originalverpackung | Zimmer | 1 | 8 | 0 | 140 | 5 | 0 |
| Tupperbox | Kühlschrank | 0 | 14 | 30 | 0 | 0 | 0 |
| Tupperbox | Zimmer | 0 | 1 | 1 | 13 | 1 | 0 |
| Lose | Kühlschrank | 0 | 21 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Lose | Zimmer | 2 | 2 | 0 | 3 | 2 | 0 |
| Gefrierbeutel | Tiefkühl | 0 | 4 | 0 | 17 | 0 | 0 |

Tab. 2: Gesamtanzahl der jeweiligen Schimmelpilze aller Versuche bei verschiedenen Lagerungsbedingungen.











haben wir bei den lose im Zimmer gelagerten Champignons festgestellt, sowie insgesamt 17 Paecilomyces und 4 Cladosporien bei den tiefgekühlten Champignons. Allgemein fanden wir sehr viele Cladosporien und Paecilomyces, hingegen kaum Penicillien.

4.3.3 Computerprogramm

Je weniger die Kolonien zusammengewachsen waren und je stärker sie sich im Foto von ihrem Untergrund abhoben, desto besser stimmte die vom Computerprogramm festgestellte Anzahl mit der vom Menschen gezählten Anzahl überein.

Wir haben jeweils 21 Agarplatten, auf denen nur Hefekolonien waren, fotografiert, per Hand gezählt und den Computer zählen lassen. Zudem haben wir darauf geachtet, dass die Kolonien nicht zu stark zusammengewachsen waren. Als Nachweis, dass ein Zusammenhang zwischen Zählung und Berechnung besteht, wird eine lineare Regressionsanalyse durchgeführt.

In Abb. 11 ist der Zusammenhang zwischen gezählten und berechneten Kolonien mit einem konstanten Toleranzradius von 20 Pixeln dargestellt. Der berechnete Verhältnisfaktor y beträgt hier 0,9549x. Das bedeutet, dass im Schnitt für eine gezählte Kolonie das 1,05 –fache berechnet wird. Der Korrelationskoeffizient R mit dem Wert 0,924 gibt an, dass ein hoher Zusammenhang besteht. Denn R = 0 bedeutet keinen Zusammenhang und R = 1 einen vollkommen proportionalen Zusammenhang [21].

Am Anfang hatten wir einen konstanten Toleranzradius, doch uns ist aufgefallen, dass der Toleranzradius von der Anzahl der Pixel pro Kolonie abhängt und dass ein variabler Toleranzradius somit noch sinnvoller wäre.

Bei dieser Auswertung schaut sich der Mensch das ausgewertete Bild an und beurteilt, ob das Ergebnis zufriedenstellend ist. Wenn nicht, wird der Toleranzradius verändert und die Auswertung noch einmal gestartet. Dabei wird der Toleranzradius in Fünferschritten verändert, da Einerschritte zu viel Zeit in Anspruch nehmen würden und dies keinen gravierenden Unterschied mehr machen würde (R = 0,998). Abb. 12 verdeutlicht,

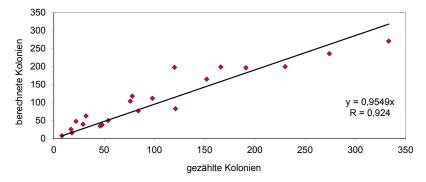


Abb. 11: Zusammenhang gezählter und berechneter Kolonien mit konstantem "Toleranzradius".

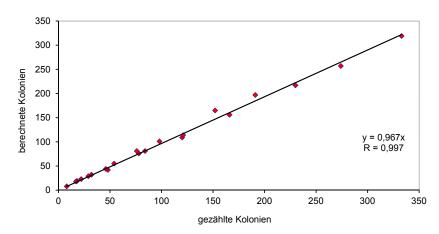


Abb. 12: Zusammenhang gezählter und berechneter Kolonien mit variablem "Toleranzradius".

dass es nahezu keine Streuung mehr gibt. Dies bestätigt der Korrelationskoeffizient R = 0,997. Dies zeigt einen beinahe perfekten linearen Zusammenhang zwischen den per Hand gezählten und den vom Computer berechneten Kolonien. Der Computer berechnet hierbei immer das 1,03-fache.

