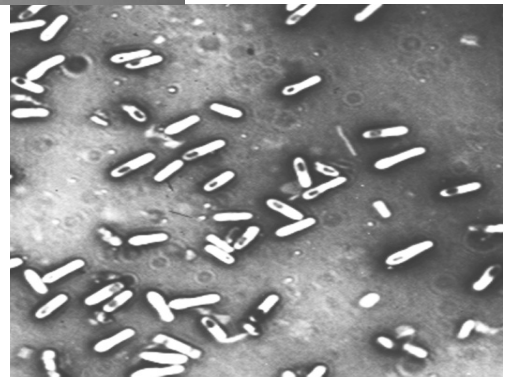
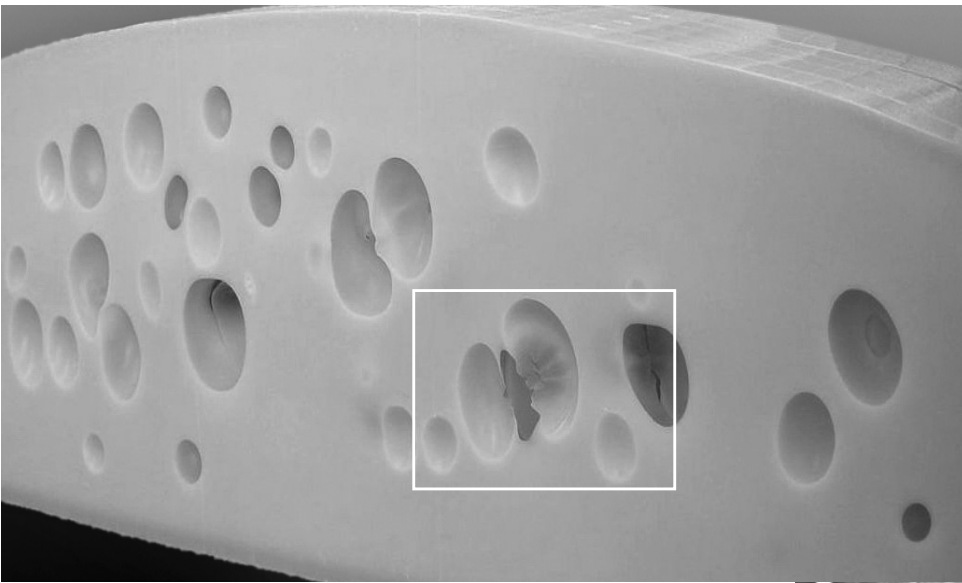


# BUTTERSÄUREBLÄHUNG – NOCH IMMER AKTUELL

Diskussionsgruppen Emmentaler



## Inhalt

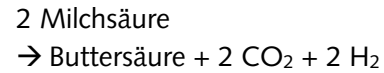
1	Einleitung	3
2	Die Buttersäuregärung	3
3	Analytischer Nachweis der Buttersäuregärung	4
3.1	Methoden	4
3.2	Die Quellen freier Buttersäure im Käse	4
3.3	Probenahme für die Untersuchung von Käse	6
4	Sporenbelastung der Rohmilch	6
4.1	In der Rohmilch vorkommende Sporenbildner	6
4.2	Kontaminationsquellen	8
4.3	Massnahmen zur Minimierung der Sporenbelastung der Milch	8
4.4	Trinkwasser als Kontaminationsquelle	9
5	Einfluss der Käseherstellung auf die Buttersäuregärung	10
6	Nachweis der Buttersäuresporen in der Milch	10
6.1	Die Methoden	10
6.2	Praxismethoden	10
6.3	Richtigkeit und Genauigkeit der quantitativen Methoden (Labormethoden)	13
6.4	Anforderungen an die Käsereimilch (Hartkäse)	14
6.5	Molekularbiologische Methoden für den Nachweis von <i>Cl. tyrobutyricum</i>	14
7	Überwachung der Sporenbelastung der Milch	15
7.1	Regelmässige Untersuchungen	15
7.2	Rückstellproben	15
7.3	Beweiskraft von Mischproben oder Stichproben	15
7.4	Welcher Probenplan?	15
7.5	Probenahme und Lagerung	16
8	Stallinspektionen	17
9	Zusammenfassung	17
10	Literatur	18

## 1 Einleitung

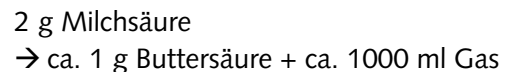
Buttersäuregärungen (BSG) treten beim Emmentalerkäse wieder vermehrt auf [1]. Erfahrungsgemäss nehmen die BSG-Fälle jeweils im Winterhalbjahr zu. Es scheint jedoch, dass die aktuelle Entwicklung nicht nur saisonal bedingt ist. Unter dem starken wirtschaftlichen Druck, dem Milchproduzenten und -verarbeiter heute ausgesetzt sind, werden die Anstrengungen bei der Qualitätssicherung und Kontrolle der Rohmilch zuweilen vernachlässigt. Seit der Lockerung der Vorschriften betreffend die silofreie Milchproduktion Ende 1998 ist aber gerade in diesem Bereich erhöhte Aufmerksamkeit gefordert. Da die verarbeitete Milchmenge je Betrieb im Zuge der Betriebschliessungen angestiegen ist, hat auch die Schadenssumme pro BSG-Fall zugenommen. Damit wächst nicht zuletzt auch der Druck der Versicherungen, die vorbeugenden Massnahmen zu erhöhen.

## 2 Die Buttersäuregärung

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



oder



Erste Anzeichen einer BSG treten in der Regel nach 6 bis 10 Wochen Lagerzeit auf. Sie äussert sich in einem ranzigen Geschmack und einer meist deutlichen Blähung der Käse als Folge der intensiven Gasbildung (Abb. 1). Enthält ein Käse 1 mg durch eine BSG gebildete freie Buttersäure pro Kilogramm, so wurden bis zum Zeitpunkt der Probenahme etwa 50 ml des wasserunlöslichen Wasserstoffs gebildet (45 ml H<sub>2</sub>/mmol Buttersäure; Gasmenge unter Normaldruck).

Selbst wenn die Käse noch kaum sichtbare Veränderungen aufweisen, sind die von einer BSG betroffenen Käse praktisch unverkäuflich. Deshalb muss man den Erreger, *Cl. tyrobutyricum*, als eigentlichen «Käsekiller» bezeichnen.

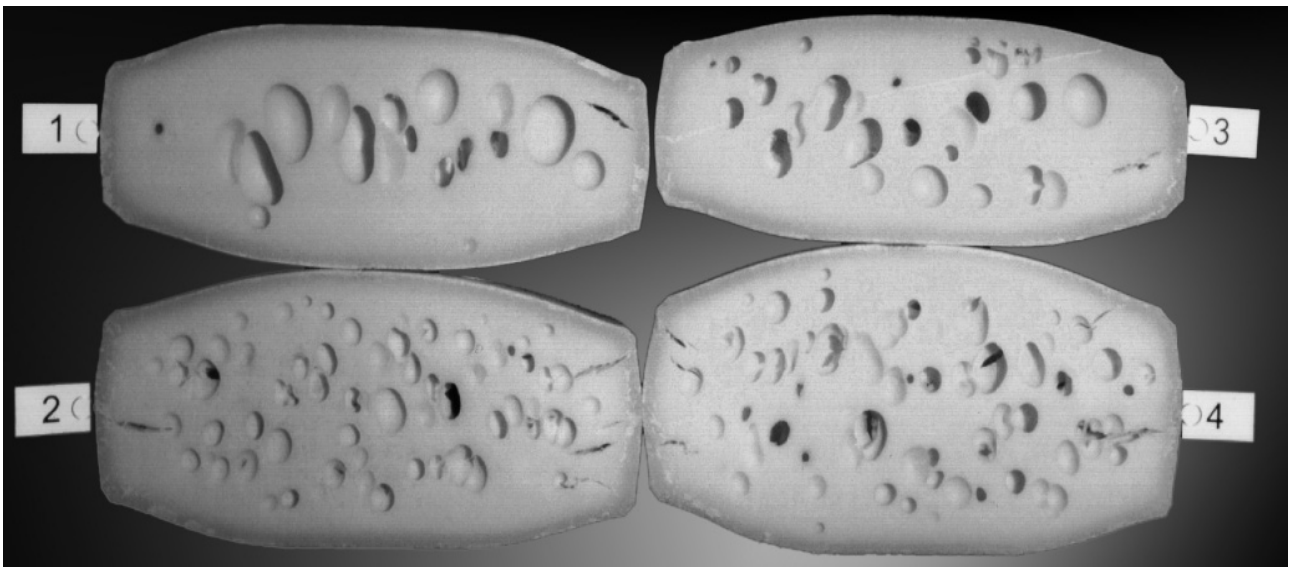


Abb. 1: Versuchskäse mit unterschiedlich stark ausgeprägter Buttersäureblähung

### 3 Analytischer Nachweis der Buttersäuregärung

#### 3.1 Methoden

Eine BSG kann grundsätzlich mit folgenden Methoden festgestellt werden:

