

Vermeidung von persistenten Kontaminationen in Melkanlagen

Jürg Maurer, Daniel Wechsler, Stefan Irmeler und Thomas Berger
 Agroscope, 3003 Bern, Schweiz

Auskünfte: Jürg Maurer, E-Mail: juerg.maurer@agroscope.admin.ch



Sehr gepflegte und optisch saubere Melkanlagen können mit *Lactobacillus parabuchneri* und Propionsäurebakterien persistent kontaminiert sein. (Foto: Jürg Maurer, Agroscope)

Einleitung

Propionsäurebakterien (PSB) und *Lactobacillus parabuchneri* (*L. parabuchneri*) verursachen immer wieder gravierende Käsefehler und können bei Kontaminationen mit *L. parabuchneri* auch zu gesundheitlichen Problemen führen. Der Marktwert der Produkte wird damit stark herabgesetzt. Diese Keime gelangen in der Regel über kontaminierte Lieferantenmilch in den Verarbeitungsprozess und werden wegen ihrer Hitzeresistenz bei der Herstellung von Halbhart- und einiger Hartkäse aus Rohmilch nicht abgetötet. Beide Keime können sich im reifenden Käse vermehren und führen zu einer übermässigen Bildung von CO₂, Aromafehlern und bei

L. parabuchneri zur Bildung gesundheitsschädlicher biogener Amine, vor allem Histamin. Kontaminierte Käse weisen oft eine sortenuntypische Lochung auf oder haben gar Risse im Teig (Abb. 1 und 2).

PSB bilden aus Milchsäure Propionsäure, die dem Käse ein süssliches Aroma verleiht. Bekanntester Vertreter der PSB ist die Spezies *Propionibacterium freudenreichii*, die bei der Herstellung von Emmentaler als Lochbildungs- und Aromakultur zugesetzt wird. Bei anderen Sorten wie z.B. Appenzeller, Raclette oder Gruyère ist die Bildung von Propionsäure aber unerwünscht, da Käse durch das Wachstum der PSB ein sortenuntypisches Aroma und oftmals auch eine untypische Lochung oder braune Tupfen aufweisen.

L. parabuchneri ist bekannt für die Bildung von Histamin. Histamin ist ein Abbauprodukt der Aminosäure Histidin. Käse, die stark mit Histamin belastet sind, werden im Mund als pikant und brennend wahrgenommen, da Histamin die Mundschleimhäute reizt. Viele Konsumenten empfinden solche Käse als unangenehm und konsumieren sie nicht. Bei etwa einem Prozent der Bevölkerung führt der Konsum Histamin-haltiger Lebensmittel sogar zu pseudoallergischen Reaktionen mit Symptomen wie Durchfall, Unwohlsein, Hautrötungen und Übelkeit. Um Kontaminationen mit PSB und *L. parabuchneri* in Melkanlagen und somit in der Milch zu vermeiden, wurden bei Agroscope Liebfeld zuverlässige und schnelle Methoden für den Nachweis dieser unerwünschten Keime entwickelt. Diese Methoden erleichtern es, auf betroffenen Milchproduktionsbetrieben die Kontaminationsquellen zu lokalisieren und Empfehlungen zur Vermeidung dauerhafter Kontaminationen zu erarbeiten.

Vorkommen und Nachweis von Propionsäurebakterien

PSB finden sich in der Pansenflora von Wiederkäuern, in deren Fäkalien und auch in Silagen. Über die Stallumgebung gelangen die Keime in Melkanlagen, wo sie sich unter günstigen Bedingungen einnisten und persistieren können. In Milch und Milchprodukten werden typischerweise vier verschiedene Arten von PSB gefun-

den. Es sind dies *Propionibacterium freudenreichii*, *Propionibacterium thoenii*, *Propionibacterium jensenii* und *Propionibacterium acidipropionici*. Von diesen vier Arten weist *Propionibacterium freudenreichii* die höchste Hitzeresistenz auf, weshalb dieser Spezies eine besondere Bedeutung zukommt. In hochgebrannten Käsesorten wie Sbrinz und Gruyère, bei deren Herstellung der Käsebruch über mehrere Minuten auf Temperaturen von 56–57 °C erwärmt wird, werden unerwünschte Propionsäuregärungen ausschliesslich durch *Propionibacterium freudenreichii* verursacht (Turgay et al. 2018).

