

## ANALYTIK RUND UM DIE BUTTERSÄUREGÄRUNG

Diskussionsgruppen

### Autor

Ernst Jakob

Forschungsanstalt Agroscope Liebefeld-Posieux ALP

CH-3003 Bern, ernst.jakob@alp.admin.ch



Schweizerische Eidgenossenschaft  
Confédération suisse  
Confederazione Svizzera  
Confederaziun svizra

Eidgenössisches  
Volkswirtschaftsdepartement EVD  
**Forschungsanstalt**  
**Agroscope Liebefeld-Posieux ALP**



Schweizerische Eidgenossenschaft  
Confédération suisse  
Confederazione Svizzera  
Confederaziun svizra

Eidgenössisches  
Volkswirtschaftsdepartement EVD  
**Forschungsanstalt**  
**Agroscope Liebefeld-Posieux ALP**

ALP gehört zur Einheit ALP-Haras

## Impressum

ISSN	1661-0814 (online) / 16.03.2011
Herausgeberin	Forschungsanstalt Agroscope Liebefeld-Posieux ALP Schwarzenburgstrasse 161, CH-3003 Bern Tel. +41 (0)31 323 84 18, Fax +41 (0)31 323 82 27 info@alp.admin.ch, www.agroscope.ch
Fotos	ALP
Gestaltung	RMG Design, CH-1700 Fribourg
Copyright	© 2010 ALP Nachdruck bei Quellenangabe und Zustellung eines Belegexemplars an die Herausgeberin gestattet.

---

# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung .....	4
2	Käseschädliche Sporenbildner .....	4
2.1	Einteilung der käseschädlichen Clostridien .....	4
2.2	Vorkommen und Eigenschaften der Clostridien .....	4
2.3	Clostridium butyricum .....	5
2.4	Clostridium tyrobutyricum .....	5
2.5	Clostridium sporogenes .....	6
2.6	Clostridium oceanicum .....	6
2.7	Clostridium botulinum .....	7
2.8	Relative Bedeutung der verschiedenen Clostridien als Erreger von Buttersäuregärungen .....	7
3	Der Nachweis der durch Clostridien verursachten Fehlgärungen .....	8
3.1	Erkennung anhand des typischen Schadenbildes .....	8
3.2	Mikroskopischer Nachweis .....	9
3.3	Kultureller Nachweis .....	9
3.4	Nachweis der flüchtigen Carbonsäuren mittels Gaschromatografie (GC) .....	10
3.5	Interpretation der GC-Analyse hinsichtlich Buttersäuregärung .....	11
3.6	Molekularbiologischer Nachweis der Buttersäuregärungserregers .....	12
4	Bestimmung des Sporengehaltes von Milch .....	14
4.1	Praxismethoden .....	14
4.2	Labormethoden .....	14
4.2.1	MPN-Methode .....	14
4.2.2	MPN-Methode in der Romandie (Modifizierte Methode CNERNA) .....	15
4.2.3	Rückstellproben und Vorgehen im Schadenfall .....	16
4.2.4	Filtrationsmethode .....	17
4.2.5	Vergleich der Methoden bezüglich Aussagewert und Messunsicherheit .....	18
4.3	Sporenanalytik in baktofugierter Milch .....	19
5	Zusammenfassung .....	20

# 1 Einleitung

Buttersäuregärungen treten in der Praxis immer noch sehr verbreitet auf. Ob sie – wie dies teilweise vermutet wird - seit der Aufhebung der Siloverbotzonen im Jahr 1999 wieder häufiger geworden sind, ist mangels statistischer Zahlen schwer zu sagen. Wir können aber bestätigen, dass aufgrund der wachsenden Betriebsgrößen heute grössere Schadenfälle auftreten. Nach Aussage der Versicherungsgesellschaften, die Versicherungen gegen Buttersäuregärungen anbieten, haben die finanziellen Schäden in den letzten Jahren deutlich zugenommen. Das heisst, es war in der Summe eine zunehmend grössere Käsemenge von Buttersäuregärungen betroffen. Der für die Versicherungen unerfreuliche Schadenverlauf führt unter anderem dazu, dass die Versicherer im Schadenfall genauere Abklärungen verlangen und bezüglich Rückverfolgbarkeit und Prävention höhere Anforderungen stellen.

## 2 Käseschädliche Sporenbildner

### 2.1 Einteilung der käseschädlichen Clostridien

Von den rund 100 bekannten Clostridienarten sind in der Käseherstellung nur wenige von Bedeutung:

#### Proteolytische Arten

- *Clostridium bifermentans*
- *Clostridium botulinum* Typ A, und teilw. Typ B, F
- *Clostridium oceanicum*
- *Clostridium sporogenes*

#### Zuckerspaltende (saccharolytische) Arten

- *Clostridium beijerinckii*
- *Clostridium botulinum* Typ E (psychrotroph)
- *Clostridium butyricum*
- *Clostridium tyrobutyricum*

Tab. 1: Eigenschaften potentiell käseschädlicher Clostridien

Spezies	Minimaler aw-Wert	Temperaturminimum	pH-Minimum	pH-Optimum	Glucose	Galaktose	Laktose	Milchsäure	Proteolytisch
<i>C. butyricum</i>	0.97 (<5% NaCl)	≥ 7°C	≥ 4.8	um 6.5	+	+	+	+/- (>pH 5.3)	+/-
<i>C. tyrobutyricum</i>	0.96 (<6% NaCl)	>10°C	4.2-4.8	5.0-5.9	+	+/-	-	+	-
<i>C. beijerinckii</i>	0.96	≥ 7°C	≥ 4.8	k.A.	+	+	+	+/-	-
<i>C. sporogenes</i>	0.95 (≤6% NaCl)	≥10°C	5.0-5.8	6.0-7.5	+	k.A.	-	-	++
<i>C. bifermentans</i>	0.96	>7°C	4.5	k.A.	+	k.A.	-	-	+
<i>C. oceanicum</i>	0.94 (<10% NaCl)	≥3°C	5.5-6.0	6.5-8.6	+	k.A.	k.A.	k.A.	++

### 2.2 Vorkommen und Eigenschaften der Clostridien

#### Vorkommen

Clostridiensporen kommen vor allem in der Erde vor. In Silage können sich Clostridien bei ungenügender Säuerung (langsame pH-Senkung, zu hoher End-pH) stark vermehren. Die Verfütterung von Silage oder von stark mit Erde verschmutztem Gras erhöht den Clostridiensporengehalt des Kotes der Kühe. Indirekt erhöht sich damit auch die Sporenbelastung der Milch. Eine Verunreinigung der Milch über die Blutbahn ist unmöglich.

Gewisse Clostridienarten gehören zur natürlich Pansenflora. Es sind fast ausschliesslich an das Pansenmilieu angepasste Spezialisten. Im Zusammenhang mit kohlehydratreicher Fütterung isolierten einige Autoren allerdings auch die potentiell käseschädliche Art *C. butyricum*.

#### Eigenschaften der Clostridien

- Stäbchenförmige Bakterien
- mittels Geisseln beweglich
- strikt anaerob (Absterben in Gegenwart von Sauerstoff)
- Sporenbildend: bei ungünstigen Bedingungen (z.B. Nährstoffmangel) entsteht innerhalb der Zelle eine gegen Umwelteinflüsse (z.B. Hitze) hochresistente Kapsel.
- Energiegewinnung durch anaerobe Gärung wobei neben CO<sub>2</sub> und meist auch Wasserstoffgas gebildet wird. Wasserstoffgas ist schlecht wasserlöslich und führt zu sofortiger Lochbildung im Käse

### 2.3 *Clostridium butyricum*

*Clostridium butyricum* kann in der Regel Laktose verwerten, Milchsäure in der Regel aber nicht. Typische Gärprodukte sind Buttersäure, Essigsäure, Wasserstoff und Kohlendioxidgas. *C. butyricum* ist weniger tolerant gegenüber Säure und Kochsalz als *Clostridium tyrobutyricum*. Die Abhängigkeit von Zucker und die geringe Salztoleranz erklären, warum *C. butyricum* selten und fast ausschließlich im Zusammenhang mit früher Lochbildung (siehe Abb. 1) als Schadenerreger identifiziert wird. Als Erreger von Spätblähungen spielt *C. butyricum* keine Rolle.



