

Gram-negative Bakterien in oberflächengereiften Weichkäsen



Rotholz 50a - 6200 Rotholz - Österreich

☎ +43 (0)5244 62262 📠 +43 (0)5244 62262 29

direktion@rotholz.lebensministerium.at - <http://www.bam-rotholz.at>

Bundesanstalt für Alpenländische Milchwirtschaft Rotholz

Abschlussbericht zu Projekt
BAM W22/03
Gram-negative Bakterien in
oberflächengereiften Weichkäsen

Diplomarbeit von Sigrid Neuhauser
(Institut für Mikrobiologie, Universität Innsbruck, 2005)

Externe Kooperationspartner: Käsereien

Projektleitung
Dr. Frieda Eliskases-Lechner & Dr. Peter Zangerl

Laufzeit: 2003 - 2005

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
Zielsetzung.....	2
Systematischer Überblick.....	2
Gram-negative Bakterien.....	2
Enterobacteriaceae.....	2
Coliforme Bakterien.....	3
2. Material und Methoden.....	5
Probenaufarbeitung.....	6
Nachweis Gram-negativer Bakterien.....	6
Nachweis von coliformen Bakterien und <i>E. coli</i>	6
Isolierung und Identifizierung Gram-negativer Bakterien.....	7
pH-Wert.....	7
Galactose und Lactose.....	7
Trockenmasse.....	7
Chlorid als NaCl.....	8
3. Ergebnisse.....	9
Betrieb A.....	9
Grüner Käse.....	9
Reifer Käse.....	10
Vergleich der Keimzahlen der grünen und reifen Käse.....	11
Artenspektrum.....	13
Chemische Daten.....	14
Betrieb B.....	15
Grüner Käse.....	15
Reifer Käse.....	15

Gram-negative Bakterien in oberflächengereiften Weichkäsen

Keimzahlvergleich der grünen und reifen Käse	16
Artenspektrum	17
Betrieb C.....	20
Grüner Käse	20
Reifer Käse	20
Vergleich der Keimzahlen der grünen und reifen Käse.....	21
Artenspektrum	21
Chemische Daten.....	24
Betrieb D.....	25
Grüner Käse	25
Reifer Käse	25
Vergleich der Keimzahlen der grünen und reifen Käse.....	26
Artenspektrum	27
Chemische Daten.....	29
Betrieb E.....	30
Grüner Käse	30
Reifer Käse	30
Vergleich der Keimzahlen der grünen und reifen Käse.....	31
Artenspektrum	32
Chemische Daten.....	34
Betrieb F	35
Grüner Käse	35
Reifer Käse	35
Vergleich der Keimzahlen der grünen und reifen Käse.....	36
Artenspektrum	38
Chemische Daten.....	38
4. Diskussion	39
5.Zusammenfassung	45
6. Literatur	47

1. Einleitung

Im Rahmen der Diskussion um die Festlegung neuer mikrobiologischer Grenzwerte für Lebensmittel wurde für Weichkäse eine Erweiterung des Spektrums von coliformen Bakterien auf Enterobacteriaceae diskutiert. Der Ersatz der Untersuchung auf coliforme Bakterien durch die Untersuchung auf Enterobakterien bei gleich bleibenden Grenzwerten würde aufgrund des größeren Keimspektrums eine Verschärfung der hygienischen Anforderungen an die Produzenten bedeuten. Bei der Weichkäseherstellung sind Rekontaminationen mit Enterobakterien und anderen Gram-negativen Bakterien mit der heute üblichen Technologie zwar weitgehend vermeidbar, nach einem Rekontaminationsereignis ist allerdings mit einer praktisch unvermeidbaren Vermehrung der Bakterien zu rechnen.

Die zurzeit in Österreich geltenden Grenzwerte laut Milchhygieneverordnung (MHVO) für *Escherichia coli* und coliforme Bakterien in Weichkäse aus pasteurisierter Milch sind in Tabelle 1 angegeben.

Tab. 1: Grenzwerte für Weichkäse aus wärmebehandelter Milch laut MHVO.

Mikroorganismen	Anforderungen
<i>E. coli</i>	m = 100 KBE/g M = 1 000 KBE/g n = 5 c = 2
Coliforme Bakterien	m = 10 000 KBE/g M = 100 000 KBE/g n = 5 c = 2

n = Anzahl der Proben;

m = Schwellenwert; das Ergebnis gilt als zufrieden stellend, wenn die Keimzahl jeder einzelnen Probe den Wert m nicht übersteigt;

M = Höchstwert; das Ergebnis gilt als nicht zufrieden stellend, wenn die Keimzahl einer oder mehrerer Proben den Wert M erreicht oder überschreitet;

c = Anzahl der Proben mit einer Keimzahl zwischen m und M; das Ergebnis gilt als akzeptabel, wenn die Keimzahl der übrigen Proben höchstens den Wert m erreicht.

