

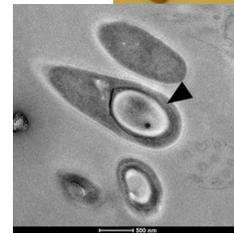
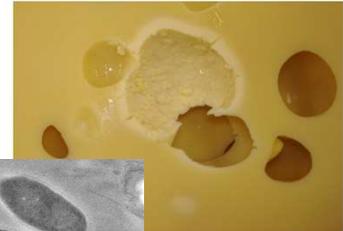
## Neue Spezies von proteolytischen Clostridien (*Cl. putrificus* im Emmentaler)

### Hitzeresistente Propionsäurebakterien

Emmanuelle Arias

Wintertagung 21.02.2025

[www.agroscope.ch](http://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

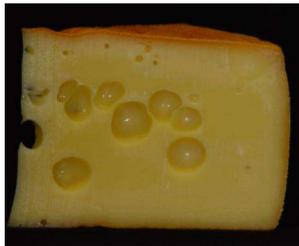


## Käseschädliche Sporenbildner



### **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, CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>
- Ab 3 Wochen durch Blähung sichtbar
- Hohe Buttersäuregehalte (> 3 mmol/kg)
- 5 mmol/kg Bs = je 220 cm<sup>3</sup> CO<sub>2</sub> und H<sub>2</sub>



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 ↑



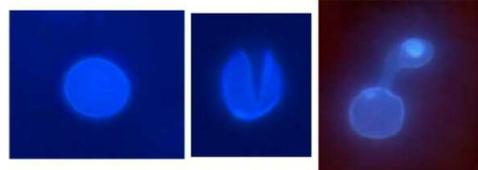
8



## 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  $\leq 5.25$** , 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:

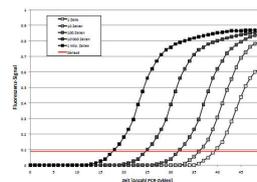
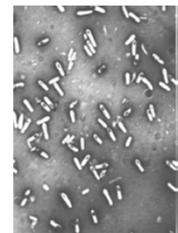
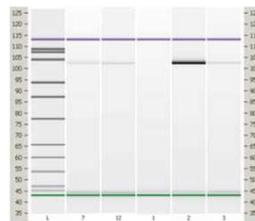
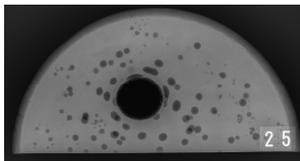
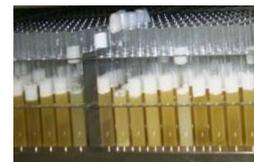
- grosser Wasserzusatz
- erhöhte Brenn- und Ausziehtemperatur
- tieferer Milchsäuregehalt im Käse nach 24 Stunden
- höherer Wassergehalt im Käse nach 24 Stunden
- höherer pH-Wert im Käse nach 24 Stunden
- früherer Lochbildungsbeginn
- kürzere Lochbildungsdauer
- höherer pH-Wert im Verlaufe der Reifung
- 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

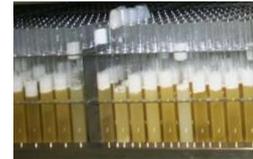
SY-Lab



Filtrationsmethode



MPN-Methode

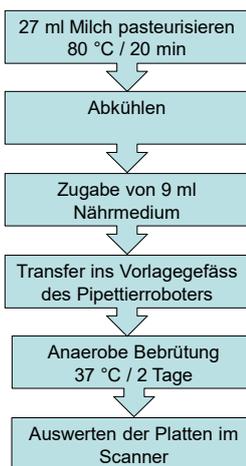


Prutrifikus - Hitzeresistente Propionsäurebakterien  
Wintertagung 2025

13



## Methode SY-Lab



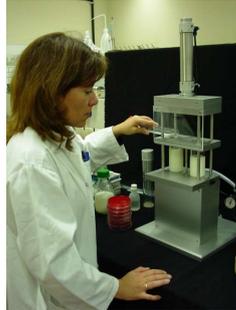
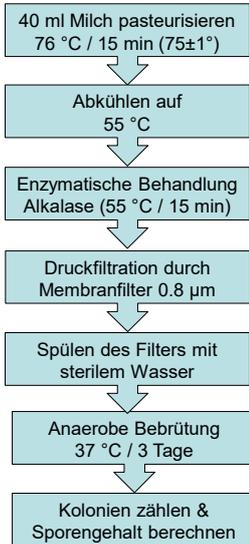
Modifiziertes Test-Format: 96 x 0.24 ml Milch

Prutrifikus - Hitzeresistente Propionsäurebakterien  
Wintertagung 2025

14



## Filtrationsmethode nach Bourgeois

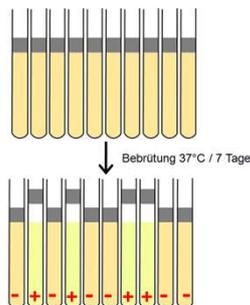
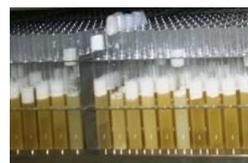
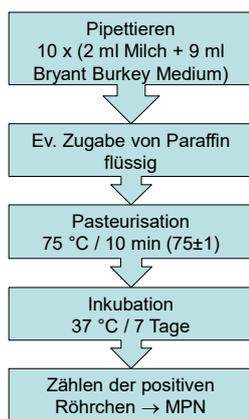