5 Diskussion

Wir haben nur Aflatoxine in den Champignons nachgewiesen. Durch die vorhandenen Schimmelpilze könnten aber auch noch weitere Mykotoxine wie z.B. Ochratoxin A oder Deoxynivalenol vorhanden sein. Diese sind unter anderem immunsuppressiv oder nephrotoxisch [18].

Aber schon allein die nachgewiesenen Aflatoxine machen unsere untersuchten Champignons gefährlich genug: Aflatoxine gelten als giftig für den Menschen. Aus diesem Grund wurde in der Kontaminanten-Verordnung vom 19.3.2010 einen Höchstgehalt von 4 ppb für die Summe der Aflatoxine B1, B2, G1 und G2 in allen nicht extra aufgeführten Lebensmitteln festgelegt [5]. Das bedeutet, dass nur eine Lagerungsmethode für Champignons in Bezug auf die Aflatoxinkontamination verwendet

werden dürfte: Die Originalverpackung im Kühlschrank.

In allen Versuchen hatten kühl gelagerte Champignons eine bessere Qualität als bei Zimmertemperatur gelagerte Champignons (siehe Abb. 3 bis 5). Nur im Hinblick auf die Schimmelpilzkontamination der in der Tupperbox gelagerten Pilze hatten kühl gelagerte Champignons eine schlechtere Qualität. Möglicherweise lag das daran, dass sich im Kühlschrank in der Tupperbox Feuchtigkeit bildet, die das Schimmelpilzwachstum fördert: "Schimmelpilze sitzen nicht auf dem Trockenen" [25].

Tiefgekühlte Champignons kann man nicht mehr so gut verarbeiten, sie sind etwas matschig. Zwar wiesen sie bei der Keimzahlbestimmung (8,69 %) sowie hinsichtlich der Schimmelpilze (1,9 % und 17 *Paecilomyces*) eine niedrige Kontamination auf, aber ihre Aflatoxinbelastung war mit 20 ppb deutlich zu hoch. Das könnte daran liegen, "dass während des Tiefkühlens Eiskristalle wachsen, die die empfindlichen Zellen zerstören." [14] Die hohe Aflatoxinbelastung könnte daher kommen, dass "Mykotoxine [...] entweder in das Substrat, auf dem die

Jugend forscht

[Schimmel]pilze wachsen ausgeschieden, oder in den Zellen eingelagert und dann freigesetzt [werden], wenn das Pilzmycel (Zellverbund der Pilzfäden) auseinander bricht." [26]

Hinsichtlich hochgerechneten der Schimmelpilzanzahlen haben die unverpackten Champignons die besten Ergebnisse erzielt. Auch bei den Keimzahlbestimmungen konnten sie brillieren. Im Gegensatz dazu kamen sie bei den Aflatoxintests schlechter weg. Die Aflatoxinbildung wird (neben Temperatur und Feuchtigkeit) auch von anderen Umweltfaktoren, wie das Vorhandensein von molekularem Sauerstoff, beeinflusst. Kohlenstoffdioxid hingegen hemmt die Bildung [6]. Vielleicht ist das dann gerade bei den lose gelagerten Pilzen der Fall: viel Sauerstoff und keine erhöhte Kohlenstoffdioxidkonzentration in der Luft. Bei der Aflatoxinproduktion gibt es offensichtlich zwischen den verschiedenen Umweltfaktoren eine Wechselwirkung.