- visuelle und sensorische Beurteilung der Käselaike
- Nachweis der Clostridien im Käse
- Messung der freien Buttersäure in Käseteig mittels Gaschromatographie (GC) oder Flüssigchromatographie (LC)
- molekularbiologischer Nachweis von *Cl. tyrobutyricum* im Käse (siehe 6.5, Seite 15)

Die visuelle und sensorische Methode setzt voraus, dass die BSG bereits zu wahrnehmbaren Veränderungen der Käse geführt hat. Sie ist zudem subjektiv und im Anfangstadium der BSG unsicher.

Auch der mikrobiologische Nachweis hat seine Tücken. Die ausgekeimten Sporen wachsen im Käse als räumlich begrenzte Kolonien. Sind dies nur wenige, so besteht die Möglichkeit, dass die Bohrpfeife keine Keime erfasst. Ausserdem entgehen die vegetativen Zellen der Analyse, da sie bei der Probenaufarbeitung absterben.

Als Methode der Wahl zum Nachweis einer BSG hat sich die Bestimmung der freien Buttersäure (GC oder LC) etabliert. Da die Buttersäure im Käse diffundiert, kann sie auch abseits der Erregerkolonien nachgewiesen werden. Die Gefahr falsch negativer Befunde ist somit wesentlich kleiner.

#### 3.2 Die Quellen freier Buttersäure im Käse

Freie Buttersäure kann auf drei verschiedenen Arten gebildet werden [7], nämlich durch:

1. enzymatische Fettspaltung (Lipolyse)
2. Abbau von freien Aminosäuren durch die Mikroflora des Käses
3. Buttersäuregärung

Der Anteil lipolytisch gebildeter Buttersäure kann anhand des Gehaltes an freier Capronsäure abgeschätzt werden. Milchfett enthält n-Buttersäure (n-C<sub>4</sub>) und n-Capronsäure (n-C<sub>6</sub>) in einem Mol-Verhältnis von 2:1. Bei den flüchtigen Fettsäuren im Käse liegt das Verhältnis bei etwas 3:1, da Buttersäure bei der Lipolyse im Vergleich zu den anderen Fettsäuren etwas bevorzugt freigesetzt wird.

Für den proteolytisch bedingten Anteil gilt die Faustregel, dass in etwa dieselben Mengen iso-Buttersäure (2-Methyl-Propionsäure) und n-Buttersäure gebildet werden.

Für die Menge freier n-Buttersäure im Käse (n-C<sub>4total</sub>) gilt also näherungsweise die folgende Beziehung:

$$n-C_{4total} \text{ [mol/kg]} = 3 * n-C_6 + i-C_4 + n-C_{4BSG}$$

wobei

n-C<sub>6</sub> = Gehalt  
an freier Capronsäure in mmol/kg

i-C<sub>4</sub> = Gehalt  
an freier iso-Buttersäure in mmol/kg

n-C<sub>4BSG</sub> = durch Buttersäuregärung  
gebildete Buttersäure in mmol/kg

Einwandfreier Emmentaler im Alter von 3 Monaten enthält weniger als 1 mmol/kg freie Buttersäure [11]. Werte von über 1 mmol/kg an gärungsbedingter Buttersäure (n-C<sub>4BSG</sub>) weisen klar auf eine BSG hin (siehe Tab. 1, Abb. 2).

Tab. 1: Freie Fettsäuren in verschiedenen Emmentalerproben  
(Beispiele aus der Beratungspraxis von ALP)

Probe	A	B	C	D	E	F	G	H
Alter [Monate]	2.6	2.2	2.9	3.0	3.0	3.2	3.6	4.7
Flüchtige Fettsäuren total	98.1	103.0	106.0	104.0	105.0	112.0	109.0	109.0
Ameisensäure C <sub>1</sub>	3.1	3.8	3.6	3.6	3.3	4.1	4.6	4.5
Essigsäure C <sub>2</sub>	42.9	47.6	44.2	43.3	28.4	47.8	42.1	42.8
Propionsäure C <sub>3</sub>	51.8	49.7	56.2	57.7	30.9	57.8	53.8	48.0
iso-Buttersäure i - C <sub>4</sub>	0.0	0.0	0.1	0.1	0.0	0.0	0.1	0.1
Buttersäure n - C <sub>4</sub>	0.2	1.3	1.4	2.7	31.4	1.7	7.8	9.5
Capronsäure n - C <sub>6</sub>	0.1	0.4	0.1	0.2	10.6	0.2	0.2	4.0
Buttersäure aus Gärung	< 0.1	0.1	0.9	2.0	< 0.1	1.0	7.1	< 0.1
	N	R	(BSG)	BSG	R	BSG	BSG	R

Legende:

N = einwandfreier Käse

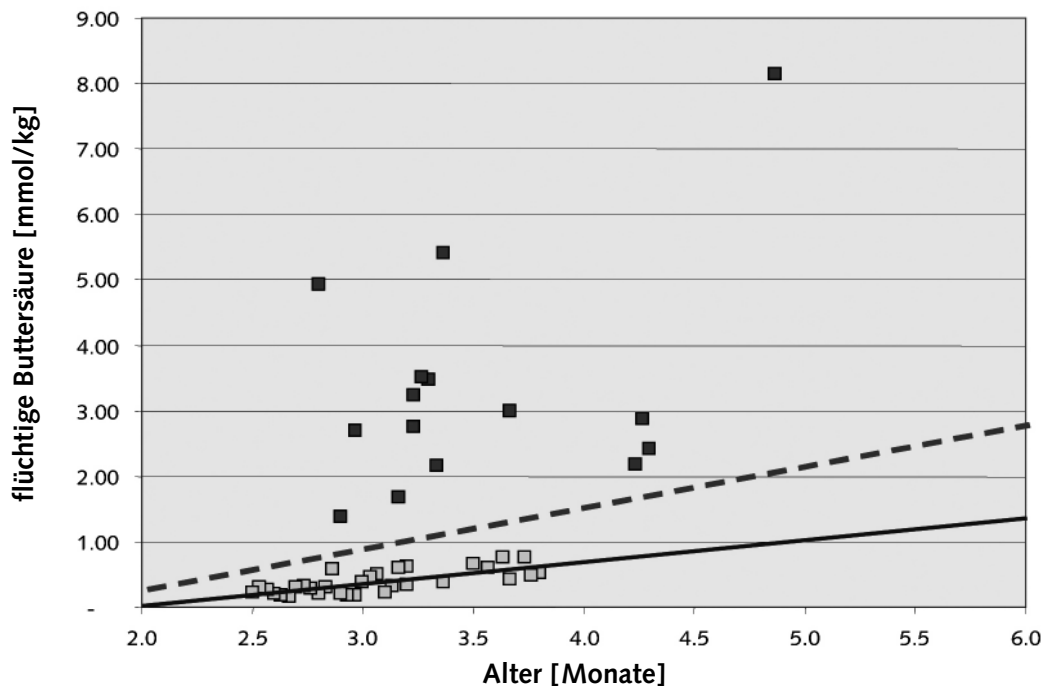
R = ranziger Käse

BSG = Käse mit Buttersäuregärung

(BSG) = Verdacht auf Buttersäuregärung

### Freie Buttersäure in Emmentaler mit und ohne Buttersäuregärung

(N = einwandfreier Käse, davon 15 mit BSG; alle Käse aus einem Betrieb)



Tab. 1:

Freie Buttersäure in 46 einzelnen Tageschargen aus einer Emmentalerkäserei.  
Die durchgezogene Regressionsgerade zeigt die reifungsbedingte Entwicklung  
der freien Buttersäure bei den einwandfreien Chargen.

