

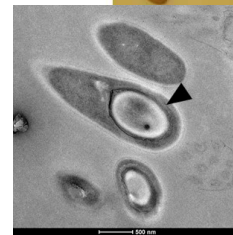
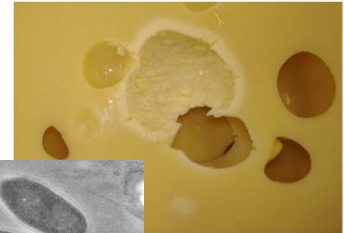
Neue Spezies von proteolytischen Clostridien (*Cl. putrificus* im Emmentaler)

Hitzeresistente Propionsäurebakterien

Emmanuelle Arias

Wintertagung 21.02.2025

www.agroscope.ch | gutes Essen, gesunde Umwelt



Übersicht

1. Teil: Analytik rund um die Buttersäuregärung
2. Teil: Putrifikus - Beschreibung der neuen Spezies
3. Teil: Putrifikus - Nachweis in der Milch
4. Teil: Hitzeresistente Propionsäurebakterien



Teil 1: Analytik rund um die Buttersäuregärung

3



Käseschädliche Sporenbildner

Woher kommen sie?

- Boden, See- und Flusswasser
- Vermehren sich überall dort wo anaerobe Bedingungen, Feuchtigkeit und organische Substanz vorhanden sind:
 - **Silage**, gärende Futtermittel
 - Mist- und Komposthaufen
 - Morastige Stellen
 - Nasse Stellen unter Liegeflächen
 - Schmutzige Tränken

4



Belastung der Milch mit Sporen

Einflussfaktoren:

- Verunreinigung des Futters mit Erde, Staub
 - Witterung (Nässe, Trockenheit!)
 - Jahreszeit
- Bodentopografie (Unebenheit)
- Erntetechnik
 - Maschinen: Typ Mäher, Wender, Ladewagen
 - Schnitthöhe (bis zu 10x höhere Sporenzahl wenn Schnitthöhe 7 cm statt 10 cm)
- Menge Hofdünger & andere potentiell sporenhaltige organ. Dünger
- Stallhygiene
- Zitzenreinigung

Putrifikus - Hitze resistente Propionsäurebakterien
Wintertagung 2025

5



Käseschädliche Sporenbildner

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

Proteolytische Arten = Putrifikus

- 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**

Putrifikus - Hitze resistente Propionsäurebakterien
Wintertagung 2025

6

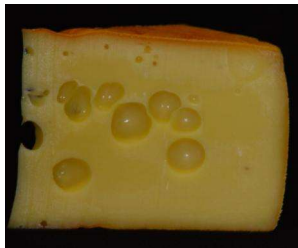


Käseschädliche Sporenbildner



C. butyricum verursachte Lochung

- Stopp der Fehlgärung wegen Verbrauch des Restzuckers
- Rückbildung der festgestellten leichte Blähung während der Reifung
- Tiefe Buttersäuregehalte (selten > 1.5 mmol/kg)



C. tyrobutyricum verursachte Lochung

- Abbau von Milchsäure zu Buttersäure, CO₂, H₂
- Ab 3 Wochen durch Blähung sichtbar
- Hohe Buttersäuregehalte (> 3 mmol/kg)
- 5 mmol/kg Bs = je 220 cm³ CO₂ und H₂



Putrifikus - Hitzeresistente Propionsäurebakterien
Wintertagung 2025

7

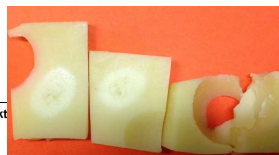


Käseschädliche Sporenbildner



Putrifikus (5 Mt)

- Zersetzt den Käseteig durch Fäulnis
- Verstoffwechselt Aminosäuren und bildet überriechende Stoffe
- Erhöhte Werte aller flüchtigen Carbonsäuren
- **Gefürchtet beim Emmentaler wegen optimaleren Wachstumsbedingungen** pH ↑ NaCl ↓ ReifeT ↑



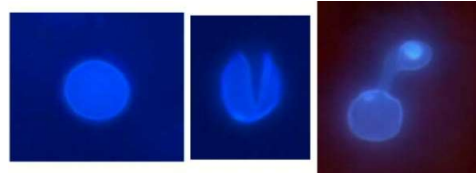
8



GHP in der Fabrikation gegen Clostriden

➤ Keine oder tiefe Sporenbelastung der Milch

- Kein Milch- oder Bruchanbrennen im Fertiger
- Kulturen-Schüttmenge mind. 2‰
- Genügend Laktobazillen schütten
- Wasserzusatz gesamt $\leq 18\%$
- Laibgewicht < 100 kg
- Brenntemperatur $\leq 53^\circ\text{C}$ (Thermometerkontrolle)
- Abfülltemperatur eher im unteren Normbereich
- **Gute Milchsäuregärung** (Sonde 2h 10 – 12 °SH, **pH 1 Tag ≤ 5.25** , GMS **> 120 mmol/kg**)
- Gärraumtemperatur $< 23^\circ\text{C}$



Prutrifikus - Hitzeresistente Propionsäurebakterien
Wintertagung 2025

9



Eckdaten für Emmentaler beim Auspacken (ca. 20h)

Temperatur im Käse

Flachseite 1 cm uN $> 31^\circ\text{C}$

Laibzentrum $< 43^\circ\text{C}$

pH-Wert Järbseite (Messung auf Platz)

Mitte $> 5.15 - < 5.25$

pH-Differenz unten + oben $< 0,1$

Milchsäure

GMS 120 – 130 (Anteil L+ 45 - 50 %)



Prutrifikus - Hitzeresistente Propionsäurebakterien
Wintertagung 2025

10



IB 162 / 1986

Die zahlreichen Ergebnisse dieses Fabrikationsversuches ermöglichen folglich einige Hinweise zur Lösung der Frage nach den Ursachen für das Aufkommen des Käsefehlers Putrificus. Aus dem Vergleich der Kontrollkäse mit den Käsen der einzelnen Versuchsvarianten müssen folgende Parameter als Putrifikus-fördernd bezeichnet werden:

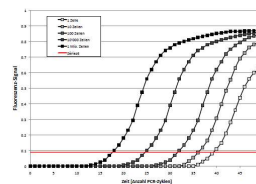
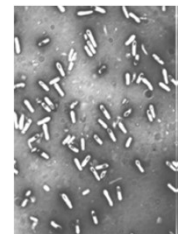
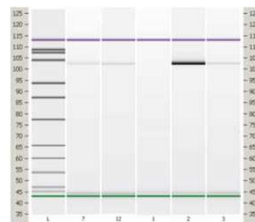
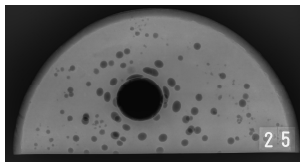
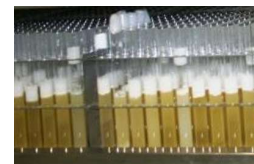
- grosser Wasserzusatz
- erhöhte Brenn- und Ausziehtemperatur
- tieferer Milchsäuregehalt im Käse nach 24 Stunden
- höherer Wassergehalt im Käse nach 24 Stunden
- höherer pH-Wert im Käse nach 24 Stunden
- früherer Lochbildungsbeginn
- kürzere Lochbildungsdauer
- höherer pH-Wert im Verlaufe der Reifung
- kleinerer Gehalt flüchtiger Fettsäuren
- schwächerer Eiweissabbau
- tieferer Kochsalzgehalt

