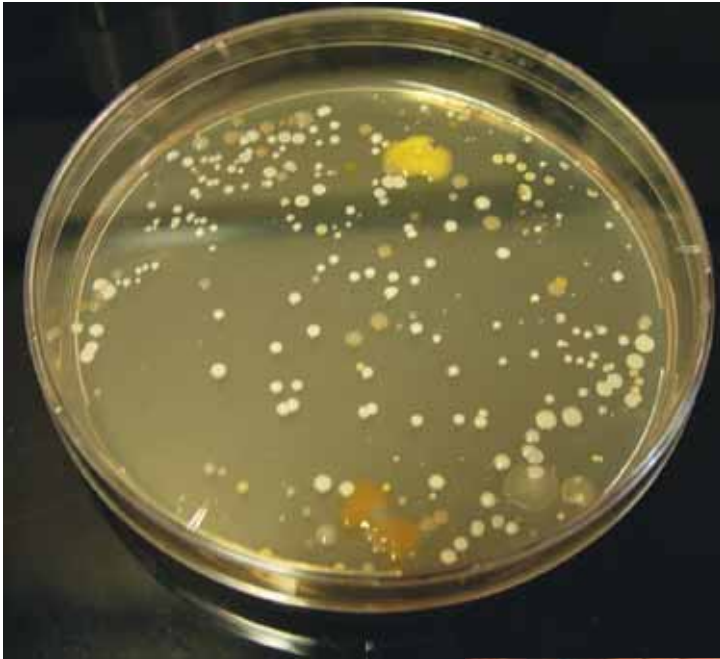


# MIKROBIOLOGISCHE KRITERIEN IN DER KÄSEFABRIKATION

Diskussionsgruppen



Schweizerische Eidgenossenschaft  
Confédération suisse  
Confederazione Svizzera  
Confederaziun svizra

Eidgenössisches Volkswirtschafts-  
departement EVD  
**Forschungsanstalt**  
**Agroscope Liebefeld-Posieux ALP**



## Inhalt

1	Einleitung	4
2	Die Rohmilchflora	5
3	Indirekte Methoden zur Erfassung der mikrobiologischen Qualität der Milch	6
3.1	Reduktase	6
3.2	Säuregrad der Milch nach 11 Stunden bei 38°C - „Luzernerprobe“	7
3.3	Gärprobe	8
3.4	Keimbelastung der Milch gemäss MQV und VHyMP	9
4	Allgemeine klassisch-mikrobiologische Prüfmerkmale	10
4.1	Aerobe, mesophile Keimzahl (AMK)	10
4.2	Aerobe, mesophile Fremdkeime (FKZ)	11
4.3	Salztolerante Keime	12
4.4	Psychrotrophe Keime	13
4.5	Lipolytische Keime (Lipolyten)	14
4.6	Proteolytische Keime (Proteolyten)	14
5	Selektive Bestimmung bestimmter Keimgattungen und -arten	15
5.1	Aerobe Sporen (Bacillus)	15
5.2	Anaerobe Sporenbildner (Buttersäuresporen nach MPN-Methode ALP)	16
5.3	Clostridium tyrobutyricum (Filtrationsmethode)	18
5.4	Propionsäurebakterien	19
5.5	Fakultativ heterofermentative Laktobazillen (FHL)	20
5.6	Obligat heterofermentative Laktobazillen (OHL)	21
5.7	Enterobakterien	22
5.8	Fäkalindikatoren	23
5.9	Koagulasepositive Staphylokokken	26
6	Durch schädliche Keime hervorgerufene Käsefehler	27
7	Richtwerte für Rohstoffe und Halbfabrikate	28
7.1	Lieferantenmilch	28
7.2	Fertiger- und Kessmilch	28
7.3	Emmentaler 24 h	28
7.4	Gruyère 24 h	29
7.5	Tilsiter und Appenzeller Käse 24 h	29
8	Toleranzwerte für Trinkwasser (unbehandelt, im Verteilernetz)	29
9	Probenplan gemäss Hygieneverordnung (Stand 25. Mai 2009) und QM Fromarte 2008	30

## Abkürzungen

KBE	Koloniebildende Einheiten
FHL	Fakultativ heterofermentative Lb.
GHP	Gute Herstellungspraxis
GW	Grenzwert
HyV	Hygieneverordnung
MQV	Milchqualitätsverordnung
MPN	wahrscheinlichste Zahl (Most Probable Number)
OPA	Ortho-Phthaldialdehyd-Wert = Mass für die freien Aminosäuren
SLMB	Schweiz. Lebensmittelbuch
sp.	Spezies (Arten)
ssp.	Subspezies (Unterarten)
TW	Toleranzwert
VHyMP	Verordnung über die Hygiene in der Milchproduktion
wff	Wasser im fettfreien Käse

## 1 Einleitung

Es sind fast immer Mikroorganismen, die den Verderb von Milch und Milchprodukten verursachen. Selbst bei keimfreien UHT-Produkten sind es oft die von Bakterien der Rohmilchflora gebildeten Stoffe, welche die Haltbarkeit limitieren. Mikroorganismen sind auch die wichtigste Ursache von Käsefehlern. Der Käser weiss, dass sich nur aus qualitativ einwandfreier, frischer Milch und durch die sichere Lenkung des mikrobiologischen Geschehens qualitativ herausragender und gut lagerfähiger Käse herstellen lässt. In der Praxis sind die Reduktaseprobe und die Luzernerprobe sowie die gärtechnischen Kontrollen während der Fabrikation natürlich die wichtigsten Überwachungsinstrumente. In vielen Fällen sind aber mikrobiologische Untersuchungen auf ganz bestimmte Keime oder Keimgruppen notwendig. Beispiele:

- Rohmilchuntersuchung auf Fehlgärungserreger
- Rohmilchuntersuchung auf pathogene Keime
- Trinkwasseruntersuchung
- Endproduktkontrollen
- Untersuchung von Umgebungsproben auf pathogene Keime (z.B. Listerienmonitoring gemäss HyV Art. 58d)

Im vorliegenden Diskussionsgruppenstoff werden die wichtigsten mikrobiologischen Kriterien in der Milchverarbeitung, ihre praktische Bedeutung und soweit möglich Richtwerte und Toleranzwerte für Rohmilch, Trinkwasser und Produkte vorgestellt. Von den pathogenen Keimen wird nur auf Staphylokokken eingegangen.

## 2 Die Rohmilchflora

Milch aus gesunden Eutern ist ein weitgehend steriles Sekret. Die bakterielle Verunreinigung beginnt beim Passieren des Strichkanals. Die wichtigsten Kontaminationsquellen liegen aber ausserhalb des Euters. Beispiele: Haut von Zitzen und Euter, Melkgeräte, Transportleitungen, Lager- und Transportbehälter, die Umgebungsluft, von Zitzenbechern aspirierter Schmutz usw. Auch die Faktoren Zeit und Temperatur spielen eine grosse Rolle, d.h. die Keimvermehrung zwischen der Gewinnung und der Verarbeitung der Milch.

Hinsichtlich der Verarbeitungstauglichkeit der Milch ist nicht nur die Keimbelastung insgesamt, sondern auch die Zusammensetzung der Keimflora entscheidend. Bekanntlich können schon wenige Buttersäuresporen in einer ansonsten absolut einwandfreien Milch ganze Käseproduktionen vernichten. Untersuchungen auf spezifische Keime oder Keimgruppen rechtfertigen sich aber nicht nur in Bezug auf spezifische Risikokeime. Die Zusammensetzung der Milchflora liefert auch wertvolle Hinweise auf die Herkunft der Keime und damit auf mögliche Kontaminationsquellen (siehe Tab. 1).

Die mikrobielle Flora von frischer Rohmilch besteht in der Regel vorwiegend aus grampositiven Keimen. Während der Kühlagerung der Milch vermehren sich aber vor allem gramnegative Keime, so dass nach 1-2 Tagen eine von gramnegativen Keimen dominierte Flora vorliegt.

Die Auswahl der Prüfparameter bzw. der Methoden richtet sich nach der Zielsetzung der Untersuchungen, der Art Probenmaterials und nicht selten auch nach den Kosten. Nachweise und Keimzählungen von bestimmten Keimen oder Keimgruppen sind oft nur in speziell eingerichteten Labors durchführbar und wesentlich teurer als die Praxismethoden, liefern aber in der Regel präzisere Informationen.