Resultate oberhalb der gestrichelten Linie stammen von Käsen mit BSG.

### 3.3 Probenahme für die Untersuchung von Käse

Gaschromatographische Analysen sind relativ teuer (Preis ALP: Fr. 70.– pro Probe). Deshalb ist es angebracht, diese erst aufgrund konkreter Verdachtsmomente (schnell «öffnende» bzw. stark «schaffende» Käse, ranziger Geschmack) zu veranlassen. Da von einer Monatsproduktion oft nur eine oder wenige Tagesproduktionen betroffen sind, ist es nicht zweckmässig, grosse Mischproben (z.B. des ganzen Monats) auf Buttersäure untersuchen zu lassen.

Sinnvollerweise wird eine Triage – gemäss nachfolgender Tabelle – vorgenommen:

Gruppe	Umschreibung	Untersuchung
A. klare Verdachtskäse	Blähungsverdacht, ranziger Geschmack	Mischprobe
B. fragliche Käse	zweifelhafter Taxationsbefund, an Gruppe A angrenzende Tagesproduktionen	jede Tagesproduktion einzeln
C. unverdächtige Käse	einwandfreier Taxationsbefund	keine (oder ev. Mischprobe)

Dieses Vorgehen birgt zweierlei Risiken:

1. Falsch negativer Befund bei BSG im Anfangsstadium: Schwach positive Chargen bleiben unerkannt (negativer Befund infolge des Verdünnungseffekts der Mischprobe)
2. Überschätzung des Schadenumfangs bei positiver Mischprobe: Einwandfreie Produktionen bleiben in der Mischprobe unerkannt.

## 4 Sporenbelastung der Rohmilch

### 4.1 In der Rohmilch vorkommende Sporenbilder

Milch ist natürlicherweise ein weitgehend steriles Sekret, es sei denn, es liege eine Euterinfektion vor. Die bakterielle Verunreinigung der Milch beginnt beim Passieren des Strichkanals. Die wichtigsten Kontaminationsquellen liegen aber ausserhalb des Euters: Haut von Zitzen und Euter, Melkgerät, Transportleitungen, Lager- und Transportbehälter, Umgebungsluft, Einstreu usw.. Das Keimspektrum der Kontaminationsflora ist breit. Hinsichtlich der Buttersäuregärung interessieren die Sporenbildner (Tab. 2, Seite 7).

Die **aeroben Sporenbildner** (*Bacillus* spp.) kommen sehr verbreitet vor, z.B. im Boden und Wasser, in Futtermitteln, gärendem Pflanzenmaterial. In trockenem Pflanzenmaterial, wo sie als Sporen vorliegen, sind sie der wichtigste Bestandteil der Keimflora. Im Käse findet man aerobe Sporenbildner kaum, obwohl die meisten auch unter anaeroben Bedingungen wachsen. Bei stark kontaminierter Milch können sie aber wegen ihrer stark proteolytischen und lipolytischen Enzyme zu vielfältigen Problemen Anlass geben, wie z.B. zu unreinem Geschmack im Käse.

Tab. 2: Sporenbildende Bazillen in der Milch

Vertreter	Eigenschaften					
	wächst aerob	wächst anaerob	Gas- bildung	Bildung von Butter- säure	wächst < 10°C*	
<b>Aerobe Sporenbildner (<i>Bacillus spp.</i>)</b>						
<i>B. cereus</i>	X	X	–	–	+/-	Pathogen, Proteolyt
<i>B. licheniformis</i>	X	X	+/-	–	+/-	starker Proteolyt
<i>B. polymyxa</i>	X	X	+	–	+	starker Proteolyt
<i>B. pumilis</i>	X	X	–	–	+/-	starker Proteolyt und Fettspalter
<i>B. subtilis</i>	X	–	–	–	+/-	strikt aerob, Proteolyt («Heubazillus»)
<b>Anaerobe Sporenbildner (Clostridien)</b>						
<i>Cl. butyricum</i>	–	X	++	+	–	Vergärt Laktose und Milchsäure zu Buttersäure
<i>Cl. tyrobutyricum</i>	–	X	++	++	–	Erreger der klassischen Buttersäuregärung (Spätblähung)
<i>Cl. beijerinckii</i>	–	X	(+)	(+)	–	Buttersäure- und Gasbildung (H <sub>2</sub> ) in vitro
<i>Cl. sporogenes</i>	–	X	+++	+	–	Starker Proteolyt und Lipolyt, Blähungserreger; bildet CO <sub>2</sub> , H <sub>2</sub> , H <sub>2</sub> S und NH <sub>3</sub> . Verursacher von Putrifikus
<i>Cl. perfringens</i>	–	X	++	+	–	Pathogen (Durchfall, Gasbrand)
<i>Cl. bifermentans</i>	–	X	++	(+)	–	Starker Proteolyt, pathogene Stämme bekannt

\* +/- bedeutet: Das Wachstum bei <10° ist eine stammspezifische Eigenschaft

Die **anaeroben Sporenbildner** (*Clostridium spp.*) können in sauerstoffhaltigem Milieu nur in sporulierter Form überleben. In der Kessmilch erfolgt daher keine Vermehrung. Darin unterscheiden sie sich wesentlich von den Vertretern der Gattung *Bacillus*.

Durch *Clostridium butyricum* verursachte BSG sind selten. Gefahr besteht bei schlechter Säuerung und bei unvollständiger Vergärung des Milchzuckers, sofern die Milch mit den Sporen verunreinigt ist.

*Cl. tyrobutyricum* gilt nach heutigen Erkenntnissen als der einzige Erreger der als Spätblähung bezeichneten BSG. 50 Sporen pro Liter Milch können genügen, um einen Hartkäse zu blähen [3].

*Cl. beijerinckii* und *Cl. bifermentans* kommen – wie *Cl. tyrobutyricum* – häufig in Silage vor und somit auch in der Rohmilch. Nach Guericke [9] ist *Cl. beijerinckii* die häufigste Clostridium-Spezies in Rohmilch, hat aber als Blähungserreger im Käse offenbar keine Bedeutung. Zwar konnten holländische Forscher [10] vegetative Keime von

*Cl. beijerinckii* in Halbhartkäsen mit Spätblähung nachweisen. Zur Bildung von Gas und Buttersäure scheinen sie im Käse aber nicht fähig.

*Cl. sporogenes*, der Erreger des Putrifikus («Stinker Käse»), ist ein sehr starker Proteolyt, der Aminosäuren zu Wasserstoff, CO<sub>2</sub>, Aminen und Schwefelverbindungen zersetzt. Helle Tupfen im Teig bis hin zu faustgrossen, weisslich verfärbten Löchern sowie fauliger Geruch und Geschmack sind das typische Schadenbild. Putrifikus tritt deutlich seltener auf als BSG. Betroffen sind v.a. lange reife Käse mit pH-Werten im Teig >5.3. Die Kontamination der Milch erfolgt wie bei *Cl. tyrobutyrium* (siehe 4.2).

Die meisten der oben erwähnten, in der Milch vorkommenden Sporenbildner wachsen unter den Bedingungen der praxisüblichen Nachweismethoden für *Cl. tyrobutyricum* und können so zu falsch positiven Befunden bzw. zu überhöhten Messwerten Anlass geben (siehe 6.3).

## 4.2 Kontaminationsquellen

Clostridien kommen natürlicherweise im Boden sowie in See- und Flusswasser vor. Im Boden variieren die Sporenzahlen von Zehntausend bis mehreren Millionen pro Gramm, je nach Art der Düngung und Nutzung. Clostridien, speziell die Buttersäurebazillen, reichern sich überall dort an, wo anaerobe Bedingungen in Gegenwart von Feuchtigkeit und organischem Material vorliegen.