Abb. 1: Durch *C. butyricum* verursachte Lochung in Käse (Alter 3 Monate). Da die Fehlgärung nach der Fermentation des Restzuckers zum Stillstand kam, bildete sich die bei den jungen Läiben (1-2 Wochen) feststellbare leichte Blähung während der Reifung wieder zurück. Die Buttersäuregehalte solcher Käse übersteigen selten 1.5 mmol/kg.

### 2.4 *Clostridium tyrobutyricum*

*C. tyrobutyricum* ist kein enger Verwandter der anderen potentiell käseschädlichen Clostridien. Die Spezies kann Glukose verwerten, Laktose in der Regel aber nicht. Das Besondere an *C. tyrobutyricum* ist die Fähigkeit, Milchsäure zu Buttersäure, CO<sub>2</sub> und Wasserstoff zu fermentieren. Dies führt in der Regel zu einer starken Blähung (Abb. 2) der Käse. Die Beobachtungen, wonach *C. tyrobutyricum* in schlechter Silage in der Regel die vorherrschende Clostridienart ist und bei späten Buttersäuregärungen in Käse immer (und meist allein) als Erreger identifiziert werden kann, erklären sich aufgrund der Laktatverwertung und vergleichsweise hohe Säuretoleranz dieses Keims.



Abb. 2: Durch *C. tyrobutyricum* geblähter Emmentalerkäse (Alter 2 Monate).

Die häufigste Form der Buttersäuregärung, die Spätblähung, wird verursacht durch die sporenbildende Bakterienart *Clostridium tyrobutyricum*. Biochemisch kann die Fehlgärung wie folgt beschrieben werden:



Enthält ein Käse 1 mmol durch Clostridien gebildete Buttersäure pro Kilogramm, so wurden bis zum Zeitpunkt der Probenahme je Kilogramm Käse etwa 45 ml des wasserunlöslichen Wasserstoffgases (Gasmenge unter Normaldruck) gebildet und nochmals 45 ml CO<sub>2</sub> (Gasmengen unter Normaldruck).

## 2.5 *Clostridium sporogenes*

*C. sporogenes* ist ein starker Proteolyt (Eiweisspalter), der zur Energiegewinnung verschiedene Aminosäure verwendet. Dabei wird eine grosse Palette teilweise übelriechender Stoffwechselprodukte und Gas ( $\text{CO}_2$  und  $\text{H}_2$ ) gebildet. An den befallenen Stellen ist der Käseteig aufgehellert (helle Flecken oder weisse Faulstellen). Im Gaschromatogramm zeigt sich typischerweise die ganze Palette der flüchtigen Carbonsäuren inklusive Capronsäure, die – wie ein Teil der Buttersäure – auf die Fettspaltung durch *C. sporogenes* zurückzuführen ist. Der als Weissfäule oder Putrifikus bezeichnete Käsefehler ist relativ selten und kommt v.a. beim Emmentaler vor, wo der höhere pH-Wert im jungen Käse, der tiefe Salzgehalt und der Aufenthalt in Gärraum das Auskeimen von *C. sporogenes* begünstigen.



Abb. 3: Emmentaler Käse mit Weissfäule (Putrifikus) verursacht durch *C. sporogenes*. Charakteristisch sind die weissen Faulstellen und der üble Geruch.



Abb. 4: Durch anaerobe Sporenbildner verursachte graue Tupfen in Halbhartkäse (Alter 5 Monate)

## 2.6 *Clostridium oceanicum*

*C. oceanicum* ist ähnlich wie *C. sporogenes* ein sehr starker Proteolyt, zeigt aber eine höhere Salztoleranz als letztere Spezies. In der Literatur wird die in Meeressedimenten vorkommende Art als Verursacher von Oberflächenfäulnis bei foliengereiftem Käse beschrieben. Typische Infektionsquelle ist das Salzbad. Charakteristisches Merkmal von *C. oceanicum* ist das Vorkommen von Zellen mit zwei Sporen.

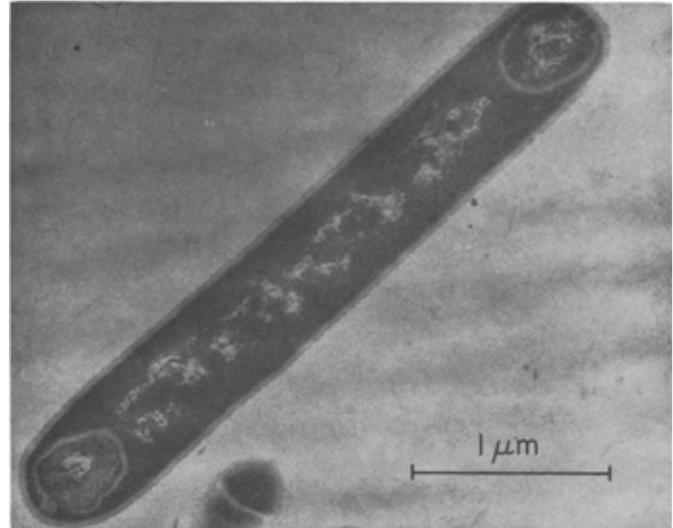


Abb. 5: *Clostridium oceanicum*. Das Bild zeigt eine Zelle mit zwei endständigen Sporen. Je nach Stamm sind wenige oder eine Mehrzahl der sporulierten Zellen zweisporig

## 2.7 *Clostridium botulinum*

*C. botulinum* bildet eines der stärksten bekannten Gifte, bekannt unter der Abkürzung „Botox“. Ein Zehntel eines Millionstel Gramms genügen, um einen Menschen zu töten. *C. botulinum* ist gefürchtet als Verursacher von Lebensmittelvergiftungen durch Konserven und Fleischwaren. Die Sporen kommen auch in der Milch vor. In den Siebzigerjahren gab es in Frankreich und der Schweiz mehrere Vergiftungsfälle nach dem Konsum von französischem Brie. Und 1996 verursachte in Italien ungenügend gekühlter Frischkäse (Mascarpone) acht Vergiftungsfälle mit einem Todesfall. Unter den Bedingungen in Halbhart- und Hartkäse vermehrt sich *C. botulinum* allerdings nicht.

## 2.8 Relative Bedeutung der verschiedenen Clostridien als Erreger von Buttersäuregärungen

In praktisch allen Fällen von Nachgärungen mit klaren Anzeichen von stärkerer Gasbildung in Verbindung mit erhöhten Buttersäuregehalten (> 3 mmol/kg nach Abzug der lipolytisch gebildeten Buttersäure) kann *C. tyrobutyricum* im Käse nachgewiesen werden. Recht häufig konnten aber gleichzeitig noch andere Clostridien nachgewiesen werden, insbesondere *C. beijerinckii*, *C. butyricum*, *C. sporogenes* oder *C. bifermentans*. Dennoch ist es nach heutigem Wissenstand so, dass nur *C. tyrobutyricum* in der Lage ist, bei niedrigen Sporenzahlen in der Milch das typische Schadenbild der Buttersäuregärung hervorzurufen.

## 3 Der Nachweis der durch Clostridien verursachten Fehlgärungen

### 3.1 Erkennung anhand des typischen Schadenbildes

Die durch *Clostridium tyrobutyricum* verursachte Buttersäuregärung ist in vielen Fällen ohne Laboranalytik zweifelsfrei als solche zu identifizieren, und zwar wenn folgende Kriterien gleichzeitig zutreffen:

- Blähung der Käse einsetzend in der Regel frühestens 3-6 Wochen ab Produktion (bei Reifungstemperaturen >18°C oder starker Kontamination der Milch ev. auch früher)
- Starke Lochbildung, bei Gruyère und ähnlichen Käse Spaltenbildung (siehe Abb. 6)
- Ausgeprägtes Buttersäurearoma bzw. ranziges Aroma.
- Beim Anstechen der Käse mit einer Hohnadel austretendes Gas ist brennbar (Wasserstoff)

Natürlich kommen in der Praxis oft auch schwach ausgeprägte Buttersäuregärungen vor, die sich nicht mit Sicherheit identifizieren lassen. In diesen Fällen muss der visuelle und sensorische Befund durch eine Laboranalyse abgesichert werden. Dies gilt namentlich dann, wenn es darum geht, innerhalb einer betroffenen Monatsproduktion einzelne Chargen oder Produktionstage als möglicherweise einwandfrei zu identifizieren.