Zielsetzung

Ziel der Arbeit war es, aktuelle Daten über das Vorkommen von Gram-negativen Bakterien in Weichkäse zu erhalten. Aus den Ergebnissen sollten Maßnahmen zu deren Beherrschung abgeleitet werden. Um die Bedeutung der verschiedenen Gruppen Gram-negativer Bakterien in oberflächengereiften Weichkäsen einschätzen zu können, wurde das typische Artenspektrum der Gram-negativen Bakterien in verschiedenen Weichkäsen bestimmt.

Außerdem wurden Oberfläche und der gesamte verzehrbare Anteil gesondert untersucht, um eine Aussage über die Keimzahlen und die Florazusammensetzung für beide Fraktionen treffen zu können.

Systematischer Überblick

Gram-negative Bakterien

Gram-negative Bakterien, die in Milch und Milchprodukten vorkommen können, gehören zu den Gattungen *Pseudomonas*, *Shewanella*, *Burkholderia*, *Chryseomonas*, *Acinetobacter*, *Gluconobacter*, *Acetobacter*, *Achromobacter*, *Flavobacterium*, *Vibrio* und *Aeromonas* (DESMASURES et al. 1997, RAJMOHAN et al. 2002, TERNSTRÖM et al. 1993, RIEMELT et al. 2003, CHAPMAN und SHARPE 1990).

Pseudomonaden kommen in ungenügend gereinigten Milchgeräten vor und sind in tiefgekühlter Rohmilch vorherrschend. Als Schadkeime bewirken sie vor allem bei nicht fermentierten flüssigen Milchprodukten, Butter und Käse Geschmacksfehler durch proteo- und lipolytische Aktivitäten. Hohe Keimzahlen von über 10^5 KBE/ml in der Milch vor der Pasteurisierung können durch die Aktivität der hitzeresistenten Enzyme zu Geschmacksfehlern in länger gereiften Käsen führen, obwohl die Keime selbst abgetötet wurden.

Enterobacteriaceae

Der Name Enterobacteriaceae leitet sich vom griechischen „έντερον“ (enteron)- Darm her und deutet somit die Herkunft dieser Bakterien an: viele Vertreter stammen aus dem Verdauungstrakt von Warmblütern. Die Herkunft der Enterobacteriaceae ist allerdings nicht nur auf den Intestinaltrakt beschränkt, sie sind ubiquitär verbreitet und finden sich im Boden, im Wasser und auf Pflanzen. Als typische „Schmutzkeime“ kommen sie in ungenügend gereinigten Geräten vor. Aufgrund ihres ubiquitären Vorkommens sind sie in

der Rohmilch und in bestimmten Milchprodukten wie Käse oder Milchpulver enthalten. Die Familie der Enterobacteriaceae umfasst im Moment 44 Gattungen (GARRITY et al. 2004). Die Enterobacteriaceae sind Gram-negative, nicht-sporenbildende, fakultativ anaerobe, oxidase-negative Stäbchen. Die meisten sind beweglich mit peritricher Begeißelung. Sie sind mesophil (Temperaturoptimum zwischen 30 und 37°C. Glucose wird unter Gas- und Säurebildung vergoren. Die wichtigsten Gärungsprodukte der Enterobacteriaceae sind Acetat, Formiat, Succinat, Lactat, Ethanol, Glycerin, Kohlendioxid, Wasserstoff und Ammoniak (RIEMELT et al. 2003).

Coliforme Bakterien

Als coliforme Bakterien werden laut ISO- Definition die Enterobacteriaceae bezeichnet, die Lactose unter Gas- und/oder Säurebildung bei 30 - 37°C abbauen (ISO 5541). Das heißt, dass die coliformen Bakterien eine funktionelle und keine taxonomische Einheit sind. Das Konzept der coliformen Bakterien hat sich in den letzten Jahren verändert (Tab. 2). Bis 1994 waren coliforme Bakterien durch ihre Fähigkeit Lactose innerhalb von 24-48h in Gas und Säure bei 36 +/- 2°C zu vergären definiert. Coliforme Bakterien sind laut dieser Definition die Gattungen *Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter* und *Citrobacter*. 1994 wurde die Definition der coliformen Bakterien geändert und beinhaltet nun alle Arten der Enterobacteriaceae, die Säure aus Lactose bilden können. Dieser Definition folgend, kommen zu den oben schon erwähnten Gattungen die Gattungen *Kluyvera* und *Pantoea* sowie Lactose-positive Stämme der Species *Hafnia alvei* und *Serratia liquefaciens* zu den Coliformen dazu.