**Tabelle 1:** Typische Keime der Rohmilchflora

	Typische Vorkommen	Psychrotroph
<b>Grampositive Keime</b>		
- aerobe Sporenbildner	Erde, Staub, Heu	teilweise
- anaerobe Sporenbildner (Clostridien)	Silage, gärendes Grünfutter, Morast	nein
- Enterokokken	Kot, Milchrückstände	nein
- Staphylokokken	Haut, Schleimhäute	nein
- Mikrokokken	Haut, Milchrückstände	teilweise
- Propionsäurebakterien	Haut, Milchrückstände	nein
- Milchsäurebakterien	Pflanzen, Silage, Milchrückstände, Schleimhäute	nein
- Coryneforme Bakterien	Haut, Boden	teilweise
<b>Gramnegative Keime</b>		
- Colibakterien (E. coli)	Kot, Abwasser	nein
- Enterobakterien	Pflanzen, Kot, Abwasser	teilweise
- Pseudomonaden	Wasser, Boden	ja
- Alcaligenes, Flavobacterium etc.	Wasser, Boden	ja
<b>Hefen</b>	Boden, Pflanzen, Milchrückstände	ja

### 3 Indirekte Methoden zur Erfassung der mikrobiologischen Qualität der Milch

#### 3.1 Reduktase

Der in der Milchwirtschaft verbreitet angewandte Methyleneblau-Reduktase-Test ist eine indirekte Methode zur einfachen Überwachung der mikrobiellen Belastung der Rohmilch. Als Qualitätskriterium findet man die „Reduktase“ teilweise auch in Milchkaufverträgen.

<b>Methode / Definition:</b>	Entfärbungszeit der Milch bei 38 °C nach Zugabe von Methyleneblau (Vorbebrütete Reduktase: vorgängige Bebrütung bei 30°C/11 h)
<b>Anwendungsbereich:</b>	Qualitätskontrolle Lieferantenmilch, bakteriologischer Status der Kessmilch (Fabrikationskontrolle)
<b>Aussagewert:</b>	Ungefähres Mass für der Belastung der Milch mit rasch wachsenden Keimen
<b>Einschränkungen:</b>	Abhängig vom Sauerstoffeintrag in die Milch Abhängig von der Zusammensetzung der Flora
<b>Anforderungen:</b>	Standardreduktase-Test: Lieferantenmilch > 6 h Entfärbezeit Vorbebrütete Reduktase: Lieferantenmilch 15-30 min Entfärbezeit (abhängig von Käsesorte bzw. Milchlagertemperatur)

Beim Reduktase-Test wird die Keimbelastung der Milch indirekt anhand der Senkung des Redox-Potenzials gemessen, welche sich als Folge der mikrobiellen Stoffwechsellätigkeit ergibt. Vereinfacht gesagt: Die Mikroorganismen verzehren den in der Milch gelösten Sauerstoff, was mit der Entfärbung des Methyleneblaus angezeigt wird. Milcheigene Enzyme und andere Milchinhaltstoffe wie Vitamin C, Riboflavin und Kupfer, aber auch Licht beeinflussen die Methyleneblau-reduktion. Ausserdem spricht der Test nicht bei allen Mikroorganismen gleich gut an (siehe Tab. 2):

**Tabelle 2:** Reaktion verschiedener Keimgruppen im Methyleneblau-Reduktasetest

#### Reduktasereaktion

<b>stark</b>	<b>mittel</b>	<b>schwach</b>
Coliforme Keime	Staphylokokken	Anaerobe Sporenbildner Pseudomonaden
Enterokokken	Streptococcus salivarius ssp. thermophilus	
Laktokokken	Laktobazillen Bacillus sp.	Bacillus cereus

Wie oben ersichtlich ist, bewirken Laktokokken und Coliforme eine schnellere Reduktasereaktion als andere Keime. Der Grund dafür liegt in der unterschiedlichen Stoffwechselaktivität und Wachstumsgeschwindigkeit. Dies bedeutet, dass sich Milchproben mit gleicher Reduktasezeit bezüglich der Keimzahl unter Umständen erheblich unterscheiden können. Tatsächlich kann eine mit 50'000 Keimen pro ml belastete Milch bei einer bestimmten Zusammensetzung der Keimflora unter Umständen die gleiche Reduktasezeit zeigen, wie eine andere Milch mit 250'000 Keimen pro ml.

Als fabrikationstechnische Kontrolle hat sich insbesondere die vorbebrütete Reduktase bewährt. Milch mit einer kurzen Entfärbungszeit ist oft vorreif und führt zu einem raschen Trocknen des Bruchkornes und später zu Käsefehlern wie z.B. Teig- und Geschmacksfehlern sowie ungenügende Lagerfähigkeit.

### 3.2 Säuregrad der Milch nach 11 Stunden bei 38°C - „Luzernerprobe“

Mit dieser Probe wird die Stoffwechsel-Aktivität von thermophilen säurebildenden Mikroorganismen mittels Säuremessung ermittelt.

<b>Methode / Definition:</b>	Säuregrad (°SH) nach Inkubation der Milch bei 38°C/11h
<b>Anwendungsbereich:</b>	Qualitätskontrolle Lieferantenmilch, bakteriologischer Status der Kessmilch (Fabrikationskontrolle)
<b>Aussagewert:</b>	Aussage zur Belastung der Milch mit Milchsäurebakterien
<b>Anforderungen:</b>	Kessmilch (Abend) < 12 °SH Lieferantenmilch < 15 °SH

Milch mit erhöhtem Säuregrad weist oft unerwünschte Milchsäurebakterien auf, welche sich in vielen Fällen ungünstig auf die Käsequalität auswirken. Es muss mit Lochungs- und Teigfehlern wie Gläs, kurzer und weisser Teig gerechnet werden, wie nachfolgendes Beispiel zeigt (Tab. 3).

**Tabelle 3:** Einfluss unerwünschter Milchsäurebakterien auf die Käsequalität (Emmentaler AOC). Ergebnisse im Käse 3 Monate (Durchschnittsprobe)

	Einheit	Kulturenmix A	Kulturenmix B	
<i>Besonderheit</i>		<b>keine</b>	<b>kontaminiert, sehr starke Endsäuerung</b>	
Säuregehalt	°SH	49-54	67-72	
Wasser	[g/kg]	367	373	
wff	[g/kg]	541	548	
Total fl. Carbonsäuren	[mmol/kg]	90.6	100	
Ameisensäure	[mol-%]	4.0	3.9	
Essigsäure	[mol-%]	42.8	41.2	
Propionsäure	[mol-%]	52.4	54.3	
Buttersäure	[mol-%]	0.3	0.4	
Capronsäure	[mol-%]	0.1	0.1	Richtwert
Freie Aminosäuren (OPA)	[mmol/kg]	<b>105</b>	<b>286</b>	< 160
Käsequalität		<b>schöne Lochung, sehr gute Teigqualität</b>	<b>nestige Lochung, kurzer, weisser Teig</b>	

### 3.3 Gärprobe

Die Gärprobe eignet sich nebst der Luzernerprobe und der vorbebrüteten Reduktase gut zur mikrobiologischen Kontrolle der Milch in der Käseerei.

<b>Methode / Definition:</b>	Visuelle Beurteilung des Gärbildes der Rohmilch nach Bebrütung bei 38°C nach 12 h und 24 h
<b>Anwendungsbereich:</b>	Qualitätskontrolle Lieferantenmilch, bakteriologischer Status Kessmilch (Fabrikationskontrolle)
<b>Aussagewert:</b>	Sehr gut bewährter, einfacher Praxistest Grobe Aussage zur Zusammensetzung der vermehrungsfähigen Keimflora der Rohmilch. Erkennen von Milch mit potenziell käseschädlicher Flora
<b>Anforderungen:</b>	Gärprobe 12 h flüssig Gärprobe 24 h flüssig oder gallertig Achtung: Eine flüssige Gärprobe nach 24h kann auch eine Hinweis auf Hemmstoffe sein !

Die Kombination der Gärprobe mit der Reduktaseprobe, indem letztere weiter bebrütet wird, ist nicht empfohlen, da mit diesem Vorgehen Fehlbeurteilungen resultieren können.

Eine einwandfreie Gärprobe ist nach 12 h noch flüssig und zeigt schliesslich eine gallertige Gerinnung ohne Se-

paration von Molke („käsige“), Flockung („zigerig“) oder Gasbildung. Wie stark sich die Keimflora von Milchproben mit unerwünschten Gärbildern von normaler Milch unterscheiden kann, zeigt Tabelle 4. In diesem kleinen Versuch wurden 24-stündige Gärproben aus einer Käseerei mikrobiologisch analysiert.

**Tabelle 4:** Mikrobiologische Untersuchung von Gärproben mit unterschiedlichen Gärbildern

Gärbild	Fremdkeime	Laktobazillen	Enterobacteriaceae	Escherichia coli	Enterokokken	Salztolerante Keime	Hefen	Proteolytische Keime
Gallertig	++	+	+	-	+	-	-	+
käsige k1	+++(+)	++++	+++	-	+	+	-	+++(+)
käsige k2	++++	++++	+++	++	+	++	-	++++
zigerig mit Gas	+++(+)	+++(+)	+++	+++	-	-	-	+++(+)

- <100'000
- + 100'000-1'000'000
- ++ 1 Mio. - 10 Mio.
- +++ 10 Mio. - 100 Mio.
- ++++ > 100 Mio.

