

# Vergleich von Methoden zur Bestimmung der Buttersäurebakterien in Milch

Ernst Jakob<sup>1</sup> und Daniel L. Glauser<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Agroscope, 3003 Bern, Schweiz

<sup>2</sup>Suisselab AG, 3052 Zollikofen, Schweiz

Auskünfte: Daniel L. Glauser, E-Mail: daniel.glauser@suisselab.ch



Die AMP-6000<sup>®</sup> Plattform der Firma SY-LAB bestehend aus dem APS Pipettier-Roboter und der Scaneinheit.

## Einleitung

Die Buttersäuregärung, auch als Spätblähung bezeichnet, zählt zu den gefürchtetsten Fehlgärungen in Käse. Verursacht wird sie hauptsächlich durch Sporen von *Clostridium tyrobutyricum*. In selteneren Fällen werden auch *C. butyrium* und *C. beijerinckii* als Verursacher von Buttersäuregärungen nachgewiesen. Eine weitere Clostridienspezies, *C. sporogenes*, ist bekannt als Verursacherin der Weissfäule in Emmentaler Käse. Die genannten Keime werden auch als käseschädliche Clostridien, anaerobe Sporen oder Buttersäurebakterien bezeichnet und finden sich im Boden und vor allem in qualitativ schlechter Silage (Wyss und Goy 2012). Beim Melken können die Sporen in die Milch und damit in den Käse gelangen. Schon 50 Sporen pro Liter Milch können zum Verderb der Käse führen. Milch aus Betrieben, die Silage verfüttern, kann nur nach technologischer Sporenreduktion

sicher zu Käse verarbeitet werden oder nach Zusatz ungeliebter Konservierungsmittel wie Nitrat oder Lysozym. Die gängigste Milchbehandlung ist die Baktofugation, mit welcher 90 bis 99% der hitzeresistenten Bakteriosporen eliminiert werden können (Jakob und Eugster 2016). Bei starker Sporenbelastung der Milch kann die Sporenreduktion ungenügend sein, so dass trotzdem Fehlgärungen im Käse auftreten können. In der Herstellung von Rohmilchkäse ist die Baktofugation nicht anwendbar. Es bleibt nur die Verarbeitung von besonders sporenarmer Rohmilch. In jedem Fall sind die Käsereien gut beraten, die angelieferte Milch auf eine Belastung mit anaeroben Sporen zu überwachen.

Für den Nachweis von käseschädlichen anaeroben Sporen kommen in den milchwirtschaftlichen Laboratorien der Schweiz vor allem zwei Methoden zur Anwendung,

die sogenannte MPN-Methode (CNERNA 1986) und die Filtrationsmethode nach Bourgeois (Bourgeois *et al.* 1984). Die MPN-Methode verwendet die nicht-selektive Bryant Burkey Bouillon mit Laktat und Resazurin und schätzt den wahrscheinlichen Sporengehalt (Most Probable Number) der Probe anhand eines mathematischen Verfahrens. Die Filtrationsmethode ist ein Koloniezählverfahren unter Verwendung eines selektiven Agarmediums (Reinforced Clostridium Medium RCM mit Cycloserin). Im Jahr 2018 hat die Firma SY-LAB eine neue Methode zur Quantifizierung der anaeroben Sporen in Milch vorgestellt (Brändle *et al.* 2018). Die Methode verwendet ebenfalls das Nährmedium RCM, welches aber neben Cycloserin zusätzlich das Antibiotikum Trimethoprim enthält. Die Methode ermöglicht die Automatisierung gewisser Arbeitsschritte und verspricht eine schnellere selektive Bestimmung der käseschädlichen anaeroben Sporen in Milch. Ziel der vorliegenden Studie war, die neue Methode von SY-LAB mit den in der Schweiz gängigen Methoden zu vergleichen.