Aufgrund der zunehmenden Bedeutung genetischer und enzymatischer Analysen werden die coliformen Bakterien heute aufgrund des lac-Z-Genes charakterisiert. Dieses Gen codiert für das Enzym β -Galactosidase. Durch diese erweiterte Definition werden heute noch weitere Gattungen (*Cedecea*, *Ewingella*, *Moellerella*, *Leclercia*, *Rhanella* und *Yoknella*) zu den coliformen Bakterien gezählt (MANAFI 2002).

Da die Coliformen durch ihre Lactoseverwertung an das Medium Milch bestens adaptiert sind, stellen sie den Hauptbestandteil der Enterobakterienflora in Milchprodukten dar. Die Gattungen *Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Yersinia*, *Serratia*, *Hafnia*, *Pantoea* und *Kluyvera* sind am häufigsten vertreten (RIEMELT et al. 2003). Lediglich in Milchtrockenprodukten und bei geschmierten Käsen in späteren Reifungsphasen (Oberfläche) können nicht-coliforme Enterobakterien dominieren. Daher werden bei

Gram-negative Bakterien in oberflächengereiften Weichkäsen

Milchprodukten schon seit langem die coliformen Keime anstelle der Enterobakterien zur Beurteilung der Produktions- und Distributionshygiene herangezogen (BUSSE 1986, SONNENMOSER und KESSLER 1984, BECKER und TERPLAN 1987). Hohe Coliformenzahlen in Milch und Milchprodukten sind Anzeiger für Mängel bei der Verarbeitung und mangelhafte Hygiene. Da Coliforme durch die Pasteurisierung mit Sicherheit abgetötet werden, ist ihr Vorkommen in Produkten aus pasteurisierter Milch immer die Folge einer Rekontamination.

Tab. 2: Veränderung des Coliformenkonzeptes (nach MANAFI 2002).

Vor 1994: Abbau von Lactose zu Gas und Säure bei 36°C	Nach 1994: Säurebildung aus Lactose bei 37°C	Aktuelle Definition: aufgrund der β-Galactosidase (lac-Z-Gen)
<i>Escherichia</i> <i>Citrobacter</i> <i>Enterobacter</i> <i>Klebsiella</i>	<i>Escherichia</i> <i>Citrobacter</i> <i>Enterobacter</i> <i>Klebsiella</i> <i>Yersinia</i> <i>Serratia</i> <i>Hafnia</i> <i>Pantoea</i> <i>Kluyvera</i>	<i>Escherichia</i> <i>Citrobacter</i> <i>Enterobacter</i> <i>Klebsiella</i> <i>Yersinia</i> <i>Serratia</i> <i>Hafnia</i> <i>Pantoea</i> <i>Kluyvera</i> <i>Cedecea</i> <i>Ewingella</i> <i>Moellerella</i> <i>Leclercia</i> <i>Rhanella</i> <i>Yokenella</i>

2. Material und Methoden

Im Zeitraum von 1.1.2003 bis 1.9.2003 wurden zehn Weichkäse-Chargen aus sechs unterschiedlichen Produktionsstätten auf das Vorkommen Gram-negativer und coliformer Bakterien, sowie auf die Artzusammensetzung Gram-negativer Bakterien untersucht. Dazu wurden je ein Käse direkt nach dem Salzbad (grüner Käse) und ein Käse derselben Produktionscharge nach Abschluss der dreiwöchigen Reifung (reifer Käse) getestet. Die Tabelle 3 gibt einen Überblick über die in den Betrieben produzierten Käsen. Von den sechs Projektteilnehmern sind zwei Betriebe Kleinkäsereien mit vorwiegend manueller Käseverarbeitung (Betrieb A, Betrieb E); die restlichen Betriebe produzieren im industriellen Maßstab. Die Proben wurden vom jeweiligen Projektteilnehmer gezogen und gekühlt versandt. Die Untersuchung der Proben erfolgte jeweils einen Tag nach der Probenahme.

Tab 3: Übersicht über Käsesorten der Betriebe. TM= Trockenmasse, F.i.T.= Fett in Trockenmasse, Wff.= Wassergehalt.

Herstellungsbetrieb	Ausgangprodukt	Angaben zum Käse	Reifungskultur
Betrieb A	pasteurisierte Ziegenmilch	TM mind. 40% F.i.T. mind. 45% Wff. mind. 63%	Edelschimmel
Betrieb B	pasteurisierte Kuhmilch	TM 46- 49% F.i.T. mind. 45% Wff. mind. 67%	Rotschmiere
Betrieb C	pasteurisierte Kuhmilch	TM mind. 45% F.i.T. mind. 35% Wff. mind. 65%	Rotschmiere
Betrieb D	pasteurisierte Kuhmilch	TM 51- 53% F.i.T. mind. 55% Wff. 67- 69%	Edelschimmel, Rotschmiere
Betrieb E	pasteurisierte Ziegenmilch	TM 50% F.i.T. mind. 51%	Rotschmiere
Betrieb F	pasteurisierte Kuhmilch	TM mind.50 % F.i.T. mind. 60%	Rotschmiere

Probenaufarbeitung

Von allen Proben der grünen und reifen Käse wurde die Oberfläche (o) und der gesamte verzehrbare Anteil (p) auf das Vorkommen coliformer und Gram-negativer Bakterien untersucht.