Prutrifikus - Hitzeresistente Propionsäurebakterien  
Wintertagung 2025

15



## MPN-Methode nach CNERNA mod.



53
110
180
<b>260</b>
350
460
...
1200

Prutrifikus - Hitzeresistente Propionsäurebakterien  
Wintertagung 2025

16

## Testformate

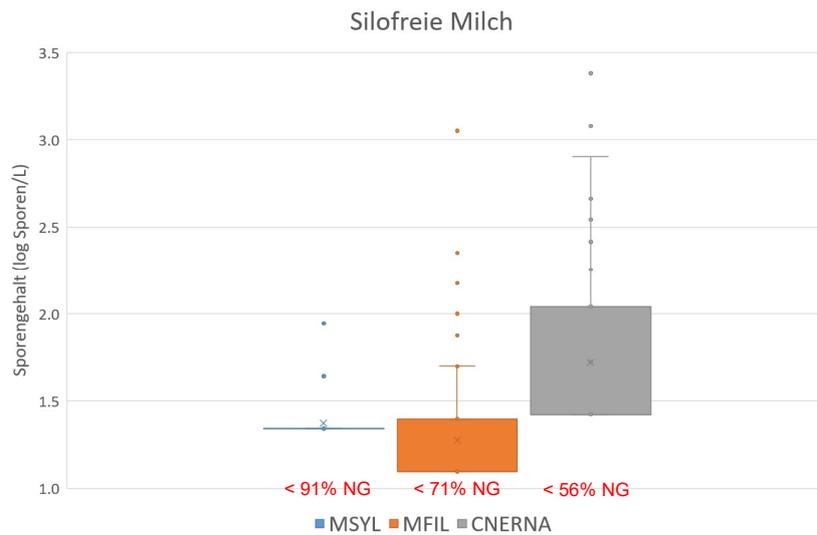
Methoden	Silomilch Sammelwagen (N = 93)	Silomilch Einzellieferanten (N = 107)	Silofreie Milch Einzellieferanten (N = 110)
SY-LAB AMP-6000	96 x 240 µl [NG = 44] [oBG = 19'000]	96 x 240 µl [NG = 44] [oBG = 19'000]	96 x 240 µl [NG = 44] [oBG = 19'000]
Filtrations- methode	40 ml [NG = 25] [oBG = 1'250]	20 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)

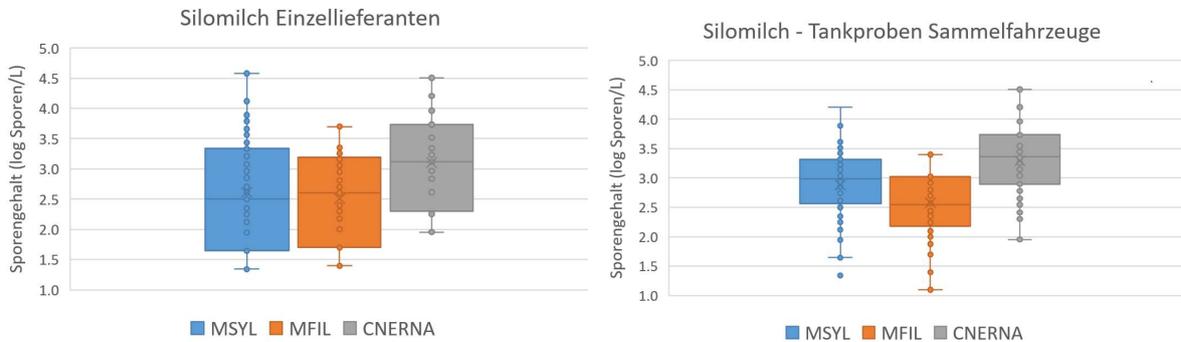


Prutrifikus - Hitzeresistente Propionsäurebakterien  
Wintertagung 2025

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  $\geq 44$  bzw.  $\geq 50$  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

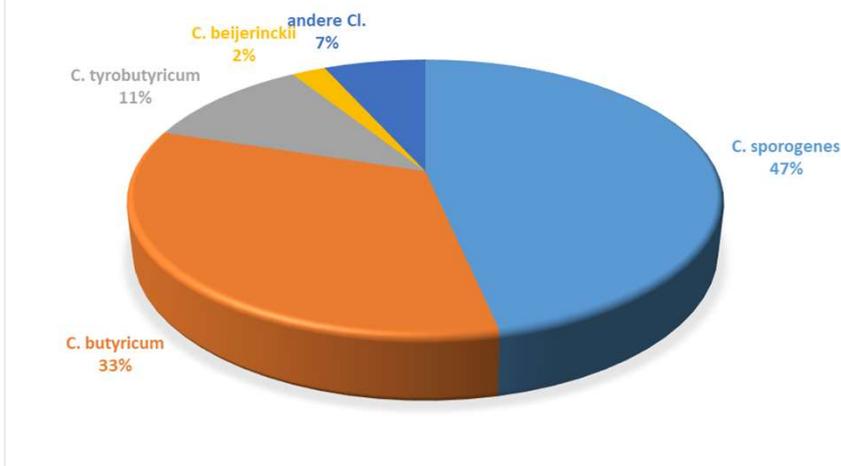
Kriterium	Methode SY-Lab	Filtrationsmethode	MPN Bryant Burkey
Nachweisgrenze (/L)	30 / 75	25	53
Obere Bestimmungsgrenze (/L)	59'000/23'000	1250	1200
Messunsicherheit bei 50/L	gross	gross	gross
Messunsicherheit bei 1000/L	gut	mässig-gut	gross
Spezifität / Selektivität	gut	gut	schwach
Robustheit	gut	mässig	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)