## Material und Methoden

Während der Wintermonate, wo die Sporenbelastung der Milch erfahrungsgemäss erhöht ist, wurden 93 Lieferantenmilchproben aus silagefreier Milchproduktion (SILFRE) erhoben. Hinzu kamen 217 Milchproben aus Betrieben mit Silagefütterung, wovon 110 Milchproben aus Tanks von Sammelfahrzeugen (SILS) und 107 aus den Milchtanks einzelner Milchproduzenten (SILE) stammten. Für die Analyse wurden die Milchproben in drei Aliquote geteilt und an die spezialisierten Labore geliefert. Die Sporengehalte jeder Milch wurden mit drei verschiedenen Methoden gemessen. Zur Anwendung kam das System AMP-6000® unter Verwendung des chromogenen Selektiv-Nährmediums AmpMedia 666 (Art. Nr. 62-166613, SY-LAB Geräte GmbH, A-3011 Neupurkersdorf), in der Folge MSYL genannt. Es handelt sich um ein neuartiges MPN-Verfahren im Mikrotiterplattenformat (Brändle *et al.* 2018). Zur Pasteurisation wurden je 27 ml Milch in 50 ml Pasteurisationsröhrchen mit Siebeinsatz (Art. Nr. 62-502200+, SY-LAB Geräte GmbH, A-3011 Neupurkersdorf) verbracht und für 20 min im zugedeckten Wasserbad bei 80 °C inkubiert. Nach einem kurzen Abkühlungsschritt (5 min im Wasserbad bei Raumtemperatur) wurden pro Probe 9 ml des AmpMedia 666 zugegeben. 96 × 320 µl des Milch-Medium-Gemisches (entspricht 96 × 240 µl Milch) wurden anschliessend mittels des AMP-6000 APS Pipettiersystems auf die Mikrotiterplatten (Art. Nr. 62-503060, SY-LAB Geräte GmbH, A-3011 Neupurkersdorf) verteilt. Die befüllten Mikro-

## Zusammenfassung

Zur Überwachung von käseschädlichen anaeroben Sporen in der Rohmilch – auch Buttersäuresporen genannt – wurden die zurzeit in der Schweiz verwendeten Analysemethoden (MPN-Methode nach CNERNA und Filtrationsmethode nach Bourgeois) mit einer neuen Methode (SY-LAB) verglichen. Dies fand im Rahmen der alljährlichen Winterkampagne eines Milchverarbeiters statt. Zu diesem Zweck wurden 93 Milchproben aus silagefreier und 217 Proben aus nicht silagefreier Milchproduktion jeweils mit allen drei Methoden untersucht. Bei der Silomilch überzeugte die neue Methode gegenüber den anderen Methoden mit einer grösseren Genauigkeit und einem sehr grossen Messbereich von 44 bis 19 000 Sporen/L. Bei den Milchproben aus silagefreier Milchproduktion wurden mit der neuen Methode nur in 9 % der Proben Sporen nachgewiesen, mit der Filtrationsmethode in 29 % (Nachweisgrenze 25 Sporen/L) und mit der MPN-Methode in 44 % der Proben (Nachweisgrenze 53 Sporen/L). Die neue Methode vereint den Vorteil der Spezifität der Filtrationsmethode mit der Robustheit von MPN-Verfahren und könnte darum trotz der geringeren Empfindlichkeit nicht nur für Silomilch, sondern auch für silofreie Milch Vorteile bieten.

titerplatten wurden in nox-18 Anaeroben-Gefässe (Art. Nr. 60-300100, SY-LAB Geräte GmbH, A-3011 Neupurkersdorf) überführt und mittels eines PetriSphere Systems (Biotool AG, CH-3422 Kirchberg) mit Schutzgas (H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> bioreduce 10/10 %, PanGas AG, CH-6252 Dagmersellen) begast. Allfälliger Restsauerstoff wurde mit Hilfe des OXOID Anaerobier-Sicherheitskatalysators (Thermo Fisher Diagnostics AG, CH-4133 Pratteln) eliminiert. Nach anaerober Bebrütung während 48 ± 2 h bei 37 °C wurden die Platten mit Hilfe des AMP-6000 Scanners und der zugehörigen Software ausgewertet.

Als Vergleichsmethoden kamen die modifizierte Filtrationsmethode nach Bourgeois (Bourgeois *et al.* 1984; Jakob *et al.* 2011) sowie die MPN-Methode nach CNERNA (CNERNA 1986) zum Einsatz. Für den Methodenvergleich wurden Labore gewählt, die jeweils eine der Methoden routinemässig einsetzen und entsprechend erfahren waren. Die verwendeten Methoden und Untersuchungsformate sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

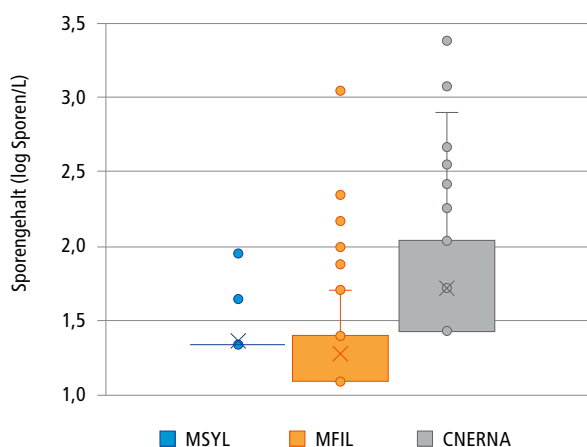
**Tab. 1** | Verwendete Methode zur Zählung der anaeroben Sporen (MPN-Format beziehungsweise Probenvolumen, Nachweisgrenze NG und obere Bestimmungsgrenze oBG [Sporen/Liter])