Die Probenahmen aus dem verzehrbaren Anteil der Käseproben erfolgte, indem $10 \pm 0,1\text{g}$ des Käseleibes so entnommen wurden, dass das Verhältnis Rinde/Inneres der aufgearbeiteten Probe dem des Käses entsprach (IDF Standard 122C). Diese Proben wurden in sterile Plastikbeutel eingewogen, mit 90ml auf 37°C vorgewärmter 2%iger Natriumcitratlösung versetzt und 2 Minuten im Stomacher (Seward Stomacher 400, Lab System) bei „NORM SPEED“ homogenisiert. Zur Untersuchung der Käsoberfläche (o) wurden $10 \pm 0,1\text{g}$ Probe von den äußeren 2mm des Käseleibes entnommen, und wie oben beschrieben aufgearbeitet.

Nachweis Gram-negativer Bakterien

Je 0,1ml der homogenisierten Käseproben wurde auf Kristallviolett-Neutralrot-Galle-Glucose-Agar (VRBD-Agar Merck 1.0275) ausgespatelt (VDLUFA-Methodenbuch VI, M 7.19). Die Inkubation erfolgte für 48h bei 30°C ; nach 24h wurden alle Kolonien mit einem Durchmesser von über zwei Millimetern ausgezählt und nach 48h wurden die zusätzlichen Kolonien gezählt.

Die im Nährboden enthaltenen Gallensalze und das Kristallviolett hemmen weitgehend die Gram-positive Begleitflora, so dass nur die Gram-negative Bakterien erfasst werden. Die Enterobacteriaceae bilden Säure aus der im VRBD-Agar enthaltenen Glukose. Durch den so erzeugten Farbumschlag des Neutralrots bilden die Enterobacteriaceae purpurrote bis violette Kolonien, wodurch sie von anderen Gram-negativen Bakterien differenziert werden können. Durch den Verzicht auf eine zusätzliche Überschichtung des Nährbodens können sich auch die obligat aeroben Gram-negativen Bakterien wie Pseudomonaden vermehren.

Nachweis von coliformen Bakterien und *E. coli*

Zur Bestimmung der Keimzahlen der coliformen Bakterien und *E.coli* wurde das Coli ID Nährmedium im Plattengussverfahren (BioMérieux, Best.Nr: 42017) verwendet. Der Nährboden wurde nach dem Erstarren mit Nährmedium überschichtet. Die Proben wurden bei 37°C inkubiert und nach 24 und 48 Stunden wurden die blauen bis blau-

grauen (coliforme Bakterien ohne *E. coli*) und rot-violetten (*E. coli*) Kolonien mit einem Durchmesser von über 2mm ausgezählt. Weiße oder rosa Kolonien, die kleiner als ein Millimeter waren, wurden nicht gezählt. Zur Bestätigung von Kolonien mit zweifelhafter Farbreaktion (graublau und graue Kolonien über 2 mm) wurden diese Kolonien zusätzlich auf Gasbildung in BRILA-Bouillon (Merk 105454) getestet.

Isolierung und Identifizierung Gram-negativer Bakterien

Um einen Überblick über die typische Artzusammensetzung der Gram-negativen Bakterien in den verschiedenen Käsesorten zu erhalten, wurde von geeigneten VRBD-Platten (10 bis 100 Kolonien) vom vorherrschenden Kolonietyp fünf Kolonien auf Trypton- Soja- Agar (TSA, Oxoid CM 129) überimpft. Um eine Reinkultur zu erhalten wurden mindestens drei Verdünnungsaustriebe auf TSA durchgeführt. Die Reinkulturen wurden mikroskopisch überprüft.

Zur Identifizierung der Bakterien wurde eine Grobdifferenzierung (KOH-Test, Katalase-Test, Oxidase-Test, Oxidations-Fermentations-Test, Gasbildung aus Lactose) und eine Feindifferenzierung (API 20E-System, Bio Mérieux) durchgeführt.

pH-Wert

Der pH-Wert wurde bei allen Käseproben (grün und reif) bestimmt (VDLUFA C8.2). Dazu wurde eine repräsentative Probe des Käses aufgerieben und gut durchmischt. Ein Teil wurde fest in ein kleines Becherglas (25 ml) gepresst. Der pH- Wert wurde potentiometrisch mithilfe einer Einstichelektrode gemessen.