Abb. 6: Für einzelne Käsesorten typische Schadenbilder bei Buttersäuregärungen durch *C. tyrobutyricum*. Bilder oben: geschmierte Hartkäse. Bilder unten: Halbhartkäse

### 3.2 Mikroskopischer Nachweis

Bei Verdacht auf eine durch Clostridien ausgelöste Fehlgärung gelingt der Nachweis der Clostridien teilweise sehr schnell mit Hilfe des Mikroskops. Mit einem befeuchteten sterilen Tupfer macht man hierfür einen Abstrich von den Löchern und untersucht das Material bei mind. 800-facher Vergrößerung. Findet man dabei die typischen keulenförmigen Stäbchen mit deutlicher Schwellung im Bereich der meist terminal (endständig) liegenden Spore, hat man mit Sicherheit Clostridien nachgewiesen. Obwohl das Aussehen der sporulierten Zellen artspezifisch variiert, kann die Clostridienart mikroskopisch nicht sicher identifiziert werden.

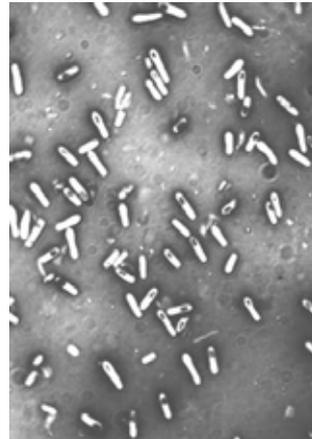


Abb. 7: Mikroskopisches Bild von *C. tyrobutyricum* mit Sporen. Typisch ist die keulenförmige Schwellung der Zellen im Bereich der Spore (= dunkler Einschlusskörper)

### 3.3 Kultureller Nachweis

Für den Nachweis von Clostridiensporen in Käse können grundsätzlich dieselben Methoden angewandt werden, wie sie bei der Analyse von Milch (siehe Kapitel 4) eingesetzt werden. So haben italienische Forscher (Bacci et al. 2002) in Extrahartkäse mit Buttersäuregärung sowohl mit der MPN-Methode als auch mit der Filtrationsmethode Sporengehalte zwischen 4'000 und 160'000 Sporen/g nachgewiesen. Für die Untersuchung wurden jeweils 10 g geriebener Käse homogenisiert. Die Buttersäuregehalte der Käse lagen zwischen 2.7 mmol/kg und sehr hohen 21 mmol/kg.

Auch ALP hat sporadisch Verdachtskäse mit der MPN-Methode auf Sporen untersucht und in positiven Fällen Sporenzahlen von 46'000/g bis >1 Mio./g gemessen. Allerdings gab es auch Fälle, wo trotz erhöhtem Buttersäuregehalt und offensichtlicher Gasbildung im Käse der Sporennachweis nicht gelang oder nicht interpretierbare Werte um 3-5 Sporen/g resultierten. Für die gescheiterten Nachweise gibt es verschiedene mögliche Gründe:

- Es lag tatsächlich keine Fehlgärung durch Clostridien vor.
- Die Clostridien waren noch nicht sporuliert und bei der Pasteurisation der Probe abgetötet.
- Inhomogenität der Probe: Der Käse enthielt zwar Clostridien, sie wurden aber durch die Stichprobe nicht erfasst.

Tatsächlich wachsen die Clostridien im Käse als lokal begrenzte Kolonien (siehe oben Abb. 4). Nur auf der Oberfläche von Gläszonen oder Löchern breiten sie sich aus. Trifft man also mit einer Bohrprobe keine Clostridienkolonie, weist man keine oder nur vereinzelte inaktive Sporen nach. Die unten beschriebene Methode über den Buttersäurenachweis mittels GC (siehe unten) ist unseres Erachtens robuster, da sich die Buttersäure als wasserlösliches, kleines Molekül im Käseteig ausbreitet, dies im Unterschied zu Bakterienzellen, die im geschlossenen Teig nicht wandern können.

Aus diesem Grund empfiehlt ALP für die Abklärung von

Buttersäureverdachtsfällen die akkreditierte GC-Methode und nicht die mikrobiologische Analyse. Letztere kann jedoch angezeigt sein, wenn es darum geht, den Erreger zu isolieren und genau zu bestimmen. Bei der mikrobiologischen Analyse ist es besonders wichtig, eine möglichst grosse Menge Probenmaterial, die Verdachtszonen (z.B. Gläszonen) miteinschliesst, zu homogenisieren und dann zu untersuchen.

### 3.4 Nachweis der flüchtigen Carbonsäuren mittels Gaschromatografie (GC)

Bei dieser Methode werden die freien Carbonsäuren in einer Käseprobe von 10 g mittels Wasserdampf verflüchtigt. Im gesammelten Destillat befinden sich danach alle flüchtigen Carbonsäuren von der Ameisensäure (C1) bis und mit der Capronsäure (C6). Das Destillat wird gaschromatografisch untersucht, um die Konzentrationen der einzelnen Säuren zu bestimmen.

Die nachgewiesenen flüchtigen Carbonsäuren erlauben es in vielen Fällen, sicher auf den Typ der Fehlgärung zu schließen, z.B. im Falle einer klassischen Buttersäuregärung. Wie Tabelle 2 zeigt, liefert das GC bei den proteolytischen Clostridien, wie z.B. *C. sporogenes*, lediglich einen Hinweis. Die in diesem Falle zu beobachtenden iso-Carbonsäuren können auch durch Proteolyten aus der Gruppe der „Salztoleranten“ gebildet werden.

#### Einfluss der Probenahme

Obwohl aus den oben erwähnten Gründen die GC-Methode weniger anfällig ist auf falsch negative Befunde, so hat auch bei dieser Methode die Probenahme Einfluss auf die Messergebnisse. Tabelle 3 zeigt eine Untersuchung in Gruyèrekäse. Die Gläszone zeigte einen Buttersäuregehalt von 4.7 mmol/kg, der – wie der tiefe Wert der n-Capronsäure zeigt – nicht durch Fettspaltung, sondern nur durch das Wachstum von Buttersäurebakterien zu erklären ist. Abseits der Gläszone waren die Buttersäurewerte deutlich tiefer, aber immer noch klar über der Limite von 1.5 mmol/kg.

**Fazit: die GC-Methode erlaubt eine sichere Identifikation von Buttersäuregärungen im Käse. Grenzfälle gibt es aber auch mit dieser Methode, wie mit jeder anderen Methode. Zu empfehlen ist in jedem Falle eine nicht zu kleine Probe-menge oder eine Probe, die fehlerhafte Stellen im Käse mit einbezieht (beim Emmentaler oft unmöglich).**

Art	Essigsäure	Propionsäure	n-Buttersäure	iso-Buttersäure	iso-Valerian-säure	iso-Capron-säure
<i>C. bifermentans</i>	x	x	x	x	x	x
<i>C. sporogenes</i>	x	x	x	x	x	x
<i>C. butyricum</i>	x		x			
<i>C. tyrobutyricum</i>	x		x			
<i>C. beijerinckii</i>	x		x			

Tab. 2 Fermentationsprodukte käseschädlicher Clostridienarten

		Zone ohne Lochung Probe 1 (Zentrum)	Zone ohne Lochung Probe 2	Zone mit Lochung (Gläs)	Sollwert
Flüchtige Carbon-säuren (total)	[mmol/kg]	10.8	11.3	14.9	<20
n-Buttersäure (C4)	[mmol/kg]	2.5	2.2	4.7	<1.5
n-Capronsäure (C6)	[mmol/kg]	0.1	0.1	0.1	<0.3

Tab. 3. Bestimmung der flüchtigen Carbonsäuren mittels GC in 6 Monate altem Gruyèrekäse mit lokaler Gläsbildung. Untersucht wurden die Gläszone sowie zwei Zonen ohne Gläs im selben Laib.

### 3.5 Interpretation der GC-Analyse hinsichtlich Buttersäuregärung

Die freie n-Buttersäure im Käse stammt aus drei potentiellen Quellen:

- Fettspaltung (Lipolyse) durch Lipase --> n-Buttersäure aus Lipolyse
- Abbau von Aminosäuren durch Keime der Rohmilchflora --> n-Buttersäure aus Proteolyse
- Buttersäuregärung durch Clostridien --> Buttersäure aus Buttersäuregärung

Die durch Fettspaltung freigesetzte Buttersäuremenge lässt sich gut schätzen, da bei der Fettspaltung auch n-Caprinsäure freigesetzt wird, nämlich im Verhältnis von 1 mol n-Caprinsäure auf 3 mol n-Buttersäure). Und da es ausser der Lipolyse keine Caprinsäurequelle im Käse gibt, entspricht n-Buttersäure aus Lipolyse dreimal dem Gehalt an n-Caprinsäure.