Der klassische Nachweis von PSB erfolgt auf Agarplatten und dauert ca. sieben bis zehn Tage. Die milchwirtschaftlichen Labors in der Schweiz verwenden für Untersuchung von Rohmilch den Laktat-Agar bestehend aus je 30g Caseinpepton und Hefepepton, 15 g Natriumlactat und 12g Agar pro Liter Medium. Die beimpften Platten werden anaerob bei 30 °C während sieben bis zehn Tagen bebrütet. Typische Kolonien (erhaben, beige bis rötlich) werden dann gezählt. Die Koloniefarbe erlaubt keine sichere Differenzierung der oben genannten PSB-Arten.

In den letzten Jahren wurden neue molekularbiologische Methoden basierend auf quantitativer Polymerasekettenreaktion (qPCR) entwickelt (Turgay et al. 2016), die eine schnellere Bestimmung in ein bis zwei Arbeitstagen ermöglichen. Der Vorteil dieser qPCR-basierten Methoden besteht darin, dass damit die vier in Rohmilch vorkommenden Propionsäurearten spezifisch und quantitativ nachgewiesen werden können. Weiter wurde ein



Abb. 1 | Raclettekäse mit fehlerhafter Lochung verursacht durch eine Propionsäuregärung (Propionsäuregehalt: 38 mmol/kg).



Abb. 2 | Deklassierter Emmentaler mit Rissen und brennendem Geschmack als Folge der Bildung von Histamin durch *L. parabuchneri* (Histamingehalt: 485 mg/kg).

Zusammenfassung

Persistente Kontaminationen mit Propionsäurebakterien und *Lactobacillus parabuchneri* in Melkanlagen haben immer wieder finanzielle Schäden in der Käseverarbeitung zur Folge. Histamin im Käse, verursacht durch *Lactobacillus parabuchneri*, kann ausserdem auch die Gesundheit der Konsumentinnen und Konsumenten beeinträchtigen. Um diese Keime rasch und sicher, sowohl in der Ablieferungsmilch, wie auch in den Melkanlagen und Milchtanks nachweisen zu können, wurden biochemische und molekularbiologische Methoden entwickelt und in der Praxis eingeführt. Durch Abklärungen auf den Milchproduktionsbetrieben und Beprobungen verschiedener Melkanlageteile konnten heikle Stellen sowie die häufigsten Ursachen für persistente Kontaminationen nachgewiesen und behoben werden. Somit stehen Mittel und Informationen zur Verfügung, um Milchproduktionsbetrieben rasch und nachhaltig helfen zu können.

qPCR-basiertes Nachweissystem entwickelt, mit dem die drei Arten *Propionibacterium thoenii*, *Propionibacterium jensenii* und *Propionibacterium acidipropionici* gemeinsam erfasst werden können. Zusammen mit dem speziesspezifischen Nachweis von *Propionibacterium freudenreichii* kann so eine Differenzierung zwischen hitzeresistenten und weniger hitzeresistenten PSB vorgenommen werden.

Wie die Abbildung 3 zeigt, ist die Übereinstimmung der qPCR-Methode für *Propionibacterium freudenreichii* mit der Koloniezählmethode ab einer Keimzahl von 10–50 KBE/ml relativ gut, obwohl sich die beiden Methoden bezüglich der Selektivität unterscheiden. Die untere Bestimmungsgrenze der qPCR-Methode liegt bei 50 Genäquivalenten (GE; entspricht theoretisch der Anzahl lebender und toter Zellen) pro ml Milch.

Mit der qPCR-Methode steht ein Werkzeug zur Verfügung, das eine selektive und zuverlässige Erfassung der für die Käsefehler hauptverantwortlichen Art *P. freudenreichii* in Rohmilchproben erlaubt. Der Nachweis von PSB mit den neu entwickelten qPCR Methoden bietet im Vergleich zur klassischen Methodik vor allem bei der Untersuchung von Lieferantenmilchproben Vorteile. Neben der Spezifität ist insbesondere auch die wesentlich kürzere Analysendauer hervorzuheben. Gesperrte Milchlieferanten können nach einer erfolgreichen Loka-