Galactose und Lactose

Bei den grünen Käsen nach Salzbad wurde der Restzuckergehalt gemessen. Die Bestimmung des Restzuckergehalts des Käses erfolgte enzymatisch mit dem „Enzym Testsatz Boehringer Mannheim“ (Best. Nr. 176303) laut Anleitung.

Trockenmasse

Die Bestimmung der Trockenmasse erfolgte nach der Folienmethode (VDLUFA C 35.4) nur bei den reifen Käsen. Dabei wurde die homogenisierte Probe auf Alufolie dünn ausgewalzt und das Wasser durch Erhitzen auf 130°C für 30 Minuten entzogen und anschließend das Trockengewicht bestimmt.

Chlorid als NaCl

Die potentiometrische Kochsalzbestimmung erfolgte nur bei den drei Wochen alten Käseproben (reif). Dazu wurde die aufgeriebene Probe mit Salpetersäure angesäuert und mit einer Silbernitratlösung (0,1 molar) bis zum Farbumschlag titriert. Der Endpunkt wurde potentiometrisch ermittelt (TSCHAGER und JAGER 1979).

3. Ergebnisse

Bei der Betrachtung der Ergebnisse ist zu beachten, dass die Coliformen eine Teilfraktion der Gram-negativen Flora darstellen. Das heißt, dass sich bei gleich hohen Werten die Gram-negativen überwiegend aus Coliformen zusammensetzen. Sind die Gram-negativen-Keimzahlen höher als die Coliformenkeimzahlen, kommen auch nicht-coliforme Enterobakterien oder andere Gram-negative die nicht zu den Enterobakterien zählen (z.B. *Pseudomonas* spp.) vor. Liegt die Coliformenkeimzahl hingegen über der Gram-negativen-Keimzahl ist dies auf die Methodenungenauigkeit zurückzuführen. Die Nachweisgrenze betrug 10/g beim Nachweis von Coliformen und *E.coli* sowie 100/g beim Nachweis der Gram-negativen.

Betrieb A

Grüner Käse

Bei je vier Proben konnten coliforme Bakterien im verzehrbaren Anteil und auf der Käseoberfläche nachgewiesen werden (Tab. 4). Bei je sechs Proben konnten im verzehrbaren Anteil und auf der Käseoberfläche Gram-negative Bakterien nachgewiesen werden. *E.coli* wurde bei Probe 7 sowohl im verzehrbaren Anteil als auch auf der Oberfläche nachgewiesen.

Bei den Proben 3 und 4 wurden auf der Käseoberfläche hohe Keimzahlen Gram-negativer Bakterien nachgewiesen. Coliforme Bakterien wurden bei diesen Proben dagegen nur in geringen Keimzahlen nachgewiesen. Da die Käseoberfläche stärker kontaminiert war, fand die Rekontamination vermutlich nach der Bruchabfüllung statt. Als Ursache kommen ungenügend gereinigte Formen in Frage. Die höchsten Keimzahlen an Coliformen wurden in Probe 10 nachgewiesen. Die hohen Keimzahlen auf der Oberfläche und im Inneren der Probe weisen auf eine Rekontamination während der Milchlagerung und -verarbeitung hin.

Gram-negative Bakterien in oberflächengereiften Weichkäsen

Tab. 4: Keimzahlen (KBE/g) im grünen Käse nach Salzbad. p = verzehrbare Anteil; o= Käseoberfläche (äußerste 2mm).

Probe	Gram- negative p	Gram- negative o	Coliforme p	Coliforme o	E. coli p	E. coli o
1	<100	<100	< 10	< 10	< 10	< 10
2	200	<100	< 10	< 10	< 10	< 10
3	860	14.000	10	10	< 10	< 10
4	1.000	20.000	< 10	20	< 10	< 10
5	<100	<100	< 10	< 10	< 10	< 10
6	<100	200	< 10	< 10	< 10	< 10
7	100	200	60	160	60	160
8	<100	<100	< 10	< 10	< 10	< 10
9	100	100	100	<10	< 10	< 10
10	16.000	20.000	24.000	14.000	< 10	< 10

Reifer Käse

Beurteilt man die Untersuchungsergebnisse nach den in der MHVO festgelegten Grenzwerten, überschritt eine Probe den Schwellen- und drei Proben den Höchstwert für coliforme Bakterien (Tab. 5). Bei den Proben mit Coliformenzahlen $> 10^3$ / g lag die Zahl der Gram-negativen in derselben Größenordnung. Lediglich bei Probe 4 waren die Keimzahlen der Gram-negativen um eine Zehnerpotenz höher als die Coliformen. Auf der Käseoberfläche konnten höhere Keimzahlen sowohl bei den Gram-negativen als auch bei den coliformen Bakterien gefunden werden.