Putrificus - Hitzeresistente Propionsäurebakterien
Wintertagung 2025

11



Analytik rund um die Buttersäuregärung



Putrificus - Hitzeresistente Propionsäurebakterien
Wintertagung 2025

12



Vergleich von Methoden zur Bestimmung von Buttersäure-sporen in Milch

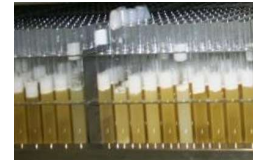
SY-Lab



Filtrationsmethode



MPN-Methode

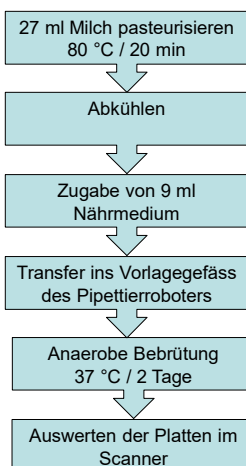


Prutrifikus - Hitzeresistente Propionsäurebakterien
Wintertagung 2025

13



Methode SY-Lab

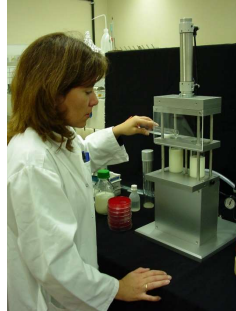
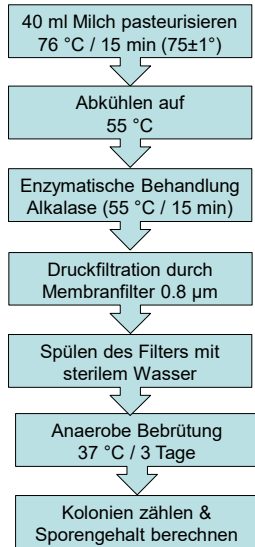


Modifiziertes Test-Format: 96 x 0.24 ml Milch

Prutrifikus - Hitzeresistente Propionsäurebakterien
Wintertagung 2025

14

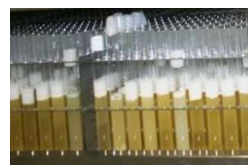
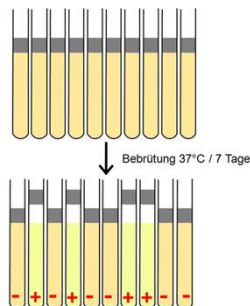
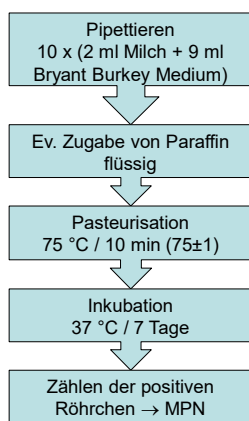
🇨🇭 Filtrationsmethode nach Bourgeois



Prutrifikus - Hitzeresistente Propionsäurebakterien
Wintertagung 2025

15

🇨🇭 MPN-Methode nach CNERNA mod.



53
110
180
260
350
460
...
1200

Prutrifikus - Hitzeresistente Propionsäurebakterien
Wintertagung 2025

16

Testformate

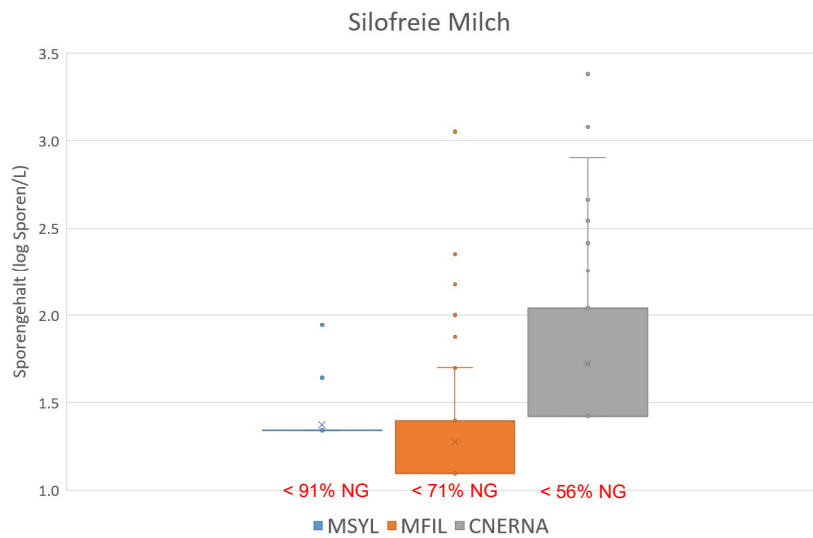
Methoden	Silomilch Sammelwagen (N = 93)	Silomilch Einzellieferanten (N = 107)	Silofreie Milch Einzellieferanten (N = 110)
SY-LAB AMP-6000	96 x 240 µl [NG = 44] [oBG = 19'000]	96 x 240 µl [NG = 44] [oBG = 19'000]	96 x 240 µl [NG = 44] [oBG = 19'000]
Filtrations- methode	40 ml [NG = 25] [oBG = 1'250]	20 ml [NG = 50] [oBG = 2'500]	40 ml [NG = 25] [oBG = 1'250]
MPN-Methode (CNERNA)	5 x 1 ml + 5 x 0.1 ml [NG = 180] [oBG = 16'000]	5 x 1 ml + 5 x 0.1 ml [NG = 180] [oBG = 16'000]	10 x 2 ml [NG = 53] [oBG = 1'200]

Prutrifikus - Hitzeresistente Propionsäurebakterien
Wintertagung 2025

17

17

Vergleich silofreie Milch (Einzellieferanten)

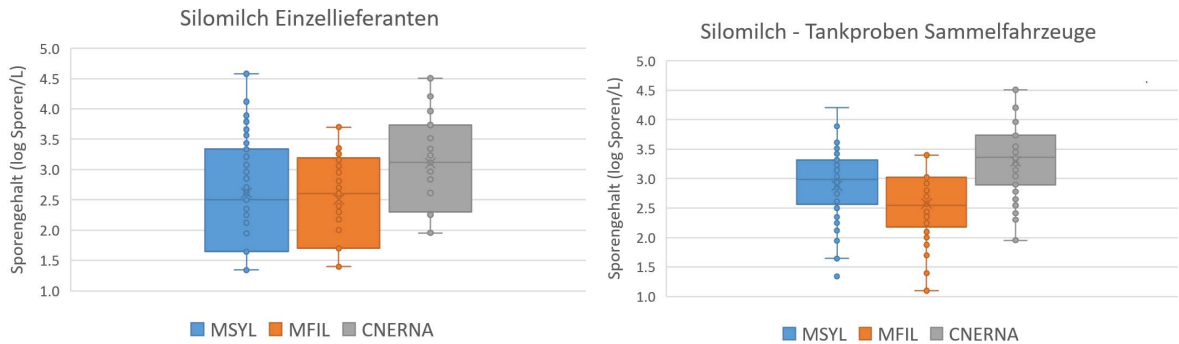


Prutrifikus - Hitzeresistente Propionsäurebakterien
Wintertagung 2025

18

18

Vergleich Silomilch



Prutrifikus - Hitzeresistente Propionsäurebakterien
Wintertagung 2025

19

Schlussfolgerung aus dem Methodenvergleich

- SY-Lab-Methode ist ein interessanter Ansatz für die Sporenanalytik
- Vereint Vorteile von MPN-Verfahren (Robustheit) und Filtrationsmethode (Selektivität)
- Kurze Analysezeit 2 Tage
- Sehr breiter Messbereich von 44 bis 19'000 Sporen/L (silofreie Milch und Silomilch und können ohne Anpassung der Methode untersucht werden)
- Silomilch: ähnliche Ergebnisse wie bei Filtrationsmethode
- Silofreie Milch: 50% tiefere Quote mit ≥ 44 bzw. ≥ 50 Sp./L als Filtrationsmethode (selektiver?)
- Ausgeflockte Proben können mit der SY-Lab nicht untersucht werden (Verstopfung der Pipettenspitze)

Prutrifikus - Hitzeresistente Propionsäurebakterien
Wintertagung 2025

20



Vergleich der verschiedenen Labormethoden für anaerobe Sporen

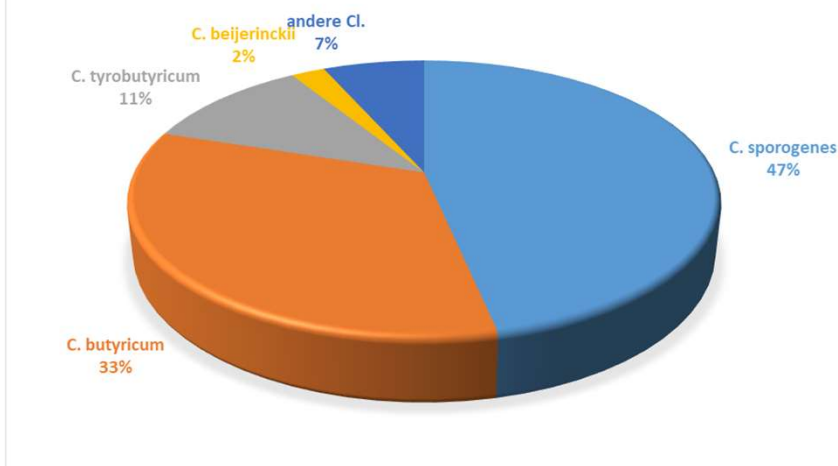
Kriterium	Methode SY-Lab	Filtrationsmethode	MPN Bryant Burkey
Nachweisgrenze (/L)	30 / 75	25	53
Obere Bestimmungsgrenze (/L)	59'000/23'000	1250	1200
Messunsicherheit bei 50/L	gross	gross	gross
Messunsicherheit bei 1000/L	gut	mässig-gut	gross
Spezifität / Selektivität	gut	gut	schwach
Robustheit	gut	mässig	gut
Dauer der Analyse	2 Tage	3 Tage	7 Tage
Arbeitsaufwand	mässig	hoch	mässig
Aufwändigster Schritt	Vorbereitung der Proben	Aufschluss, Filtration	Pipettieren