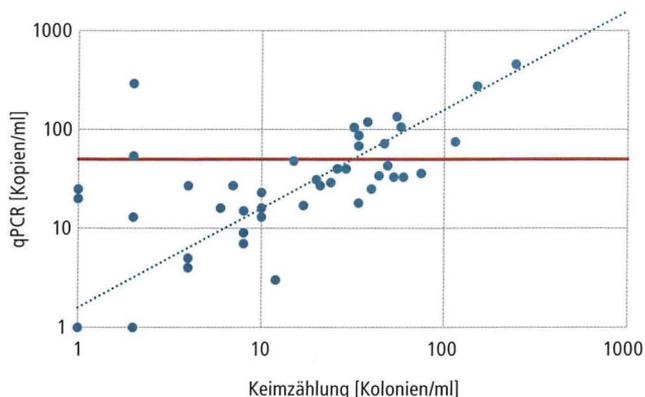


Abb. 3 | Vergleich der Koloniezählmethode und der qPCR-Methode für PSB anhand von Kessmilchproben aus Hartkäsebetrieben. Die rote Linie markiert die untere Bestimmungsgrenze der qPCR-Methode (Bestimmungsgrenze = 50 GE/ml). Für die Koloniezählung wurden 0,5 ml Milch auf 5 Platten verteilt. Drei Ergebnisse mit < 2 KbE/ml wurden als 1 KbE/ml berücksichtigt.

lisation und Entfernung der Kontaminationsquelle ihre Milch schneller wieder in die Käserei liefern. Problematisch bleibt der Umstand, dass PSB auch in Konzentrationen unterhalb der unteren Bestimmungsgrenze zu Fehlgärungen in Käse führen können. Der Nachweis von PSB in Mischmilchen wie z.B. Kessmilchproben bietet im Falle von negativen Befunden keine absolute Sicherheit vor Fehlgärungen. Dies trifft sowohl für den Nachweis mit der klassischen mikrobiologischen Methode als auch für den qPCR-basierten Nachweis zu. Die regelmässige Kontrolle von Lieferantmilchen ist somit die wichtigste Massnahme zur Vorbeugung von Propionsäuregärungen in Käse.

Vorkommen und Nachweis von *L. parabuchneri*

L. parabuchneri zählt zur Gattung der Milchsäurebakterien und wurde in Humanspeichel, Käse, Bier und Silage nachgewiesen. Auch in Birtreber wurde *L. parabuchneri* nachgewiesen. Gelangt der Keim in Melkanlagen mit Ablagerungen, kann er dort persistieren. In den letzten Jahren wurden neue biochemische und molekularbiologische Methoden entwickelt, mit denen Kontaminationen von *L. parabuchneri* in Rohmilch und Käse nachweisbar sind (Berthoud *et al.* 2017). Die Schadschwelle von *L. parabuchneri* in Käsereimilch ist sehr tief. Selbst bei Keimzahlen unterhalb der Bestimmungsgrenze von ca. 50 Keimen pro ml muss mit Schäden im Käse gerechnet werden. In Histamin-haltigen Käsen ist *L. parabuchneri* typischerweise in einer Konzentration von 10^5 – 10^7 GE/g Käse vorzufinden und somit sehr einfach mittels qPCR nachweisbar.

Für die Untersuchung von Milchproben auf die Präsenz von Histamin-bildenden Keimen wird in der Praxis aus Kostengründen ein indirektes Nachweisverfahren angewendet, bei dem die Bildung von Histamin mit einem enzymatischen Test nachgewiesen wird. Die Milchproben werden vor der Analyse während vier bis sieben Tagen in einem Medium mit Zusatz von Histidin bebrütet. Der Nachweis von Histamin erfolgt über die Bildung eines orangen Farbstoffs, der bei 470nm photometrisch bestimmt wird (Abb. 4). In einer Praxisstudie von Ascone *et al.* (2017) konnte in 97 % der Rohmilchproben, in denen eine Histaminbildung nachweisbar war, die Präsenz von *L. parabuchneri* mittels qPCR bestätigt werden. Praxiserfahrungen zeigen, dass es Käsereien gibt, deren Käse dauerhaft einen erhöhten Gehalt an Histamin