Solche Bedingungen sind in folgenden Biotopen gegeben:

- Silofutter (insbesondere bei schlechter Säuerung, nasser Silage)
- Gärende Futtermittel und Futtermittelrückstände (Grünfutter, Rübenschnitzel, Obst) und entsprechende Abfälle
- Misthaufen, Kompost
- Morastige Flächen (Weiden, Laufhöfe, Flurwege)
- Nässende Stellen unter Liegematten
- Abgestandenes, stark verunreinigtes Wasser (hier sorgen aerobe Mikroorganismen rasch für anaerobe Verhältnisse)

Nach Angaben in der Literatur [4, 5] variiert der Gehalt der Silage an Clostridiensporen von rund 100 Sporen/g bis zu Werten um 1 Mio. Sporen/g. Gute Silage enthält in der Regel weniger als 1'000 Clostridiensporen/g. Dies ist aber immer noch genug, um bei mangelnder Stall- und Melkhygiene eine kritische Kontamination der Milch zu verursachen.

Kot enthält bis zu 5 mal mehr anaerobe Sporen als das vom Tier verzehrte Futter. Es findet also eine Anreicherung statt. Kotrückstände an Eutern, in der Einstreu, an Kleidern und Händen des Melkers usw. sind darum die bedeutendsten Kontaminationsquellen.

Abbildung 3 zeigt den saisonalen Verlauf der Belastung der Milch mit anaeroben Sporen. Im Winterhalbjahr sind die Werte höher als in den wärmeren Jahreszeiten. Witterungsbedingt können die Sporenzahlen aber jederzeit nach oben ausschlagen.

Anaerobe Sporen in der Kessmilch (Region MIBD FR-NE)  
1999/2000

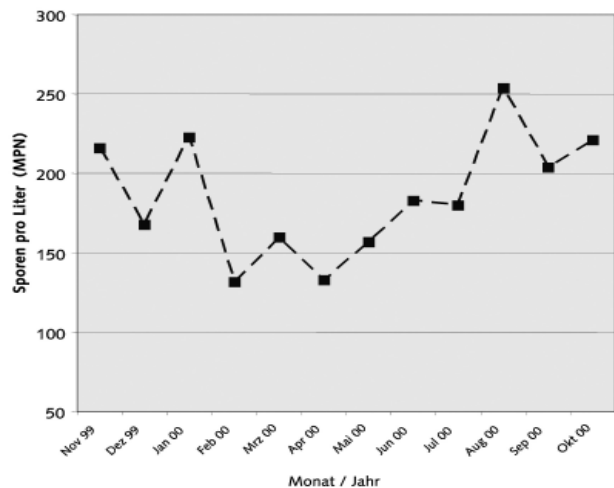


Abb. 3: Jahreszeitliche Schwankungen in der Sporenbelastung der Milch (Quelle: SICL FR-NE)

## 4.3 Massnahmen zur Minimierung der Sporenbelastung der Milch

### Minimierung des Sporeneintrags in den Stall

- Grünfutter nicht mit Humus verunreinigen (nicht zu tief mähen)
- Wartefrist für Weidegang und Grasschnitt nach Düngung mit Hofdünger
- saubere und trockene Futterlagerung
- Tiere aus Silobetrieben erst nach Quarantäne in den silofreien Stall aufnehmen
- Auslaufhöfe mit festem Grund (kein Morast)

### Minimierung der Sporenanreicherung im Stall

- intakte Gummimatten, darunter keine Nässe
- Saubere intakte Futterkrippen, Futtermischer, Tränkebecken
- frisches, einwandfreies Futter: keine gärenden Futtermittel(reste)

### Minimierung des Sporeneintrags in die Milch (Melkhygiene)

- saubere Umgebung während des Melkens (gemästete Läger)
- Bildung von Staub und Aerosolen (Spritzen mit Wasser!) unmittelbar vor und während des Melkens vermeiden
- saubere Tiere
- sorgfältige korrekte Zitzenreinigung (siehe Merkblatt «Melkvorbereitung der Milchkuh» [13])
- saubere Kleidung des Melkers



- keine Berührung mit der ungereinigten Hand von Oberflächen (inkl. gereinigte Zitze), die direkt oder indirekt mit der Milch in Berührungen kommen können
- sorgfältiges Anhängen des Melkzeugs (kein «Staubsaugen»!)

**Und speziell bei silofreier Milchproduktion auf Betrieben, die auch Silagefütterung betreiben:**

- strikte getrennte Auslaufhöfe (Kot!),
- strikte getrennte Weideflächen und Zugänge, getrennte Futterflächen (Kot, Hofdünger!)
- keine Siloballen oder Silos (Säfte!) im Auslaufbereich von silofreien Tieren
- kein Verstellen von Tieren in den silofreien Stall ohne Quarantäne
- Wechsel von Kleidung und Schuhwerk sowie Händereinigung beim Wechsel vom Silagebereich in den Bereich der silofreien Milchproduktion.



Abb. 4: Sauber gehaltene Tiere und Läger sind eine Grundvoraussetzung zur Produktion sporearmer Milch

Bei genauer Beachtung der dargelegten Punkte kann selbst im Silobetrieb sporearme Milch produziert werden: In einer Studie von ALP (Tab. 3) zeigten Silomilchproben oft nicht höhere Werte als silofreie Milch. Nach oben streuen die Sporenzahlen der Silomilch allerdings viel stärker. Ausserdem gelten die an Milchsäure adaptierten anaeroben Sporenbildner aus der Silage als besonders «aggressiv».

	Geometrischer Mittelwert [ Sporen/l ]	Obergrenze des Streubereichs (95%-Vertrauensintervall) [ Sporen/l ]
Mit Silage (n=18)	50	<b>350</b>
Silofrei (n=18)	12.5	<b>50</b>

Tab. 3: Gehalt der Milch an Sporen von *Cl. tyrobutyricum* in Abhängigkeit von der Produktionsart (mit/ohne Silage) gemäss einer Erhebung von ALP [8]. Resultate der Wintersaison.

**4.4 Trinkwasser als Kontaminationsquelle**

Trinkwasser aus kommunalen Wasserversorgungen sollte keine Gefahrenquelle darstellen. Häufiger sind Kontaminationen bei privaten Wasserversorgungen. Erhöhte Gefahr droht, wenn Hofdünger im Einzugsbereich der Quelle ausgebracht wird,

bei sehr nasser Witterung oder Gewitterregen nach längeren Trockenperioden. Dies gilt besonders in Karstgebieten (z.B. Jura). Auf anaerobe Sporen im Trinkwasser ist v.a. in Käsereien zu achten, wo Wasser der Milch oder dem Bruch zugesetzt wird.

## 5 Einfluss der Käseherstellung auf die Buttersäuregärung

Es wird immer wieder darauf hingewiesen, dass der gemessene Sporengehalt der Milch keine sehr zuverlässige Prognose bezüglich des Auftretens einer BSG im Käse erlaubt. Die Gründe:

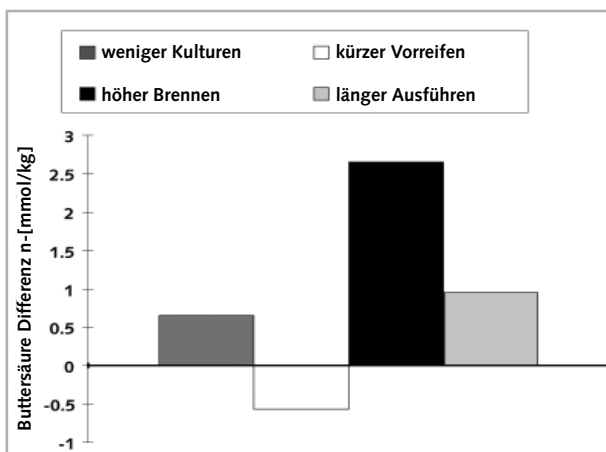
1. Sporenmessung ist ungenau (siehe 6.3)
2. Einfluss des Käsetyps und des Herstellungsprozesses

Ob Clostridien sporen auskeimen und sich vermehren, hängt von folgenden Faktoren ab:

- Sauerstoffgehalt (Redoxpotential) des Milieus
- Thermische Behandlung der Milch, Brenntemperatur
- Konkurrenzflora / eingesetzte Kulturen
- pH-Wert im Käse
- Salz- und Kupfergehalt des Käseteigs
- Lagertemperatur
- Gär-raum-aufenthalt
- Reifungsdauer

Aufgrund der hohen Brenntemperatur und der langen Reifung sind Hartkäse besonders gefährdet. Vor einigen Jahren durchgeführte Versuche von ALP zeigen: Brenntemperaturen über 54°C fördern das Auskeimen der Sporen. Ähnlich, obgleich deutlich schwächer, wirkt ein verlängertes Ausrühren (Abb. 5). Auch ein langsamer Säuerungsverlauf gilt allgemein als Risikofaktor. Nach Bachmann [3] führt dies aber nicht zu einer generellen Beschleunigung der BSG.