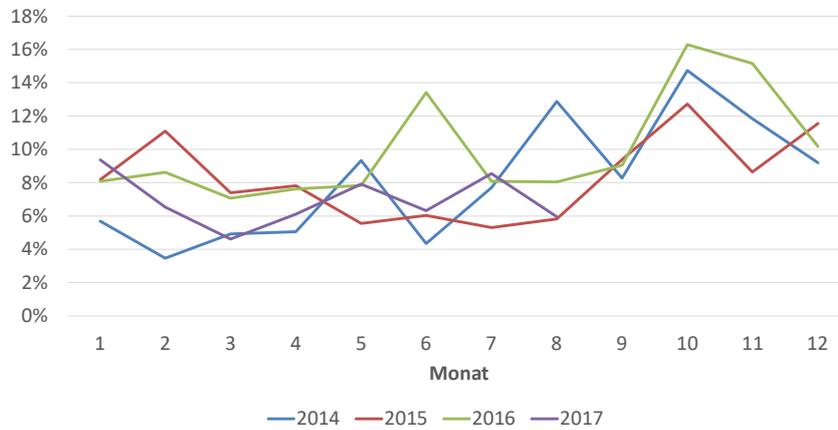
Prutrifikus - Hitzeresistente Propionsäurebakterien  
Wintertagung 2025

22



## Buttersäuresporen 2014-2017 MPN Romandie Produzentenmilchen im roten Bereich

### Ergebnisse mit $\geq 350$ 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.

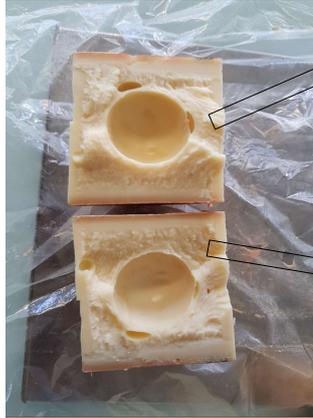
Prutrifikus - Hitzeresistente Propionsäurebakterien  
Wintertagung 2025

24



# Nachweis in Käse

Halbhartkäse mit Blastlochung - Probenahme



Direkter Nachweis  
mittels **PCR**

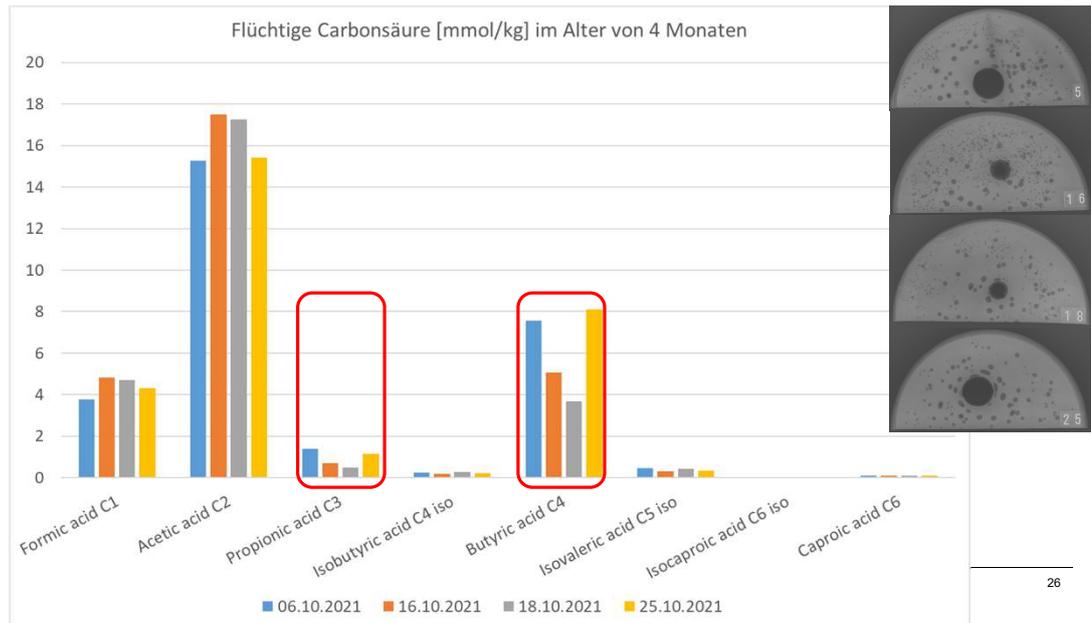
Indirekter Nachweis  
mittels  
Gaschromatographen  
**(GC)**