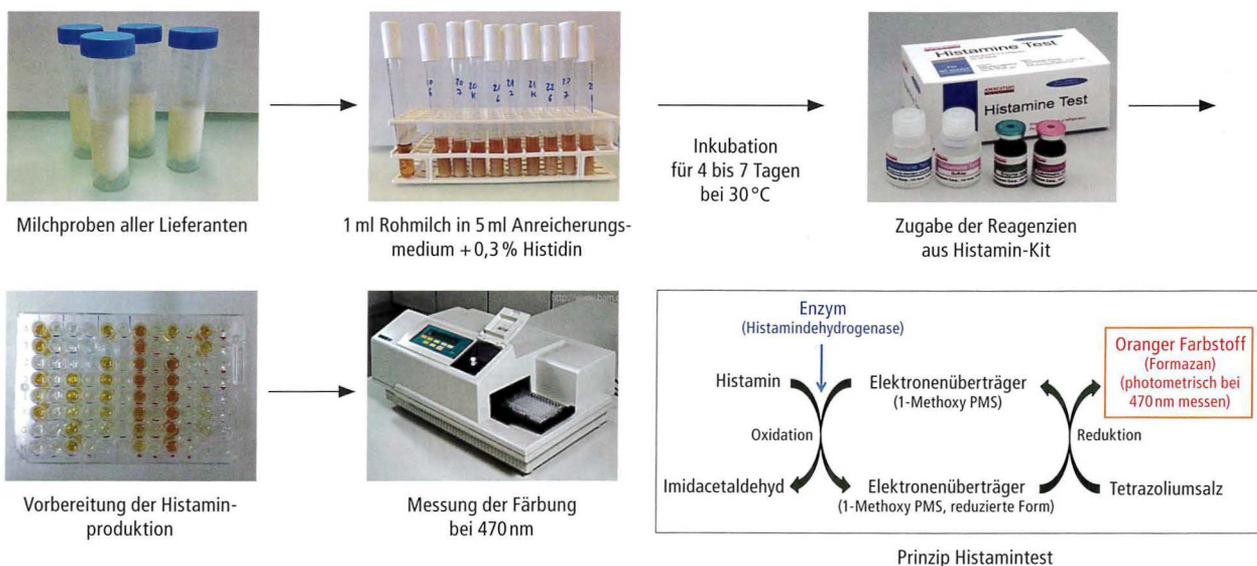


Abb. 4 | Enzymatische Methode für den Nachweis von Histamin-bildenden Keimen.

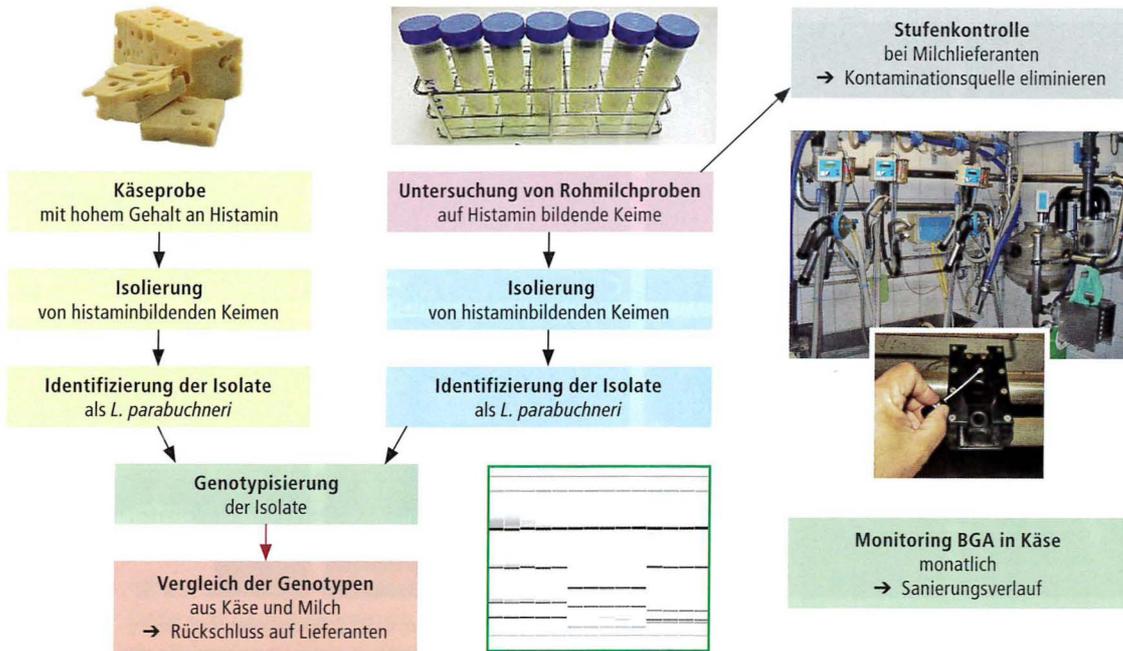


Abb. 5 | Vorgehensweise bei Problemetrieben.