Der Einfluss des Salzgehalt kann beim Emmentaler vernachlässigt werden. Er liegt deutlich unter der Effektkonzentration.



## 6 Nachweis der Buttersäuresporen in der Milch

### 6.1 Die Methoden

Zum Nachweis von Blähungserregern in der Milch sind heute verschiedene Methoden im Einsatz (Tab. 4). In den Labors erfolgt der Nachweis von *Cl. tyrobutyricum* meist mit der bei ALP entwickelten Filtrationsmethode nach Bourgeois/Casey (Abb. 7, Seite 13).

### 6.2 Praxismethoden

Für den Nachweis von Buttersäuresporen in der Käseerei kommen der MRCM-Test und die ALP Praxismethode («Käserprobe») oder ähnliche Methoden in Frage.

Der **MRCM-Test** ist ein kommerziell vertriebener Test (Foodtech AG, Uster). Die gebrauchsfertigen, sterilen Röhrchen mit Nährmedium und Parafin sind relativ einfach zu handhaben. Mittels mitgelieferter Spritzen werden 10ml Milch in das Röhrchen injiziert. Anschließend wird die Probe pasteurisiert und bei 4 Tage bei 36°C bebrütet. Gasbildung und ein Farbumschlag von rot nach gelb zeigen eine positive Reaktion an. Der Test liefert nur ein qualitatives Ergebnis (positiv/negativ). Mit nur 10ml Proben-volumen liegt die Nachweisgrenze bei 100 Sporen pro Liter, d.h. die Befunde sind relativ unsicher (vgl. Tab. 5). Durch Ansetzen von drei oder mehr Röhrchen pro Probe kann die Nachweisgrenze gesenkt werden, und eine quantitative Auswertung nach dem Prinzip der wahrscheinlichsten Zahl (MPN) wird dann möglich (siehe Seite 13, MPN-Verfahren).

Abb. 5: Einfluss verschiedener Fabrikationsparameter auf den Gehalt an n-Buttersäure aus Buttersäuregärung in 90 Tage alten Modell-Gruyère-Käsen [3].

Differenzen zwischen folgende Stufen:

1. weniger Kulturen (0.8 statt 2.5 ‰),
2. kürzer Vorreifen (5 statt 45 Min.),
3. höher Brennen (58 statt 54 °C),
4. länger Ausrühren (30 statt 5 Minuten)

Der MRCM-Test ist auch im preisgünstigeren Kleinformat erhältlich. Mit einem Probevolumen von nur 1 ml pro Röhrchen liegt die Nachweisgrenze aber viel zu hoch, um silofreie Milch überwachen zu können.

Eine teilweise übliche Praxis ist, die Kessimilch an sechs aufeinander folgenden Tagen mit Hilfe des 10 ml – MRCM-Tests zu prüfen und die sechs

Befunde anhand einer MPN-Tabelle quantitativ auszuwerten (Beispiel: 2 x positiv und 4 x negativ ergibt einen Tabellenwert von 41 Sporen/l).

Doch Vorsicht: Da jeder der sechs Tests mit einer anderen Milch durchgeführt wurde, vermittelt der «Messwert» unter Umständen ein ziemlich trügerisches Bild. Nur sporadisch auftretende, hohe Sporenbelastungen werden kaum als solche erkannt.

Tab. 4: Gebräuchliche Methoden für den Nachweis anaerober Sporenbilder in der Milch

	Prinzip	Indikation für Clostridien	Spezifität (erfasste Gasbildner)	Vor- und Nachteile
<b>Praxismethoden</b>				
Gärprobe	Aerobe Inkubation der Milch bei 38 °C/24h (keine Erhitzung)	Gasbildung	<i>Coliforme</i> inkl. <i>E. coli</i> <i>Bacillus</i> spp.	+ einfach – unspezifisch, <i>Clostridien</i> werden kaum erfasst – nur qualitativ
Weinzirlprobe	Milch wird bei 83 °C 15min pasteurisiert. Inkubation bei 37 °C/7d (unter Paraffin)	Gasbildung	Sporen von Clostridien und ev. <i>Bacillus</i> spp.	+ einfach + erfasst nur Sporen – erfasst <i>Cl. tyrobutyricum</i> nicht (nur <i>Cl. butyricum</i> )
MRCM-Test <sup>TM 1)</sup>	Gebrauchsfertige Röhrchen mit modifiz. RCM-Medium. Injektion von 10 ml Milch → 85 °C/10-15min, Inkubation bei 36 °C/96 h	Gasbildung + Farbumschlag	Clostridien-Sporen Nachweisgrenze: 100 Sporen/L	+ einfach + gebrauchsfertige Röhrchen + erfasst – rel. selektiv Buttersäuresporen – rel. teuer (7.– pro Röhrchen)
Praxismethode ALP «Käserprobe»	30 ml Milch + Milchsäure → Erhitzung auf 75 °C/15min. Inkubation bei 38 °C/96 h (unter Paraffin)	Gasbildung	Sporen von Clostridien und ev. <i>Bacillus</i> spp. Nachweisgrenze: 35 Sporen/L	+ relativ einfach + erfasst nur Sporen. – erfasst nicht nur Buttersäuresporen
<b>Labormethoden</b>				
NIZO-Methode (mod. Weinzirl-Methode)	Nährmedium: Milch + Glucose + Milchsäure (pH 5.45). Probe wird pasteurisiert und bei 37 °C/7d bebrütet. Mehrere Röhrchen pro Verdünnung	Gasbildung	Sporen von Clostridien und ev. <i>Bacillus</i> spp. NG: meist 25 Sporen/L (40ml Probe)	+ relativ einfach + erfasst nur Sporen – erfasst nicht nur Buttersäuresporen – Messunsicherheit – lange Analysendauer
MPN - Methode	Pasteurisierte Probe in Dextrose-Kartoffel-Medium. Anaerobe Bebrütung 37 °C/9d. Mehrere Röhrchen pro Verdünnung	Gasbildung	Sporen von Clostridien und ev. <i>Bacillus</i> spp. NG: 25 Sporen/L (40ml Probe)	+ relativ einfach + erfasst nur Sporen – erfasst nicht nur Buttersäuresporen – Messunsicherheit lange Analysendauer
Filtrationsmethode nach Bourgeois/Casey	Membranfiltration der Probe nach Pasteurisation und enzymatischer Behandlung. Inkubation auf RCM-Agar (4d, 37 °C)	Form und Farbe der Kolonien, Geruch	Sporen von Buttersäurebazillen (Clostridien) NG: 25 Sporen/L (40ml Probe)	+ gute Selektivität + gute Präzision (bei höheren Keimzahlen) + raschere Resultate – nur f. filtrierbare Proben – Filtrationsgerät benötigt

1) Kommerzieller Test von Kemikalia AB, Lund (S); Vertrieb Foodtech AG, 8610 Uster

## Käserprobe

Die Käserprobe erlaubt eine hinreichend zuverlässige Überwachung der Sporen im Käsereibetrieb mit einfachen Mitteln. Die Durchführung ist in Abb. 6 schematisch beschrieben.