Folgerung für den Käser:

Milch, welche nach 24 h ein käsige oder zigerige Gärbild aufweist, enthält sehr viel mehr proteolytisch aktive Keime, welche Teig-, Geschmacks- und Lochungsfehler verursachen können.



### 3.4 Keimbelastung der Milch gemäss MQV und VHyMP

<b>Methode:</b>	Keimbelastung der Milch (fluoreszenzoptische Zählung)
<b>Prinzip der Methode:</b>	Die Bakterienzellen werden mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert und anschliessend opto-elektronisch detektiert und gezählt (Bactoscan-Methode). Die Messwerte (Impulse) werden anschliessend in KBE/ml umgerechnet, d.h. in die Einheiten der Referenzmethode (siehe 4.1)
<b>Anwendungsbereich:</b>	Rohmilch inkl. Schaf- und Ziegenmilch
<b>Aussagewert:</b>	Mass für die Gesamtbelastung mit Bakterienzellen aller Art
<b>Aussagewert:</b>	Mass für die Gesamtbelastung mit Bakterienzellen aller Art
<b>Anforderungen:</b>	<p>Für Verkehrsmilch gemäss Art. 8, VHyMP (Stand vom 1. März 2008):</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Kuhmilch: max. 80'000 Keime/ml (2011 wird diese Limite voraussichtlich auf 100'000 Keime/ml erhöht).</li> <li>- Rohmilch anderer Säugetierarten <ul style="list-style-type: none"> <li>- für die Herst. von Rohmilchprodukten &lt; 500 000 Keime/ml</li> <li>- für die Herst. von sonstigen Produkten: &lt; 1 500 000 Keime/ml</li> </ul> </li> </ul> <p>Aufgrund einer Erhebung von ALP bei Schweizer Schaf- und Ziegenmilchverarbeitern beurteilen wir die Limiten gemäss OHyPL als viel zu hoch. Die Erhebung hat gezeigt, dass bei Einhaltung der guten Hygienepraxis in der Milchproduktion 200'000 Keime/ml (entspricht ca. 500'000 Impulsen/ml in alten Einheiten) nicht überschritten werden<sup>1</sup>.</p>

<sup>1</sup> Ziegen- und Schafmilchproduktion: Qualität zahlt sich aus. ALP aktuell, Nr. 29, 2007.

Seit 1998 kommt in der Schweiz bei der Qualitätskontrolle der Verkehrsmilch nur noch die instrumentelle Keimzählung (Abb. 1) zur Anwendung, welche gegenüber der klassischen Agarplattenmethode wesentlich kostengünstiger ist.

Als Referenzmethode bleibt die klassische Methode (siehe 4.1 „aerobe, mesophile Keimzahl“) aber weiterhin von Bedeutung. Um die Vergleichbarkeit der Ergebnisse sicherzustellen, werden die bei der fluoreszenzoptischen Keimzählung anfallenden Impulszahlen in koloniebildende Einheiten (KBE/ml) umgerechnet.

Das Bactoscanverfahren ist sehr zuverlässig und eignet sich darum gut für die Qualitätsbeurteilung der Milch. Über die Verunreinigung der Milch mit käseerschädlichen Keimen sagt die Keimzahl aber nichts aus. Darum haben die bewährten Praxismethoden und die klassisch-mikrobiologischen Labormethoden kaum an Bedeutung verloren.



**Abb. 1:** Vollautomatische Keimzählung in der Milch mit dem Bactoscan (Bild: Foss, DK)

## 4 Allgemeine klassisch-mikrobiologische Prüfmerkmale

### 4.1 Aerobe, mesophile Keimzahl (AMK)

<b>Synonym:</b>	Gesamtkeimzahl
<b>Methode:</b>	Plattengussverfahren mit Plate Count Agar (Keimzahlagar, Standard method Agar). Koloniezählung nach 3 Tagen aerober Bebrütung bei 30°C. Referenz : SLMB, Ausgabe 2004 Kapitel 56, Methode E.1
<b>Anwendungsbereich:</b>	Allgemein für Rohstoffe und nicht fermentierte Lebensmittel
<b>Aussagewert:</b>	Mass für die Belastung an aeroben und fakultativ anaeroben Keimen
<b>Einschränkungen:</b>	Nicht erfasst werden Keime, welche unter den Bedingungen der Methode innert 3 Tagen keine von blossem Auge sichtbaren Kolonien zu bilden vermögen.
<b>Anforderungen:</b>	Grenzwerte gemäss HyV Art. 48: - Rohe Kuhmilch vor der Verarbeitung: 300'000 KBE/ml - Verarbeitete Milch vor der Weiterverarbeitung: 100'000 KBE/ml - Rahm für die Weiterverarbeitung: 300'000 KBE/ml

Für **nicht fermentierte Lebensmittel** stellt die AMK das wichtigste mikrobiologisch-hygienische Kriterium dar: Überschreitet die AMK bei 10 Mio. KBE/g, so ist mit ersten sensorisch wahrnehmbaren Veränderungen zu rechnen, bei Keimzahlen ab 100 Mio./g muss Lebensmittel als verdorben bezeichnet werden.

Der oft gebrauchte Bezeichnung „Gesamtkeimzahl“ ist irreführend, da z.B. obligat anaerobe Keime sowie sehr anspruchsvolle oder generell sehr langsam wachsende Mikroorganismen mit der Methode nicht erfasst werden.

**> Bei fermentierten Lebensmitteln macht die Bestimmung der AMK keinen Sinn. Die Resultate sind unzuverlässig und lassen sich kaum interpretieren.**



**Abb. 2:** Bestimmung der aeroben, mesophilen Keime nach SLMB. Die nach 3 Tagen Bebrütung bei 30°C sichtbaren Kolonien werden gezählt.

#### 4.2 Aerobe, mesophile Fremdkeime (FKZ)

<b>Synonym:</b>	Fremdkeimzahl (FKZ)
<b>Prinzip der Methode:</b>	Plattengussverfahren mit Sugar Free Agar + Penicillin Koloniezählung nach 3 Tagen aerober Bebrütung bei 30°C Referenz: SLMB, Ausgabe 1985, Kapitel 56, Methode 7.03.
<b>Anwendungsbereich:</b>	Fermentierte Lebensmittel
<b>Aussagewert:</b>	Als „Fremdkeime“ erfasst werden vor allem die gramnegativen Verderbserreger (Pseudomonaden, Enterobacteriaceen usw.). Milchsäurebakterien und Hefen werden unterdrückt.
<b>Einschränkungen:</b>	Grampositive und anspruchsvollere gramnegative Fremdkeime werden auch unterdrückt.
<b>Anforderungen:</b>	Kessmilch < 20'000 KBE/ml

**Achtung:** Zur Bestimmung der aeroben, mesophilen Fremdkeime (FKZ) wie oben beschrieben gibt es eine **methodische Variante ohne den Zusatz von Penicillin**. Das Nährmedium ohne Antibiotikum liefert meist höhere Keimzahlen (Penicillin unterdrückt die grampositiven Keime praktisch vollständig). Bei der Interpretation der Ergebnisse ist darum immer genau zu klären, welche Methode angewandt werden wurde.

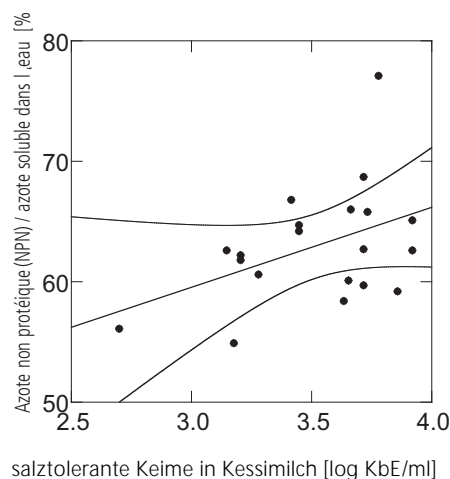
### 4.3 Salztolerante Keime

<b>Prinzip der Methode:</b>	Koloniezählung auf Mannit-Salz-Agar (7.5% NaCl) nach 2 Tagen Bebrütung bei 37°C.
<b>Anwendungsbereich:</b>	Rohmilch, Salzbad, Stufenkontrollen im Käsebetrieb
<b>Aussagewert:</b>	Erfasst werden Mikrokokken, Staphylokokken, Enterokokken, salztolerante Hefen, gewisse aerobe Sporenbildner sowie typische Schmierebakterien (Brevibacterium & Arthrobacter) Erhöht bei mangelhafter Melkhygiene
<b>Kontaminationsquellen:</b>	Haut, Euter, Kot, Staub, Käseschmiere
<b>Anforderungen:</b>	Kessmilch: < 5'000 KBE / ml Lieferantenmilch: < 5'000 KBE / ml

Der Gehalt an salztoleranten Keimen ist ein seit Jahrzehnten angewandtes Qualitätskriterium für die Rohmilch und noch heute in vielen Milchkaufverträgen spezifiziert. Tatsächlich lassen hohe Werte bei den salztoleranten Keimen meist auf ungenügende Euterreinigung schliessen. Viele salztolerante Keime sind nämlich auf der Haut und im Haarkleid zu finden oder sind typische Darmbewohner (Enterokokken). Auch Euterentzündungen können sich in erhöhten Werten niederschlagen, insbesondere bei Infektionen mit pathogenen Staphylokokken.