Prutrifikus - Hitzeresistente Propionsäurebakterien
Wintertagung 2025

21



CLOSTRIDIENSPOREN IN SILOFREIER MILCH



Agroscope, 2020. Untersuchung von **181 positiven MPN-Röhrchen** (Milieu Bryant-Burkey) aus der Analyse von silofreier Milch durch ARQHA, Winter 2019/20. Multiplex qPCR (C. sporogenes, C. butyricum, C. tyrobutyricum, C. beijerinckii) 142 (78%) der geblähten Röhrchen waren PCR negativ (= andere Clostridien oder sonstige anaerobe oder fakultativ anaerobe Sporen)

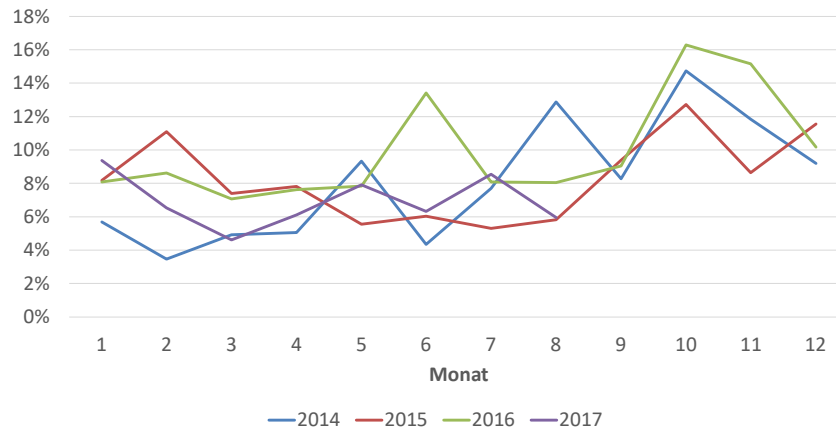
Prutrifikus - Hitzeresistente Propionsäurebakterien
Wintertagung 2025

22



Buttersäuresporen 2014-2017 MPN Romandie Produzentenmilchen im roten Bereich

Ergebnisse mit ≥ 350 Sporen pro Liter



Prutrifikus - Hitzeresistente Propionsäurebakterien
Wintertagung 2025



N=22'348

23



MeteoSchweiz - Klimabulletin Sommer 2016 2

Der Juni-Niederschlag lag in vielen Gebieten der Schweiz weit über dem Durchschnitt. Ab Monatsmitte führten Starkniederschläge vielerorts zu Hangrutschen und Überschwemmungen. Von den Starkniederschlägen besonders betroffen waren das Tessin, Nord- und Mittelbünden, das Oberengadin sowie der zentrale und östliche Alpennordhang. Im Juli brachte die regional unterschiedliche Gewitteraktivität sehr unterschiedliche Niederschlagsmengen. Lokal fielen über 150 Prozent der Norm, während die Mengen gebietsweise auch unter 50 Prozent der Norm 1981-2010 blieben. Erneut führten Wasser- und Schlammassen als Folge heftiger Gewitter an verschiedenen Orten zu Schäden an Gebäuden, Strassen und Bahnlinien. Im August blieben die Niederschlagsmengen in vielen Gebieten deutlich unterdurchschnittlich. In der Westschweiz, im Wallis und im Tessin fiel lokal nicht einmal ein Drittel der normalen Augustsummen.

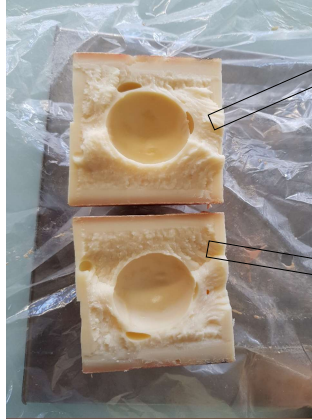
Prutrifikus - Hitzeresistente Propionsäurebakterien
Wintertagung 2025

24



Nachweis in Käse

Halbhartkäse mit Blastlochung - Probenahme



Direkter Nachweis
mittels **PCR**

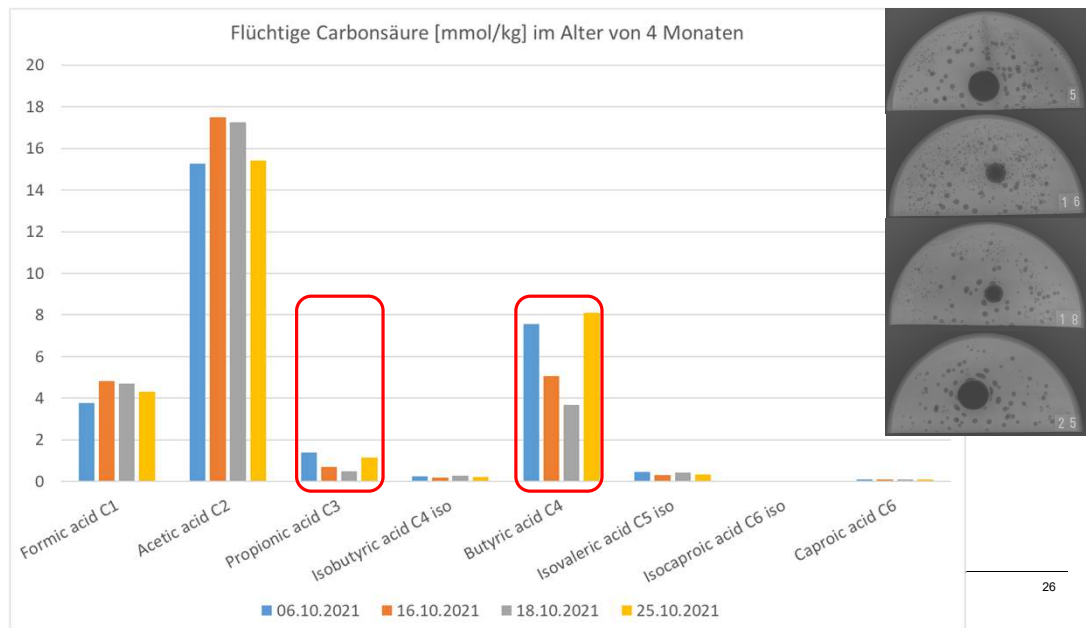
Indirekter Nachweis
mittels
Gaschromatographen
(GC)

Prutrifikus - Hitzeresistente Propionsäurebakterien
Wintertagung 2025

25



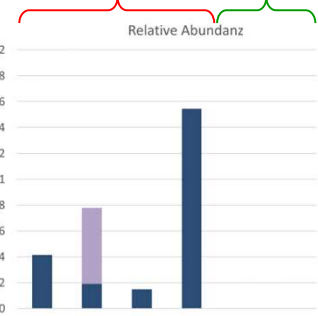
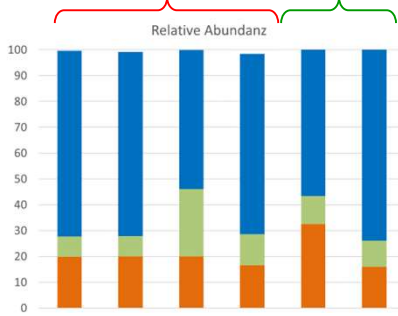
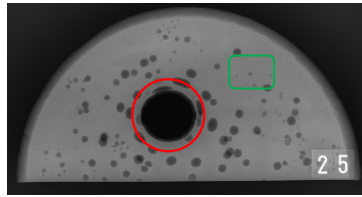
Indirekter Nachweis mittels GC - Halbhartkäse mit Blastlochung



26



Direkter Nachweis mittels PCR (16S Sequenzierung) - Käse mit Blastlochung



Prutrifikus - Hitzeresistente Propionsäurebakterien
Wintertagung 2025

27



Nachweis von Putrifikus Emmentaler 3.5 Monate

Flüchtige Carbonsäuren total	mmol/kg	116.2
Ameisensäure	mmol/kg	2.9
Essigsäure	mmol/kg	43.5
Propionsäure	mmol/kg	69.0
n-Buttersäure	mmol/kg	0.6
n-Caprinsäure	mmol/kg	0.2
Freie Aminosäuren total (OPA)	mmol/kg	normaler Teig 188 weisse Stelle 265

Bemerkungen

Sowohl das Fehlerbild (weisse Stellen im Teig), siehe Foto, sowie auch der deutliche Unterschied der Proteolyse (OPA) vom normalen Teig und der weissen Stelle lassen zweifelsfrei auf den Fehler Putrifikus schliessen.