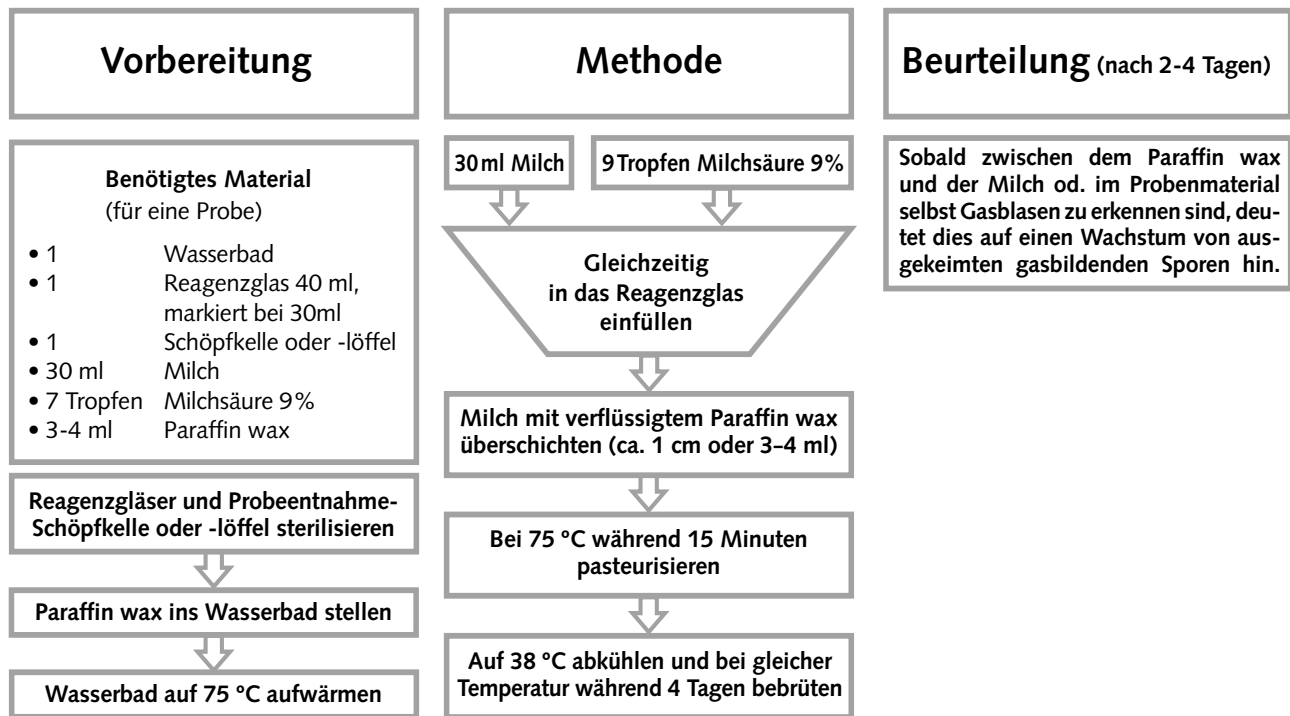


Abb. 6 Nachweis anaerober Sporenbildner mit Hilfe der ALP-Praxismethode («Käserprobe»)

Drei Punkte sollten bei der Durchführung der Käserprobe zusätzlich beachtet werden:

- 1. Pasteurisation:** Die befüllten Reagenzgläser sollten bis zum Rand erhitzt werden. Andernfalls können vegetative Keime aus der Probe in der kühleren Zone überleben und die erhitzte Milch wieder kontaminieren.
- 2. Abfälle:** Positive Röhrchen (Gasbildung) können bis zu 1 Milliarde BSG-Erreger enthalten. Darum die Röhrchen vor der Entleerung 15 min. im Dampfkochtopf sterilisieren.
- 3. Wenn Flüssigkeit aus einem bebrüteten Röhrchen ausläuft, Hände und Arbeitsfläche gründlich desinfizieren.**

Auch die Käserprobe liefert nur ein qualitatives Resultat (positiv/negativ). Vom Zeitpunkt des Auftretens erster Gasblasen oder von der Gasmenge nach 4 Tagen Bebrütung kann nicht unbedingt auf die Sporenzahl geschlossen werden, da die Reaktionszeit von der individuellen Zusammensetzung der Sporenflora der Probe abhängt.

### 6.3 Richtigkeit und Genauigkeit der quantitativen Methoden (Labormethoden)

#### MPN-Verfahren

Jeder qualitative Test, auch die Käserprobe, kann zu einer quantitativen Methoden abgewandelt werden, indem pro Probe mehrere Röhrgen gleichzeitig angesetzt werden. Der Mehraufwand ist bescheiden. MPN-Rechner zum Auswerten beliebiger Kombinationen von Röhrgen findet man im Internet, z.B. den MPN Calculator unter <http://members.ync.net/mcuriale/mpn/> (kostenloser Download).

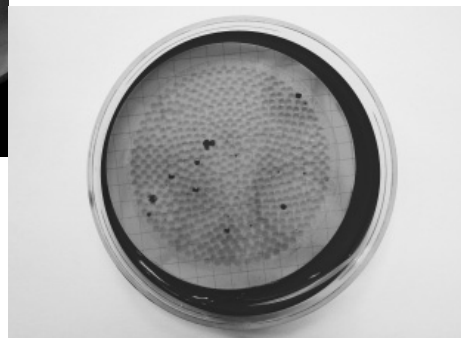


Abb. 7 Links: Filtrationsgerät zur Bestimmung des Gehaltes an *Cl. tyrobutyricum*-Sporen in Milch. Rechts: Membranfilter nach anaerober Bebrütung. Bilder: M. Dalla-Torre, ALP

#### Richtigkeit

Bei der Filtrationsmethode (Abb. 7) ist es möglich, *Cl. tyrobutyricum* von anderen Sporenbildnern zu unterscheiden. Demgegenüber werden bei der MPN-Methode alle Sporenbildner erfasst, die unter anaeroben Bedingungen Gas bilden. Die MPN-Methode liefert deshalb höhere Werte und mehr falsch positive Befunde.

Die Häufigkeit falsch negativer Befunde hängt u.a. von der untersuchten Probenmenge und damit von der Nachweisgrenze der Methode ab. Tab. 5 zeigt: Werden mehrmals hintereinander 40 mL einer Milch mit 50 Sporen/L untersucht, so ergibt - rein statistisch betrachtet und ungeachtet der Methode – jede achte Untersuchung (13%) einen negativen Befund. Weil anaerobe Sporenbildner in flüssigen Nährmedien etwas besser gedeihen als auf Agar-Nährböden, ist die MPN-Methode in der Praxis gleichwohl etwas empfindlicher.

Tab. 5 Wahrscheinlichkeit negativer Sporenbefunde in Abhängigkeit von Probenvoluminen und Sporenbelastung der Milch.

Wahrer Sporengehalt der Probe [Sporen/l]	Probenvolumen			
	10ml	30ml	40ml	100ml
	% Analysen mit negativem Ergebnis, d.h. ...			
	<100 Sporen/L	< 35 Sporen/L	< 25 Sporen/L	< 10 Sporen/L
25	78% **	43%	<b>36%</b>	7%
50	61%	22%	13%	0.5%
75	47%	10%	5%	0.04%
100	<b>37%</b>	5%	2%	< 0.01%

\* 30 mL entspricht «Käserprobe», 40 ml: Normalvolumen bei MPN-Methode und Filtrationsmethode, 100 ml = maximales Probenvolumen bei Filtrationsmethode.

\*\* Lesebeispiel: Bei einem Sporengehalt von 25/l und einem Probenvolumen von 10 ml fallen 78 von 100 Analysen negativ aus.

Tab. 6: Präzision der quantitativen Methoden zur Bestimmung der anaeroben Sporen in Milch (95%-Vertrauensbereich der Messwerte)

	Filtrationsmethode (mit 40 mL Probe)	MPN-Methode (3x4 Ansatz: 6/0.6/0.06 ml)
Messwert	50 Sporen/L	150 Sporen/L
Unterer Vertrauensgrenze	15 Sporen/L	46 Sporen/L
Oberer Vertrauensgrenze	175 Sporen/L	520 Sporen/L

### Präzision

Die Filtrationsmethode ist grundsätzlich genauer, da gewachsene Kolonien gezählt werden können, wogegen die MPN-Methode immer einen statistischen Schätzwert liefert. Wie Tabelle 6 zeigt, messen aber beide Methoden recht unscharf, wenn der Sporengehalt im Bereich der Sporengrenzwerte (siehe 6.4) und somit nahe der Nachweisgrenze der Methoden liegt. Ergibt beispielsweise die Analyse mit der MPN-Methode (3x4 Ansatz) einen Sporengehalt von 150 Sporen pro Liter, so liegt der tatsächliche Wert irgendwo zwischen 34 und 520 Sporen pro Liter.