Prutrifikus - Hitzeresistente Propionsäurebakterien  
Wintertagung 2025

25



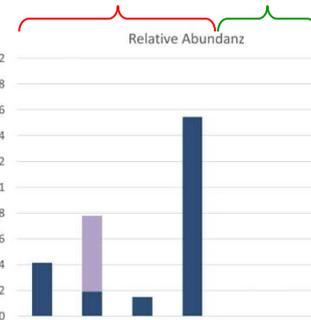
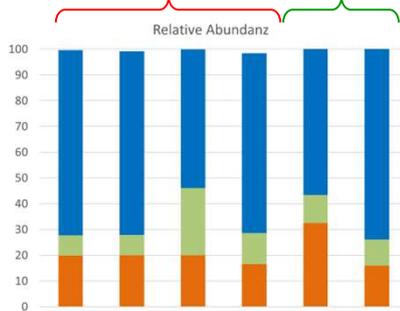
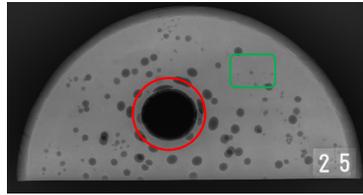
# Indirekter Nachweis mittels GC - Halbhartkäse mit Blastlochung



26



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



Putrifikus - 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
<b>n-Buttersäure</b>	<b>mmol/kg</b>	<b>0.6</b>
n-Caprinsäure	mmol/kg	0.2
Freie Aminosäuren total (OPA)	mmol/kg	normaler Teig 188 weisse Stelle <b>265</b>

### 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.



Putrifikus - Hitzeresistente Propionsäurebakterien  
Wintertagung 2025

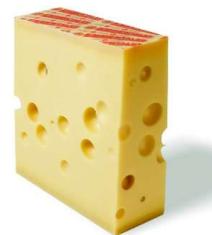
28



## 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
  - Isolaten 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 Röhrchen	von 10	0	0	0	1	9										2					
Bezeichnung Röhrchen		-	-	-	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

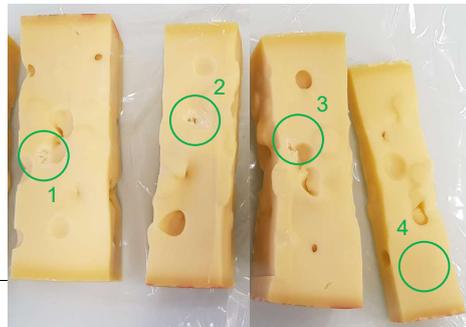
## Praxis-Fall – Isolieren aus Käseproben

### 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 Isolaten 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

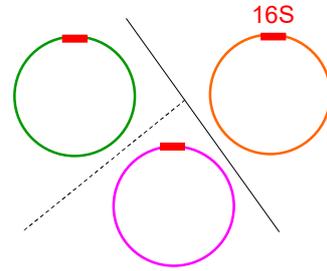


# Praxis-Fall – Isolieren aus Käseproben

*C. tyrobutyricum*  
Greyerzer



*Clostridium*  
aus Putrifikus-Stellen  
Emmentaler

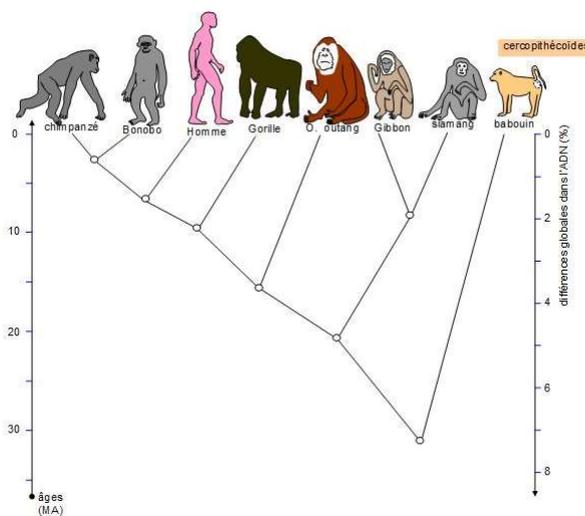


*Clostridium sporogenes*  
Glerner Schabziger

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



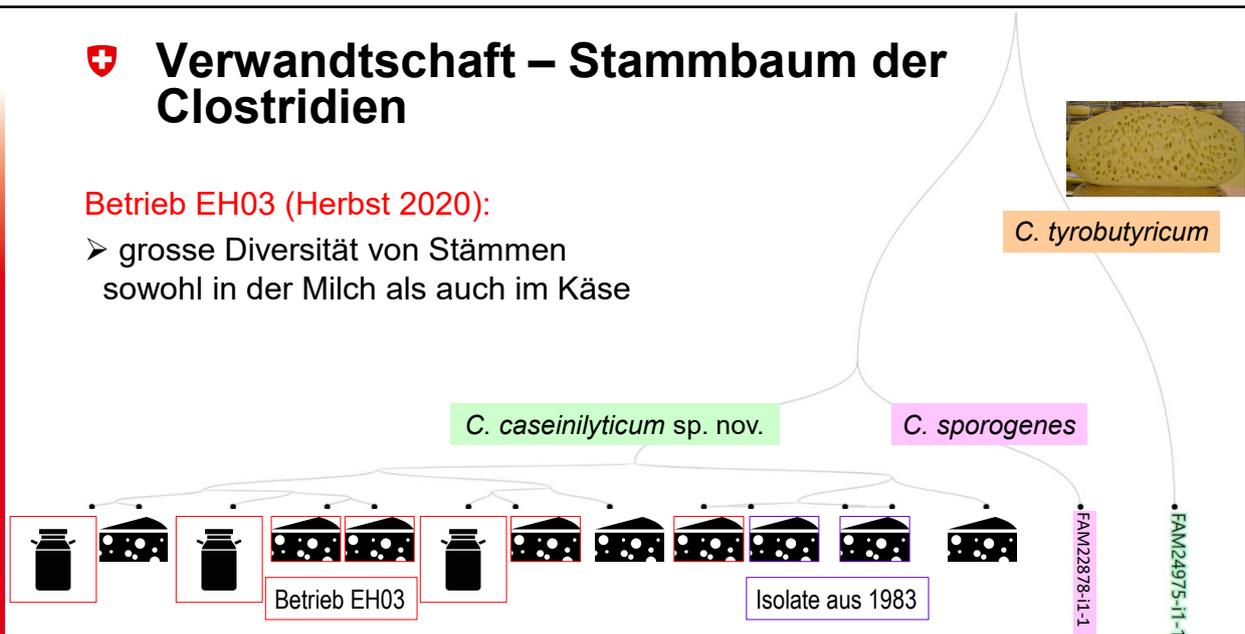
# Verwandtschaft – Stammbaum des Menschen