Salztolerante Keime zeigen – obwohl sie keine Sporenbildner sind - im Allgemeinen eine recht **grosse Widerstandsfähigkeit** gegen Trockenheit und hohe Salzkonzentrationen. Nicht selten widerstehen sich auch Säure und Wärme erstaunlich gut.

Viele der salztoleranten Keime sind **starke Proteolyten** und fördern im Käse die Proteolyse in die Tiefe, was sich oft negativ auf die Käsequalität (kurzer Teig, Gläs) auswirkt. Diese Erkenntnis aus der Beratung und aus früheren Versuchen bestätigte sich auch in einer Erhebung in 30 Emmentalerkäsereien. Das Diagramm in Abb. 3 zeigt: Je höher die Salztoleranten in der Kessmilch, desto höher der NPN-Gehalt im reifen Käse.



**Abb. 3:** Gehalt der Kessmilch an salztoleranten Keimen und Proteinabbau in die Tiefe (NPN) beim Emmentaler.

Der Gehalt der Kessmilch an salztoleranten Keimen wirkte sich negativ auf die folgenden Qualitätsmerkmale in den 3 und 6 Monate alten Emmentalerkäsen aus:

- Lagerfähigkeit
- Lochung
- Teig

Der Nachweis von Salztoleranten eignet sich auch gut für die mikrobiologische Kontrolle des Käsebruches und des Käses (Hartkäse nur Randprobe) vor dem Salzbad. Nachfolgend zwei Beispiele ungenügender Ergebnisse bei Stufenkontrollen in der Praxis (Tab. 5):

**Tabelle 5:** Zwei Beispiele von Stufenkontrollen in Käse-  
reibetrieben mit Qualitätsproblemen, bei denen salzto-  
lerante Keime erhöht werden .

Käsetyp	Halbhartkäse (thermisiert)	Emmentaler
<b>Problem</b>	<b>Pick, gross offen</b>	<b>Nestige Lochung, weisser kurzer Teig</b>
Probenahmestelle:		
- Bassin / Tank	4'150	5'250 ↑
- Kessmilch	1'850	3'950
- Bruch	20'600 ↑	> 300'000 ↑↑
- Sirte Form	225	1'400 ↑
- Käse 1 Tag	91'000 ↑↑	2'800 ↑

**Folgerung für den Käser:**

-> Hohe Gehalte an Salztoleranten erhöhen das Risiko  
von Fehlgärungen im Käse.

**4.4 Psychrotrophe Keime**

<b>Prinzip der Methode:</b>	Koloniezählung auf Standard-Agar mit 0.1% Magermilchpulver nach 10 Tagen Bebrütung bei 6.5°C.
<b>Anwendungsbereich:</b>	Rohmilch, Pastmilch
<b>Aussagewert:</b>	Erfasst werden die bei < 7°C wachsenden Keime, d.h. die psychrotrophe Verderbs- flora (Pseudomonaden, div. Enterobakterien und Bacillusarten, Hefen etc.)
<b>Kontaminationsquellen:</b>	Rohrleitungen, Pumpen, nicht trockene Kannen, Wasser, Schmutz
<b>Anforderungen:</b>	Kessmilch: < 3000 KBE / ml

Unter den psychrotrophen Keimen finden sich viele Li-  
polyten und Proteolyten, deren Enzyme nicht nur sehr  
aktiv sind, sondern teilweise auch sehr hitzeresistent.  
Auch in der Käseherstellung sind die psychrotrophen

Keime wegen negativer Einflüsse auf den Geschmack  
unerwünscht. Psychrotrophe Keime bilden in der Regel  
kaum Säure.

#### 4.5 Lipolytische Keime (Lipolyten)

<b>Prinzip der Methode:</b>	Koloniezählung auf Crossley Agar mit Butterfett (Oberflächenausstrich) nach 72 h aerober Bebrütung bei 30°C. Die von einem klaren Hof umgebenen Kolonien werden als Lipolyten gewertet.
<b>Anwendungsbereich:</b>	Rohmilch, Butter
<b>Aussagewert:</b>	Typische Lipolyten sind Pseudomonaden, Hefen, div. Bacillus-Arten und einige Enterobacteriaceen. Erhöhte Keimzahlen von Lipolyten bedeuten ein erhöhtes Risiko für die Entstehung von ranzigem Geschmack.
<b>Kontaminationsquellen:</b>	Siehe Psychrotrophe Keime

Die Methode dient der Zählung von Fett spaltenden Keimen (Lipolyten) in Milch und Milchprodukten. Diese Keime können zu ranzigem Geschmack bei Käse, Butter und anderen fetthaltigen Milchprodukten führen. Die Pseudomonaden, welche zum Teil starke Lipolyten sind,

bilden Lipase, die extrem hitzeresistent sind. Darum können bei starker Belastung der Rohmilch (lange Kühlung!) selbst UHT-Produkte mit der Zeit ranzig werden.

#### 4.6 Proteolytische Keime (Proteolyten)

<b>Prinzip der Methode:</b>	Koloniezählung auf Calcium Caseinat Agar nach Frazier und Rupp nach 3 Tagen aerober Bebrütung bei 30°C Die von einem klaren Hof umgebenen Kolonien werden als Proteolyten gewertet.
<b>Anwendungsbereich:</b>	Rohmilch
<b>Aussagewert:</b>	Viele Bacillus-Arten, Pseudomonaden, diverse salztolerante Keime und <i>Lb. helveticus</i> sind starke Proteolyten
<b>Kontaminationsquellen:</b>	Siehe -> 4.4 Psychrotrophe Keime

Proteolyten sind für die „käsige“ Gerinnung der Gärprobe verantwortlich und können den Proteinabbau im Käse in unerwünschter Weise beeinflussen, z.B die Entstehung von Bittergeschmack, übermäßige Proteolyse oder die Bildung biogener Amine begünstigen.

Die Proteasen gewisser psychrotropher Proteolyten sind sehr hitzestabil und können zur Süssgerinnung von UHT-Milch führen.

## 5 Selektive Bestimmung bestimmter Keimgattungen und -arten

### 5.1 Aerobe Sporen (Bacillus)

<b>Methode:</b>	Pasteurisation der Probe bei 75°C/15 min, anschliessend Koloniezählung auf Standard Agar (Plate Count Agar) mit Casein. Bebrütung 3 Tage bei 30°C. Referenz: SLMB, Ausgabe 1985, Kapitel 56, Methode 7.02.
<b>Anwendungsbereich:</b>	Milch, flüssige Milchprodukte
<b>Aussagewert:</b>	Sporen der Gattung Bacillus Melkhygiene (Heustaub, Staub)
<b>Kontaminationsquellen:</b>	Heu, Boden, Luft Erhöht bei Heufütterung zur Melkzeit, Ansaugen von Schmutz bei Anhängen des Melkzeugs („Staubsaugen“)
<b>Einschränkungen:</b>	Vegetative Zellen sporenbildender Keime werden aufgrund der Hitzebehandlung der Probe nicht erfasst

Die aeroben Sporenbildner sind (abgesehen von den typischen Rekontaminationskeimen Pseudomonas und Enterobakterien) die klar wichtigsten Verderbserreger bei pasteurisierten Milchprodukten, da sie oft auch psychrotroph sind. Mit Bacillus cereus gehört auch ein Erreger von Lebensmittelvergiftungen zu dieser Gruppe.

In der Käserei sind hohe Belastungen der Kessmilch unerwünscht, da die Enzyme den Proteinabbau in der Kessmilch negativ beeinflussen können (siehe Proteolyten). Anders als die anaeroben Sporenbildner sind aber die aeroben Sporenbildner von käsertechnologisch sehr geringer Bedeutung, da sie sich im Käse kaum vermehren können.

## 5.2 Anaerobe Sporenbildner (Buttersäuresporen nach MPN-Methode ALP)

Zu den anaeroben Sporenbildner zählen jene Keime, welche insgesamt für die grössten durch nicht pathogene Keime verursachten finanziellen Schäden in Käsereien verantwortlich sind: die Erreger von Buttersäuregärung (*Cl. butyricum*, *Cl. tyrobutyricum*) und Putrifikus (*Cl. sporogenes*). Schon 10 Sporen pro Liter Milch können unter Umständen eine Käseblähung hervorrufen.