Prutrifikus - Hitzeresistente Propionsäurebakterien
Wintertagung 2025

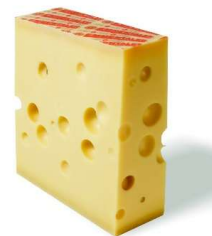
28



Teil 2: Putrifikus - Beschreibung der neuen Spezies

Noam Shani, Emmanuelle Arias, Daniel Marzohl, Caroline Choulat,
Hélène Berthoud

Praxis-Fall – eine Käserei – Herbst 2020



Praxis-Fall – Isolieren aus Milchproben



Protokoll der Analyse

- MPN-Methode (nach CNERNA)
 - 10 x 2 mL Milch
 - Bryant-Burkey Medium
 - Bebrütung 7 Tage / 37°C
- Die positiven Proben (=Gas-Bildung) wurden :
 - mittels Multiplex-PCR analysiert
 - Isolate von Sporen wurden mittels 16S-Sequenzierung identifiziert

28+29.08.2020	Milchlieferrant	1	2	3	4	5										6					
Buttersäuresporen	Sporen/L	<53	<53	<53	53	1200										110					
positiven Röhrrchen	von 10	0	0	0	1	9										2					
Bezeichnung Röhrrchen		-	-	-	4	5A	5B				5C	5D	5E	5F	5G			5H	5I	6A	6B
Isolate	Identifizierung	-	-	-	0	0	Clostridium butyricum + Paraclostridium bifermentans				0	0	0	0	Clostridium butyricum			0	0	0	0
	% Identität	-	-	-	0	0	97 und 99				0	0	0	0	99			0	0	0	0
Multiplex	C. sporogenes	-	-	-	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	
	C. tyrobutyricum	-	-	-	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	
	C. beijerinckii	-	-	-	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	
	C. butyricum	-	-	-	neg	pos	pos	pos	pos	neg	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	neg	neg	

Putrifikus - Hitzeresistente Propionsäurebakterien
Wintertagung 2025

31

31

Praxis-Fall – Isolieren aus Käseproben

Protokoll der Analyse

- 3 Putrifikus-Stelle (Nr. 1, 2, 3) + 1 Kontrollstelle (Nr. 4) wurden beprobt (je 10g)
- Homogenisieren in 90 ml Peptonwasser, pasteurisiert (76°C 15 min)
- Keimzahl auf RCM (37°C, anaerob, 7 Tagen)
- Je 2-3 Isolate pro Stelle mittels 16S-Sequenzierung identifiziert (ca. 500 bp)

Chargen	29.08.2020			
Putrifikus-Stelle	ja	ja	ja	nein
Nr.	1	2	3	4
Sporen/g	17'400	648'000	6'700	<100
Isolate	A, B	A, B	A, B	-
Identifizierung	Clostridien sporogenes / botulinum (A, B)			-
% Identität	99			-

Charge vom 29.08.2020, analysiert am 28.01.2021



Putrifikus - Hitzeresistente Propionsäurebakterien
Wintertagung 2025

32

32

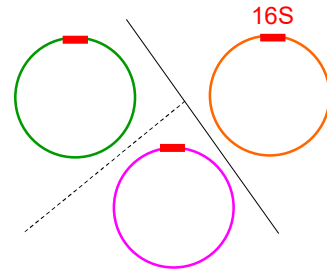


Praxis-Fall – Isolieren aus Käseproben

C. tyrobutyricum
Greyerzer



Clostridium
aus Putrifikus-Stellen
Emmentaler

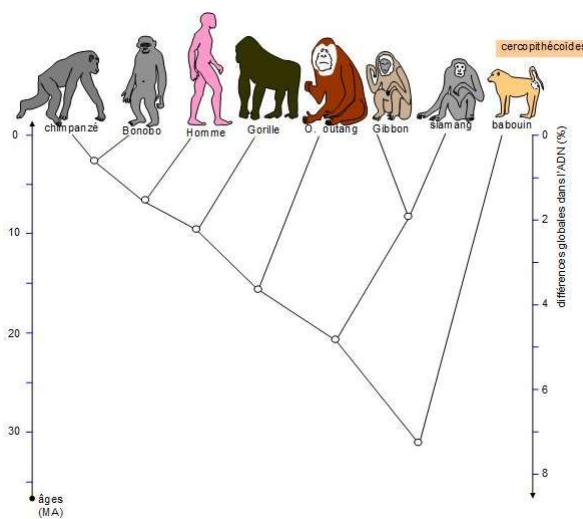


Clostridium sporogenes
Glerner Schabziger

- September 2020 → 13 Stämme
- 3 weitere Käseereien / 2019-2020 → 3 Stämme
- Emmentaler + Greyerzer / 1983 → 2 Stämme



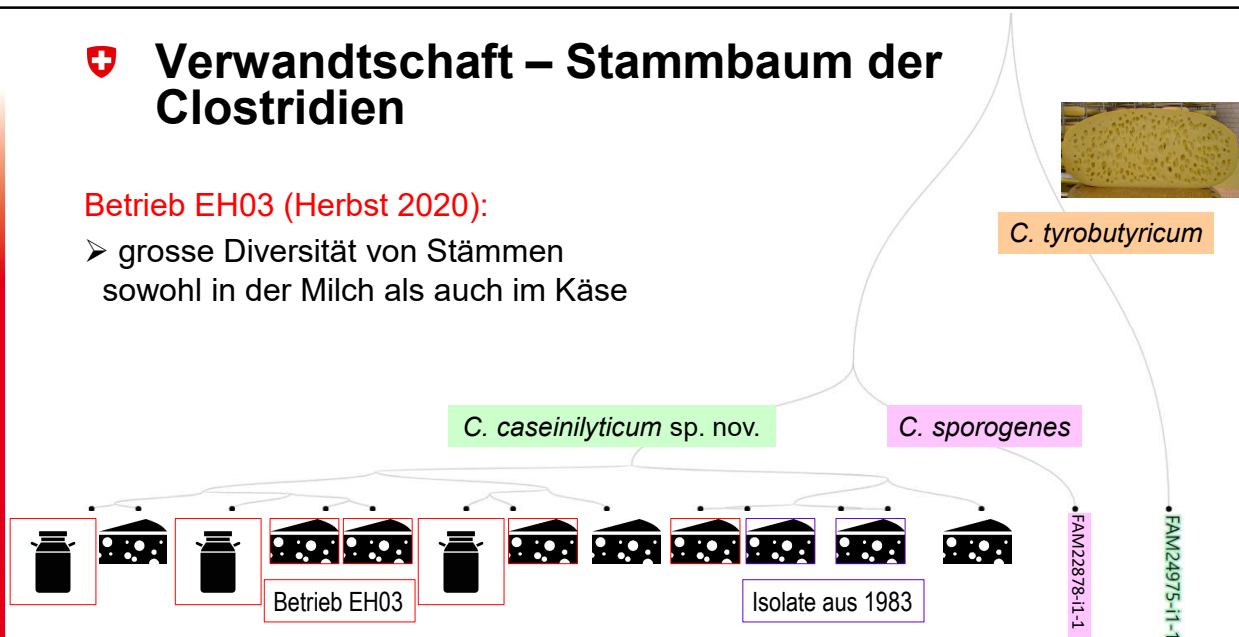
Verwandtschaft – Stammbaum des Menschen



Verwandtschaft – Stammbaum der Clostridien

Betrieb EH03 (Herbst 2020):

- grosse Diversität von Stämmen sowohl in der Milch als auch im Käse



Prutrifikus - Hitzeresistente Propionsäurebakterien
Wintertagung 2025

35

35

Käseschädliche Sporenbildner

Woher kommen sie?