Zusammenfassend ist festzuhalten:

- Die MPN-Methode liefert meist zwei- bis dreimal höhere Werte als die Filtrationsmethode, darum bestehen methodenspezifische Grenzwerte.
- Die MPN-Methode liefert mehr falsch positive Befunde, aber etwas weniger falsch negative.
- Die Filtrationsmethode liefert kaum falsch positive Befunde, aber etwas mehr falsch negative.
- Sporengehalte, welche mit der Filtrationsmethode bestimmt wurden, sagen mehr über das BSG-Risiko aus, weil die Methode den Erreger selektiver erfasst.
- Sporengehalte nach MPN-Methode sind etwas aussagekräftiger bzgl. der Stallhygiene und des Keimeintrags unmittelbar beim Melkvorgang, da mehr Sporenbildner erfasst werden.
- Beide Methoden sind im Bereich der Schadschwelle relativ ungenau. Darum ergeben nur regelmässig durchgeführte Kontrollen ein gutes Bild der Risikosituation.

### 6.4 Anforderungen an die Käsereimilch (Hartkäse)

Einwandfreie Milch ab Hof weist in der Regel einen Gehalt von weniger als 25 Clostridien-Sporen pro Liter auf. Ab 50 Sporen/l in der Kessimilch steigt das Risiko einer BSG deutlich. Die Festlegung von Grenzwerten für die Sporenbelastung der Lieferantenmilch erfolgt im Rahmen von privatrechtlichen Vereinbarungen. Typische Limiten sind in Tabelle 7 zusammengestellt.

### 6.5 Molekularbiologische Methoden für den Nachweis von *Cl. tyrobutyricum*

Vor gut 10 Jahren wurden erste Methoden entwickelt, um *Cl. tyrobutyricum* anhand der Erbsubstanz (DNA) des Keims nachzuweisen. Inzwischen werden entsprechende Testkits angeboten (Beispiel: MicroDetect Clostridium Detection Kit von IQ Products, Groningen NL). DNA-Tests erfordern spezielle Laborgeräte und Know-How. Für die Routineuntersuchung von Milch, wo eine sehr tiefe Nachweisgrenze gefordert ist, sind solche Tests noch zu teuer und bieten gegenüber klassischen Methoden kaum Vorteile, ausser dass das Resultat innert weniger Stunden vorliegt. Sie eignen sich aber gut für die Analyse geblähter Käse. Interessant sind die molekularbiologischen Methoden wegen ihrer hohen Spezifität. Heute ist es möglich, die verschiedenen Stämme von *Cl. tyrobutyricum* anhand ihres genetischen «Fingerabdrucks» zu unterscheiden. Wird der Schädling aus einem Käse isoliert, so ist es grundsätzlich möglich, dessen Herkunft anhand dieses «Fingerabdrucks» bis zum Milchlieferanten zurückzuverfolgen.

Tab. 7: Gebräuchliche Limiten für den Gehalt der Käsereimilch an anaeroben Sporen.

	Limite (Filtrationsmethode)	Limite (MPN)	Limite «Käserprobe»
Kessimilch	≤ 50 Sporen/L	150 Sporen/L	Keine Blähungen mit 30ml Milch
Lieferantenmilch	≤ 75 Sporen	300 Sporen/L	

## 7 Überwachung der Sporenbelastung der Milch

### 7.1 Regelmässige Untersuchungen

Sporenanalysen von frischer Kessmilch und/oder Milch der einzelnen Lieferanten erlauben es, Gefahrensituation frühzeitig zu erkennen und (grösseren) Schäden vorzubeugen. Diese Sofort-analysen sind daher sehr zu empfehlen. Sie können mittels der «Käserprobe», dem MRCM-Test oder im externen Labor erfolgen. Die Untersuchungsfrequenz sollte der Jahreszeit angepasst (im Winter häufiger) und bei positiven Befunden sofort erhöht werden. Bei wiederholt positiv getesteter Kessmilch sind Lieferantenmilchproben zu untersuchen.

### 7.2 Rückstellproben

Rückstellproben von Lieferantenmilch bezwecken, bei später auftretenden Buttersäuregärungen den oder die verantwortlichen Milchlieferanten zu eruieren. Sie werden also meist erst im Schadenfall, d.h. mit erheblichem zeitlichem Verzug untersucht. Als vorbeugendes Instrument gegen BSG genügen sie darum nicht, obwohl die regelmässigen Probennahmen erfahrungsgemäss durchaus eine gewisse präventive Wirkung entfalten. Die laufende Erhebung von Rückstellproben ist relativ aufwändig und erfordert bald einmal viel Platz im Tiefkühler. Deshalb sind Rückstellproben in der Regel Mischproben mehrerer Gemelke oder einzelne Stichproben.

### 7.3 Beweiskraft von Mischproben oder Stichproben

Sowohl mit Mischproben als auch mit Stichproben können notorisch ungenügende Lieferanten aufgedeckt werden. Schwieriger ist es, wenn zeitlich eng begrenzte BSG-Fälle auftreten.

- Stichproben sind naturgegeben lückenhaft und – falls sie zeitlich neben dem Produktionsdatum einer geblähten Charge liegen – nur beschränkt beweiskräftig.
- Mischproben erfassen ein einzelnes, sporenriches Einzelgemelk bei sonst guter Milchqualität eher als Stichproben, falls nicht zu viele Gemelke gemischt werden. Werden z.B.

sechs Einzelgemelke gemischt, wovon eines 400 Sporen/l, die anderen um 10 Sporen/l aufweisen, so liegt der Wert in der Mischprobe bei ca. 75 Sporen/l. Die Wahrscheinlichkeit, dass dann die Untersuchung ein Ergebnis von  $\leq 25$  Sporen/l ergibt, liegt bei immerhin 23%.

- Auch bei täglicher Probenahme werden herkömmliche mikrobiologische Sporennachweise nie zwingende Beweiskraft haben, wie z.B. ein molekularbiologischer Test (siehe dazu 6.5).

### 7.4 Welcher Probenplan?

Probenahmepläne für laufende Sporenanalysen und Rückstellproben müssen der betriebspezifischen Risikobeurteilung Rechnung tragen, allenfalls auch Vorgaben der Versicherung. Hinzu kommen saisonale Aspekte und betriebliche Begebenheiten wie die Zahl der Lieferanten, die Probenahme (automatisch/ manuell), Personalkapazitäten usw.. Ob nun Rückstellproben in Form laufender Mischproben oder – weniger arbeitsintensiv – als Stichproben erhoben werden, ist nicht entscheidend im Hinblick auf das BSG-Risiko. Wichtiger ist, dass der Käser die Sache nicht dem Zufall überlässt. Eine mögliche Vorgehensweise ist in Abb. 8, Seite 16 dargestellt. Eine in der Romandie verbreitete Praxis ist, jeweils vier aufeinander folgende Gemelke eines Lieferanten zu einer Rückstellprobe zu mischen. Pro Monat und Lieferant fallen damit 15 Proben an. Einmal im Monat wird eine solche Probe untersucht statt eingefroren.