aufweisen. In solchen Situationen werden, nachdem anhand von Stufenkontrollen Kontaminationen mit *L. parabuchneri* in der Käseerei ausgeschlossen werden können, wiederholt Milchproben aller Lieferanten auf die Präsenz von Histamin-bildenden Keimen untersucht, um jene Milchlieferanten zu identifizieren, deren Milch mit *L. parabuchneri* kontaminiert ist.

Die Genotypisierung der Isolate von *L. parabuchneri* ermöglicht es, einen kausalen Zusammenhang zwischen kontaminierten Lieferantenmilchproben und der Bildung von Histamin im Käse aufzuzeigen. Dazu wird nach dem in Abbildung 5 dargestellten Schema vorgegangen: Im ersten Schritt wird versucht, aus kontaminierten Käse- und Lieferantenmilchproben Histamin-bildende Keime zu isolieren. Die Isolate können vor der

Genotypisierung mit Hilfe der speziesspezifischen qPCR als *L. parabuchneri* identifiziert werden. Für die Genotypisierung der gewonnenen Isolate wird eine von Berthoud *et al.* (2017) entwickelte Methode angewendet. Der Vergleich der Genotypen aus Käse und Milchproben ermöglicht Rückschlüsse auf den beziehungsweise die problemverursachenden Milchlieferanten.

Die Genotypisierung der Isolate von *L. parabuchneri* liefert auch bei der Lokalisierung von Kontaminationsquellen auf Milchproduzentenbetrieben wertvolle Hinweise. Durch den Vergleich der jeweiligen Bandenmuster von Milchproben mit Tupferproben von kontaminierten Anlageteilen, kann die Ursache für Probleme genau lokalisiert werden (Abb. 6).

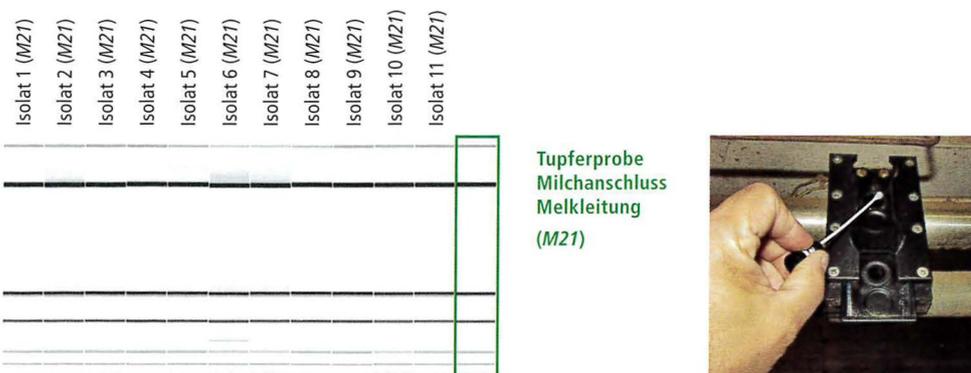


Abb. 6 | Vergleich der Genotypen von Isolaten aus einer Lieferantenmilch und einer Tupferprobe.

