

Auszählung von Buttersäure bildenden (käsereischädlicher) Clostridien - methodische Überlegungen

IDF Faktencheck 22/2022

Vorbereitet von den Experten des Ständigen Ausschusses für die Harmonisierung mikrobiologischer Methoden (SCHMM) - Action Team H26 über Überlegungen zu Methoden für die Sporenzählung von Buttersäure bildenden (käsereischädlicher) Clostridien.

Der Verderb von Käse ist ein bedeutendes Problem, insbesondere bei der Herstellung von Hart- und Schnittkäse. Der Verderb trägt zur Verschwendung in der Lebensmittelkette bei, verringert die Effizienz und verursacht schwere wirtschaftliche Verluste bei der Herstellung von Hartkäse.

Die Kosten für Schäden, welche durch käsereischädliche Clostridien verursacht werden, wurden von mehreren nationalen IDF-Komitees im Rahmen einer Umfrage zur Veröffentlichung eines IDF-Bulletins bestätigt. Dieses Bulletin beschäftigt sich mit den aktuell verfügbaren Methoden zur Auszählung von Buttersäure bildenden Clostridien.

Hintergrund

Der schwerwiegendste Fehler von Hart- und Schnittkäse, die so genannte Spätblähung, wird durch die unerwünschte mikrobielle Aktivität von Buttersäure produzierenden Clostridien während der Käsereifung verursacht. Diese anaeroben, endosporenbildenden Bakterien, vor allem die Spezies *Clostridium tyrobutyricum*, produzieren übermäßige Mengen an Gasen und organischen Säuren, die Blähungen, unerwünschte Löcher, Schlitze und Risse sowie ausgeprägte Fehlparfömen im Käse verursachen¹.

Das Auftreten von Spätblähungen wird bis zu einem gewissen Grad von technologischen Parametern wie Salzkonzentration, pH-Wert und Reifebedingungen beeinflusst. Der wichtigste Einfluss auf die Qualität von Hart- und Schnittkäse ist jedoch die Qualität der Rohmilch. Clostridien sporen werden hauptsächlich über das Futter aufgenommen und gelangen während des Melkens aus der Stallumgebung in die

Rohmilch; aufgrund ihrer thermoduren Eigenschaften werden sie durch Wärmebehandlungen wie Pasteurisierung nicht inhibiert. Daher ist es für Hersteller von Hart- und Schnittkäse von größter Bedeutung, den Kontaminationsgrad mit Clostridien sporen in der Milch, die für die Käseherstellung verwendet wird, zu kennen. Aus diesem Grund haben mehrere Länder den Nachweis und die Auszählung von Clostridien sporen in Milch in die routinemäßige Qualitätsbewertung von Rohmilch aufgenommen. Da es jedoch keine international standardisierten Nachweis- und Auszählungsmethoden gibt, wird derzeit eine Fülle unterschiedlicher Verfahren angewandt. In diesem Merkblatt werden die Merkmale der wichtigsten Verfahren dargestellt.

Die Methode der wahrscheinlichsten Anzahl (MPN) für den Nachweis und die Zählung von Clostridien sporen in Milch

Nur wenige oder sogar einzelne Clostridien sporen pro Liter Rohmilch können einen schweren Verderb von Hartkäse verursachen. Um solch niedrige Nachweis- und Quantifizierungsgrenzen zu erreichen, eignet sich ein Verfahren mit der wahrscheinlichsten Anzahl (MPN) (ISO 7218:2014)^{1,2}. Im Allgemeinen können die erforderlichen Nachweisgrenzen der MPN-Verfahren an die gesetzlichen Anforderungen und praktischen Erwägungen angepasst werden. Einer der wichtigsten Parameter in diesem Zusammenhang ist die untersuchte Probenmenge und die Anzahl der Replikate (Teströhrchen), da die Messunsicherheit mit einer höheren Anzahl von Teströhrchen abnimmt.

Für die Auszählung von Clostridien sind derzeit verschiedene MPN-Verfahren mit unterschiedlichen Medienformulierungen in Gebrauch. Ein Vergleich der gebräuchlichsten Verfahren ist in Tabelle 1 dargestellt.