Der Anteil der Buttersäure aus Proteolyse entspricht im statistischen Durchschnitt etwa dem Gehalt an iso-Buttersäure. Diese Regel ist aber im Einzelfall nicht anwendbar. Die Auswertung von 5500 Käseproben, die in den letzten Jahren im Zusammenhang mit Fehlgärungen untersucht worden waren, ergab Folgendes:

- 75% der 5500 untersuchten Proben enthielt weniger als 0.2 mmol/kg iso-Buttersäure, also vernachlässigbare Mengen
- 4% der Proben enthielten mindestens 1 mmol iso-Buttersäure pro kg (Höchstwerte um 8 mmol/kg). Gut 30% dieser Proben enthielten mehr iso-Buttersäure als n-Buttersäure!
- Die iso-Buttersäuregehalt korrelieren mit den Werten für iso-Valeriansäure und iso-Caprinsäure ( $r = 0.8$ ). Bei einem Käse mit Buttersäuregärungsverdacht könnte dies ein Hinweis auf die unterschwellige Aktivität von proteolytischen Clostridien sein.
- Käseschmiere bzw. rindennaher Teig von schmieregereiften Käsen enthält deutlich mehr iso-Buttersäure als die Kernzone.

Aufgrund dieser Feststellungen erachten wir es als nicht zweckmässig, die iso-Buttersäure bei der rechnerischen Schätzung der n-Buttersäure aus Buttersäuregärung mitzuberechnen und wenden die folgende Formel an:

$$\text{n-Buttersäure aus Buttersäuregärung} = \text{n-Buttersäure gesamt} - 3 (\text{n-Caprinsäure})$$

In den Gutachten wird ALP fortan neben der „Buttersäure gesamt“ auch die n-Buttersäure aus Buttersäuregärung (BSBSG) gemäss obiger Gleichung angeben, und die Interpretation auf den letzteren Wert abstützen. Gegenüber der „Buttersäure gesamt“ hat die BSBSG den Vorteil, dass der reifungsbedingte Anstieg des Buttersäuregehaltes, der bei einwandfreien Käse fast ausschliesslich auf die Lipolyse zurückzuführen ist, berücksichtigt ist.

**Wichtig:** Auch anhand des Gaschromatogramms gilt eine Buttersäuregärung erst dann als bestätigt, wenn der Käse neben einem erhöhten Buttersäurewert auch das typische Schadenbild zeigt. Beispielsweise muss ein Befund als zweifelhaft beurteilt werden, wenn z.B. 4.0 mmol/kg n-Buttersäure aus Buttersäuregärung gemessen wurden, der Käse aber keine fehlerhafte Lochung (z.B. Gläs) aufweist.

#### Vorgehen in nicht eindeutigen Fällen

In der Praxis wird es immer wieder nicht eindeutige Fälle geben. Beispiele:

1. Der Käse zeigt eine übermässige oder grosse Lochung, die Buttersäurewerte liegen aber gerade noch im Normbereich

Mögliche Gründe:

- Es liegt eine andere Fehlgärung vor (Hefegärung, Propionsäuregärung, Milchsäurevergärung durch obligat heterofermentative Laktobazillen, Bildung von biogenen Aminen und/oder GABA durch Aminosäureabbau).
- Stichprobenfehler (Der Infektionsherd wurde mit der Probe nicht erfasst)
- Analysenfehler

Weiteres Vorgehen:

- Falls andere Fehlgärungen auszuschliessen sind, die Analyse an neuer Probe (möglichst von Fehlerstelle) wiederholen, oder die Käse weiter reifen und zu einem späteren Zeitpunkt nochmals untersuchen.

	Probenahme	Normwert
		n-Buttersäure aus Buttersäuregärung
Emmentaler	Mischprobe mehrere Bohrlinge des verdächtigen Laibs	<1.0 mmol/kg
Sbrinz	Gläszone des verdächtigen Laibs	<1.0 mmol/kg
Gruyère	Gläszone des verdächtigen Laibs	<1.5 mmol/kg
Halbhartkäse	Käsestück (>100g) oder Bohrling von Blähstelle	<1.0 mmol/kg

Tab. 4. Normwerte für Buttersäure

2. Der Käse zeigt überhöhte Buttersäurewerte, die typische Lochung fehlt.

Mögliche Gründe:

- Es liegt keine durch *C. tyrobutyricum* verursachte Buttersäuregärung vor. Buttersäure stammt aus starker Proteolyse (Indiz: erhöhte Werte bei den iso-Carbonsäuren)
- Die Buttersäure stammt aus Fettspaltung

Weiteres Vorgehen:

- Capronsäurewert überprüfen
- Sporennachweis im Käse (MPN oder Filtrationsmethode; Probe muss Fehlerstellen beinhalten!)

### 3.6 Molekularbiologischer Nachweis der Buttersäuregärungserregers

Seit einigen Jahren sind molekularbiologischer Methoden verfügbar, die es ermöglichen, Clostridien im Käse anhand der Erbsubstanz (DNA) nachzuweisen. ALP hat eine dieser Methoden (Le Bourhis A.-G. et al.; 2005) in wenigen Schadenfällen eingesetzt, in denen der gaschromatografische Befund im Widerspruch zum Schadenbild stand (siehe Tab. 5 und Abb. 8).

Die Methode besteht aus folgenden Schritten:

1. **Extraktion** der Bakterien-DNA aus dem Käsemasse
2. Vermehrung des für Clostridien charakteristischen Abschnittes innerhalb der DNA mit Hilfe der **Polymerase-Kettenreaktion** (PCR). Dazu setzt man der Probe so genannte Primer zu, die nur an Clostridien-DNA binden und den zu vervielfältigenden Abschnitt der DNA markieren. Es gibt Primer, die spezifisch für

eine einzige Art wie z.B. *C. butyricum* sind, und solche, die eine ganze Gruppe miteinander erfassen, z.B. die Gruppe I (*C. tyrobutyricum*, *C. butyricum*, *C. sporogenes*, *C. beijerinckii*, *C. pasteurianum*).

3. **Elektrophorese**: Auftrennung mit Hilfe von Gleichstrom und Sichtbarmachung der vervielfältigten DNA-Abschnitte in einem Gel.
4. Ev. weitere Tests wie z.B. eine Sequenzierung der vervielfältigten DNA-Abschnitte, um die Spezies zweifelsfrei zu identifizieren.

Abbildung 8 zeigt das Ergebnis einer PCR-Analyse von verschiedenen Käseproben. Die dunkle Bande an der Position 103 bp von Bahn Nr. 2 (Bündner Bergkäse) markiert das für Clostridien typische PCR-Produkt. Bei den anderen Proben fehlt diese Bande oder ist nur ganz schwach. Die anschließende Sequenzierung bestätigte die Anwesenheit von *C. tyrobutyricum* in Probe Nr. 2, während die PCR-Produkte jener Proben, die nur ein schwaches Signal ergaben, keiner potentiell käseschädlichen Clostridienart zugeordnet werden konnten. Es konnte nur bestätigt werden, dass es sich im Clostridien handelt.

Die PCR-Befunde erstaunen teilweise, wenn man sie mit den Resultaten der GC-Analyse der Käse (Tab. 5) vergleicht. Sie decken sich aber relativ gut mit dem Fehlerbild (Tab. 5 und Abb. 9) und dem Ergebnis des kulturellen Sporennachweises in den Käsen.