Hinsichtlich der Aflatoxinkonzentration konnte sich im Vergleich die Originalverpackung durchsetzen. Diese sind andererseits bei der Keimzahlbestimmung und vor allem bei der hochgerechneten Schimmelpilzanzahl auf der Strecke geblieben. Schlecht schnitten wie erwartet vor allem die Pilze in der Tupperbox ab. Die Tupperbox eignet sich schon deshalb nicht zur Lagerung von Champignons, weil man Champignons laut Stiftung Warentest in einem luftdurchlässigen Gefäß lagern sollte [24]. Unsere Ergebnisse bestätigen dies.

keinem unserer Versuchsansätze stimmt die Anzahl der Schimmelpilze mit der Aflatoxinkontamination überein. Besonders auffällig ist dies bei den originalverpackten Champignons bei Zimmertemperatur: Sie wiesen eine sehr geringe Aflatoxinbelastung auf und besaßen im Gegensatz dazu im Vergleich die meisten Schimmelpilze. Andersherum waren die tiefgekühlten Champignons stark mit Aflatoxin belastet, während sie bei den Schimmelpilzen am besten abschnitten. Auch bei den anderen Versuchen ließ sich keine Korrelation feststellen. Das könnte daran liegen, dass wir keinen Schimmelpilz der Gattung Aspergillus bestimmen konnten, der als Aflatoxinbildner am bekanntesten ist. Für Europa gelten sie [die Aflatoxine] deshalb als "importierte Toxine" [19]. Aus diesem Grund sind die hohen Aflatoxingehalte eher schwer zu erklären. Da wir weder den gesamten Pilz noch die pürierte unverdünnte Pilzsubstanz verwendet haben, ist es also durchaus möglich, dass wir deshalb keinen Aspergillus in den ausplattierten Verdünnungsstufen nachweisen konnten. "Da unterschiedliche Schimmelpilzarten inkonstant Mykotoxine produzieren, kann man aus dem Ausmaß der Verpilzung [...] nicht sicher auf das Vorhandensein und die Menge eines evtl. produzierten Mykotoxins schließen." [22]

Das Computerprogramm wertet die Platten effizienter aus als wir. Der Korrelationskoeffizient bei variablem Toleranzradius ist sehr gut (s. Abb. 5), sodass das Computerprogramm bereits verwendet werden könnte. Bei hohen Koloniezahlen ist es effizienter als der Mensch, bei geringen Koloniezahlen zählt der Mensch beim derzeitigen Entwicklungsstand noch schneller.

Bei den Agarplatten müssen wir vor dem Einlesen in das Programm die Kontraste im Bild erhöhen, das kostet Zeit. Außerdem kann das Computerprogramm dicht zusammen liegende Kolonien teilweise nicht unterscheiden. Allerdings macht auch ein Mensch Fehler beim Auszählen, z.B. durch den Koinzidenzfehler [10]. Mit dem Computerprogramm können auch kleine Agarplatten mit Schimmelpilzen ausgewertet werden.

Die Auswertung mit dem variablen Toleranzradius dauert länger als bei einem konstanten Toleranzradius von 20 Pixeln, ist dafür aber genauer. Sinnvoll wäre es, das Programm so zu verändern, dass es automatisch den günstigsten Toleranzradius bestimmt.

6 Fehlerbetrachtung

Um Lagerungsversuche durchzuführen, wäre es sinnvoll, die Ausgangskeimzahl der gekauften Champignons zu bestimmen. Ein großes Problem war, dass keine Mykotoxintests für Champignons auf dem Markt zu finden waren. Dementsprechend mussten wir auf andere Tests ausweichen. Es besteht die Möglichkeit, dass unsere Tests dadurch verfälscht sind. Auffällig war auch, dass wir die typischen Aflatoxinbildner Aspergillus flavus und Aspergillus parasiticus nicht auf unseren

Agarplatten bestimmen konnten. Positiv zu bemerken ist trotz allem, dass wir in zwei Pilzproben keine Aflatoxine gefunden haben. Das deutet darauf hin, dass sich nicht unbedingt andere Stoffe in den Champignons befinden, auf die die Tests reagieren.

Sollte diese Arbeit fortgesetzt werden, würden wir die Methode der Mykotoxintests weiterverwenden. Es wäre auch möglich, die Champignons auf ein weiteres Mykotoxin zu prüfen, zumal wir einige mykotoxinbildende Schimmelpilze identifizieren konnten.