Für den Nachweis von käseerschädlichen anaeroben Sporen kommen in der Schweiz v.a. zwei Methoden zur Anwendung, die ältere und weniger selektive so genannte MPN-Methode und die neuere, weiter unten beschriebene Filtrationsmethode, welche eine selektive Erfassung von *Cl. tyrobutyricum* erlaubt.

MPN steht für Most Probable Number (= wahrscheinlichste Zahl), d.h. für ein in der Mikrobiologie verbreitet angewandtes Verfahren zur statistischen Schätzung einer Keimzahl. Praktisch jede Keimart kann nach dem MPN-Verfahren quantifiziert werden. In der Milchwirtschaftlichen Praxis steht „MPN-Methode“ praktisch synonym für die Bestimmung der anaeroben Sporen nach der nachfolgend beschriebenen Methode.

<b>Bezeichnungen:</b>	Buttersäuresporenzahl (BSBZ) – „MPN-Methode“
<b>Methode:</b>	Keimzahlschätzung mit Kartoffel-Dextrose-Medium (halbfest) in Röhrchen (MPN-Verfahren) nach Pasteurisation bei 75°C/15 min. Anaerobe Bebrütung 9 Tage / 37°C. Gezählt werden alle Röhrchen mit deutlicher Gasbildung.
<b>Anwendungsbereich:</b>	Rohmilch, Kessmilch, Käse
<b>Aussagewert:</b>	Erfasst unter Sauerstoffausschluss wachsende, gasbildende Sporen, insbesondere <i>Clostridium sporogenes</i> , <i>Clostridium butyricum</i> , <i>Clostridium tyrobutyricum</i> , <i>Clostridium bifermentans</i> . Guter Indikator für die allgemeine Stall- und Melkhygiene.
<b>Kontaminationsquellen:</b>	Silage, gärendes Grünfutter, Kot, Morast, stark mit Erde verunreinigtes Gras/Heu, Staub
<b>Einschränkungen:</b>	Eine Differenzierung zwischen käseerschädlichen und anderen gasbildenden Sporen ist nicht möglich Methode gibt mindestens 4 x höhere Werte als die Filtrationsmethode (->5.3) und auch mehr „falsch positive“ Befunde.
<b>Bemerkungen:</b>	Auch für schlecht oder nicht filtrierbare Probenarten geeignet (z.B. gefrorenen Milch, Schafmilch, Büffelmilch, Käse)
<b>Anforderungen (Richtwerte ALP):</b>	Kessmilch: < 140 Sporen pro Liter Lieferantenmilch: < 200 Sporen pro Liter Wasser: < 50 Sporen pro Liter



Für nicht filtrierbare Probenarten ist die MPN-Methode praktisch die einzige Methode, mit welcher sich die anaeroben Sporen mit hinreichender Empfindlichkeit bestimmen lassen.

Für Milch verwendet ALP die MPN-Methode im Format 3x4, wobei jeweils 4 Röhrchen Kartoffel-Dextrose-Medium mit je 6 ml Milch beimpft, weitere 4 mit je 3 ml und nochmals 4 mit je 1 ml beimpft werden. Das ergibt eine Nachweisgrenze von 25 Sporen pro Liter. In der Praxis gibt es aber auch vereinfachte Varianten der Methode mit weniger Röhrchen. Solch vereinfachte Methoden sind aber weniger empfindlich (höhere Nachweisgrenze) und weniger präzise.

Der „MPN-Methode“ ähnlich ist der im Käsebedarfshandel erhältliche MRCM-Test. Der MRCM-Test scheint aber etwas selektiver in Richtung → *Cl. tyrobutyricum* als die eben beschriebene „MPN-Methode“.

Neben der Methode von ALP werden in der Schweiz auch andere MPN Methoden zur Bestimmung von Buttersäuresporen eingesetzt, bei denen im Handel erhältliche Fertignährmedien eingesetzt werden. Eines dieser Medien ist das Standardmedium für Clostridien, die „Reinforced Clostridium Bouillon“, das andere ein speziell für die Bestimmung von laktatvergärenden Clostridien in

Silage und Milch entwickelte Nährmedium, die Bryant-Burkey-Bouillon mit Resazurin (Biokar diagnostics oder Merck AG)

Der in einigen Käsereien eingesetzte MRCM-Test, ist der MPN-Methode ähnlich und kann im Käsebedarfshandel bezogen werden (Foodtech AG, 8610 Uster). Allerdings wird meist nur mit einem Röhrchen gearbeitet, so dass nur die Anwesenheit oder Abwesenheit von Sporen in 10 ml Milch geprüft wird (Nachweisgrenze: 100 Sporen pro Liter). Der Test scheint ein wenig selektiver zu sein bezüglich → *Cl. tyrobutyricum* als die oben beschriebene MPN-Methode.

#### **Wichtig für die Praxis :**

Die unterschiedlichen Nährmedien, die bei verschiedenen MPN-Methoden verwendet werden, führen zu Unterschieden in der gemessenen Sporenzahl. Deshalb muss der Grenzwert für die Sporenbelastung der Milch für jede MPN-Methode anders festgelegt werden. Aus diesem Grunde ist eine methodische Vereinheitlichung der Buttersäuresporenanalytik wünschbar.

### 5.3 Clostridium tyrobutyricum (Filtrationsmethode)

*Clostridium tyrobutyricum* ist der Erreger der typischerweise nach 6-8 Wochen Reifezeit auftretenden Form der Buttersäuregärung (Spätblähung). Bei den Hartkäsen ist *Cl. tyrobutyricum* der klar bedeutendste Schädling.

Deshalb hat ALP in den 90er-Jahren eine Methode zur selektiven Erfassung des Keims entwickelt: die Filtrationsmethode nach Bourgeois & Casey (Abb. 4).

<b>Bezeichnungen:</b>	<i>Clostridium tyrobutyricum</i> – „Filtrations-Methode“
<b>Methode:</b>	Membranfiltration von 40 ml Milch nach Pasteurisation bei 75°C/15 min und enzymatischer Behandlung. Die Filter werden auf RCM-Agar ausgelegt und 3 Tage bei 37°C anaerob bebrütet.
<b>Anwendungsbereich:</b>	Rohmilch (Kuh), Kessmilch, Wasser
<b>Aussagewert:</b>	Alle käsereschädlichen Clostridien wachsen auf dem Agar. Anhand von Geruch und Koloniemerkmalen kann <i>Cl. tyrobutyricum</i> differenziert und selektiv gezählt werden.
<b>Kontaminationsquellen:</b>	siehe 5.2
<b>Einschränkungen:</b>	Ungeeignet für nicht filtrierbare Proben wie z.B. Schaf- und Büffelmilch (Viskosität), ausgeflockte Milch oder feste Proben. Probleme können sich auch mit gefrorenen ergeben, die oft schlecht filtrierbar sind.
<b>Bemerkungen:</b>	Bezüglich der Aussage zur Melkhygiene weniger aussagekräftig als die „MPN-Methode“
<b>Anforderungen:</b>	Kessmilch: < 25 Sporen pro Liter Lieferantenmilch: < 25 Sporen pro Liter Wasser: < 10 Sporen pro Liter

In der routinemässigen Überwachung von frischen Kessi- und Lieferantenmilch von Käsereien hat sich die Filtrationsmethode breit durchgesetzt und bewährt. Bei der Untersuchung von gefrorenen Rückstellproben ist im Schadenfall gleichwohl die Anwendung der „MPN-Methode“ empfohlen und zwar aus folgenden Gründen:

- Durch das Einfrieren der Milch bedingte Ausflockungen können bei der Filtration Probleme verursachen, stören bei der „MPN-Methode“ dagegen nicht.
- Die MPN-Methode ist labortechnisch robuster (Anaerobiose!).
- Sporen keimen im flüssigen Nährboden der MPN-Methode zuverlässig aus.
- Die Gefahr negativer Befunde trotz geblähter Käse ist bei der MPN-Methode geringer.

Wie eine frühere Untersuchung von ALP zeigte, hat das Einfrieren der Milchproben keinen Einfluss auf die Sporenzahlen.