## 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](http://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

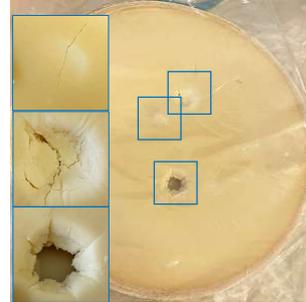
Council for Agricultural Research and Economics, Research Centre for Animal Production and Aquaculture (CREA-ZA), Via A. Lombardo 11, 26900, Lodi, Italy

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

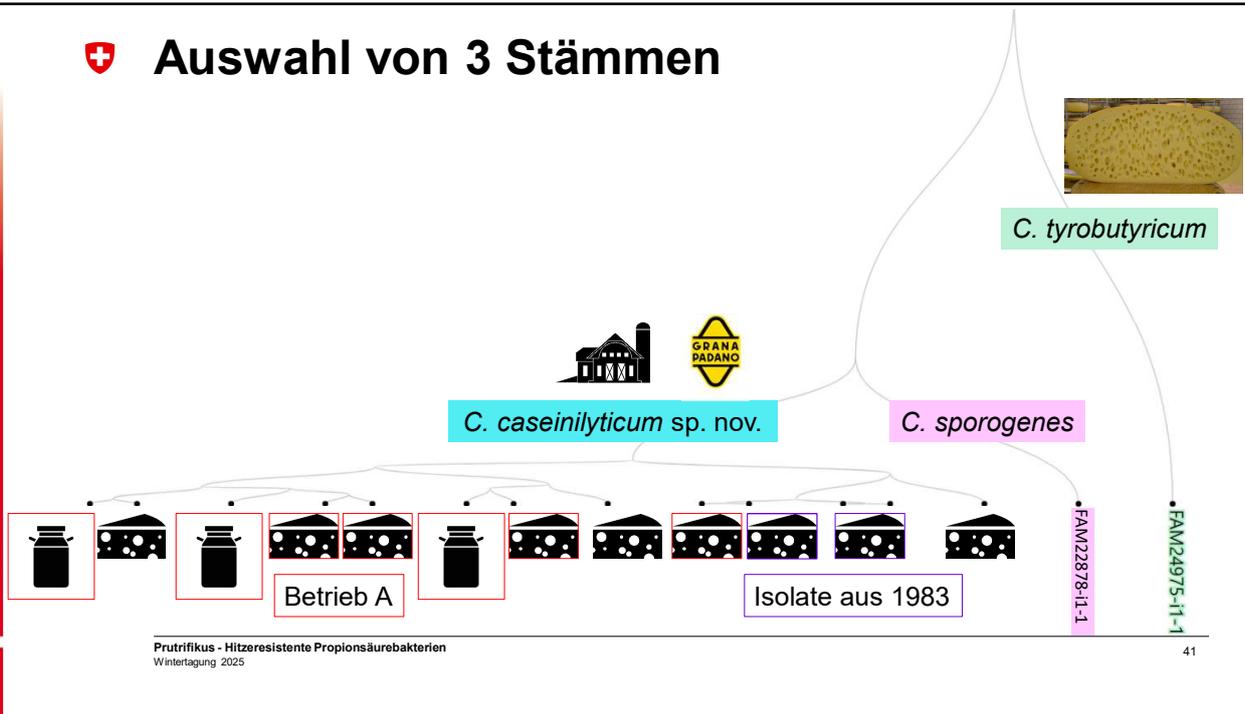


- Charakterisierung der Isolate aus verdorbenen und fehlerfreien Zonen desselben Käselais  
→ zwei verschiedenen vorherrschenden Stämmen von *C. sporogenes*, die zwei getrennten genetischen Linien entsprechen, mit bemerkenswerten morphologischen und taxonomischen Unterschieden