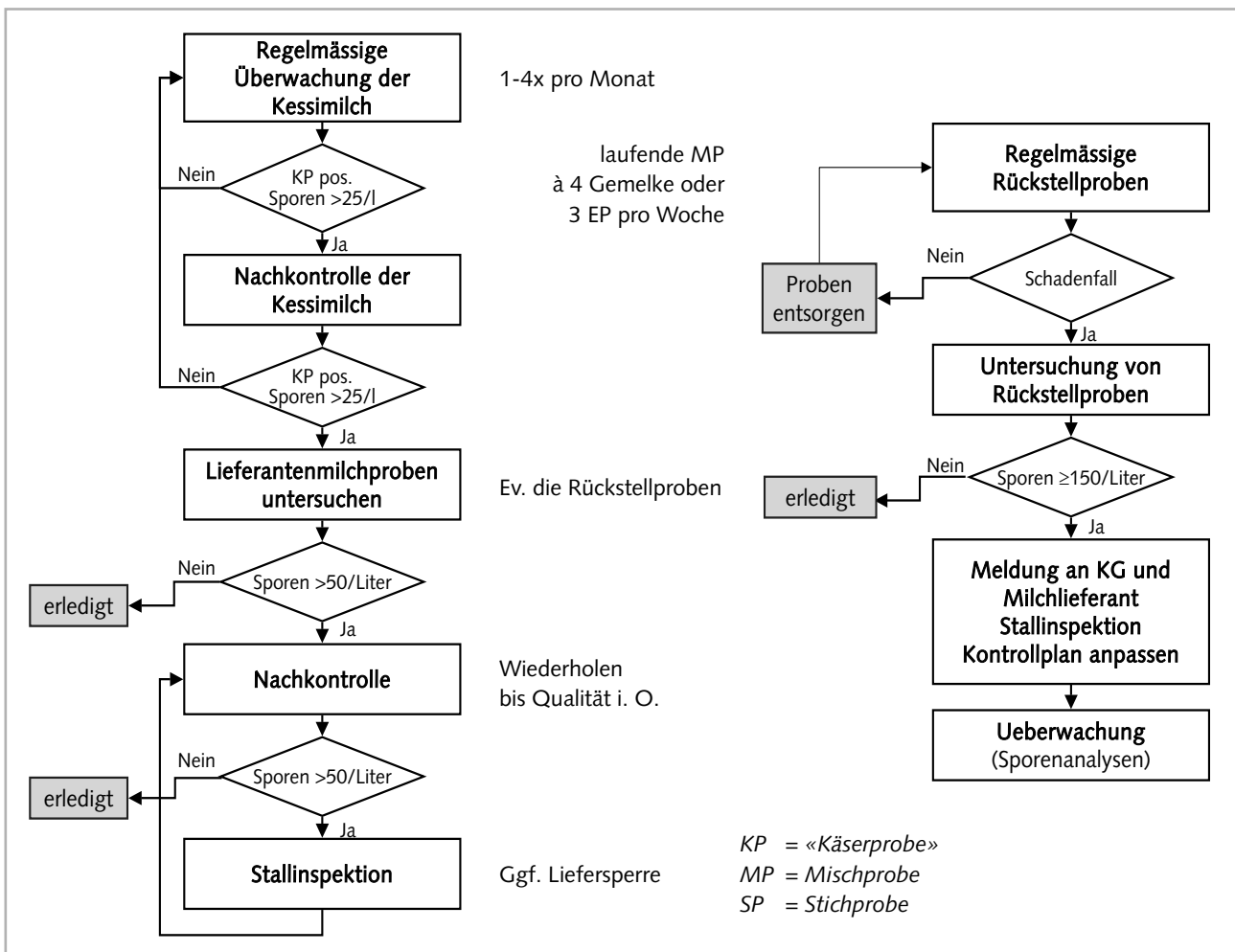


Abb. 8: Mögliches Vorgehen bei der Überwachung der Sporenbelastung der Käseemilch mittels laufender Analysen (links) und Rückstellproben (rechts).

## 7.5 Probennahme und Lagerung

Werden Mischproben angelegt, sollten diese erst eingefroren werden, wenn das letzte Gemelk hinzu gegeben worden ist. Wiederholtes Einfrieren/Auftauen ist zu vermeiden. Dies führt zu Ausflockungen in der Milch, welche die Sporenanalyse beeinträchtigen (schlechte Homogenität, Filtrierbarkeit).

Als Gefässe für Rückstellproben eignen sich:

- Saubere und desinfizierte **Polypropylenfläschchen** wie sie die Zuchtverbände bei der Milchleistungsprüfung verwenden. Die Fläschchen haben ein Nennvolumen von 50 ml, sind bruchstark und lassen sich problemlos einfrieren (nicht zu stark füllen!).
- Flüssigkeitsdichte **PE-Beutel** mit Drahtverschluss (z.B. Whirl-Pak® oder SteriBag®). Die Beutel kosten zwischen 20–30 Rp. pro Stück (auch als Stehbeutel erhältlich). Standardvolumina sind 60 und 120 ml.
- Beutel haben den Vorteil, dass die Reinigung entfällt (Einwegmaterial).  
Nachteil: Die Proben müssen – wenn flüssig – stehend gelagert und transportiert werden.



## 8 Stallinspektionen

Stallinspektionen werden heute weit weniger häufig durchgeführt als früher. Die insgesamt ausgezeichnete Milchqualität scheint dies zu rechtfertigen. Doch gerade im Hinblick auf Sporeninfektion der Milch sind sie ein unverzichtbares Instrument. Denn erfahrungsgemäss können Schwachstellen mittels Stallinspektionen rasch aufgedeckt und eliminiert werden. Dabei ist wichtig, das Gespräch mit dem Bauern zu suchen. Der Beizug des Melkberaters ist in vielen Fällen hilfreich. Die Inspektionen sollten zur Melkzeit erfolgen und in konkrete Vereinbarungen zwischen den Partnern münden.

## 9 Zusammenfassung

Die BSG ist anhand der freien Buttersäure im Käse zuverlässig nachzuweisen. Drei Monate gereifter Emmentaler mit Werten  $>1\text{mmol/kg}$  gärungsbedingter Buttersäure kann als BSG-Fall beurteilt werden. Der BSG-Erreger, *Cl. tyrobutyricum*, wird in den allermeisten Fällen mit der Rohmilch eingeschleppt. Die Verantwortung für BSG liegt aber nicht allein beim Milchlieferanten. Durch Aufklärung der Lieferanten, regelmässige Kontrollen der Kessmilch und der Lieferantenmilch und das Fassen von Rückstellproben kann der Käser viel zur Vermeidung von BSG beitragen. Regelmässige Sporenanalysen sind deshalb so wichtig, weil aufgrund der methodischen Streuungen und der Schwankungen in der Sporenbelastung der Milch erst wiederholte Analysen ein zuverlässiges Bild der Risikosituation ergeben. Ist eine solche gegeben, sind häufigere Untersuchungen angezeigt. Gezielte Stallinspektionen erlauben dann, die Schwachstellen in der Stall- und Melkhygiene zu eliminieren.

Auch hier gilt: Agieren statt reagieren!

## 10 Literatur

1. Anon. Buttersäurebakterien nehmen wieder überhand.  
*Alimenta* (2005) 1 (2), S. 21 2005.
2. Bachmann H.P.: Einflussfaktoren auf das Auskeimen und Wachstum von *Clostridium tyrobutyricum* in Hartkäse aus silofreier Milch.  
*Mitt.Lebensm.Hyg.* 90 (1) 62-72 (1999a)
3. Bachmann H.P.: Technologische Einflussfaktoren auf die Buttersäuregärung.  
*Agrarforschung*, 6 (4)137–140 (1999b)
4. Bühler, N.B. «Clostridien in Silage, Dung, Milch und Käse – Spätblähung im Käse»  
ETH Diss. Nr. 7770 (1985)
5. Kalzendorf Ch. Clostridien-Sporen in der Rohmilch. Ursachen und Massnahmen zur Vermeidung des Sporeneintrages.  
*Milchpraxis* 34 (1) 38–41 (1994)
6. Anon: Reglement über den Gebrauch der Garantiemarke SILOFREI vom 10.09.2001.  
FROMARTE Schwarztörstrasse 26, 3001 Bern
7. Bachmann H.P., Häni J.P. Drei Wege für die Bildung von n-Buttersäure.  
*Schweizerische Milchzeitung* 123 (21), 7 (1997)
8. Walter Schaeren, Jürg Maurer, Werner Luginbühl, Heinz Sollberger, Georges Bühlmann, Marius Col-lomb, Marc Dalla Torre.  
*ALP intern* 2004, Nr 37 (2004)
9. Guericke S. Laktatvergärende Clostridien bei der Käseherstellung.  
*Deutsche Milchwirtschaft.* 48, 735-739, (1993)
10. Klijn N, Nieuwenhof F.F.J., Hoolwerf J.D., Van der Waals C.B., Weerkamp A.H. Identification of *Clostridium tyrobutyricum* as the causative agent of late blowing in cheese by species-specific PCR Amplification.  
*Appl. Environ. Microbiol.* 61 (6) 2919-2924 (1995)
11. Anon: QM-Handbuch FROMARTE. Stand vom 1.10.2003.  
FROMARTE Schwarztörstrasse 26, 3001 Bern
12. Dalla Torre M., Berger T. Bestimmung der Anzahl Sporen von *C. tyrobutyricum* und Buttersäurebazillen in Milch. *ALP science* 2004, Nr. 474. Agroscope Liebefeld-Posieux, 3003 Bern. (2004).
13. Ewy A. Melkvorbereitung der Milchkuh. Merkblatt. UFA-Revue 5/03. (2003).  
Bezugsquelle: Rindergesundheitsdienst, Eschikon 28, 8315 Lindau