- Boden, See- und Flusswasser
- Vermehren sich überall dort wo anaerobe Bedingungen, Feuchtigkeit und organische Substanz vorhanden sind:
 - **Silage**, gärende Futtermittel
 - Mist- und Komposthaufen
 - Morastige Stellen
 - Nasse Stellen unter Liegeflächen
 - Schmutzige Tränken

Prutrifikus - Hitzeresistente Propionsäurebakterien
Wintertagung 2025

36

36



Isolate aus Silage



Isolat	PCR-TTGE	MALDI-TOF	Partielle Sequenzanalyse
	Spezies	Spezies	Spezies
IS 1	PCR 1 nicht amplifiziert	kein Wachstum auf RCM mod	PCR nicht amplifiziert
IS 2	<i>C. tyrobutyricum</i>	<i>C. tyrobutyricum</i>	<i>C. tyrobutyricum</i>
IS 3	<i>C. sporogenes</i>	<i>C. sporogenes</i>	<i>C. sporogenes</i>
IS 37	<i>C. tyrobutyricum</i>	<i>C. tyrobutyricum</i>	<i>C. tyrobutyricum</i>
IS 38	<i>C. beijerinckii</i>	<i>C. beijerinckii</i>	<i>C. beijerinckii</i>
IS 59	kein übereinstimmendes Profil	<i>C. sporogenes</i>	<i>C. sporogenes</i>
IS 60	<i>C. tyrobutyricum</i>	<i>C. tyrobutyricum</i>	<i>C. tyrobutyricum</i>
IS 61	<i>C. sporogenes</i>	<i>C. sporogenes</i>	<i>C. sporogenes</i>
IS 62	<i>C. sporogenes</i>	<i>C. sporogenes</i>	<i>C. sporogenes</i>
IS 96	<i>C. beijerinckii</i>	<i>C. beijerinckii</i>	<i>C. beijerinckii</i>
IS 97	<i>C. tyrobutyricum</i>	<i>C. tyrobutyricum</i>	<i>C. tyrobutyricum</i>
IS 98	kein übereinstimmendes Profil	<i>C. sporogenes</i>	<i>C. sporogenes</i>
IS 103	<i>C. sporogenes</i>	<i>C. sporogenes</i>	<i>C. sporogenes</i>
IS 104	<i>C. tyrobutyricum</i>	<i>C. tyrobutyricum</i>	<i>C. tyrobutyricum</i>
IS 105	<i>C. sporogenes</i>	<i>C. sporogenes</i>	<i>C. sporogenes</i>
IS 106	kein übereinstimmendes Profil	keine Identifizierung möglich	<i>C. sporogenes</i>

111 Clostridien-Isolate aus einer Silageprobe – BA Maya Gantenbein 2012

- mit 3 Methoden identifiziert:
 - Mehrheit von *Clostridium sporogenes* / *Clostridium tyrobutyricum*
 - Minderheit von *Clostridium beijerinckii*
 - und *C. caseinilyticum* sp. nov.?

→ 3 Isolate

Prutrifikus - Hitzeresistente Propionsäurebakterien
Wintertagung 2025

37



Grana Padano



Food Control 155 (2024) 110050



Contents lists available at ScienceDirect

Food Control

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodcont



Identification and characterization of the microbial agent responsible of an alteration in spoiled, Grana Padano cheese during ripening

Domenico Carminati, Barbara Bonvini, Lia Rossetti, Monica Mariut, Miriam Zago, Giorgio Giraffa

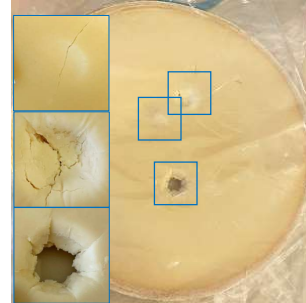
Council for Agricultural Research and Economics, Research Centre for Animal Production and Aquaculture (CREA-ZA), Via A. Lombardo 11, 26900, Lodi, Italy

Prutrifikus - Hitzeresistente Propionsäurebakterien
Wintertagung 2025

38



Grana Padano



- Grana Padano nach 6–7 Monaten
- 1 Betrieb
- nur bei einigen Käsen einer begrenzten Anzahl Chargen
- häufiger in den Frühlings- und Sommermonaten
- einzelner, weißlicher Flecken von Käsedegradation
- Verflüssigung der Käsematrix
- unangenehmen und ekelerregenden Geruch
- ≠ von Spätblähung, geringer Gasansammlung zu finden
- Defekt trat trotz Verwendung von Lysozym (2,5 g/100 kg Kesselmilch) als technologischem Hilfsstoff zur Verhinderung des Ausbruchs von Spätblähung auf

Prutrifikus - Hitzeresistente Propionsäurebakterien
Wintertagung 2025

39



Grana Padano

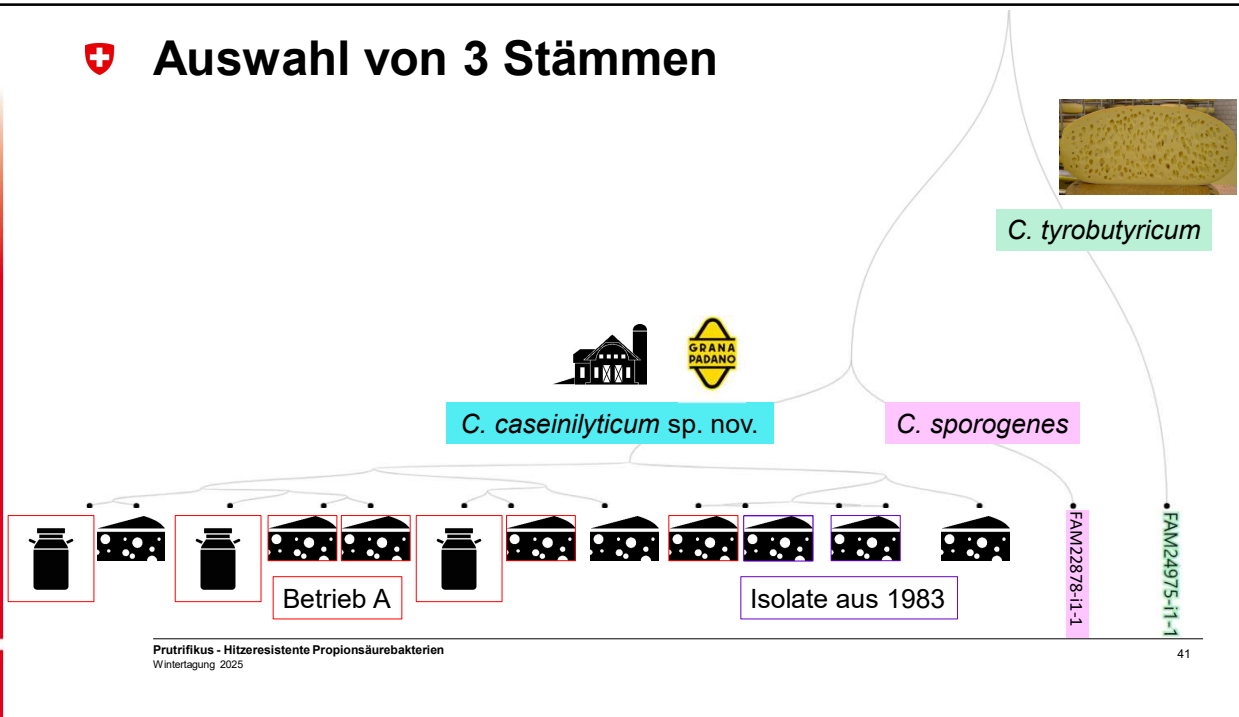


- Charakterisierung der Isolate aus verdorbenen und fehlerfreien Zonen desselben Käselais
→ zwei verschiedenen vorherrschenden Stämmen von *C. sporogenes*, die zwei getrennten genetischen Linien entsprechen, mit bemerkenswerten morphologischen und taxonomischen Unterschieden