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

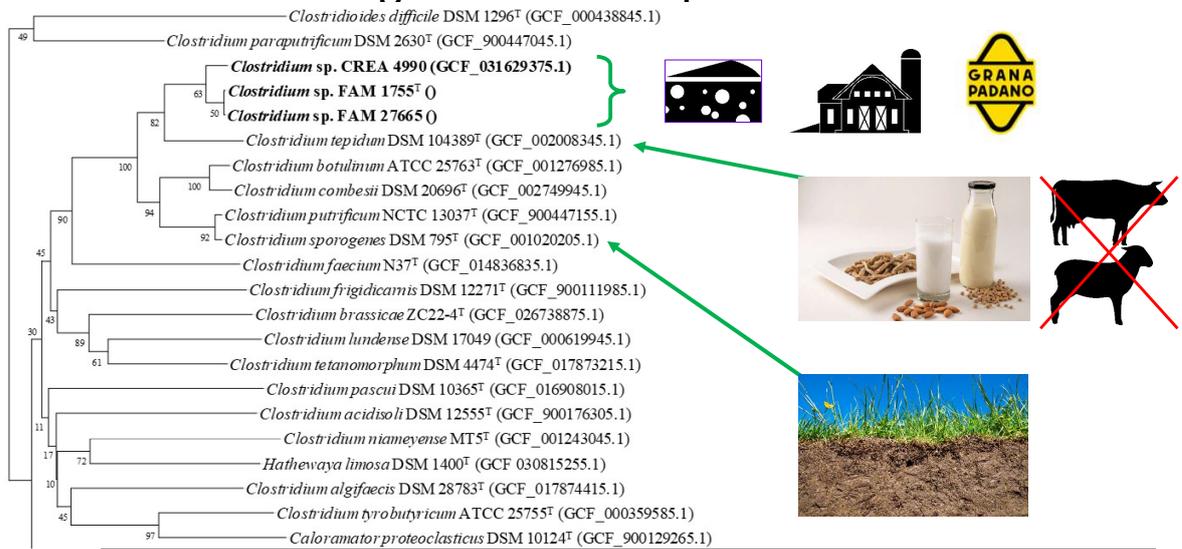
Noam Shavit<sup>1\*</sup>, Miriam Zanon<sup>2</sup>, Fatme Bealoui<sup>3</sup>, Daniel Marzohl<sup>1</sup>, Emilie Michellod<sup>3</sup>, Katia Gindro<sup>3</sup>, Giorgio Giraffa<sup>2</sup> and Emmanuelle Girard<sup>4</sup>

**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



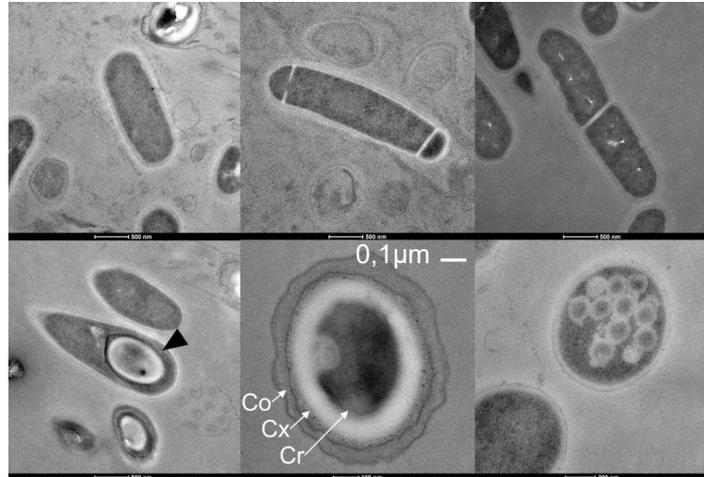
## Beschreibung der neuen Spezies

*C. caseinilyticum* sp. nov.



Casein-Abbau auf Magermilch-Agar

TEM Mikroskopie



Prutrifikus - Hitzeresistente Propionsäurebakterien  
Wintertagung 2025

45



## Beschreibung der neuen Spezies

*C. caseinilyticum* sp. nov.



FAM 1755<sup>T</sup>



CREA 4990



FAM 27665

*C. tepidum*



DSM 104389<sup>T</sup>

*C. sporogenes*



DSM 795<sup>T</sup>

	FAM 1755 <sup>T</sup>	CREA 4990	FAM 27665	DSM 104389 <sup>T</sup>	DSM 795 <sup>T</sup>
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