**Abb. 4:** Quantitative Bestimmung von *Clostridium tyrobutyricum* mit der Filtrationsmethode nach Bourgeois & Casey

## 5.4 Propionsäurebakterien

<b>Methode:</b>	Koloniezählung mittels Oberflächenausstrich auf Laktat-Agar Bebrütung 10 Tage bei 30°C, anaerob.
<b>Anwendungsbereich:</b>	Rohmilch, Käse
<b>Aussagewert:</b>	Nachgärungserreger bei Gruyère, Sbrinz, Appenzeller und anderen Rohmilchkäsen. Propionsäurebakterien bewirken einen süsslichen Geschmack und können zudem braune Tupfen im Teig verursachen.
<b>Einschränkungen:</b>	In Probenmaterial mit starker Begleitflora und geringe Prop-Keimzahlen sind die Zählergebnisse unzuverlässig bzw. ist die Nachweisgrenze erhöht.
<b>Kontaminationsquellen:</b>	Zitzen, Haut, Fell, Dichtungen, Tierläger, gärendes Grünfütter, Silage
<b>Anforderungen:</b>	Lieferantenmilch und Kessimilch: - Sbrinz < 10 KBE/g - Gruyère < 20 KBE/g - Appenzeller < 30 KBE/g

Selbst im Emmentalerkäse, bei welchem die Kessimilch mit Propionsäurebakterien beimpft wird, können wilde Stämme aus der Rohmilch Nachgärungsprobleme verursachen. Ist die Milch nämlich stark mit Propionsäurebakterien belastet, welche Asparaginsäure, eine Aminosäure, gut verwerten und durch die „Fakhet“ meist auch weniger gehemmt werden, dann können mit fortschreitender Proteolyse durchaus Nachgärungen entstehen.

Es gibt heute auch Siliermittel wie z.B. Kofasil® LIFE und AIV Bioprofit, welche Propionsäurebakterien (*P. freudenreichii*) enthalten. Silage ist also auf Milchproduktionsbetrieben, welche neben silofreier Milch auch Rindermast unter Verwendung von Silage betreiben, eine ernst zu nehmende Infektionsquelle für Kontaminationen der Milch auch mit Propionsäurebakterien!

## 5.5 Fakultativ heterofermentative Laktobazillen (FHL)

Untersuchungen von Rohmilch auf fakultativ heterofermentative Milchsäurebakterien werden vor allem in der Gruyère-Fabrikation durchgeführt, da sie ähnlich wie die Propionsäurebakterien zu Gläs führen können.

<b>Methode:</b>	Koloniezählung mittels Oberflächenausstrich auf Selektivagar mit Mannit, Acetat und Vancomycin. Anaerobe Bebrütung 72 h / 37°C
<b>Anwendungsbereich:</b>	Rohmilch, Käse
<b>Aussagewert:</b>	Die fakultativ heterofermentative Laktobazillen können Citrat unter Bildung von CO <sub>2</sub> vergären. Die Citratvergärung spielt eine wichtige Rolle bei der Lochbildung von Halbhartkäsen, kann aber beim Gruyère Gläs verursachen.
<b>Kontaminationsquellen:</b>	Grünfutter, Silage, Melkutensilien, Dichtungen, Kannen, Fettsirtenkultur
<b>Anforderungen:</b>	Gruyère: - Produzentenmilch < 30 KBE/ml - Kessmilch vor dem Einlaben < 100 KBE/ml

Im Verdachtsfall ist auch die mikrobiologische Untersuchung der Käse angezeigt, da sich Fehlgärung durch „Fakhet“ anhand der üblichen gaschromatographischen Untersuchung kaum nachweisen lassen.

## 5.6 Obligat heterofermentative Laktobazillen (OHL)

<b>Methode:</b>	Der Test erfolgt in Reagenzgläsern mit OH-Bouillon (modifiziertes flüssiges MRS Medium mit Melibiose und Raffinose) und Durhamröhrchen. Bebrütung: 3 Tage bei 37°C. Röhrchen, die Gasbildung zeigen, werden als „positiv“ gewertet.
<b>Anwendungsbereich:</b>	Rohmilch, Käse
<b>Aussagewert:</b>	Die OHL vergären Zucker unter CO <sub>2</sub> -Bildung und können für Frühblähungen, Vielsatz, Nisser und unsaubere Lochung verantwortlich sein. Ausserdem können gewisse OHL starke Nachgärungen und durch Bildung von Histamin einen brennenden Geschmack hervorrufen können.
<b>Einschränkungen:</b>	Die Methode ist bei Produkten wie z.B. Rohmilch, welche noch andere Keime (z.B. Hefen) enthalten können, die unter den gewählten selektiven Bedingungen Gas zu bilden vermögen, nur mit Vorbehalt anwendbar.
<b>Bemerkungen:</b>	Semiquantitativ (<10, <100, ... KBE/ml) oder quantitativ (MPN-Verfahren mit mehr als 1 Röhrchen pro Verdünnung)
<b>Kontaminationsquellen:</b>	Gärendes Grünfutter, Silage, Milchrückstände, Dichtungen, Milchlagerung > 15°C

Untersuchungen auf obligat heterofermentative Milchsäurebakterien werden nur selten durchgeführt. Da diese Keime aber bei genügend hoher Keimzahl schon während des Laktoseabbaus im frischen Käse Gas bilden können, sind heterofermentative Milchsäurebakterien bei unsauberer Lochung immer als Verursacher in Betracht zu ziehen.

Ausserdem können verschiedene OHL Milchsäure zu CO<sub>2</sub> und Essigsäure abbauen, ein im Käse höchst unerwünschter Vorgang, der zu schweren Nachgärungen führen kann! Hinzu kommt, dass gewisse OHL (v.a.

*Lactobacillus buchneri*) oft aus Käse mit hohen Gehalten an Histamin isoliert werden kann. Histamin erzeugt einen brennend Geschmack und kann Lebensmittelvergiftungen hervorrufen. Es gibt auf dem Markt Silierhilfsmittel, welche obligat heterofermentative Laktobazillen (*Lb. buchneri*) enthalten. ALP hat fünf dieser Produkte geprüft und festgestellt, dass die verwendeten Stämme kein Histamin bilden. Nachgärung im Käse können sie wegen der Laktatvergärung trotzdem verursachen. Bei Mischbetrieben mit silofreier Milchproduktion und Rindermast mit Silage ist Vorsicht geboten !

## 5.7 Enterobakterien

<b>Synonyme:</b>	Enterobacteriaceen, Enterobacteriaceae
<b>Methode:</b>	Koloniezählung mittels VRBG-Agar. Bebrütung während 24 h bei 37°C, aerob. Referenz: SLMB, Ausgabe 2004, Kapitel 56, Methode E.2
<b>Anwendungsbereich:</b>	Alle Lebensmittel
<b>Aussagewert:</b>	Enterobakterien sind hitzelabil und darum ein wichtiger Hygieneindikator bei erhitzten Lebensmittel. Ihr Vorkommen in erhitzten Lebensmitteln zeigt eine Rekontamination an.
<b>Kontaminationsquellen:</b>	Grünfütter, Kot, Schutz, Boden, Abwasser, Schmiere, Schmierewasser
<b>Anforderungen:</b>	Produzentenmilch: < 300 KBE/g Kessmilch: < 500 KBE/g Rohmilchkäse (Teig) - vor dem Salzbad: < 10'000 KBE/g - Komsumreif: < 100 KBE/g Vollthermisierte Käse (Teig) - vor dem Salzbad: < 100 KBE/g - Komsumreif: < 10 KBE/g Schmierewasser: < 10'000 KBE/g

Die Enterobakterien sind eine grosse Familie verschiedener Gattungen von gramnegativen, fakultativ anaeroben und nicht sporenbildenden Stäbchen. Aufgrund des Namens (gr. Enteron = Darm) werden Enterobakterien fälschlicherweise oft mit Fäkalkeimen gleichgesetzt. Doch der kleinere Teil der verschiedenen Enterobakterien sind typische oder ausschliessliche Darmbewohner. Für Salmonellen und --> *Escherichia coli* trifft es allerdings zu.

Alle Enterobakterien sind hitzelabil und werden bei Pasteurisationsbedingungen sicher abgetötet. Wie oben erwähnt sind sie darum ein wichtiger Hygieneindikator bei erhitzten Lebensmitteln. Enterobakterien sind im Allgemeinen wenig säuretolerant und viele ausserdem psychrotroph. Darum sind sie wichtige Verderbserreger bei nicht sauren Frischprodukten.

Bei thermisierten Halbhartkäse und generell bei Hartkäsen findet man nach 24 h bei sauberer Fabrikationsweise und einwandfreier Säuerung kaum noch Enterobakterien und damit natürlich auch keine --> Coliformen Keime oder --> *E. coli*.

Die europäische Lebensmittelsicherheitsbehörde EFSA hat vorgeschlagen, bei Käse die Enterobakterien als Indikator für eine mögliche Präsenz von pathogenen Enterobakterien, insbesondere pathogene *E. coli* und Salmonellen zu nutzen. Ein erhöhter Wert im Käse vor dem Salzbad bedeutet demnach ein erhöhtes Risiko, dass pathogene Enterobakterien den Käsereifungsprozess überleben könnten.

Bei geschmierten Käsen sind auch gelegentliche Kontrollen der Käseschmiere empfohlen. Eine Untersuchung von ALP hat gezeigt, dass in der Praxis Keimzahlen von über 1 Mio. Enterobakterien pro g Schmiere vorkommen können, was ein Problem in der Vorverpackung von Käse darstellen kann.