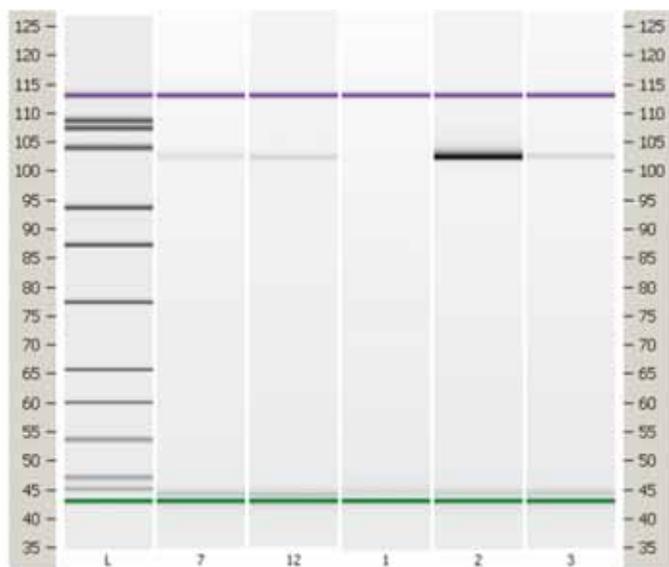


Abb. 8: Molekularbiologischer Nachweis von *C. tyrobutyricum* in Käseproben mittels PCR (16S RNA) zur Abklärung von Buttersäuregärungen. Proben von links nach rechts: L = Molekulargewichtsmarker (bp), 7 = Gruyère Probe 1, 12 = Gruyère Probe 6, 1 = Bündner Bergkäse (Vergleichsprobe), 2 = Bündner Bergkäse 2, 3 = Gruyère (Vergleichsprobe aus Detailhandel)



Abb. 9: Schnittbild des Käses „Gruyère 6“ aus Tabelle 5 mit einem Buttersäuregehalt von 7.49 mmol/kg, aber negatives Ergebnis beim mikrobiellen und molekularbiologischen Nachweis von Clostridien.

Bezeichnung	Fehlerbild	Alter	Propion- säure	n-Butter- säure	i-Butter- säure	n-Capron- säure	n-Butter- säure aus Gärung	Kultureller Sporen- nachweis*
Gruyère 1	süss, keine Löcher	7 m	8.39	11.32	0.73	0.35	10.27	negativ
Gruyère 6	süss, wenig Gläs	7 m	6.99	7.49	0.32	0.06	7.31	negativ
Bündner Bergkäse (Vergleichsprobe)	i.O.	3 m	0.94	0.25	0.79	0.02	0.19	negativ
Bündner Bergkäse	Gläs, Nach- gärung	4 m	2.26	1.54	1.92	0.00	1.54	positiv

\* Anreicherung in Bryant-Burkey-Bouillon

Tab. 5: Merkmale der mittels PCR untersuchten Käseproben (vgl. Abb. 8)

Das dargestellte Beispiel zeigt, dass es wichtig ist, die Ergebnisse der GC-Analyse immer unter Berücksichtigung des Schadenbildes zu interpretieren. Der molekularbiologische Nachweis ist dagegen hoch spezifisch, kennt aber – ähnlich wie der kulturelle Sporennachweis im Käse – auch seine kritischen Punkte:

- Es muss eine genügend grosse Probenmenge homogenisiert werden, damit mindestens eine Clostridienkolonie mit dem Probenmaterial erfasst wird.
- Auch nicht ausgekeimte Clostridien werden erfasst und liefern u.U. schwache Signale.
- Sensitivität und Robustheit der Methode sind noch ungenügend bekannt.
- Zur Zeit noch relativ teuer
- Keine Anbieter vorhanden (auch ALP bietet die Methode routinemässig noch nicht an, da die Zuverlässigkeit der Methode noch nicht hinreichend geklärt ist).

Die molekularbiologische Analytik entwickelt sich aber rasch weiter, wird einfacher und kostengünstiger. Darum sei die Prognose gewagt, dass der PCR-Nachweis von käseschädlichen Clostridien bei Fehlgärungen in der Praxis Einzug halten wird.

Interessant ist vor allem die so genannte Real-Time-PCR (Abb. 10), welche einfach in der Durchführung ist und ausserdem quantitative Ergebnisse liefert, indem das Signal umso früher ansteigt, je mehr DNA-Moleküle aus der Probe extrahiert wurden (Abb. 10). Ausserdem können im Prinzip Systeme entwickelt werden, die den gleichzeitigen Nachweis mehrerer Arten ermöglichen.

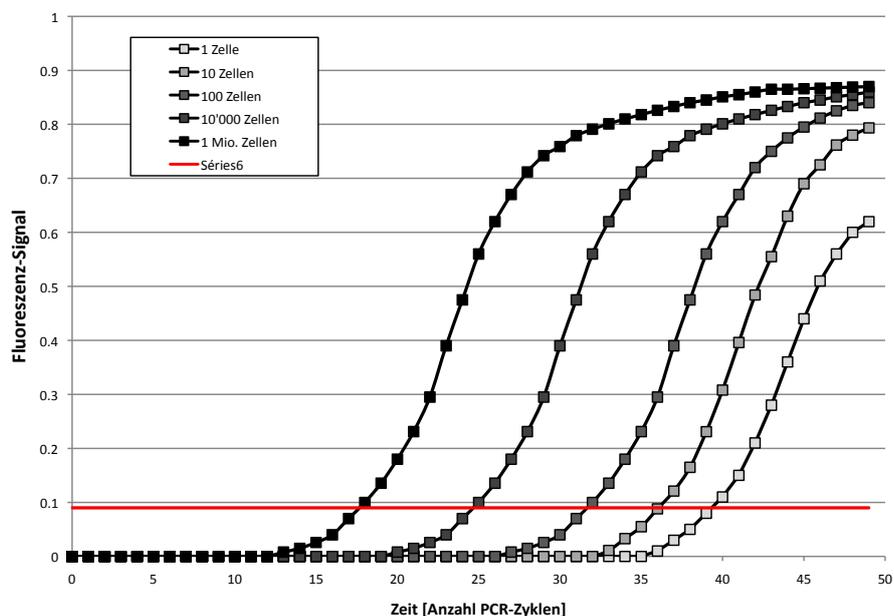


Abb. 10: Mit Real-Time PCR lassen sich Clostridien zuverlässig und quantitativ nachweisen. Je mehr Bakterienzellen in der Probe vorhanden waren, umso früher ist das Fluoreszenz-Signal messbar.

## 4 Bestimmung des Sporengehaltes von Milch

### 4.1 Praxismethoden

Einige Käsereien überwachen den Gehalt der Milch an anaeroben Sporen selbst. Der dabei am häufigsten eingesetzte Test ist der MRCM-Test der Foodtech AG (Abb.11). Die gebrauchsfertig gelieferten Röhrchen enthalten das sterile Nährmedium (RCM modifiziert) und Paraffin. Der Untersuchungsablauf ist wie folgt:

- Mittels steriler Spritze werden 10ml Milch durch die Gummimembran in das Röhrchen eingespritzt
- Probe wird mit Wasserbad bei 75°C während 15 min pasteurisiert, wobei das Paraffin schmilzt und einen Deckel über dem Nährmedium bildet.
- Nach Abkühlung wird das Röhrchen 4 Tage bei 37°C bebrütet.
- Gasbildung und ein Farbumschlag von rot nach gelb zeigen eine positive Reaktion an
- Der Test liefert nur ein qualitatives Ergebnis (positiv / negativ)
- Nachweisgrenze: 100 Sporen pro Liter

Neben dem MRCM-Test gehört auch die im FROMARTE Qualitätsmanagement-Konzept beschriebene „Käserprobe zum Nachweis von anaeroben Sporenbildner“ zu den Praxismethoden. Bei der Käserprobe werden 30 mL Milch mit 7 Tropfen Milchsäure 9% angesäuert mit Paraffin überschichtet, bei 75°C 15 min pasteurisiert und 4 Tage bebrütet.

Bei der Durchführung von Sporennachweisen in der Käseerei ist darauf zu achten, dass die Sporen aus positiven Röhrchen nicht in die Laborumgebung und über Hände und Kleidung in die Fabrikationsräume gelangen. Die bebrüteten Röhrchen müssen vor der Entsorgung ungeöffnet bei 121°C sterilisiert werden!



Abb. 11: MRCM-Test für den Sporennachweis in der Praxis

### 4.2 Labormethoden

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

#### 4.2.1 MPN-Methode

MPN steht für Most Probable Number (= wahrscheinlichste Zahl), ein in der Mikrobiologie verbreitet angewandtes Verfahren zur statistischen Schätzung einer Keimzahl. Hierfür wird eine bestimmte Menge der zu untersuchenden Milchprobe auf eine definierte Zahl von Reagenzgläsern mit Nährmedium verteilt (siehe Abb. 12).

Anhand der Anzahl Röhrchen, in denen Wachstum feststellbar war, lässt sich die wahrscheinlichste Sporenzahl (MPN) aus einer Tabelle ablesen.