Während bei Probe 4 nur auf der Oberfläche *E. coli* gefunden werden konnte, wurde bei Probe 8 der Schwellenwert und bei Probe 7 der Höchstwert von *E.coli* überschritten.

Gram-negative Bakterien in oberflächengereiften Weichkäsen

Tab. 5: Keimzahlen (KBE/g) im Käse nach dreiwöchiger Reifung. p = verzehrbare Anteil; o= Käseoberfläche (äußerste 2mm).

Probe	Gram- negative p	Gram- negative o	Coliforme p	Coliforme o	E. coli p	E. coli o
1	<100	400	< 10	< 10	< 10	< 10
2	120.000.000	180.000.000	93.000.000	160.000.000	< 10	< 10
3	<100	26.000	< 10	20.000	< 10	< 10
4	340.000.000	1.600.000.000	32.000.000	180.000.000	< 10	2.700
5	<100	9.000	20	2.200	< 10	< 10
6	100	100.000	< 10	28.000	< 10	< 10
7	1.200	1.500	2.000	1.400	2.000	1.400
8	2.200	60.000	960	20.000	300	3.400
9	16.000	18.000	16.000	16.000	< 10	10
10	820.000	1.200.000	1.000.000	1.400.000	< 10	< 10

Vergleich der Keimzahlen der grünen und reifen Käse

Zwei Proben wiesen weder im grünen noch im reifen Käse Coliforme auf, bei einer Probe wurde eine geringfügige Kontamination an der Nachweisgrenze im grünen Käse festgestellt, die nach der Reifung nicht mehr nachweisbar war. Bei vier der sieben im Endprodukt belasteten Käse waren im grünen Käse keine Coliformen nachweisbar. Allerdings waren Käse, die nach dem Salzbad eine Kontamination mit coliformen Bakterien aufwiesen, am Ende der dreiwöchigen Reifung nicht stärker belastet als die Käse, bei denen die coliformen Keimzahlen nach dem Salzbad unter der Nachweisgrenze lagen (Abb. 1). Ein ähnliches Bild zeigte sich bei den Gram-negativen Bakterien (Abb. 2). Die Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass die Keimzahlen der grünen Käse nach dem Salzbad keinen Hinweis auf das Keimzahlniveau am Ende der Reifung liefern. Dies könnte auch durch den nachfolgend beschriebenen Florawechsel bedingt sein.

Gram-negative Bakterien in oberflächengereiften Weichkäsen

Abb. 1: Coliformen-Keimzahlen der grünen und reifen Käse aus Betrieb A (n=10)