Andere gebräuchliche Auszählungstechniken und molekulare Methoden

Eine auf der Koloniezahl basierende Auszählungstechnik ist die Membranfiltration, die hauptsächlich in der Schweiz verwendet wird⁷. Die Sporen von *Clostridium tyrobutyricum* werden nach Druckfiltration der pasteurisierten und vorbereiteten Rohmilchprobe auf einer Filtermembran und anaerober Inkubation für 3 Tage bei 37 °C in RCM (Reinforced Clostridal Medium) mit Cycloserin und Säurefuchsin quantifiziert⁸⁻¹². Diese Filtrationsmethode kann jedoch nicht automatisiert werden und ist weder für Büffel-, Schafs- oder Ziegenmilch noch für die Analyse von eingefrorenen Proben geeignet⁸.

Molekulare Methoden wie die quantitative PCR oder semiquantitative isothermale Amplifikationsverfahren (LAMP) ermöglichen den spezifischen Nachweis von *Clostridium tyrobutyricum*^{12,13}. Diese Methoden erreichen eine untere Nachweisgrenze von etwa 2.000 Sporen/Liter Milch. Aufgrund der Notwendigkeit des Nachweises von Sporenniveaus von bis zu 100 Sporen pro Liter oder sogar weniger, sind molekulare Methoden derzeit jedoch nicht geeignet, die Rohmilchqualität angemessen zu überwachen.

Qualitätsbasierte Rohmilchbezahlung

Die in Tabelle 1 beschriebenen MPN-Methoden werden in verschiedenen IDF-Mitgliedsländern verwendet, um einen zusätzlichen Parameter für die Qualitätsbezahlung von Milch zu erhalten. Da die Ergebnisse erheblich von der verwendeten Methode beeinflusst werden^{1,7,8}, ist es wichtig, dass die Sporenergebnisse sowie die für die Qualitätsbezahlung geltenden Grenzwerte im Zusammenhang mit der für die Untersuchung verwendeten Methode betrachtet werden.

Methodenname	Bryant and Burkey (CNERNA) ³	Niederländischer Standard	RCM Laktet	AMP-6000 Methode ⁶
		(NEN 6877) ⁴	(VDLUFA M7.18.3.1) ⁵	
Abkürzung	BB	NEN	RL	AMP
Medium	Byrant and Burker Brühe (mir Resazurin)	Milch-Glucose-Laktat Medium	Verstärkter Clostridienagar	Chromogenes AmpMedia 666
Untersuchungsgefäße	Reagenzglas	Reagenzglas	Reagenzglas	Mikrotiterplatte, Mikrotubes
Pausteurisation	75 °C, 10 Min.	80 °C, 10 Min. gefolgt von 44-47 °C, 15 Min.	75 °C, 10 Min.	80°C, 20 MIN
Anaerobiose	Paraffinstopfen	Paraffinstopfen	Paraffin- oder Agarstopfen	anaerober Behälter
Inkubation	37°C±1°C, 7 Tage	37°C±1°C, 96h±4h	37°C±1°C, 3 bis 5 Tage	37°C±1°C, 48h±4h
Auswertung	Gasbildung führt zum Anheben des Paraffinstopfen	Gasbildung führt zum Anheben des Paraffinstopfen	Gasbildung führt zum Anheben des Paraffinstopfen bzw. zum Bruch das Agars	Clostridienwachstum induziert Farbwechsel der Brühe von rot zu gelb
Automationsmöglichkeit	Probenvorbereitung und Beimpfung	Probenvorbereitung und Beimpfung	Probenvorbereitung und Beimpfung	Probenvorbereitung, Beimpfung und Ergebnisauswertung
Länder mit Akkreditierten Laboren für die jeweilige Methode	Frankreich, Schweiz	Niederlande, Deutschland	Deutschland	Österreich, Italien, Schweiz
Bemerkungen	<ul style="list-style-type: none"> Granuliertes oder pulverförmiges Medium verfügbar Keine Einstellung des pH-Wertes erforderlich Inkubation mit Paraffinüberzug Untersuchung geringer Anzahl an Replikaten im Routineprotokoll (große Konfidenzintervalle trotz großer Probe- und Mediumvolumen) Spezifität für <i>Clostridium spp.</i> 37%⁷ 	<ul style="list-style-type: none"> Preisgünstiges Medium pH-Wert muss eingestellt werden Inkubation mit Paraffinüberzug Anzahl der Replikate und Volumen im Routineprotokoll variabel Kurze Haltbarkeit des Mediums (24h für Milch-Glucose-Laktat-Lösung) Spezifität für <i>Clostridium spp.</i> 58%⁷ 	<ul style="list-style-type: none"> Granuliertes oder pulverförmiges Medium verfügbar pH-Wert muss eingestellt werden Inkubation mit Paraffinüberzug Untersuchung geringer Anzahl an Replikate im Routineprotokoll Schnelle Beimpfung erforderlich um Erstarren des Mediums zu verhindern Spezifität für <i>Clostridium spp.</i> 39%⁷ 	<ul style="list-style-type: none"> Gebrauchsfertiges Medium verfügbar Keine Einstellung des pH-Wertes erforderlich Strenge anaerobe Inkubation durch anaerobern Behälter Quantifizierung von Clostridien sporen über einen weiten Konzentrationsbereich Untersuchung hoher Zahl an Replikate im Routineprotokoll Einwegmaterial Hochspezifisch für <i>Clostridium spp.</i> >95%⁶