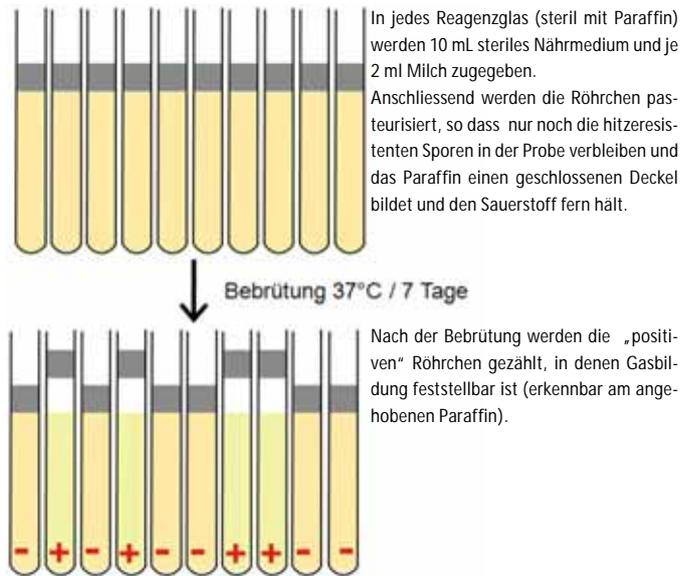


Abb. 12: Prinzip des MPN-Verfahrens zur Schätzung der Sporenzahl in Milch

In der Schweiz (vor allem in der Westschweiz) waren bis vor kurzem drei verschiedene MPN-Methoden im Einsatz:

ALP-Methode (nicht akkreditiert)  
Nährmedium: Kartoffel-Dextrose-Agar  
Format: 4x6 mL + 4x3 mL + 4x1mL Milch

Methode LAAF (nicht akkreditiert)  
Nährmedium: Reinforced Clostridium Agar (RCA bzw. RCM)  
Format: 4x6 mL + 4x3 mL + 4x1mL Milch

Methode CNERNA (F) (akkreditiert)  
Nährmedium: Bryant-Burkey-Medium  
Format: 10x 1 mL oder 5x1 mL und 5x0.1mL

Auf Initiative der Interprofession du Gruyère einigten die Labors in der Romandie im letzten Jahr darauf, die MPN-Methode zu vereinheitlichen. Die Methode sollte ausserdem akkreditierbar sein und auf die Bedürfnisse der Gruyère-Fabrikation zugeschnitten sein.

Nach zahlreichen Versuchen wurde nun eine leicht abgewandelte Form der in Frankreich verbreiteten Methode (CNERNA) eingeführt. Die Methode ist anerkannt und die Qualität durch regelmässige Ringversuche des französischen Instituts Cecalait abgesichert. Das Nährmedium ist kommerziell erhältlich, ebenso sterile Einwegreagenzgläser mit Paraffin, was die Laborarbeit stark vereinfacht.

#### 4.2.2 MPN-Methode in der Romandie (Modifizierte Methode CNERNA)

Nährmedium  
Bryant-Burkey-Medium (Merck, Biokar, BioLife)

Format  
10x2 mL für silofreie Milch  
5x1 + 5x0.1 mL für Silomilch

Bebrütung  
7 Tage / 37°C

Nachweisgrenze  
silofreie Milch: 53 Sporen/L  
Silomilch: 180 Sporen/L

Obere Bestimmungsgrenze  
silofreie Milch: 1'200 Sporen/L  
Silomilch: 16'000 Sporen/

Die Methode wird von den Laboratorien ARQHA (Moudon) und LAAF (IAG, Grangeneuve) im Geltungsbereich der Akkreditierung angeboten.

Ein umfangreicher Methodenvergleich hat ergeben, dass die „neue“ Methode etwa doppelt so hohe Werte liefert wie die bisherigen MPN-Methoden von ALP und LAAF. Darum mussten auch die Sporengrenzwerte für die Milch überarbeitet werden.

	bisherige Limite [Sporen/L]	neue Limite [Sporen/L]
Methode	ALP / LAAF	CNERNA modifiziert
Kessmilch	< 140	< 260
Lieferantenmilch (silofrei)	< 210	< 350
Lieferantenmilch (Silomilch)	< 1'500	< 2'800

Tab. 6: Grenzwerte für den Sporengehalt der Milch (MPN-Methode)

#### 4.2.3 Rückstellproben und Vorgehen im Schadenfall

Das Fassen und Einfrieren von Rückstellproben für den Schadenfall hat sich in den Käsereien eingebürgert. Viele Westschweizer Gruyère-Käsereien mit 2x täglicher Milcheinlieferung nehmen Proben à 10 mL von jeder Lieferung und frieren diese ohne Verzug in platzsparenden Kunststoffschachteln ein (Abb. 13).

Zusammen mit der Vereinheitlichung der Analytik hat die Interprofession du Gruyère auch ein einheitliches Vorgehen bei der Untersuchung der Rückstellproben im Schadenfall beschlossen (siehe Tab. 7).

Das Verfahren mag aufwändig scheinen. Es trägt aber der relativ grossen Messunsicherheit der Sporenmethoden Rechnung. Durch die Mehrfachanalyse wird die Messung wesentlich genauer und die Beurteilung der Milchlieferanten entsprechend besser.



Abb. 13. Erhebung von Rückstellproben der Lieferantenmilch

Anzahl Tage mit Buttersäuregärung	Mischprobe je Lieferant	Anzahl parallele Analysen aus der Mischprobe	Limite (Methode CNERNA mod.)
1 Tag	Morgen- und Abendmilch	1	< 350 Sporen/L
2 Tage	Alle Gemelke der Periode	2	Mittelwert der 2 Bestimmungen liegt < 350 Sporen/L
3 oder mehr Tage	Alle Gemelke der Periode	3	Mittelwert der 3 Bestimmungen liegt < 350 Sporen/L

Tab. 7: Vorgehen bei der Untersuchung von Lieferantenmilchproben im Schadenfall

#### 4.2.4 Filtrationsmethode nach Bourgeois & Casey

Auf der Basis der in Frankreich entwickelten Methode nach Bourgeois hat ALP in den 90er-Jahren eine Methode zur selektiveren Erfassung von *C. tyrobutyricum* entwickelt. Die Methode ist allgemein als Filtrationsmethode bekannt, zuweilen auch als „Schnellmethode“.

Das Prinzip der Methode: 40 ml Milch werden zwecks Selektion der Sporen pasteurisiert (75°C/15 min). Nach einer enzymatischen Behandlung lässt sich die Milch durch ein Membranfilter mit einer Porengrösse von 0.8 µm filtrieren. Der Filter wird nun auf ein selektives Agarmährmedium ausgelegt und 3 Tage bei 37°C unter Ausschluss von Sauerstoff bebrütet. Danach werden die Kolonien gezählt. Der Farbstoff (Säurefuchsin) erlaubt eine gewisse Differenzierung der Kolonien. Zudem sind sie gut zu mikroskopieren.

Die Methode eignet sich auch für die Analyse von Wasserproben (Filtration von 100 mL). Italienische Forscher haben die Methode mit Erfolg auch für die Untersuchung von Fehlgärungskäse untersucht (Verdünnung der Käseproben 1:100 – 1:1000). Dagegen bereitet die Untersuchung von Schafmilch Schwierigkeiten infolge des hohen Fettge-

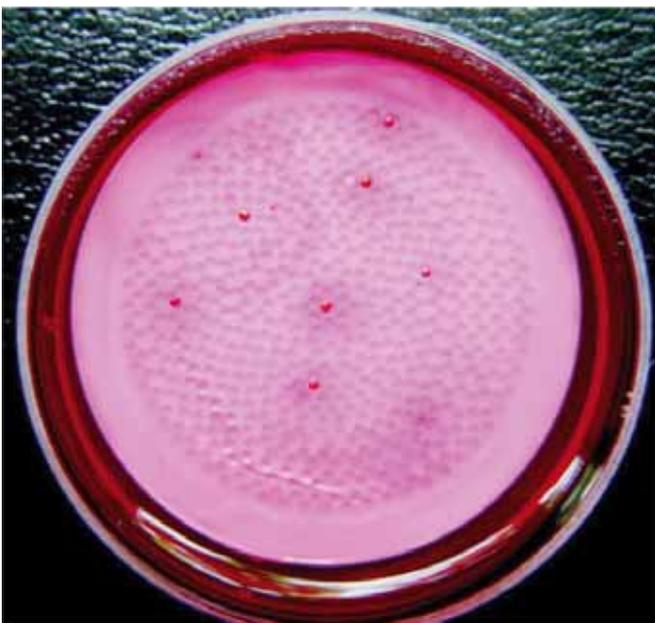
haltes und der hohen Viskosität.