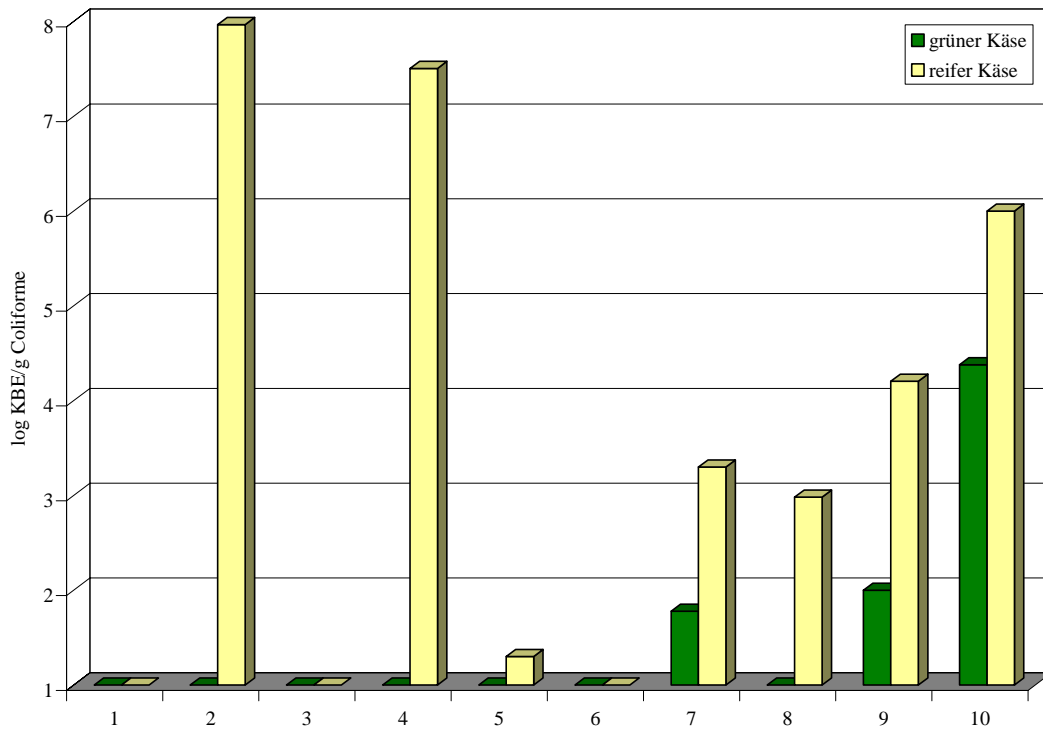
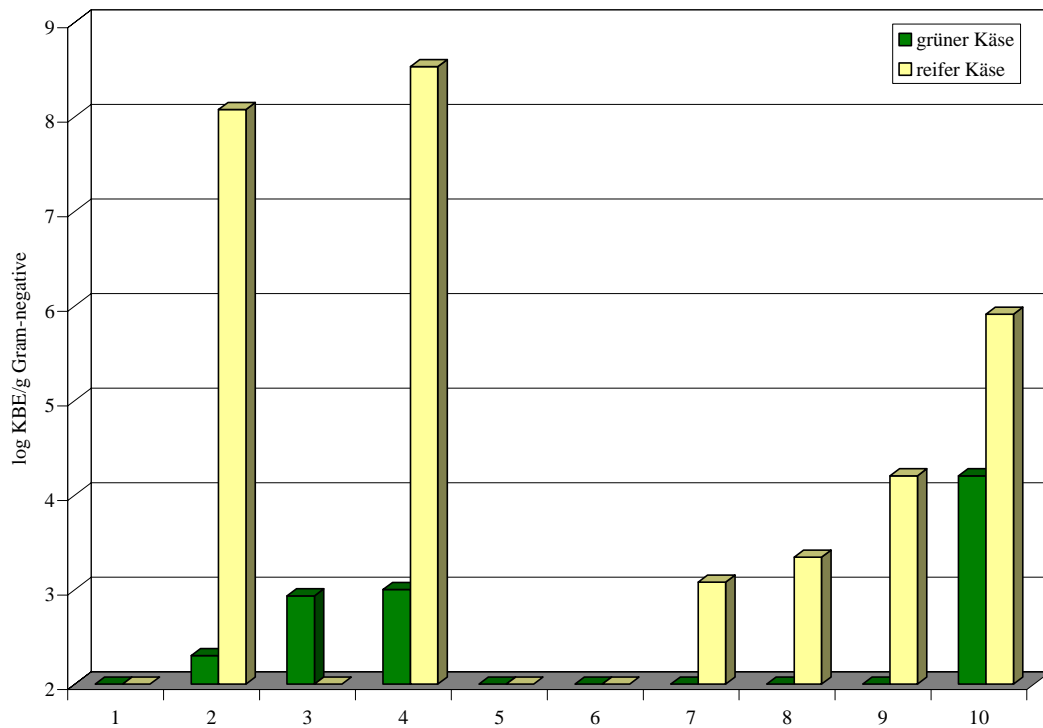


Abb. 2: Gram-negativen-Keimzahlen der grünen und reifen Käse aus Betrieb A (n=10)



Artenspektrum

Von den Käseproben dieses Betriebes wurden insgesamt 65 Stämme isoliert und identifiziert, davon stammten 25 vom grünen und 40 vom reifen Käse. Insgesamt wurden acht verschiedene Arten identifiziert (Tab. 6). Tabelle 7 zeigt die Verteilung der verschiedenen Gruppen Gram-negativer Bakterien im grünen und reifen Käse. Das Artenspektrum im Käse änderte sich während der Reifung deutlich. Im grünen Käse dominierten mit *Acinetobacter baumannii/calcoaceticus* Gram-negative Bakterien, die weder zu den Coliformen noch zu den Enterobacteriaceae gehören (56%). Daneben wurden noch coliforme Bakterien (40%) gefunden, nicht-coliforme Enterobacteriaceae (4%) waren dagegen nur vereinzelt nachweisbar. Im Reifungsverlauf verschob sich das Artenspektrum hin zu den coliformen Bakterien (50%), die als *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca* und *Serratia proteamaculans* subsp. *proteamaculans* identifiziert wurden. Daneben kamen noch Stämme der Gattung *Pantoea*, die kein Gas aus Lactose bildeten und daher zu den nicht-coliformen Enterobakterien gezählt wurden, vor (37,5%). Andere Gram-negative Bakterien wurden im reifen Käse nur vereinzelt (12,5%) nachgewiesen und als *Pseudomonas aeruginosa* identifiziert.