## 5.8 Fäkalindikatoren

### 5.8.1 Coliforme Keime

<b>Methode:</b>	Koloniezählung mittels VRB-Agar und anderen Medien. Bebrütung 24 h bei 37°C, aerob
<b>Anwendungsbereich:</b>	v.a. bei Produkten für den Export
<b>Aussagewert:</b>	ähnlich -> <i>Escherichia coli</i>
<b>Kontaminationsquellen:</b>	Kot, Schutz, Abwasser
<b>Anforderungen:</b>	Siehe 5.8.2 <i>E. coli</i>

Als coliforme Keime werden jene Arten aus der Familie der --> Enterobakterien bezeichnet, welche Milchzucker vergären können. Wie der Name erahnen lässt, zielt die Bestimmung der Coliformen eigentlich auf den Fäkalkeim --> *Escherichia coli*. Laktose positiv sind aber noch einige andere Enterobakterien (z.B. *Citrobacter freundii*) und werden daher mit erfasst.

In der Schweiz haben die coliforme Keime ihre Bedeutung als mikrobiologisches Kriterium schon vor über 20 Jahren weitgehend verloren, da einfache Nährmedien zur selektiven Erfassung von *E. coli* verfügbar wurden. In gewissen Exportländern findet man aber das Kriterium „Coliforme“ noch immer in Produktspezifikationen oder Normen.

## 5.8.2 Escherichia coli

<b>Synonyme:</b>	Colibakterien, E. coli
<b>Methode:</b>	Koloniezählung mittels Chromogen E.coli-Agar. Bebrütung 24 h bei 37°C, aerob. Referenz: SLMB, Ausgabe 2004, Kapitel 56, Methode E.3
<b>Anwendungsbereich:</b>	Alle Lebensmittel, Trinkwasser
<b>Aussagewert:</b>	Indikator für fäkale Verunreinigung, Melkhygiene, Produktionshygiene
<b>Bemerkungen:</b>	Erhöhte Werte in Rohmilch können im Käse zu Nisserlochung oder zu Frühblähung innert der ersten 24 h führen. E. coli ist thermophil, unter 8°C praktisch kein Wachstum
<b>Kontaminationsquellen:</b>	Warmblüterdarm, Kot, Jauche

E. coli dienen in der Lebensmittelmikrobiologie allgemein als Indikator für fäkale Kontaminationen. In der Käseherstellung treten die Colibakterien vor allem als Verursacher von nisseriger Lochung in Erscheinung, wobei sowohl eine übermäßige Verunreinigung der Milch, zu warme Milchlagerung als auch eine schlechte Säuerung z.B. infolge einer Hemmstoffkontamination der Milch verantwortlich sein kann.



### 5.8.3 Enterokokken

<b>Synonyme:</b>	Fäkalstreptokokken, D-Streptokokken
<b>Methode:</b>	Koloniezählung mittels Kanamycin-Äsculin-Azid-Agar oder Slanetz-Bartley-Agar. Bebrütung 24 h bzw. 48 h bei 37°C, aerob. Referenzen: - SLMB, Ausgabe 1984 Kapitel 56, Methode 7.11 (allg. Anwendung) - SLMB, Ausgabe 2004, Kapitel 56, Methode E.15 (Wasser)
<b>Anwendungsbereich:</b>	Alle Lebensmittel, Trinkwasser
<b>Aussagewert:</b>	Indikator für fäkale Verunreinigung
<b>Bemerkungen:</b>	Enterokokken gehören zu den Milchsäurebakterien. Sind sehr widerstandsfähig und zählen zu den salztoleranten Keimen
<b>Kontaminationsquellen</b>	Kot, Jauche

Wie E. coli dienen Enterokokken in der Lebensmittel-mikrobiologie als Indikator für eine fäkale Kontamination. Da Enterokokken gegen Temperatur, Trockenheit und andere Einflüsse resistenter sind als E. coli, ist ihre Bestimmung v.a. in Trockenprodukten (z.B. Milchpulver) üblich. Aber auch nach einer fäkalen Kontamination von Trinkwasser können Enterokokken im Verteilernetz in der Regel über einen längeren Zeitraum nachgewiesen werden als E. coli.

In Rohmilchkäsen sind Enterokokken häufig und teilweise mit recht hoher Keimdichte zu finden. Enterokokken sind bekanntermaßen starke Proteolyten, denen auch ein positiver Einfluss auf das Käsearoma nachgesagt wird. Andererseits können Enterokokken zur verstärkten Bildung von Tyramin, einem unerwünschten biogenen Amine, führen.

## 5.9 Koagulasepositive Staphylokokken

<b>Synonyme:</b>	<i>Staphylococcus aureus</i> (hauptsächlich)
<b>Methode:</b>	Koloniezählung mittels Baird Parker Agar mit Hasenfibrinogen Bebrütung 48 h bei 37°C, aerob. Referenz : SLMB, Ausgabe 2004, Kapitel 56, Methode E.6
<b>Anwendungsbereich:</b>	Alle Lebensmittel
<b>Aussagewert:</b>	In Rohmilch: Indikator für Eutergesundheit Produkte: Lebensmittelsicherheitskriterium (Gefahr der Toxinbildung bei >100'000 Keimen/g)
<b>Bemerkungen:</b>	Staphylokokken gehören zu den salztoleranten Keimen
<b>Kontaminationsquellen:</b>	Kranke Euter, Wunden, Schleimhäute
<b>Anforderungen:</b>	Lieferantenmilch < 300 KBE/g Kessmilch < 100 KBE/g Käse: siehe unten sowie Kap. 9

Koagulasepositive Staphylokokken sind (wie teilweise auch die Listerien) in der Kessmilch praktisch immer nachweisbar. In der Regel stammen sie von Kühen, die an einer subklinischen Mastitis erkrankt sind. Normalerweise liegen die Keimzahlen in Mischmilch klar unter 1'000 KBE/g. ALP hat aber auch schon Lieferantenmilchproben mit über einer Million koagulasepositiver Staphylokokken pro ml beobachtet. Eine solche Milch stellt trotz der wahrscheinlichen Verdünnung durch andere Milch eine Gefahr für die Lebensmittelsicherheit dar. Je nach Milchlagerung, Milchbehandlung und Temperaturverlauf während der Fabrikation können sich die Staphylokokken durchaus noch um Faktor 10 vermehren. Ausserdem werden die Keime im Bruch aufkonzentriert. Wenn nun Toxin bildende Staphylokokken zu irgend einem Zeitpunkt der Fabrikation eine Keimzahl von 100'000 KBE/g oder mehr erreichen, dann drohen Lebensmittelvergiftungen. Die Staphylokokken sterben zwar während der Reifung von Halbhart- und Hartkäsen ab, die Toxine bleiben jedoch im Teig. Deshalb sieht die Hygieneverordnung seit April 2008 bei Käse keine Endproduktkontrollen auf Staphylokokken mehr vor. Statt dessen wurde neu die so genannten Prozesshygienekriterien definiert.

Im Rahmen der Überwachung der Prozesshygienekriterien müssen Lebensmittelproben, zu jenem Zeitpunkt während des Herstellungsprozesse erhoben werden, wo die Keimzahl des fraglichen Keimes mutmasslich am höchsten ist. Beim Hartkäse werden dies – was die Staphylokokken betrifft - Proben des Käsebruchs unmittelbar vor Erreichen der Brenntemperatur sein. Bei Halbhart- und Weichkäse erreichen die Staphylokokken typischerweise dann ihre maximale Keimdichte, wenn der Milchzucker abgebaut ist, d.h. wenn die Milchsäuregärung abgeschlossen ist. Die Probenahme unmittelbar vor oder auch nach der Salzbadbehandlung ist hier zweckmässig.