Prutrifikus - Hitzeresistente Propionsäurebakterien
Wintertagung 2025

40

Auswahl von 3 Stämmen



41

Beschreibung der neuen Spezies

Clostridium caseinilyticum sp. nov., a close relative to *Clostridium tyrobutyricum*
Clostridium sporogenes, isolated from spoiled cheeses

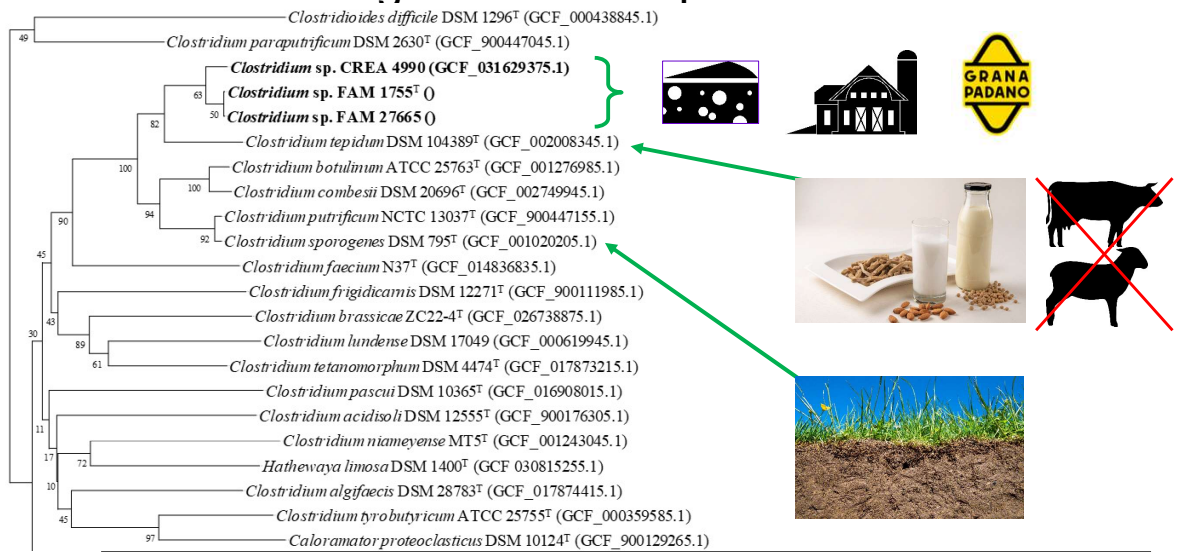
Noam Shavit^{1*}, Miriam Zanon², Fatme Bealoui³, Daniel Marzoni¹, Emilie Michellod³, Katia Gindro³, Giorgio Giraffa² and Emmanuelle Girard⁴

WORK IN PROGRESS

42



Beschreibung der neuen Spezies



Prutrifikus - Hitze-resistente Propionsäurebakterien
Wintertagung 2025

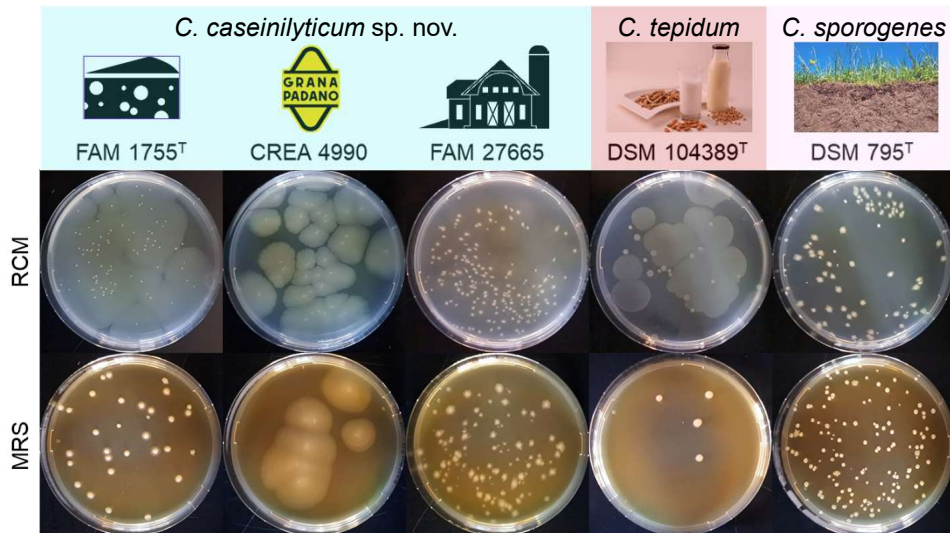
43

Agroscope

43



Beschreibung der neuen Spezies



Prutrifikus - Hitze-resistente Propionsäurebakterien
Wintertagung 2025

44

Agroscope

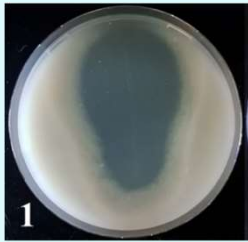
44



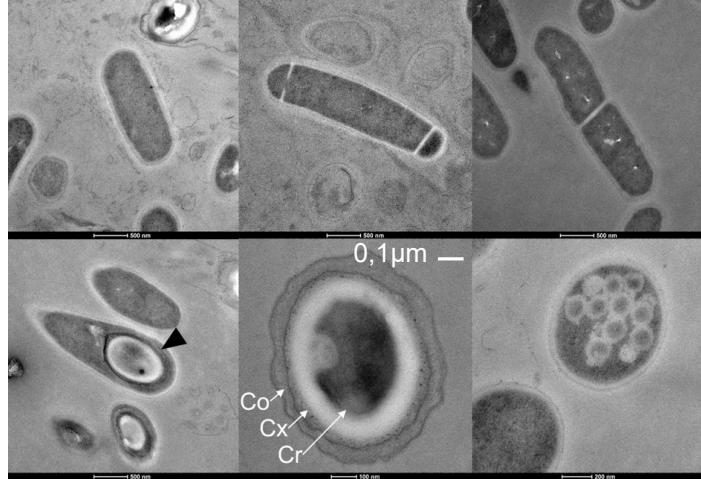
Beschreibung der neuen Spezies

TEM Mikroskopie

C. caseinilyticum sp. nov.



Casein-Abbau auf Magermilch-Agar



Prutrifikus - Hitzeresistente Propionsäurebakterien
Wintertagung 2025

45

Agroscope

45



Beschreibung der neuen Spezies

C. caseinilyticum sp. nov.



FAM 1755^T



CREA 4990



FAM 27665

C. tepidum



DSM 104389^T

C. sporogenes



DSM 795^T

	FAM 1755 ^T	CREA 4990	FAM 27665	DSM 104389 ^T	DSM 795 ^T
Temperatur	20 - 40 °C	20 - 40 °C	25 - 40 °C	30 - 45 °C	25 - 45 °C
pH	5.5 - 9.5	5.5 - 9.5	5.5 - 9.5	6.0 - 9.5	5.5 - 9.5
NaCl	0 - 5%	0 - 5%	0 - 4%	0 - 2%	0 - 5%
Optimum	1 - 2%	1 - 2%	1 - 2%	0%	4%

Prutrifikus - Hitzeresistente Propionsäurebakterien
Wintertagung 2025

46

Agroscope

46



Teil 3: Putrifikus - Nachweis in der Milch

Emmanuelle Arias, Caroline Choulat, Meral Turgay, Matthias Dreier,
Charlotte Joller, Thomas Aeschlimann, H el ene Berthoud



Praxisversuch - Putrifikus in Kessmilchen

Spezifischer Spezies Nachweis mittels PCR

Analytik wurde primär für Forschung entwickelt und sie ist nicht validiert

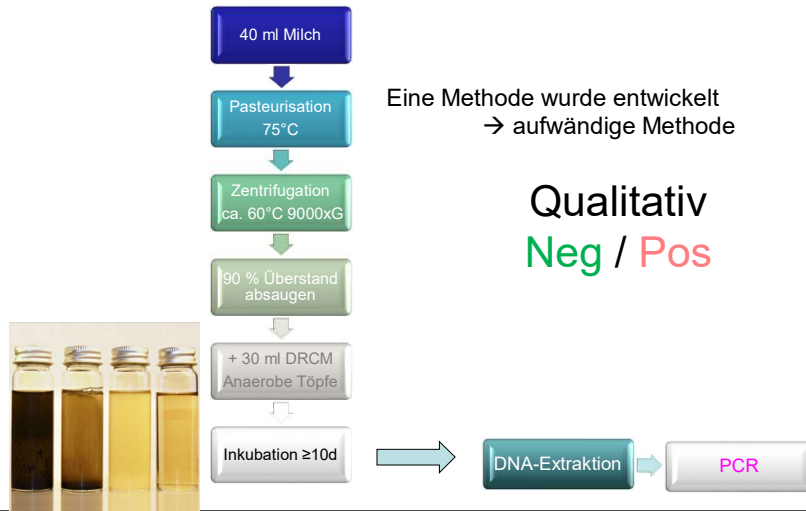


Bestandsaufnahme :

- April 2024
- 20 Kessmilchen (40mL/Kessi) von 10 Emmentaler Käsereien.
- Anreicherung während 12 Tagen und danach spezies-spezifischer PCR-Nachweis.
- Nur qualitatives Ergebnis, keine Zählung.