Methoden	Milch aus Silagefütterung Sammelwagen (SILS)	Milch aus Silagefütterung Einzellieferanten (SILE)	Silagefreie Milch Einzellieferanten (SILFRE)
SY-LAB AMP-6000 (MSYL)	96 × 240 µl [NG = 44] [oBG = 19 000]	96 × 240 µl [NG = 44] [oBG = 19 000]	96 × 240 µl [NG = 44] [oBG = 19 000]
MPN-Methode nach CNERNA (CNERNA)	5 × 1 ml + 5 × 0,1 ml [NG = 180] [oBG = 16 000]	5 × 1 ml + 5 × 0,1 ml [NG = 180] [oBG = 16 000]	10 × 2 ml [NG = 53] [oBG = 12 000]
Filtrationsmethode (MFIL)	40 ml [NG = 25] [oBG = 1250]	20 ml [NG = 50] [oBG = 2500]	40 ml [NG = 25] [oBG = 1250]

Zur Ermittlung der Wiederholpräzision der verschiedenen Methoden wurden fünf Mischmilchproben (SILE) je zehnmal in Serie untersucht. Die Vergleichspräzision für die AMP-6000 Methode wurde anhand der mitgeführten Positivkontrolle geschätzt, welche an zwölf verschiedenen Tagen verteilt über einen Zeitraum von 70 Tagen je einmal untersucht wurde.

### Statistische Auswertung

Für die Auswertung wurden alle Messwerte logarithmiert. Um auch Ergebnisse ausserhalb der Bestimmungsgrenzen (< Nachweisgrenze; > obere Bestimmungsgrenze) in die Auswertung einbeziehen zu können, wurde diese wie folgt durch Zahlwerte ersetzt: «<NG» = NG/2; «>oBG» = 2 × oBG. Die Bland-Altman-Diagramme wurden aber ohne diese Ersatzwerte erstellt. Die Standardabweichung der Wiederholbarkeit wurde mit Hilfe einer einfachen Varianzanalyse (Systat 13, SYSTAT Software Inc.) errechnet.

**Abb. 1** | Vergleich der Methoden bezüglich der gemessenen Sporengelichte in Milch von Betrieben mit silagefreier Fütterung (N=93).

## Resultate und Diskussion

### Untersuchung von silagefrei produzierter Milch

Mit der CNERNA Methode, welche das nicht-selektive Bryant Burkey Medium verwendet, wurden erwartungsgemäss höhere Sporengelichte gemessen als mit den anderen beiden Methoden, welche ein Selektivmedium verwenden. Dies zeigte sich vor allem bei den 93 Milchproben aus silagefreier Milchproduktion (Abb. 1). Mit den Methoden MSYL und MFIL zeigten 91 bzw. 71 % der Proben Sporengelichte unterhalb der Nachweisgrenze, bei CNERNA (Format 10 × 2 mL) nur 56 %. MSYL ergab keine Werte über 100 Sporen/Liter, bei MFIL lagen vier Proben über diesem Wert, bei CNERNA 24 Proben. Mittelwertvergleiche liessen sich mit den wenigen Zahlen nicht anstellen.

### Untersuchung von Milch aus Silagefütterung

Bei den total 217 Milchproben aus Silagefütterung wurden nur in ca. 10 % der Fälle Sporengelichte unterhalb der Nachweisgrenze der jeweiligen Methode erhalten. Die Streuung der Messwerte bei den Proben aus Sammelfahrzeugen war erwartungsgemäss geringer als bei jenen von Einzellieferanten (Abb. 2). Die CNERNA Methode ergab signifikant höhere Sporengelichte als die anderen beiden Methoden (Tab. 2).

Bei den Milchproben aus Sammelwagen (SILS), von denen weniger als 5 % einen Sporengelicht unterhalb der Nachweisgrenzen der Methoden aufwiesen, wichen die Werte der Methoden MFIL und MSYL signifikant voneinander ab ( $P < 0,001$ ). Bei den Einzellieferanten (SILE), wo zwischen 14 und 23 % der Proben Werte unterhalb der Nachweisgrenzen ergaben, war der Unterschied zwischen MFIL und MSYL nicht signifikant ( $P = 0,67$ ).