## 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

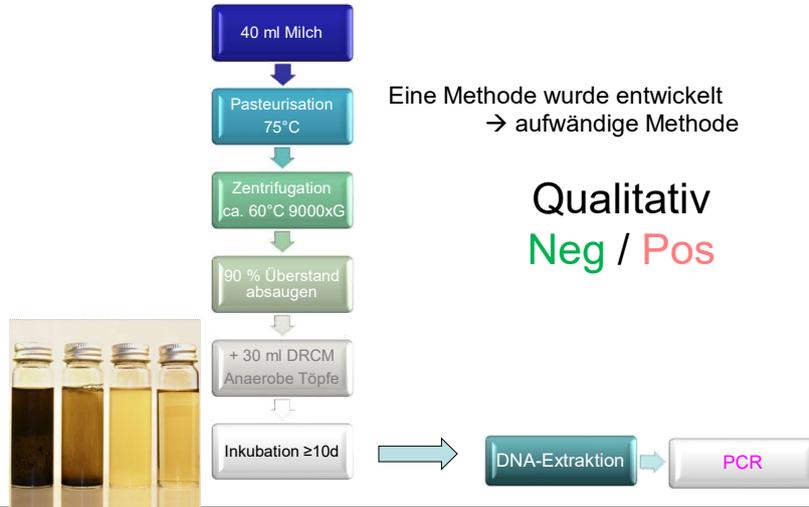


### Bestandsaufnahme :

- 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



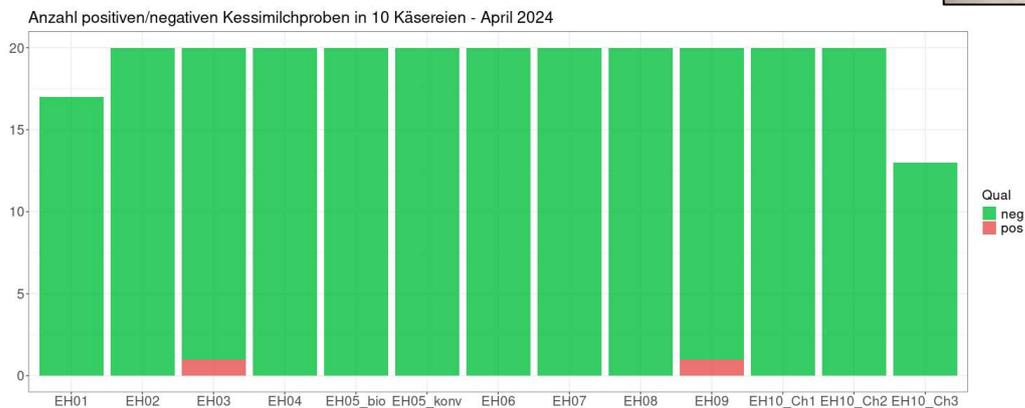
Prutrifikus - Hitzeresistente Propionsäurebakterien  
Wintertagung 2025

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



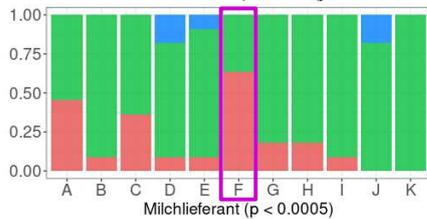
Putrifikus - Hitzeresistente Propionsäurebakterien  
Wintertagung 2025



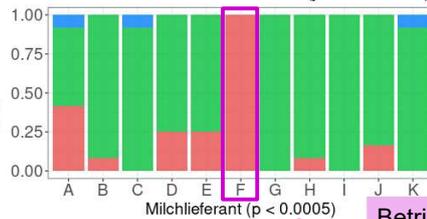
# Putrifikus in Lieferantenmilchen – Käserei EH03

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

Lieferantenmilchen Sept 2020 (je 11 Proben)



Lieferantenmilchen Okt 2020 (je 12 Proben)

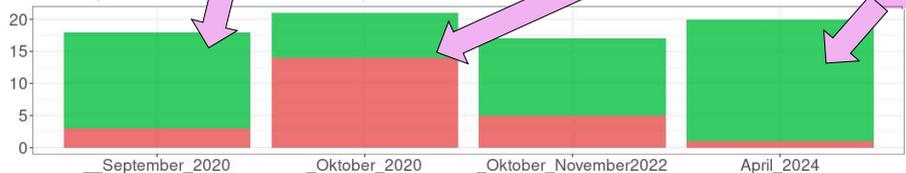


$p < 0.005$

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

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



## 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

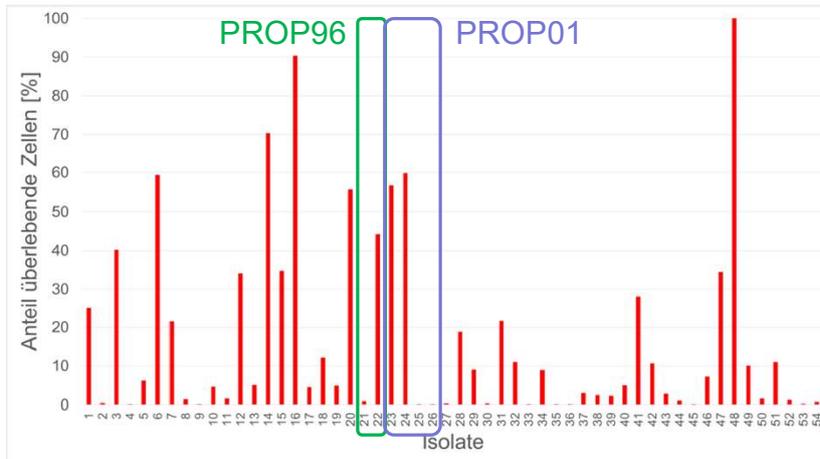


Abbildung 3. Prozentuales Überleben der Brenntemperatur [„Keimzahl nach Brenntemperatur“ / „Keimzahl vor Brenntemperatur“ \* 100].