Entwicklung einer qualitative Methode mit spezies-spezifischem PCR Nachweis



Eine Methode wurde entwickelt
→ aufwändige Methode

Qualitativ
Neg / Pos

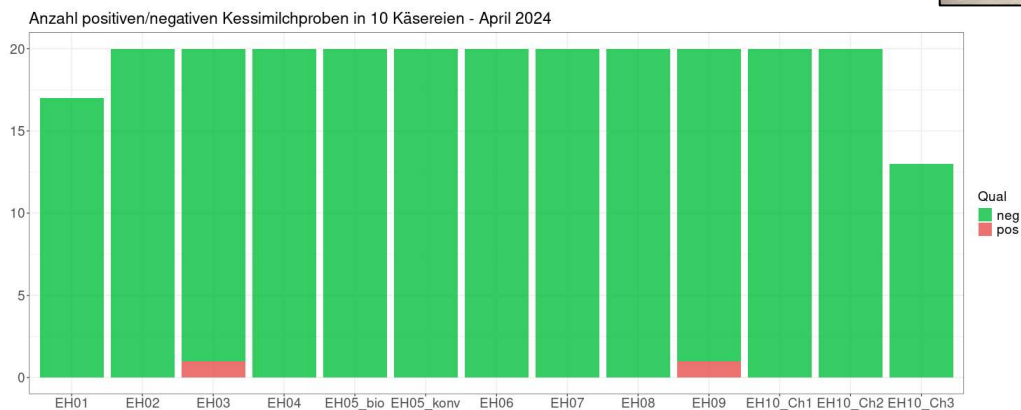
Prutrifikus - Hitzeresistente Propionsäurebakterien
Wintertagung 2025

49



Praxisversuch - Putrifikus in Kessmilchen

Clostridium caseinilyticum sp. nov. (früher *Clostridium sporogenes*)



Prutrifikus - Hitzeresistente Propionsäurebakterien
Wintertagung 2025

50



Praxisversuch - Putrifikus in Kessimilchen

Clostridium caseinilyticum sp. nov. (früher *Clostridium sporogenes*)



Anzahl positiven/negativen Kessimilchproben in Käserei EH03



Putrifikus - Hitzeresistente Propionsäurebakterien
Wintertagung 2025

51

Agroscope

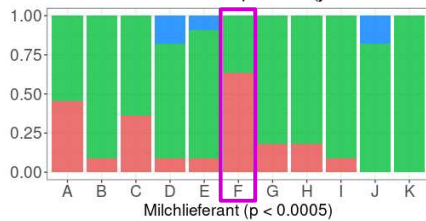
51



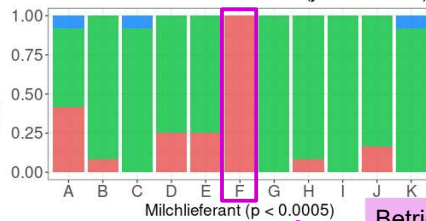
Putrifikus in Lieferantenmilchen – Käserei EH03

Clostridium caseinilyticum sp. nov. (früher *Clostridium sporogenes*)

Lieferantenmilchen Sept 2020 (je 11 Proben)



Lieferantenmilchen Okt 2020 (je 12 Proben)

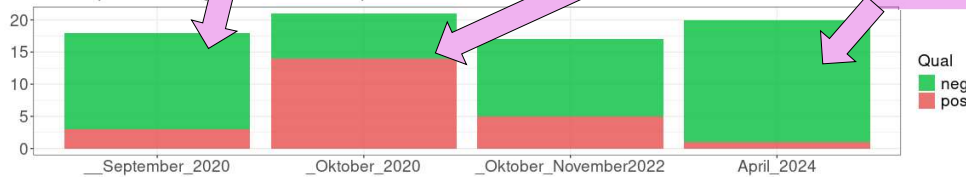


$p < 0.005$

$p < 1 \cdot 10^{-9}$

Betrieb F hat ab Januar 2024 aufgehört, Milch in die Käserei EH03 zu liefern

Anzahl positiven/negativen Kessimilchproben in Käserei EH03



Putrifikus - Hitzeresistente Propionsäurebakterien
Wintertagung 2025

52

Agroscope

52



Ermöglicht die neue Analytik eine effektivere Vorbeugung von Buttersäuregärungen?

- Stallhygiene, Melkhygiene und ein optimales Futtermanagement sind entscheidend für die Produktion sporenfreier Milch
 - Möglicherweise stärkere Belastung bei extremen Witterungsbedingungen (Trockenheit, Nässe)
- Neue Analytik nur im Rahmen von gemeinsamen Projekten
 - Aktuell ist der spezifische Nachweis von Spezies mittels PCR noch sehr zeit- und ressourcenintensiv (für Forschungszwecke geeignet)
 - Nur aussagekräftig wenn Lieferantenmilchen/Kessmilchen über Zeitraum von 1 Monat oder ca. 20 Proben untersucht werden



Teil 4 Hitzeresistente Propionsäurebakterien

Zivildienst Lorenz Ryser

Meral Turgay, Petra Lüdin, Marie Therese Fröhlich, Daniel Wüthrich



Auswahl der Stämmen

- 54 Isolate der Spezies *Propionibacterium freudenreichii* :
- Aus der Agroscope-Stammsammlung
- Ausgewählt
 - mittels einem PCR typisiert
 - Genom



Aufbau des Brenntemperatur-Versuchs

- Die 54 Stämme werden bei Bouillon kultiviert.
 - Vor Hitzebehandlung: Keimzahlbestimmung auf LA-Agar
 - Reagenzgläser für 60 Minuten in ein 53°C warmes Wasserbad gestellt
 - Nach Hitzebehandlung: Keimzahlbestimmung auf LA-Agar
- Anzahl Bakterien, die die Brenntemperatur überleben, kann berechnet werden

Ergebnisse

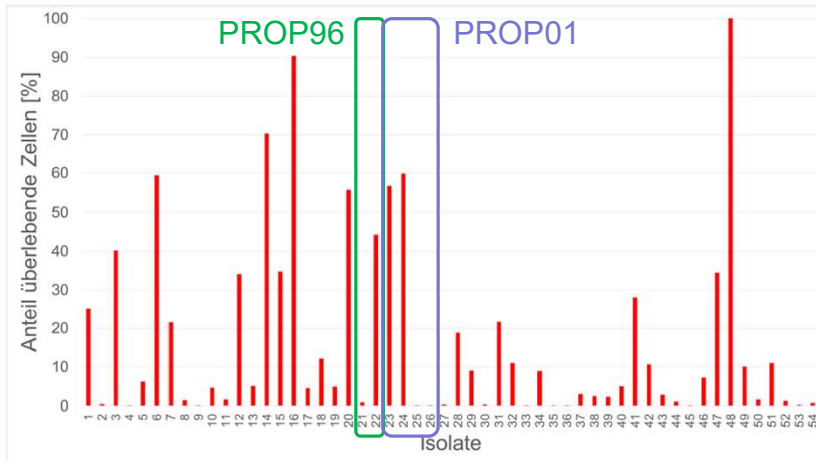


Abbildung 3. Prozentuales Überleben der Brenntemperatur [„Keimzahl nach Brenntemperatur“ / „Keimzahl vor Brenntemperatur“ * 100].