Die Bland-Altman Diagramme in den Abbildungen 3 und 4 zeigen die Übereinstimmung der neuen Me-

**Tab. 2 | Mit den drei Methoden gemessene mittlere Sporengehalte in den Milchproben aus Silagefütterung**

Methode	Milchproben aus Sammelwagen (SILS, N= 110)	Milchproben von Einzellieferanten (SILE, N= 107)
	Mittelwert* log Sporen/L (Sporen/L)	Mittelwert* log Sporen/L (Sporen/L)
MSYL	2,877 <sup>a</sup> (753)	2,612 <sup>a</sup> (410)
MFIL	2,577 <sup>b</sup> (377)	2,508 <sup>a</sup> (322)
CNERNA	3,289 <sup>c</sup> (1945)	3,107 <sup>b</sup> (1280)

\*mit unterschiedlichen Buchstaben indizierte Werte in einer Spalte unterscheiden sich signifikant ( $P < 0,001$ )

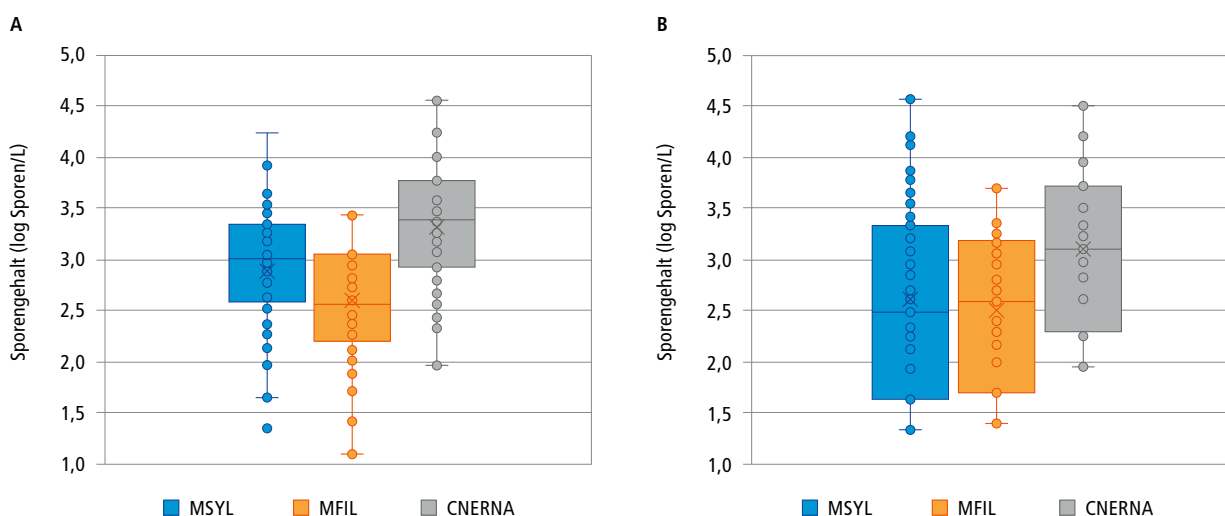
thode MSYL mit den bestehenden Methoden CNERNA und MFIL. Für die Diagramme wurden jene Proben aus Silagefütterung zusammengefasst, die mit beiden Methoden einen Zahlenwert als Ergebnis lieferten. Wie in Abbildung 3 dargestellt ist, ergab die Methode MSYL gegenüber der Methode CNERNA im Mittel um  $-0,416$  log Sporen/L ( $N=169$  Wertepaare) tiefere Sporengehalte. Dieser Wert stimmt gut mit den Angaben von Brändle *et al.* (2018) überein, die eine mittlere Abweichung von  $-0,39 \pm 0,04$  log Sporen/L gegenüber der CNERNA Methode ermittelten. Die Regressionsanalyse unserer Messwerte ergab die Beziehung  $MSYL = 0,868 \times CNERNA$  (log Sporen/L), bei einem Korrelationskoeffizienten von  $r=0,749$ . Die Konstante war nicht signifikant von Null verschieden ( $P=0,43$ ). Brändle *et al.* (2018) errechneten dagegen eine Beziehung  $MSYL = -0,54 + 1,06 \times CNERNA$

(log Sporen/L), sie berücksichtigten aber auch Ergebnisse ausserhalb der Bestimmungsgrenzen (ersetzt durch Zahlenwerte).