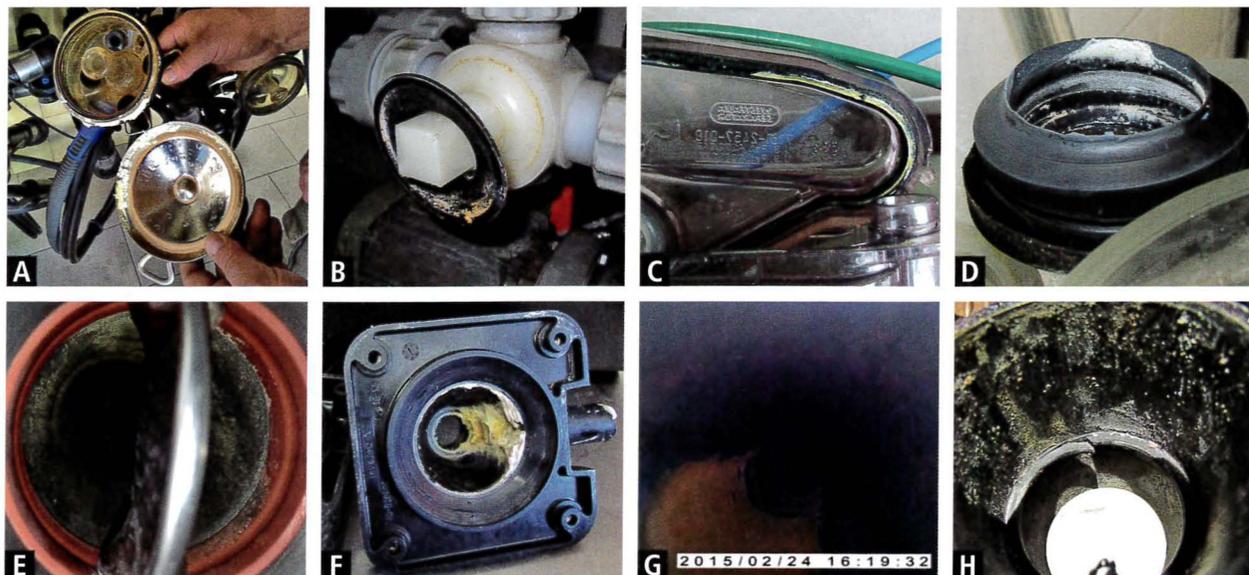


Abb. 7 | Ablagerungen und Rückstände in Anlageteilen. A: im Sammelstück; B: am Dreiweghahn; C: im Milchmengenmessgerät; D: in der Gummidichtung der Endeinheit; E: im Klappenventil des Milchtanks; F: im Luftinjektor; G: in der Milchleitung; H: Defekte Dichtung aus der Milchleitung.

Ursachen für persistente Kontaminationen in den Anlagen

Tiefe Gesamtkeimzahlen in der Ablieferungsmilch sind kein Garant, dass keine persistente Kontamination mit *L. parabuchneri* oder mit PSB in der Melkanlage oder im Milchsammeltank vorliegt. Persistente Kontaminationen in Melkanlagen sind meist auf eine der folgenden Ursachen zurückzuführen:

- zu tiefe Reinigungstemperaturen
- zu kurze Reinigungsdauer
- zu tiefe Dosierung des Reinigungsmittels oder Verwendung ungeeigneter Reinigungsmittel
- ungenügende Reinigung von heiklen Anlagenteilen bei der automatischen Reinigung der Melkanlage
- fehlende visuelle Kontrolle der Sauberkeit von Melkanlagen nach der Reinigung
- ungenügende Wartung von Melkanlagen (defekte Dichtungen, spröde Gummiteile, alte Schläuche etc.)
- mangelhafter Service von Melkanlagen
- fehlerhafte Installation von Melkanlagen
- fehlerhaft montierte Briden bei Schlauchanschlüssen
- ungenügende Reinigung des Milchsammeltanks
- verschmutzte Dichtungen im Milchsammeltank (Dichtung Rührwerk, Ventildichtung).

Die Ursachen für eine persistente Kontamination in der Melkanlage oder im Milchsammeltank mit *L. parabuchneri* und PSB sind vielfältig und können nur vor Ort auf

dem jeweiligen Betrieb durch zeitaufwändige visuelle Kontrolle der Anlagenteile eruiert werden. Dies bedingt, dass viele Anlagenteile demontiert, von Hand gereinigt oder ersetzt werden müssen. Teilweise müssen auch Änderungen an der Installation oder am Reinigungsablauf vorgenommen werden. Die Abbildung 7 A–H zeigt visuelle Ablagerungen in Anlagenteilen, die Ursache für persistente Kontaminationen waren.