7 Empfehlungen für den Kauf und die Lagerung von Champignons

Wenn man Champignons für eine Pilzpfanne verwenden möchte, sollte man sie erst kurz vorher kaufen und nicht lagern. Beim Kauf sollte man auf folgende Dinge achten: Es sollte eine Prüfung erfolgen. Die Pilze sollten: "nicht überreif, nicht alt, nicht übermäßig wässrig, frei von sichtbarem Schimmel " sein [12].

Allgemein sollte man "Lebensmittel von regionalen Erzeugern kaufen"[2], denn damit kauft man vermutlich nicht nur frischere Pilze, sondern schont auch noch die Umwelt. Auch sollte man auf den Preis der Champignons achten. Teuer heißt zwar nicht gleich gut, aber unsere Tests in einer vorigen Arbeit zeigten, dass man sich zumindest nicht mit den billigsten Pilzen zufrieden geben sollte.

Sollte man um eine Lagerung nicht herumkommen, ist auf Folgendes zu achten: Champignons sollten kühl gelagert werden.

Um eine geringe Aflatoxinkontamination zu erreichen, sollten sie hierbei in der Originalverpackung aufbewahrt werden, das heißt in einer stabilen, luftdurchlässigen Verpackung und ungequetscht. Die andere Möglichkeit wäre, sie lose aufzubewahren, damit nur wenige Schimmelpilze wachsen.

Wichtig ist, die Pilze nicht luftdicht verpackt zu lagern!

Zuhause tiefgekühlte rohe Champignons weisen eine hohe Aflatoxinbelastung auf und sehen nicht mehr gut aus – nicht empfehlenswert!

Jugend forscht

Danksagung

Ganz herzlicher Dank gebührt unserer betreuenden Lehrerin Grit Markschies, die uns mit Rat und Tat unterstützt hat. Wir

danken auch Dr. Birgit Fiedler für unseren Besuch in ihrem Speziallabor für angewandte Mikrobiologie und die vielen hilfreichen Tipps. Für die Unterstützung beim Computerprogramm danken wir Roland Illigner. Besonders dankbar sind wir den Juroren von Jugend Forscht, die uns motiviert haben, die Arbeit fortzusetzen.