Die Filtrationsmethode liefert etwa fünf- bis zehnmal tiefere Werte als die oben erwähnten MPN-Methoden. Der Hauptgrund liegt im Antibiotikumzusatz zum Nährmedium, was zur Hemmung gewisser Clostridien führt. Weitere Gründe liegen in der kürzeren Bebrütungszeit und der Art der Kultur (Oberflächenkultur statt Flüssigkultur).

In der routinemässigen Überwachung von frischen Kessi- und Lieferantenmilch von Käsereien hat sich die Filtrationsmethode in der Deutschschweiz durchgesetzt und bewährt. Sie wird zurzeit von folgenden Laboratorien angeboten: Bamos AG (Weinfelden TG), Labeco GmbH (Alberswil LU), LAAF (IAG Grangeneuve, nur noch auf Anfrage). Auch die Laboratorien des Milchverarbeiters Emmi wenden die Methode an. Eine Arbeitsgruppe mit Vertretern der verschiedenen Labors ist daran, die Grundlagen für eine Akkredierbarkeit der Filtrationsmethode zu schaffen.

Keim	Kolonieform	Sporenform
<i>C. tyrobutyricum</i>	konvex, rund und regelmässig, Kolonie klar begrenzt, glänzend, gelblich bis dunkelrosa	schlanke, subterminale Sporen, Zelle etwas aufblähend (sporuliert schlecht)
<i>C. sporogenes</i>	unregelmässig begrenzt, zartrosa gefärbt, neigt zum Schwärmen	subterminal, Zelle etwas aufblähend
<i>C. butyricum</i>	unregelmässiger, gezackte Kolonierand	zentral bis subterminal kein Aufblähen der Zelle
<i>C. bifermentans</i>	ungefärbte, flache Kolonien, mit diffusem Rand mit aufgehelltem Hof von 2 - 3 mm.	zentral oder subterminal, kein Aufblähen der Zelle

Tab 8: Differenzierung der Clostridien auf dem modifizierten RCM-Agar mit Cycloserin (2g/L) und Säurefuchsin (1 g/L) nach Bourgeois.



	Limite [Sporen/L]
Kessimilch	< 25
Lieferantenmilch (silofrei)	< 25
Lieferantenmilch (Silomilch)	< 1'000
Wasser	< 10

Tab. 9: Grenzwerte für den Sporengehalt der Milch bei Untersuchung mit der Filtrationsmethode nach Bourgeois & Casey

Abb. 14: Quantitative Bestimmung von Clostridiensporen mit der Filtrationsmethode nach Bourgeois & Casey

#### 4.2.5 Vergleich der Methoden bezüglich Aussagewert und Messunsicherheit

In Versuchen wurde die Sporenbelastung der silofreier Kessmilch (Sporengehalt MPN: ca. 45/L, Filtration: ca. 15 KbE/L) durch die Beimischung von Silomilch stufenweise erhöht und zu Modell-Emmentaler verarbeitet, wobei jedes Experiment dreifach ausgeführt wurde. Mit der Beimischung von 2% Silomilch zeigte einer von drei Versuchskäsen eine Buttersäuregärung, mit 5% waren es bereits zwei von drei Käsen. Der Versuch hatte auch zum Ziel, die Aussagekraft von Filtrations- und MPN-Methode zu vergleichen.

Wie Abb. 15 zeigt, ergab die Filtrationsmethode eine etwas schärfere Trennung zwischen den Fabrikationen mit Buttersäuregärung und den einwandfreien Käsen (Beurteilung anhand der flüchtigen Carbonsäure im reifen Käse als die MPN-Methode). Einschränkend ist allerdings zu sagen, dass die Sporenflora in diesem Versuch wegen der Beimischung von Silomilch immer ähnlich zusammengesetzt war. Es ist wahrscheinlich, dass die Korrelation zwischen den beiden Methoden bei Untersuchung von Milchproben mit unterschiedlicher zusammengesetzter Sporenflora schlechter wäre.

Abb. 15 zeigt auch, dass im Versuch keine Milch mit einem Sporengehalt von weniger als 40/L (Filtrationsmethode) eine Buttersäuregärung im Käse zur Folge hatte. Der bei der Filtrationsmethode fixierte Grenzwert von <25/L liegt somit auf der sicheren Seite.

Die Praxiserfahrungen zeigen, dass mit der MPN-Methode mehr Fälle beobachtet werden, in denen die Käse trotz hoher Sporenzahl keine Fehlgärung entwickeln. Aus Käse-reien, die ihre Milchproben mit der Filtrationsmethode untersuchen lassen, wird umgekehrt immer wieder von Fällen berichtet, in denen sich eine Buttersäuregärung entwickelte, obwohl in der Kessmilch ein Sporengehalt von <25 Sporen/L gemessen wurde.

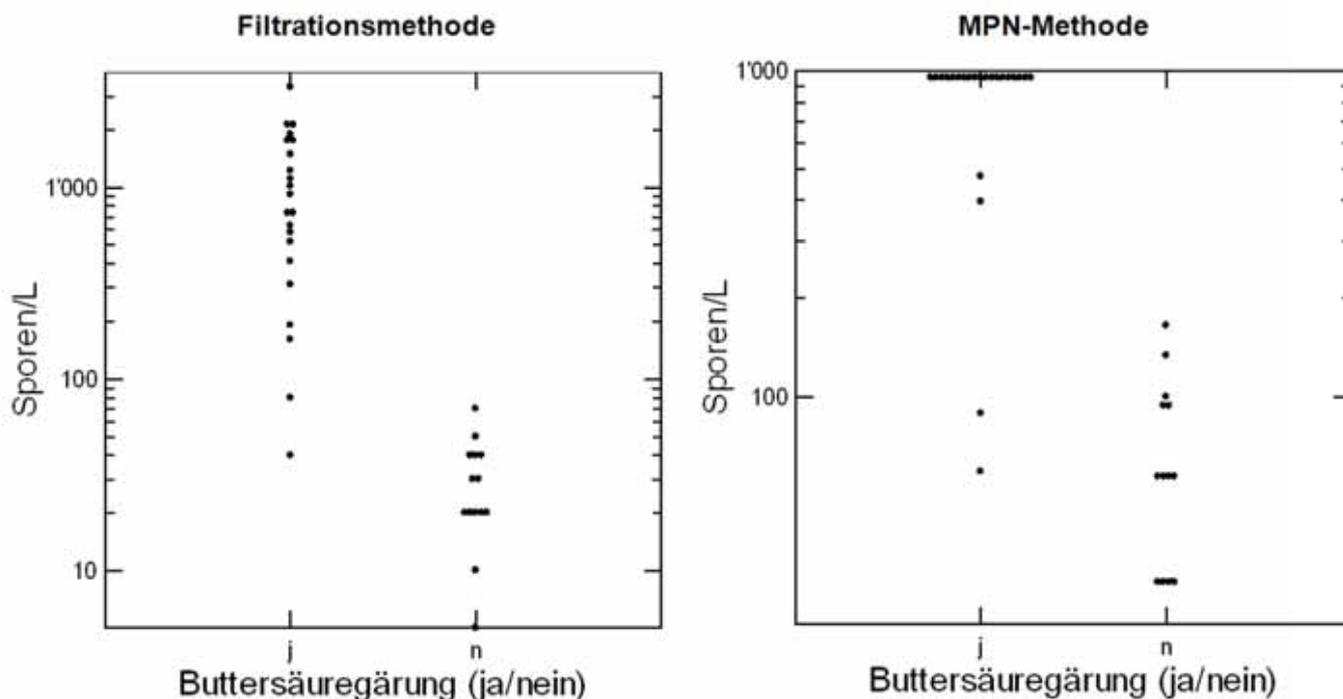


Abb. 15: Beziehung zwischen dem Sporengehalt der Kessmilch und dem Auftreten von Buttersäuregärungen in Versuchsfabrikationen

Die Grafiken in Abb. 16 und 17 zeigen, dass die Werte der Filtrationsmethode (40 mL) und der MPN-Methode (10x2 mL) im Bereich der jeweils geltenden Grenzwerte stark streuen. Dies liegt im Wesentlichen daran, dass wir nahe der Nachweisgrenze messen und mit Probenmenge von 20-40 mL Milch auskommen müssen. Daraus ergibt sich bei beiden Methoden eine relativ grobe Abstufung der möglichen Resultate.