Tabelle 1: Merkmale der Auszählungsmethoden für Buttersäure produzierende Clostridien

Literatur

1. Brändle, J., Domig, K. J., & Kneifel, W. (2016). Relevance and analysis of butyric acid producing clostridia in milk and cheese. *Food Control*, 67, 96-113, <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.02.038>
2. ISO 7218:2014, Microbiology of food and animal feeding stuffs – General requirements and guidance for microbiological examinations (ISO 7218:2007 + Amd 1:2013)
3. CNERNA, 1986. Recommandations pour l'estimation de la contamination du lait en spores de Clostridia par la méthode de culture en milieu liquide. *Revue Laitière Française*, 451, 39–45
4. NEN 6877 (2020) Milk and milk products - Detection of spores of butyric acid bacteria and enumeration of spores of butyric acid bacteria by MPN technique, <https://www.nen.nl/en/nen6877-2020-nl-276199>
5. VDLUFA (Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten e.V.), M7.18.3.1 (1996) Bestimmung von Käseerschädlichen Clostridien. Verfahren mit pH-modifiziertem RCM Agar, info@vdlufa.eu
6. Brändle, J., Heinzle, L., Fraberger, V., Berta, J., Zitz, U., Schinkinger, M., Stocker, W., Kneifel, W., & Domig, K. J. (2018). Novel approach to enumerate clostridial endospores in milk. *Food Control*, 85, 318-326, <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.10.017>
7. Brändle, J., Fraberger, V., Schuller, K., Zitz, U., Kneifel, W. & Domig K.J. (2017). A critical assessment of four most probable number procedures for routine enumeration of cheese-damaging clostridia in milk. *International Dairy Journal* 73, 109-115, <http://dx.doi.org/10.1016/j.idairyj.2017.05.011>
8. Jakob, E. & Glauser, D. (2019). Comparaison de méthodes de quantification des bactéries butyriques dans le lait. *Recherche Agronomique Suisse* 10 (10): 388–395, https://www.agrar-forschungschweiz.ch/wp-content/uploads/pdf_archive/2019_10_f_2503.pdf
9. Bourgeois, C.M., Le Parc, O., Abgrall, B., Cleret, J.-J. (1984) Membrane Filtration of milk for counting spores of Clostridium tyrobutyricum. *Journal of Dairy Science*, 67, 2493-2499
10. Jakob, E. (2011) Analytik rund um die Buttersäuregärung. ALP Forum Nr. 85
11. ALP-Methodenvorgabe (2011) „Quantitative Bestimmung käseschädlicher anaerober Sporen in Milch und Wasser – Membranfiltertechnik mit Selektivmedium“ vom 14.12.2011 1
12. Arnaboldi, S., Benevenia, R., Bertasi, B., Mangeri, L., Tilola, M., Bassi, D.; Cocconcelli, P.S., Stroppa A. & Varisco, G. (2021). Validation of a real-time PCR method on pta gene for Clostridium tyrobutyricum quantification in milk. *Food Control*, 130 (2021) 108250, <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108250>
13. Cecere, P., Gatto, F., Cortimiglia, C., Bassi, D., Lucchini, F., Cocconcelli, P.S., & Pompa, P.P. (2021). Colorimetric Point-of-Care Detection of Clostridium tyrobutyricum Spores in Milk Samples. *Biosensors* 2021, 11, 293, <https://doi.org/10.3390/bios11090293>

Quelle: IDF Factsheet 22/2022

“Enumeration of butyric acid forming (cheese spoiling) clostridia – methodical considerations”