Quellenverzeichnis

- [1] Baltes, Werner: Lebensmittelchemie 4. Auflage, Springer Verlag. Berlin- Heidelberg 1995. S. 248.
- [2] Balz, Julia et al.: Das Klimakochbuch. Franckh-Kosmos Verlags-GmbH & Co. KG, Stuttgart 2009. S.11.
- [3] Fuchs, Georg (Hrsg.): Allgemeine Mikrobiologie. Thieme Verlag. Stuttgart, New York 2007. S. 74, 87.
- [4] Glaubitz, Max/ Koch, Richard: Atlas der Gärungsorganismen. Paul Parey Verlag Berlin, 4. Auflage. S. 60, 66.
- [5] Kontaminanten-Verordnung vom 19. März 2010 (BGBl. I S. 287) Verlag. Hamburg 1968.
- [6] Munk, Katharina: Mikrobiologie. Spektrum Akademischer Verlag. Heidelberg, Berlin 2000. S. 7-12.
- [7] R-Biopharm AG: Beiheft zu RIDA* QUICK Aflatoxin, Darmstadt 23.3.2011. S. 3-5.
- [8] Rieth, Hans: Mykologie im Labor. Biotest-Serum-Institut GmbH. Frankfurt a. M. 1977.
- [9] Seeliger, Heinz P. R. und Heymer, Theresia: Diagnostik pathogener Pilze des Menschen und seiner Umwelt. Georg Thieme Verlag. Stuttgart, New York 1981. S. 264.
- [10] Süßmuth, Roland et al.: Mikrobiologisch-Biochemisches Praktikum. Thieme Verlag. Stuttgart, New York 1992. S. 24-25.
- [11] http://www.alc.wzw.tum.de/index.php?id=50 , Lehrstuhl für Analytische Lebensmittelchemie Univ.-Prof. Dr. Michael Rychlik, zuletzt gelesen am 14.02.2013 um 18.42 Uhr
- [12] http://www.bmelv.de/SharedDocs/Downloads/Ernaehrung/Lebensmittelbuch/LeitsaetzePilze.pdf, Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz, Leitsätze für Pilze und Pilzerzeugnisse zuletzt gelesen am 18.12.2012 um 19.51 Uhr
- [13] http://www.dohmepilze.de/index.swf, Dr. Ferdinand Dohme, Verkauf von Champignons zuletzt gelesen am 5.01.2012 um 16.54 Uhr
- [14] http://eatsmarter.de/magazin/thema-des-tages/lebensmittel-einfrieren/, Dirk Manthey, Lebensmittel einfrieren, zuletzt gelesen am 16.03.2013 um 23.05 Uhr
- [15] http://www.hausgarten.net/garten-kreativ/pilze/champignons.html, Marcel Klitzsch, Champignons züchten und zubereiten, zuletzt gelesen am 04.01.2013 um 15.53 Uhr
- [16] http://www.heilpraxisnet.de/naturheilpraxis/70-prozent-der-pfifferlinge-gesundheitsgefaehrdend-7021.php, Päd. Sebastian Bertram, Gesundheitsgefährdung von Pfifferlinge zuletzt gelesen am 31.01.13 um 16.45 Uhr
- [17] http://www.laborjournal.de/rubric/produkte/products_12/LjPr-12-04.pdf, Carsten T. Rees, zuletzt gelesen am 25.03.2013 um 17.23 Uhr
- [18] http://www.landwirtschaft.sachsen.de/landwirtschaft/download/2010_07_27_Schimmelpilze_Mykotoxine.pdf , Landesamt für Umwelt, Landwirtschaft und Geologie Sachsen, zuletzt gelesen 22.03.2013 um 12.36 Uhr
- [19] http://www.laves.niedersachsen.de/portal/live.php?navigation_id=20053&article_id=73244&_psmand=23 am 17.12.2013 um 19.23 Uhr
- [20] http://www.lgl.bayern.de/lebensmittel/chemie/schimmelpilzgifte/aflatoxine/index.htm, Dr. Matthias Berger Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit, Aflatoxine zuletzt gelesen am 27.12.2012 um 14.57 Uhr
- [21] http://www.medi-stat.de/statistik-lexikon-medizin-pearson-korrelation.html, medistat GmbH, zuletzt gelesen am 26.12.2012 um 14.36 Uhr
- [22] http://pferdeklinik-empfingen.de/downloads/MerkblattdesPGDzuMykotoxinen090302.pdf,
 Tierseuchenkasse Baden-Württemberg, Mykotoxine in Pferdefutter zuletzt gelesen am 26.03.2013 um 23.23 Uhr
- [23] http://www.speziallabor.com, SLM Speziallabor für angewandte Mikrobiologie GmbH, SLM Speziallabor für angewandte Mikrobiologie GmbH, zuletzt gelesen am 28.01.2013 um 13.04 Uhr
- [24] http://www.test.de/Wildpilze-Das-Geheimnis-der-Pilze-1163075-1163678/, Andreas Gebauer, Pilze lagern, zuletzt gelesen am 20.11.2012 um 16.53 Uhr
- [25] http://www.umweltdaten.de/publikationen/fpdf-l/2227.pdf, Dr. Regine Szewzyk et al., Schimmel im Haus, zuletzt gelesen am 22.12.2012 um 14.07 Uhr
- [26] http://www.vis.bayern.de/ernaehrung/lebensmittelsicherheit/unerwuenschte_stoffe/mykotoxine.htm, Dr. Gabriele Engelhardt, Mykotoxine - Giftige Stoffwechselprodukte von Schimmelpilzen zuletzt gelesen am 29.12.2012 um 13.29 Uhr
- [27] http://www.wissenschaft-online.de/abo/lexikon/biok/266 zuletzt gelesen am 01.03.2013 um 13.56 Uhr