**Das Problem der relativen grossen Messunsicherheit bei Quantifizierung anaerober Sporen kann man verringern, indem man die Anzahl Messungen erhöht.**

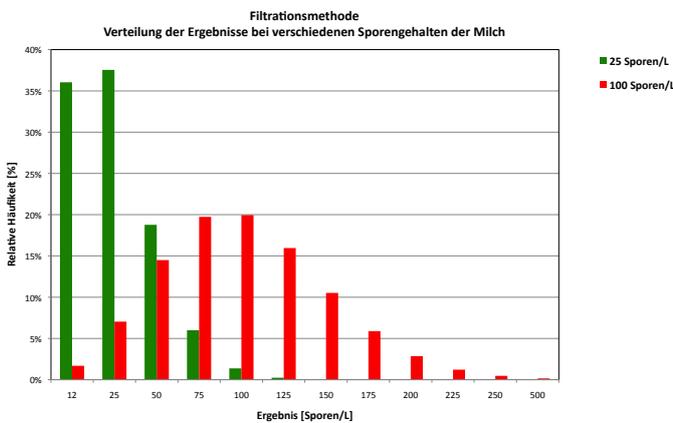


Abb. 16: Streuung der Sporenergebnisse bei der Filtrationsmethode bei Untersuchung von jeweils 40 mL Milch mit eine wahren Sporengehalt von 25 bzw. 100 Sporen/L (Modellrechnung ohne Berücksichtigung von Laborfehlern und Inhomogenität der Probe)

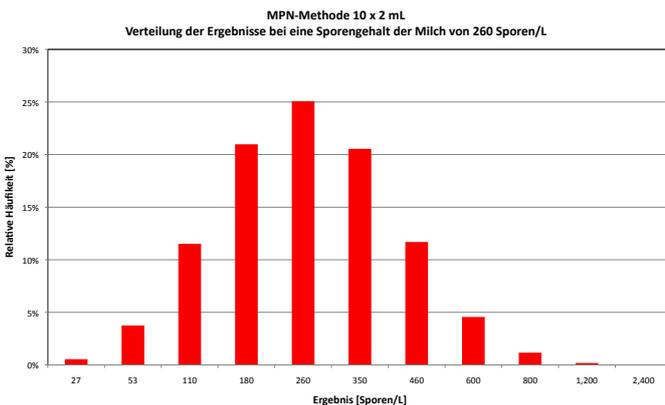


Abb. 17: Streuung der Sporenergebnisse bei der MPN-Methode (Ansatz mit 10 x 2 mL Probe) bei Untersuchung von Milch mit einen wahren Sporengehalt von 260 Sporen/L (Modellrechnung ohne Berücksichtigung von Laborfehlern und Inhomogenität der Probe)

### 4.3 Sporenanalytik in baktofugierter Milch

Die Baktofuge ermöglicht in der Regel eine zuverlässige Entfernung von Sporen aus der Milch (Abb. 18). Aufgrund der gezeigten Daten, lässt sich abschätzen, dass der mittlere Clostridiengehalt der baktofugierten Milch bei 1-2 Sporen pro Liter liegt. Allerdings kommen in der Praxis sporadisch Buttersäuregärungen bei aus baktofugierter Silomilch hergestelltem Käse vor. Mögliche Gründe sind eine zu hohe Sporenbelastung in der Ausgangsmilch oder ein verschlechterter Wirkungsgrad infolge von Funktionsstörungen (z.B. Lufteinzug) oder Fehlbedienung (z.B. ungenügender Gegendruck).

In der Beratung wurde ALP mit einem Fall konfrontiert, wo zahlreiche Tagesproduktionen eines aus baktofugierter Silomilch hergestellten pasteurisierten Halbhartkäses durch intensive Buttersäuregärung verloren gingen. Dies obwohl die Kessmilchproben meist Sporenwerte < 25/L aufwiesen. Neben temporären Störungen der Baktofugation sind in solchen Fällen natürlich auch mögliche Reinfektionsquellen zu prüfen. Aus Vergleichsuntersuchungen von Milchproben mit MPN- und Filtrationsmethode gibt es aber auch Hinweise darauf, dass der prozentuale Anteil von *C. tyrobutyricum* in der anaeroben Sporenflora bei Silomilch höher ist als bei silofreier Milch.

Aus den eben erwähnten Gründen empfehlen wir, bei Untersuchung baktofugierter Milch eine grössere Milchmenge zu untersuchen, bzw. den üblichen Test mindestens im Doppel durchzuführen.

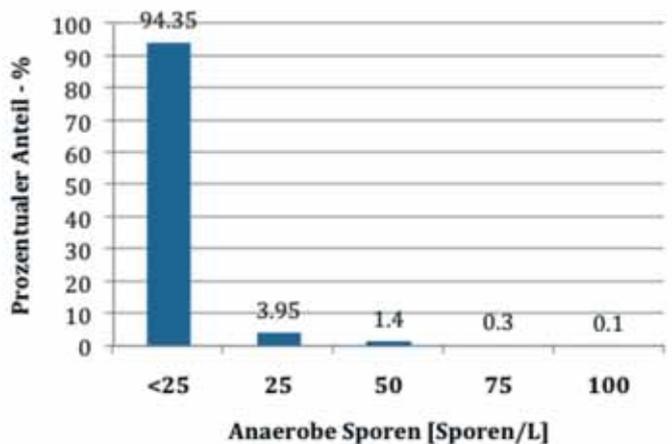


Abb. 18: Verteilung der Clostridiensporenzahlen (Filtrationsmethode) in baktofugierter Silomilch bei einwandfrei funktionierender Baktofuge (N= 1376 Proben)

## 5 Zusammenfassung

Laut den Versicherungsgesellschaften haben die durch Clostridien verursachten Schäden in Käseereien - was die Schadensumme betrifft - deutlich zugenommen. Hauptverantwortlich sind *Clostridium tyrobutyricum*, seltener *C. butyricum* und *C. sporogenes*. Fehlgärungen durch *C. butyricum* ereignen sich im frischen Käse, solange noch Restzucker vorhanden ist, und kommen anschliessend zum Stillstand. Darum sind die Auswirkungen im Vergleich zur Spätblähung (*C. tyrobutyricum*) bescheiden.

Der Nachweis der Buttersäuregärung mittels GC hat sich bewährt, weil sich die Buttersäure im Unterschied zu den Keimen im Käse ausbreitet und deshalb relativ sicher nachweisbar ist. Ab sofort wird ALP immer auch den Gehalt an „Buttersäure aus Gärung“ angeben. Die Berechnung erfolgt gemäss der folgenden Formel und bringt die durch Fettspaltung gebildete freie Buttersäure in Abzug:

$$\text{Buttersäure aus Gärung [mmol/kg]} = \text{Buttersäure [mmol/kg]} - 3 \times \text{Capronsäure [mmol/kg]}$$

Der Nachweis der Buttersäuregärung über den mikrobiologischen oder molekularbiologischen Nachweis des Erregers ist möglich, erfordert aber eine gezielte Probenahme, die einen oder mehrere Infektionsherde im Teig erfasst, bzw. genügend und gut homogenisiertes Probenmaterial.

Für den Sporennachweis in der Milch wenden die Käseereien hauptsächlich den MRCM-Test an. In den Labors der Romandie wird hauptsächlich die MPN-Methode angewandt (Methode CNERNA) in der Deutschschweiz die Filtrationsmethode nach Bourgeois und Casey. Es gelten die folgenden Anforderungen:

	MPN-Methode (CNERNA)	Filtrationsmethode
Kessmilch	< 260 Sporen/L	< 25 Sporen/L
Lieferantenmilch (silofrei)	< 350 Sporen/L	< 25 Sporen/L
Lieferantenmilch (Silomilch)	< 2'800 Sporen/L	< 1'000 Sporen/L

Da die Messunsicherheit im Bereich der Grenzwerte sowohl bei der MPN- als auch bei der Filtrationsmethode gross ist, empfiehlt sich, Entscheidungen aufgrund von zwei oder besser drei Analysen zu treffen. Die Interprofession du Gruyère hat darum festgelegt, dass im Schadenfall die in der Schadenperiode erhobenen Rückstellproben der einzelnen Lieferanten gemischt werden und anschliessend drei Analysen je Lieferant durchgeführt werden. Beanstandet werden Milchlieferungen, wenn der Durchschnitt der 3 Analysen bei 350 oder mehr Sporen pro Liter liegt.