Schlussfolgerungen

Die bei Agroscope neu entwickelten biochemischen und molekularbiologischen Methoden für den Nachweis von käseschädlichen Keimen wie PSB und *L. parabuchneri* haben sich in der Praxis bewährt.

Durch regelmässige Kontrollen der Lieferantenmilch können Kontaminationen mit unerwünschten Keimen frühzeitig erkannt und Qualitätseinbussen beim Käse vermieden werden. Wenn Histamin-bildende Keime oder PSB in der Lieferantenmilch nachgewiesen werden, müssen die Ursachen auf dem betroffenen Betrieb durch die regionale Beratung unter Mithilfe von Agroscope gesucht und eliminiert werden.

Mit den zur Verfügung stehenden Nachweismethoden und den erworbenen Kenntnissen zu den Ursachen für persistente Kontaminationen in Melkanlagen und Milchlagertanks kann den betroffenen Milchproduktionsbetrieben und Käsereien rasch und nachhaltig geholfen werden. ■

Riassunto

Evitare le contaminazioni persistenti di batteri propionici e *Lactobacillus parabuchneri* negli impianti di mungitura

Le contaminazioni persistenti di batteri propionici e *Lactobacillus parabuchneri* negli impianti di mungitura provocano spesso perdite economiche nella produzione del formaggio. L'istamina nel formaggio, causata da *Lactobacillus parabuchneri*, può inoltre compromettere la salute dei consumatori. Per poter rilevare questi germi in modo rapido e sicuro, sia nel latte di consegna che negli impianti di mungitura e nei serbatoi di latte, sono stati sviluppati e introdotti nella pratica diversi metodi biochimici e di biologia molecolare. Grazie a indagini nelle aziende di produzione del latte e al campionamento di diverse parti degli impianti di mungitura è stato possibile individuare ed eliminare le aree sensibili e le cause più frequenti di contaminazione persistente. Pertanto sono ora disponibili risorse e informazioni per aiutare in modo rapido e sostenibile le aziende di produzione del latte.

Summary

Avoiding persistent contamination with propionic acid bacteria and *Lactobacillus parabuchneri* in milking systems

Persistent contaminations with propionic acid bacteria and *Lactobacillus parabuchneri* in milking systems have repeatedly resulted in financial losses in cheese processing. Moreover, histamine in the cheese, caused by *Lactobacillus parabuchneri*, can also affect consumer health. Biochemical and molecular biological methods have been developed and introduced into practice to enable the quick and reliable identification of these bacteria both in delivered milk as well as in milking systems and milk tanks. By investigating the milk production facilities and sampling various milking system components, sensitive areas as well as the most frequent causes of persistent contamination were successfully identified and eliminated. Means and information are therefore available to help milk-producing farms quickly and sustainably.

Key words: persistent contaminations, propionic acid bacteria, milking systems, biological methods.

Literatur

- Berthoud H., Wüthrich D., Bruggmann R., Wechsler D., Fröhlich-Wyder M.-T. & Irmiler S., 2017. Development of new methods for the quantitative detection and typing of *Lactobacillus parabuchneri* in dairy products. *International Dairy Journal* 70, 65–71.
- Ascone P., Maurer J., Haldemann J., Irmiler S., Berthoud H., Portmann R. & Fröhlich-Wyder M.-T., Wechsler D., 2017. Prevalence and diversity of histamine-forming *Lactobacillus parabuchneri* strains in raw milk and cheese a case study. *International Dairy Journal* 70, 26–33.
- Turgay M., Schaeren W., Wechsler D., Bütikofer U. & Graber H.U., 2016. Fast detection and quantification of four dairy propionic acid bacteria in milk samples using real-time quantitative polymerase chain reaction. *International Dairy Journal* 61, 37–43.
- Turgay M., Schaeren W., Graber H.U., Wagner E., Amrein R., Bütikofer U. & Wechsler D., 2018. A field study investigating the effectiveness of vat milk controls by qPCR for the prevention of undesired propionic acid fermentation in Sbrinz PDO cheese. *International Dairy Journal* 77, 80–88.
- Maurer J., Haldemann J., Ascone P. & Wechsler D., 2016. Empfehlungen für Produzenten von Käseemilch zur Vermeidung von Infektionen in Melkanlagen mit Propionsäurebakterien und *Lactobacillus parabuchneri*. *Agroscope Merkblatt*, 1/2016.