### Staphylokokken sind sehr salz- und säuretolerant!

#### Prozesshygienekriterien für koagulasepositive Staphylokokken gemäss HyV, Anhang 3:

Käse aus Rohmilch: Toleranzwert m = 10'000, Grenzwert M = 100'000 KBE/g  
Andere gereifte Käse: Toleranzwert m = 100, Grenzwert M = 1'000 KBE/g  
Nicht gereifte Käse: Toleranzwert m = 10, Grenzwert M = 100 KBE/g

## 6 Durch schädliche Keime hervorgerufene Käsefehler

	Fremdkeime	Enterobakterien	Escherichia coli	Enterokokken	Salztolerante Keime	Propionsäurebakterien	Obligat heterofermentative Lb	Fakultativ heterofermentative Lb	Hefen	Cl. butyricum	Cl. tyrobutyricum	Aerobe Sporen (Clostridien)	Lipolyten	Proteolyten	Psychrotrophe Keime
<b>Lochungsfehler</b>															
Nestige Lochung							+	+	+	+					
Nestig unter dem Narben							+		+						
Vielsatz	+	+	+						+						
Frühblähung	+	+	+				+	+	+	+		+			
Unsaubere Lochung	+	+	+				+		+	+					
Spätblähung				+		+	+			+	+	+			
Gläs, Nachgärung	+			+	+	+	+	+				+		+	
<b>Geschmacksfehler</b>															
brennend					+		+	+				+		+	
bitter	+			+	+				+					+	+
ranzig	+								+	+	+	+	+		+
süßlich						+								+	
unrein	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>Teigfehler</b>															
braune Tupfen						+									
rötliche Verfärbung (Weichkäse)	+	+		+	+									+	
weiss und kurz				+	+									+	
kurz				+	+									+	
verfärbung	+			+	+									+	

### Lesebeispiele:

- 1) **Vielsatz** kann auf folgende Keime oder Keimgruppen verursacht worden sein: Fremdkeime, Enterobakterien, E. coli oder Hefen
- 2) **Propionsäurebakterien:** können Spätblähungen, Gläs, Nachgärung, süßlichen Geschmack und braune Tupfen hervorrufen.

## 7 Richtwerte für Rohstoffe und Halbfabrikate

### 7.1 Lieferantenmilch

Keimbelastung	<	80'000	Keime/ml	Anforderung gemäss VHyMP (Stand 1. März 2008)
Aerobe, mesophile Keime	<	30'000	KBE/g	für die Rohmilchkäseherstellung bestimmte Milch
Fremdkeime (nicht Säurebildner)	<	20'000	KBE/g	
Staphylokokken, koagulasepositive	<	300	KBE/g	
Enterobacteriaceae	<	300	KBE/g	
Escherichia coli	<	50	KBE/g	
Salztolerante Keime	<	5'000	KBE/g	
Propionsäurebakterien: Sbrinz	<	10	KBE/g	Andere Sorten < 30 KBE/g
Gruyère	<	20	KBE/g	
Anaerobe Sporenbildner (MPN)	<	200	Sporen/L	
Cl. tyrobutyricum (Filtration)	<	25	Sporen/L	
Lipolytische Keime	<	3'000	KBE/g	
Fak. heterofermentative Laktobazillen	<	30	KBE/g	

### 7.2 Fertiger- und Kessimilch

Aerobe, mesophile Keime	<	300'000	KBE/g	Höchstzahl gem. HyV Art. 48
Aerobe, mesophile Fremdkeime	<	20'000	KBE/g	thermisiert: <10'000
Staphylokokken, koagulasepositive	<	100	KBE/g	
Escherichia coli	<	50	KBE/g	
Enterobacteriaceae	<	500	KBE/g	
Enterokokken	<	100	KBE/g	
Salztolerante Keime	<	5'000	KBE/g	
Propionsäurebakterien	<	10	KBE/g	
Anaerobe Sporenbildner (MPN)	<	140	Sporen/L	
Cl. tyrobutyricum (Filtration)	<	25	Sporen/L	
Lipolytische Keime	<	3'000	KBE/g	
Psychrotrophe Keime	<	5'000	KBE/g	

### 7.3 Emmentaler 24 h

Salztolerante Keime	<	1'000	KBE/g
Enterokokken	<	1'000	KBE/g

#### 7.4 Gruyère 24 h

Aerobe, mesophile Fremdkeime	<	1'500	KBE/g
Salztolerante Keime	<	500	KBE/g
Propionsäurebakterien	<	10	KBE/g
Enterokokken	<	100	KBE/g
Fak. heterofermentative Laktobazillen	<	100	KBE/g

#### 7.5 Tilsiter und Appenzeller Käse 24 h

Aerobe, mesophile Fremdkeime	<	50'000	KBE/g	thermisiert: <30'000
Salztolerante Keime	<	5'000	KBE/g	
Propionsäurebakterien	<	100	KBE/g	
Enterobacteriaceen	<	1'000	KBE/g	

#### 8 Toleranzwerte für Trinkwasser (unbehandelt, im Verteilernetz)

Aerobe, mesophile Keime	<	300	KBE/ml	HyV
Escherichia coli	n.n. in 100 ml			HyV
Enterokokken	n.n. in 100 ml			HyV
Anaerobe Sporenbildner (Clostridien)	<	10	Sporen/L	GHP Käse

9 Probenplan gemäss Hygieneverordnung  
(Stand am 25. Mai 2009) und QM Fromarte 2008

	Staphylokokken, koagulasepositive		E. coli		Salmonellen		Listeria monocytogenes	
	Analysenzahl pro Jahr	Limite (KBE/g)	Analysenzahl pro Jahr	Limite (KBE/g)	Analysenzahl pro Jahr	Limite (KBE)	Analysenzahl pro Jahr	Limite (KBE)
<b>Hartkäse</b>								
Rohmilch	2	<10'000	-	<10	1	n.n./25g	2	n.n.
	Bruch bei 48-50°C				Käse konsumreif (Teig)		Käse konsumreif (Rinde)	
<b>Halbhartkäse</b>								
Rohmilch	6	<10'000	6	<10'000	2	n.n./25g	6	n.n./25g
	Bruch beim Ausziehen*		Käse vor dem Salzbad		Käseteig konsumreif		Käse konsumreif (Teig + Rinde)	
teilvermischert	4	<10'000	4	<1'000	2	n.n./25g	6	n.n./25g
	Käse vor dem Salzbad		Käse vor dem Salzbad		Käseteig konsumreif		Käse konsumreif (Teig + Rinde)	
vollthermischert	3	<1'000**	3	100	2	n.n./25g	6	n.n./25g
	Käse vor dem Salzbad		Käse vor dem Salzbad		Käseteig konsumreif		Käse konsumreif (Teig + Rinde)	
pasteurisiert	2	<100	2	100	-	-	4	n.n.
	Käse vor dem Salzbad		Käse vor dem Salzbad				Konsumreif (Rinde)	
<b>Weichkäse</b>								
Rohmilch	52	<10'000	52	<10'000	52	n.n./25g	52	n.n./25g
	Käse nach dem Salzbad		Käse nach dem Salzbad		5 Tage vor dem Verkauf (Teig mit Rinde)		5 Tage vor dem Verkauf (Teig mit Rinde)	
teilvermischert	52	<10'000	52	<1'000	52	n.n./25g	52	n.n./25g
	Käse nach dem Salzbad		Käse nach dem Salzbad		5 Tage vor dem Verkauf (Teig mit Rinde)		5 Tage vor dem Verkauf (Teig mit Rinde)	
vollthermischert	6	<1'000**	6	100	6	n.n./25g	6	n.n./25g
	Käse nach dem Salzbad		Handelsreife Käse (Teig mit Rinde)		5 Tage vor dem Verkauf (Teig mit Rinde)		5 Tage vor dem Verkauf (Teig mit Rinde)	
pasteurisiert	4	<100	4	100	-	-	4	n.n./25g
	Käse nach dem Salzbad		Handelsreife Käse (Teig mit Rinde)				Verfalltag (Teig mit Rinde)	

 Obligatorische Kriterien gemäss HyV (Stand vom 25. Mai 2009), Anhang 1 und 3

 Empfehlung von ALP (Abweichend von QM Fromarte)

\* Bei Brenntemperaturen  $\geq 50^\circ\text{C}$  empfiehlt sich die Untersuchung des Käsebruchs (analog Hartkäse)

\*\* gemäss HyV gilt für vollthermisierte Käse der gleiche Toleranzwert wie für past. Käse ( $m = 100 \text{ KBE/g}$ )

**Wichtiger Hinweis**

Die in der Tabelle angegebenen Untersuchungsfrequenzen gelten dann, wenn der Betrieb für das betreffende Produkt bereits 5 Untersuchungsergebnisse vorweisen kann, die den Anforderungen gemäss Hygieneverordnung entsprechen. Verlangt ist, dass die oben genannten Limiten für Staphylokokken und E. coli in max. 2 von 5 Untersuchungen überschritten wurde, und die Grenzwerte für Salmonellen und Listerien in keiner Probe aus 5 Proben überschritten wurde.

Wenn die oben genannten Limiten überschritten wurde, sind in jedem Fall Korrekturmaßnahmen in die Wege zu

leiten (Auswahl der Rohstoffe, Stufenkontrolle, Nachkontrollen). Ausserdem ist die Untersuchungshäufigkeit zu erhöhen bis die Korrekturmaßnahmen erfolgreich waren. Kann umgekehrt nachgewiesen werden, dass der Herstellungsprozess eines bestimmten Produktes beherrscht wird, so kann die Untersuchungshäufigkeit unter die empfohlenen Häufigkeiten gesenkt werden. Jede Änderung des Überwachungsplans muss in den QM-Dokumenten schriftlich festgehalten und begründet sein und auf Verlangen der Kontrollorgane vorgezeigt werden können.