Im Vergleich von MSYL und MFIL (Abb. 4) zeigte MSYL im Durchschnitt um  $0,226$  log Sporen/L höhere Werte ( $N=137$  Wertepaare). Die Regressionsanalyse ergab die Beziehung  $MSYL = 1,459 + 0,504 \times MFIL$  (log Sporen/L) mit einem Korrelationskoeffizienten von  $r=0,407$ . Letzterer liegt tiefer als der in der Gegenüberstellung von MSYL und CNERNA erhaltene Wert von  $r=0,749$ . Der Unterschied erklärt sich dadurch, dass der Messbereich von MSYL mit  $50\text{--}2500$  Sporen/L deutlich enger ist als bei der CNERNA Methode ( $180\text{--}16\,000$  Sporen/L).

### Präzision der Methoden

Die Standardabweichung der Wiederholbarkeit  $s_r$ , d.h. die Streuung der Messwerte bei mehrfacher Analyse einer Probe in Serie (gleicher Tag, gleiche Reagenzien usw.) wurde durch wiederholte Untersuchung von je fünf verschiedenen Mischmilchproben ermittelt. Anhand dieser Proben, die Sporengehalte zwischen  $600$  und  $1300$  Sporen/L aufwiesen (gemessen mit MSYL), wurde für die Methode MSYL ein sehr guter Wert von  $s_r=0,105$  (log Sporen/L) ermittelt. Wie Tabelle 3 zeigt, war  $s_r$  bei den Methode MFIL und CNERNA rund doppelt so hoch. Die geringere Streuung von MSYL erklärt sich in erster Linie durch die grundsätzlich höhere Genauigkeit eines MPN-Formates mit  $96$  Teilreaktionen gegenüber einem solchen mit nur zehn (CNERNA). Dieser Vorteil der Methode MSYL wird aber bei sporenarmer Milch aus silagefreier Produktion unerheblich. Untersucht man z.B. eine Milch mit  $100$  Sporen pro Liter ( $2$  Sporen


**Abb. 2 | Vergleich der Methoden bezüglich der gemessenen Sporengehalte in Milch aus Silagefütterung. A) Milchproben aus Sammelfahrzeugen, B) Milchproben von Einzellieferanten**

**Tab. 3 | Messunsicherheit der Methoden ermittelt anhand von Mischmilchproben aus Silagefütterung.**

	$s_r$ (log Sporen/L)*	$s_R$ (log Sporen/L)**
MSYL (96 × 0,24 ml = 23,04 ml Milch)	0,105	0,18*
MFIL (1 × 20 ml Milch)	0,213	n.v.
CNERNA (5 × 1 + 5 × 0,1 ml = 5,5 ml Milch)	0,203	n.v.

\*10 serielle Analyse von 5 verschiedenen Mischproben

\*\*Vergleichspräzision von Tag zu Tag (12 einfache Analysen im Zeitraum von 70 Tagen, Sporengehalt der Milch 626 Sporen/L). n.v. = nicht ermittelt

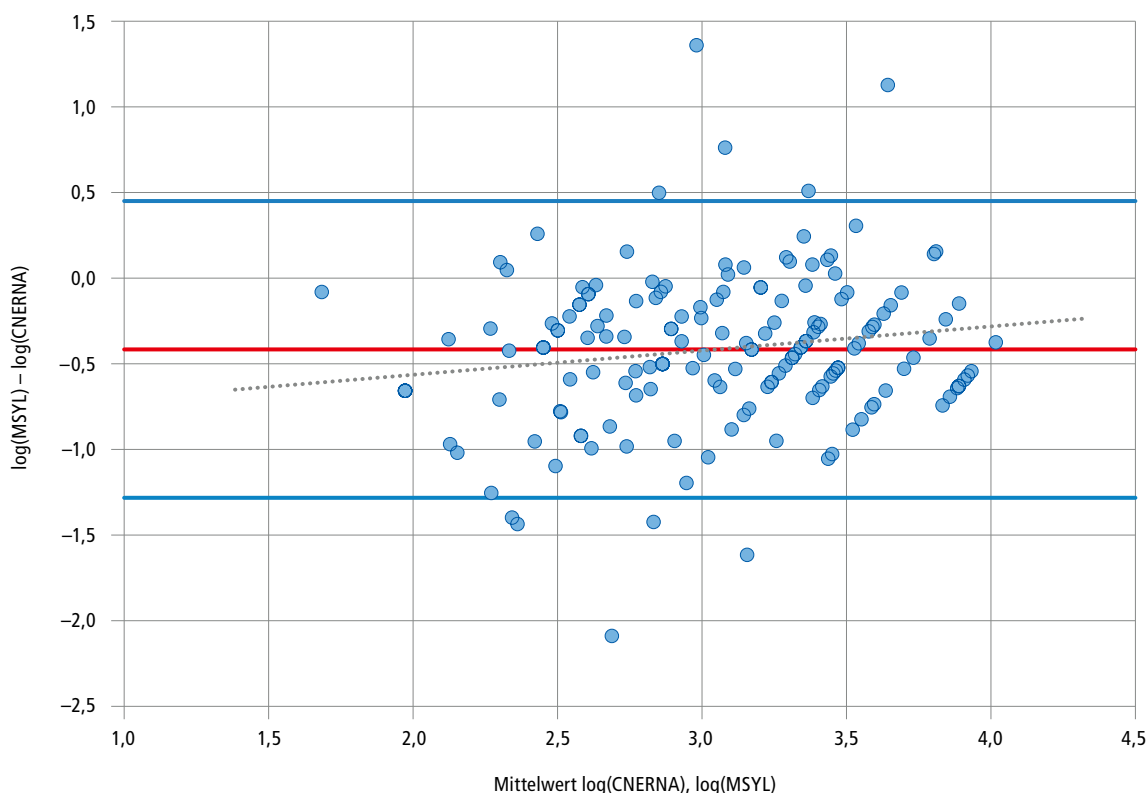
in 20 ml) ist es nicht entscheidend, ob man 20 ml Probe auf 96 (MSYL) oder auf 10 Gefässe (CNERNA 10 × 2 ml) verteilt.