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

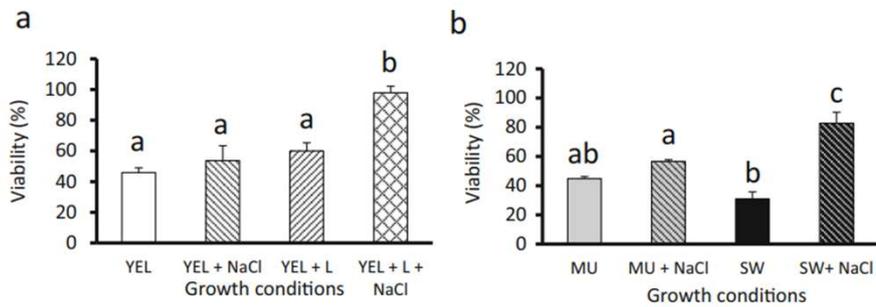
Floriane Gaucher<sup>1,2</sup> · Houem Rabah<sup>1,3</sup> · Koffigan Kponouglo<sup>1</sup> · Sylvie Bonnassie<sup>1,4</sup> · Sandrine Pottier<sup>5</sup> · Anne Dolivet<sup>1</sup> · Pierre Marchand<sup>2</sup> · Romain Jeantet<sup>1</sup> · Philippe Blanc<sup>2</sup> · Gwénaél Jan<sup>1</sup>

Prutrifikus - Hitzeresistente Propionsäurebakterien  
Wintertagung 2025

58

58

## Hitzeresistenz - Literatur



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

Prutriffikus - 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

Prutriffikus - Hitzeresistente Propionsäurebakterien  
Wintertagung 2025

60

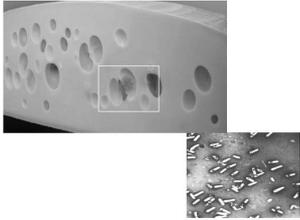




ALP forum 2005, Nr. 20 d

**BUTTERSÄUREBLÄHUNG – NOCH IMMER AKTUELL**

Diskussionsgruppen Emmentaler



**agroscope**  
LIEBEFELD-POISEUX

ALP aktuell 2006, Nr. 25

**PRODUKTION VON BUTTERSÄUREBAKTERIENARMER MILCH**

Merktblatt für die Praxis



**Jean-Pierre Hatz:**

Milch, welche für die Käseherstellung aus Rohmilch mit einer hohen Buttersäurebakterienzahl gewonnen ist, verleiht dem Käse einen besonderen Geschmack. In der Schweiz hingegen ist es üblich, dass die Milch vor dem Erzeugen in Form von Käse, Emmentaler oder Tilsiter Buttersäurebakterienarm ist.

Die wirtschaftlichen Konsequenzen einer steigenden Rohmilchzahl sind immens, da es keine Möglichkeit gibt, Käse zu produzieren, welcher durch eine Buttersäurebakterienzahl abgemildert wurde. Auch Käse, welcher in Schmelzform hergestellt wird, kann durch die Anwesenheit von Buttersäurebakterien in der Milch zu einer erhöhten Säurezahl während der Erzeugung von Käse führen.

Die Produktion von Buttersäurebakterienarmer Milch ist ein Ziel, das durch die Reduzierung der Buttersäurebakterienzahl in der Milch vor der Verarbeitung erreicht werden kann. Dies ist durch die Verwendung von Filtern, die die Buttersäurebakterien entfernen, möglich. Die Filter müssen jedoch regelmäßig gewechselt werden, um eine Kontamination zu vermeiden.

Die Reduzierung der Buttersäurebakterienzahl in der Milch ist ein Ziel, das durch die Verwendung von Filtern, die die Buttersäurebakterien entfernen, erreicht werden kann. Dies ist durch die Verwendung von Filtern, die die Buttersäurebakterien entfernen, möglich. Die Filter müssen jedoch regelmäßig gewechselt werden, um eine Kontamination zu vermeiden.

**Elisabethine Bader**  
Christine Bader  
Christine Bader

**Elisabethine Bader**  
Christine Bader  
Christine Bader

**Prutrifikus - Hitzeresistente Propionsäurebakterien**  
Wintertagung 2025



# Belastung der Milch mit Sporen

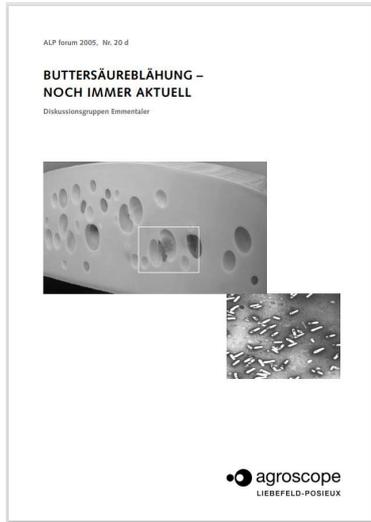
## Einflussfaktoren:

- 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 Käseerei

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

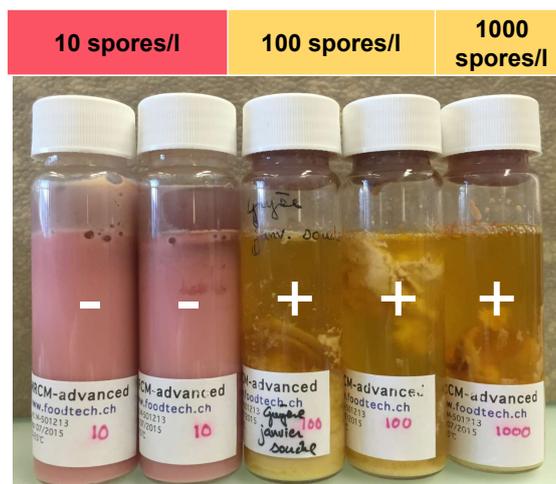


Prutrifikus - Hitzeresistente Propionsäurebakterien  
Wintertagung 2025

67



## Versuch in der Versuchskäserei Inokulieren von Sporen in die Kessimilch



Prutrifikus - Hitzeresistente Propionsäurebakterien  
Wintertagung 2025

68