Prutrifikus - Hitzeresistente Propionsäurebakterien
Wintertagung 2025

57

57

Hitzeresistenz - Literatur

Applied Microbiology and Biotechnology (2020) 104:3145–3156
<https://doi.org/10.1007/s00253-020-10425-1>

APPLIED MICROBIAL AND CELL PHYSIOLOGY



Intracellular osmoprotectant concentrations determine *Propionibacterium freudenreichii* survival during drying

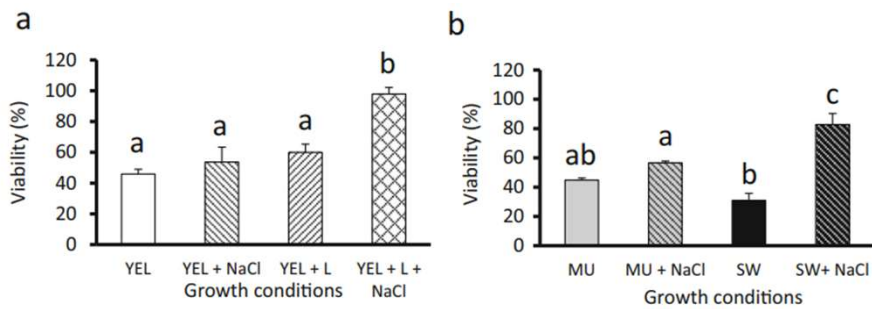
Floriane Gaucher^{1,2} · Houem Rabah^{1,3} · Koffigan Kponouglo¹ · Sylvie Bonnassie^{1,4} · Sandrine Pottier⁵ · Anne Dolivet¹ · Pierre Marchand² · Romain Jeantet¹ · Philippe Blanc² · Gwénaél Jan¹

Prutrifikus - Hitzeresistente Propionsäurebakterien
Wintertagung 2025

58

58

Hitzeresistenz - Literatur



- Wachstum mit Kochsalz schützt vor Hitzestress
- Wachstum mit Laktose schützt vor Hitzestress

Prutrifikus - Hitzeresistente Propionsäurebakterien
Wintertagung 2025

59

Gibt es hitzeresistenten Propionibakterien?

- Stamm-spezifische Hitzeresistenz
- Die Bedingungen, die die Propionsäurebakterien erleben (Laktose, Kochsalz,...), kann zusätzlich ihre Hitzeresistenz beeinflussen

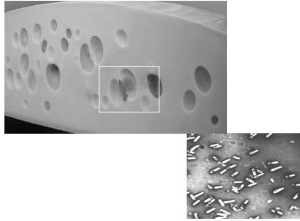
Prutrifikus - Hitzeresistente Propionsäurebakterien
Wintertagung 2025

60



ALP forum 2005, Nr. 20 d

BUTTERSÄUREBLÄHUNG – NOCH IMMER AKTUELL
Diskussionsgruppen Emmentaler



agroscope
LIEBEFELD-POISEUX

ALP aktuell 2006, Nr. 25

PRODUKTION VON BUTTERSÄUREBAKTERIENARMER MILCH
Merckblatt für die Praxis



Jean-Pierre Hatz:

Milch, welche für die Käseherstellung aus Rohmilch mit einer hohen Bakterienzahl gewonnen ist, verlangt strengere Anforderungen an Hygiene auf der Farm als Milch, die in Milch- und Molkereifabriken aus Crème, Emmentaler oder Taler Butterherstellung gewonnen wird.

Zu den 50 geringen ein paar Dutzend klassischen Streifenarmen Sporen pro Liter Milch, von Milch- und Molkereifabriken aus Crème, Emmentaler oder Taler Butterherstellung gewonnen.

Die wirtschaftlichen Konsequenzen einer strengen Kontrolle sind immens, denn es ist keine Möglichkeit für Käse zu haben, welcher durch eine Butterherstellung gewonnen wurde. Auch Käse, welcher in Schmelzform hergestellt wird, kann die Sporen einer Streifenarmen Milch enthalten, die auch keine strengen Kontrollen in Höhe von 8 bis 10 Streifen pro Liter enthält.

Die Milch, welche die Streifenarmen in der Schweiz von der Verarbeitung der Milch zu den Molkereifabriken über die Milch, für die Herstellung von Käse bestimmt ist, wird für Streifenarmen Milch erhalten. Streifenarmen Milch enthält eine Keimzahl von 10⁶ bis 10⁷ Streifenarmen pro Liter Milch.

Die Streifenarmen Milch (oder Streifenarmen) sind ohne Behandlung zur Abtötung von Bakterien geeignet, wobei bei der Produktion der streifenarmen Milch einige Regeln in Bezug auf Fütterung, Hygienemanagement, Teilmilchleistung und Melkregeln eingehalten werden.

Stellenansicht: Agroscope Liebefeld-Posieux
 Schweizerische Eidgenossenschaft
 Confédération suisse
 Confederaziun Svizra
 Confederaziun svizra

Agroscope Liebefeld-Posieux
 Eidgenössisches Forschungsanstalt für Agrarwissenschaften
 Agroscope Liebefeld-Posieux
 Agroscope Liebefeld-Posieux ALP

Prutrifikus - Hitzeresistente Propionsäurebakterien
Wintertagung 2025



Belastung der Milch mit Sporen

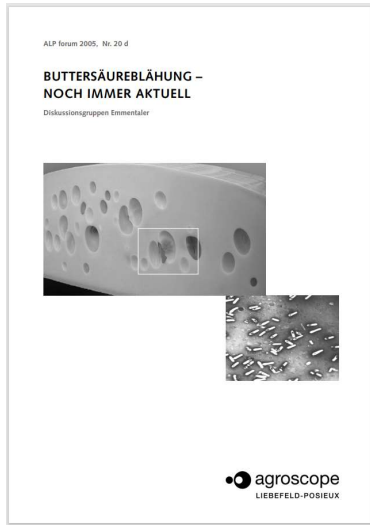
Einflussfaktoren:

- Zitzenreinigung
- Stallhygiene
- Menge Hofdünger & andere potentiell sporenhaltige organ. Dünger
- Erntetechnik
 - Maschinen: Typ Mäher, Wender, Ladewagen
 - Schnitthöhe (bis zu 10x höhere Sporenzahl wenn Schnitthöhe 7 cm statt 10 cm)
- Bodentopografie (Unebenheit)
- Verunreinigung des Futters mit Erde, Staub
 - Witterung (Nässe, Trockenheit!)
 - Jahreszeit

Prutrifikus - Hitzeresistente Propionsäurebakterien
Wintertagung 2025



Belastung der Milch mit Sporen



Prutrifikus - Hitzeresistente Propionsäurebakterien
Wintertagung 2025

65



MRCM-Test für den Nachweis von Buttersäuresporen in der Käserei

1. 10 ml Milch vor Gebrauch mittels einer Spritze ins Fläschchen geben
2. Probe pasteurisieren: 10 Min. bei 85°C
3. Probe mischen: Röhrchen 3x vorsichtig auf den Kopf drehen.
4. Paraffin bei Raumtemperatur erstarren lassen.
5. Inkubation der Röhrchen bei 38°C während 4 Tagen.



Ab 100 Sporen pro Liter

Prutrifikus - Hitzeresistente Propionsäurebakterien
Wintertagung 2025

66



Positive Proben = Gelbe Farbe und Gasbildung



Negative Proben = ohne Gasbildung

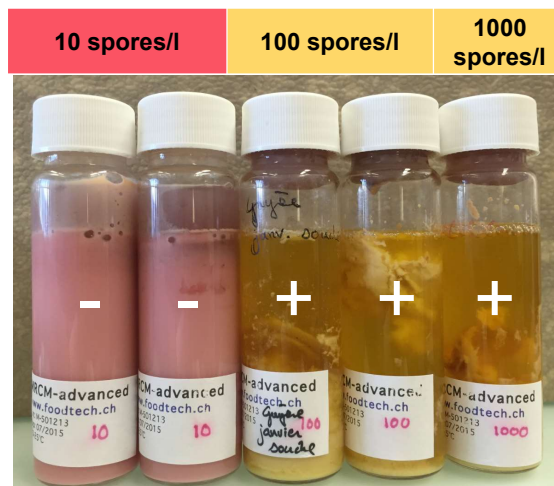


Prutrifikus - Hitzeresistente Propionsäurebakterien
Wintertagung 2025

67



Versuch in der Versuchskäserei Inokulieren von Sporen in die Kessimilch



Prutrifikus - Hitzeresistente Propionsäurebakterien
Wintertagung 2025

68