Die Standardabweichung der Vergleichbarkeit  $s_R$  wurde nur für MSYL ermittelt und zwar anhand von zwölf Analysen der immer gleichen Mischmilchprobe verteilt über einen Zeitraum von 70 Tagen. Dabei wurde ein Wert von  $s_R = 0,18$  (log Sporen/L) ermittelt. In einem Ringtest mit verschiedenen Milchproben und mit Beteiligung verschiedener Laboratorien würde  $s_R$  vermutlich höher ausfallen. Die vergangenen Ringtests von Agroscope haben

aber gezeigt, dass MPN-Methoden relativ robust sind, so dass der Beitrag der Labore zur gesamten Messunsicherheit kleiner ist als bei der Filtrationsmethode (MFIL).

### Richtwerte für Sporengehalte von Milch

Da es sich bei MSYL um eine neue Methode handelt, müssen auch neue Höchstwerte für die Sporengehalte der Milch festgelegt werden. Diese sollten mit den Höchstwerten korrespondieren, die bei Anwendung der derzeit eingesetzten Methoden gelten. Tabelle 4 gibt einen Überblick über die Anteile der Milchproben von Einzellieferanten (SILE und SILFRE), die bestimmte Sporengehalte überschritten haben. Bei Lieferantenmilch aus silagefreier Produktion werden bei Anwendung der CNERNA Methode (Format 10 × 2 ml) Sporengehalte von  $\geq 350$  Sporen/L beanstandet, was bei den hier untersuchten Proben SILFRE eine Beanstandungsquote von 8 % ergeben hätte. Diese Quote entspricht annähernd dem Anteil von 9 % der Proben mit  $\geq 44$  Sporen/L gemessen mit der Methode MSYL. Mit MFIL, wo in der Regel nur Sporengehalte von  $< 25$  Sporen/L toleriert werden, hätten 29 % der Proben SILFRE beanstandet werden müssen. Für Milch aus Silagefütterung gibt es keine einheitlichen Höchstwerte. Solche werden in der Regel von den



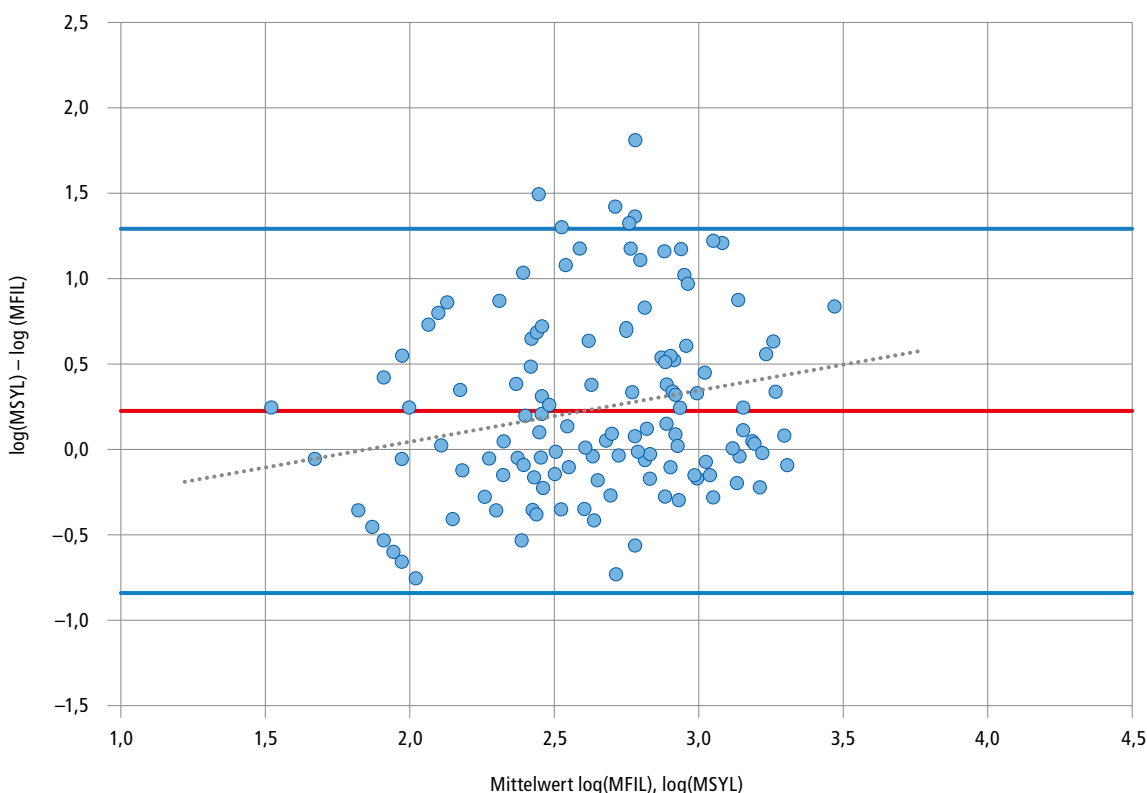
**Abb. 3 | Bland-Altman-Diagramm des Vergleichs der Methoden MSYL und CNERA (N = 169 Milchproben aus Silagefütterung). Die rote Linie zeigt die mittlere Abweichung zwischen den Methoden, die blauen Linien umfassen den Vertrauensbereich.**

**Tab. 4 | Vergleich der Analysemethoden hinsichtlich der Anteile von Lieferantenmilchproben, die bestimmte Sporengehalte überschreiten**

Methode	Proben SILE (N=107)		Proben SILFRE (N=93)	
	Sporengesamt	Anteil	Sporengesamt	Anteil
MSYL	≥ 1000	36 %		
MSYL	≥ 2000	25 %	≥ 44 (≥ NG)	9 %
MSYL	≥ 4000	20 %	≥ 88	2 %
MFIL	≥ 1000	36 %	≥ 25 (≥ NG)	29 %
MFIL	≥ 1500	26 %	≥ 50	17 %
MFIL	≥ 2000	22 %	≥ 75	8 %
CNERNA	≥ 2000	39 %	≥ 180	14 %
CNERNA	≥ 4000	26 %	≥ 260	10 %
CNERNA	≥ 6000	21 %	≥ 350	8 %

Milchkäufern selbst festgelegt und richten sich nach der verwendeten Technologie der Sporentfernung (einfache Baktofugation, Doppelbaktofugation). In jedem Fall sind auch für Milch aus Silagefütterung je nach Methode andere Höchstwerte festzulegen. Wie Tabelle 4 zeigt, wäre bei Anwendung der folgenden Höchstwerte eine jeweils ähnliche Beanstandungsquote um 25 % zu er-

warten: MSYL < 2000, MFIL < 1500, CNERNA < 4000 Sporen/L. Eine Beanstandungsquote von 25 % scheint hoch und mag dafürsprechen, die Höchstwerte eher höher anzusetzen. Unsere Erfahrungen zeigen aber, dass die Sporengehalte der Milch bei guter Silagequalität und Melkhygiene deutlich unter 1000 Sporen/L (MFIL) gehalten werden können.



**Abb. 4 | Bland-Altman-Diagramm des Vergleichs der Methoden MSYL und MFIL (N= 137 Milchproben aus Silagefütterung). Die rote Linie zeigt die mittlere Abweichung zwischen den Methoden, die blauen Linien umfassen den Vertrauensbereich.**

## Schlussfolgerungen

Die neue Methode MSYL zur Quantifizierung käseschädlicher Sporen in Milch präsentiert sich als interessante Alternative zu den beiden derzeit in der Schweiz angewandten Analysemethoden, der MPN-Methode (CNERNA) und der Filtrationsmethode (MFIL). Mit Bestimmungsgrenzen von minimal 44 und maximal 19000 Sporen/L weist die Methode einen sehr breiten Messbereich auf. Dies hat den Vorteil, dass die Methode nicht an den jeweils erwarteten Sporengehalt der Milch angepasst werden muss und sowohl für Milch aus silagefreier Milchproduktion als auch für «Silomilch» geeignet ist. Auch bezüglich der Präzision (Wiederholbarkeit) zeigt sich die neue Methode überlegen, vor allem bei höheren Sporengehalten der Milch. In der Untersuchung von Proben aus silagefreier Milchproduktion bietet die Methode den Vorteil der hohen Selektivität gegenüber den kä-

seschädlichen Clostridiensporen. Die neue Methode ist diesbezüglich vergleichbar mit der Filtrationsmethode, ist jedoch etwas weniger empfindlich (Nachweisgrenze von 44 statt 25 Sporen/L).

Diesen Nachteil kann die neue Methode aber womöglich mit einer grösseren Robustheit kompensieren. Weitere Vorteile der neuen Methode sind die Analysendauer von nur zwei Tagen und die Automatisierbarkeit gewisser Arbeitsschritte. Und im Unterschied zur Filtrationsmethode eignet sie sich auch für die Analyse von Schaf-, Ziegen- und Büffelmilch. ■

### Dank

Die Autoren danken Florian Schmutz und Tsilla Sunier für ausgezeichnete technische Unterstützung sowie Roger Flury und Urs Bühler für die Bereitstellung von Milchproben und Analyseresultaten.



**Riassunto****Confronto tra i metodi per quantificare i batteri dell'acido butirrico nel latte**

Nell'ambito della campagna annuale invernale di un'azienda di trasformazione del latte per il controllo della contaminazione del latte crudo con spore anaerobiche dannose per il formaggio, note anche come spore di batteri butirrici, sono stati confrontati i metodi analitici attualmente utilizzati in Svizzera (metodo MPN secondo CNERNA e metodo di filtrazione secondo Bourgeois) usando un nuovo metodo (SY-LAB). A tal fine sono stati esaminati, usando i tre metodi, 93 campioni di latte provenienti da una produzione di latte senza insilati e 217 campioni di latte da una produzione con insilati. Per il secondo gruppo, il nuovo metodo è stato più convincente rispetto agli altri metodi, attestando una maggiore precisione e un campo di misura molto ampio, da 44 a 19000 spore/L. Nei campioni provenienti dalla produzione di latte senza insilati, le spore sono state rilevate solo nel 9 % dei campioni con il nuovo metodo, nel 29 % dei campioni con il metodo di filtrazione (limite di rilevamento 25 spore/L) e nel 44 % dei campioni con il metodo MPN (limite di rilevamento 53 spore/L). Il nuovo metodo combina il vantaggio della specificità del metodo di filtrazione con la robustezza dei metodi MPN e potrebbe quindi offrire vantaggi non solo per il latte prodotto con insilati, ma anche per il latte prodotto senza insilati, nonostante la minore sensibilità.

**Summary****Comparison of methods for quantifying butyric acid bacteria in milk**

As part of a milk processor's annual winter campaign for monitoring the contamination of raw milk with anaerobic spores harmful to cheese – also called butyric acid spores – the analysis methods currently used in Switzerland (MPN method according to CNERNA and filtration method according to Bourgeois) are compared with a new method (SY-LAB). To this end, 93 milk samples from silage-free and 217 samples from non-silage-free milk production were examined with all three methods. In the latter group, the new method delivered more impressive results than the other methods, thanks to its greater precision and a very large measurement range of 44 to 19,000 spores/L. In the milk samples from silage-free milk production, the new method detected spores in only 9 % of the samples, the filtration method in 29 % (detection level of 25 spores/L) and the MPN method in 44 % of the samples (detection level of 53 spores/L). In combining the filtration method's advantage of specificity with the robustness of MPN methods, the new method could offer advantages not just for silo milk, but also for silo-free milk, despite its lower sensitivity.

**Key words:** anaerobic spore counts, milk, analytical methods, comparison.

**Literatur**

- Wyss U. & Goy D., 2012. Sporengehalte an Buttersäurebakterien in Silagen und Feuchtheu unter der Lupe. *Agrarforschung Schweiz* 3 (11–12), 544–551.
- Jakob E. & Eugster E., 2016. Lebensmittelsicherheit von Käse: Verfahren zur Behandlung der Käseemilch. *Agrarforschung Schweiz* 7 (11–12): 476–483.
- 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.
- 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.
- Jakob E., Berta A., Bühler U., Gsell H. & Odermatt P., 2011. Quantitative Bestimmung käseschädlicher anaerober Sporen in Milch und Wasser – Membranfiltertechnik mit Selektivmedium. Forschungsbereich Mikrobielle Systeme von Lebensmitteln, Agroscope, CH-3003 Bern.
- 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.