Tab. 6: Zusammensetzung der Gram-negativen Bakterienflora im grünen und reifen Käse aus Betrieb A

Art	Grüner Käse	Reifer Käse	Gesamt
<i>Acinetobacter baumannii / calcoaceticus</i>	14	0	14
<i>Enterobacter cloacae</i>	10	14	24
<i>Escherichia coli</i>	0	1	1
<i>Klebsiella oxytoca</i>	0	1	1
<i>Pantoea</i> spp.	0	15	15
<i>Proteus vulgaris</i>	1	0	1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0	5	5
<i>Serratia proteamaculans</i> subsp. <i>proteamaculans</i>	0	4	4

Gram-negative Bakterien in oberflächengereiften Weichkäsen

Tab. 7: Gruppenzugehörigkeit der isolierten Bakterienstämme aus Betrieb A [Anzahl (%)]

	Coliforme	Enterobacteriaceae (ohne Coliforme)	Gram-negative (ohne Enterobacteriaceae)	Gesamt
Grüner Käse	10 (40,0%)	1 (4,0%)	14 (56,0%)	25
Reifer Käse	20 (50,0%)	15 (37,5)	5 (12,5%)	40
Gesamt	30 (46,2%)	16 (24,6%)	19 (29,2%)	65

Chemische Daten

Die chemischen Parameter sind in Tab. 8 zusammengefasst. Die chemischen Parameter lagen im Normbereich dieses Käses.

Tab. 8: Mittelwerte der chemischen Untersuchungen der grünen und reifen Käse aus Betrieb A

	n	Grüner Käse	Reifer Käse
pH- Wert	10	5,16 ±0,04	5,88 ±0,39
Galactose [g/kg]	9	7,35 ±1,07	
Lactose [g/kg]	9	1,31 ±1,41	
Kochsalz [%]	6		1,68 ±0,27
Trockenmasse [%]	6		55,10 ±3,80

Betrieb B

Grüner Käse

Coliforme Bakterien wurden bei drei Proben im verzehrbaren Anteil und bei vier Proben auf der Oberfläche gefunden. Gram- negative Bakterien wurden bei vier Käsen im verzehrbaren Anteil und bei sieben auf der Oberfläche gefunden (Tab. 9). *E. coli* konnte nicht nachgewiesen werden.

Tab. 9: Keimzahlen (KBE/g) im grünen Käse nach Salzbad. p = verzehrbarer Anteil; o= Käsoberfläche (äußerste 2mm).

Probe	Gram- negative p	Gram- negative o	Coliforme p	Coliforme o	E. coli p	E. coli o
1	100	100	< 10	< 10	<10	<10
2	200	600	< 10	< 10	<10	<10
3	<100	100	< 10	< 10	<10	<10
4	<100	300	< 10	< 10	<10	<10
5	<100	<100	< 10	< 10	<10	<10
6	<100	<100	< 10	20	<10	<10
7	1.200	1.200	1.200	1.000	<10	<10
8	<100	100	20	80	<10	<10
9	500	1.400	240	1.200	<10	<10
10	<100	<100	<10	<10	<10	<10

Reifer Käse

Bei den Coliformen wurde der Schwellenwert nur von 1 Probe, der Höchstwert von keiner Probe überschritten (Tab. 10). *E. coli* konnte nicht nachgewiesen werden.

Beim Großteil der Proben lagen die Gram-negativen in der gleichen Größenordnung wie die Coliformen. Lediglich bei zwei Proben wurden höhere Zahlen an Gram-negativen als Coliformen gefunden. In Probe 4 lagen auf der Oberfläche die Gram-negativen um etwa drei Zehnerpotenzen höher als die Coliformen. In Probe 10 wurden keine Coliformen in 0,1 g nachgewiesen, während die Gram-negativen 10^5 / g überschritten.

Gram-negative Bakterien in oberflächengereiften Weichkäsen

Tab. 10: Keimzahlen (KBE/g) im Käse nach dreiwöchiger Reifung. p = verzehrbare Anteil; o= Käseoberfläche (äußerste 2mm).

Probe	Gram- negative p	Gram- negative o	Coliforme p	Coliforme o	E. coli p	E. coli o
1	1.200	2.000	680	860	<10	<10
2	200	600	10	140	<10	<10
3	300	1.200	30	550	<10	<10
4	2.200	19.000	70	< 10	<10	<10
5	12.000	44.000	13.000	24.000	<10	<10
6	300	15.000	300	5.400	<10	<10
7	100	100	< 10	80	<10	<10
8	5.000	7.400	1.400	2.600	<10	<10
9	500	1.200	80	820	<10	<10
10	140.000	160.000	< 10	<10	<10	<10

Keimzahlvergleich der grünen und reifen Käse

Im reifen Käse wurden in mehr Proben Coliforme nachgewiesen als im grünen Käse. Die Keimzahlen liegen jedoch im Allgemeinen sehr niedrig bei $10^1 - 10^3$ KBE/g (Abb. 3). Zwischen den Coliformenzahlen im grünen Käse und im reifen Käse konnte kein Zusammenhang festgestellt werden. Bei einer Probe, bei der im jungen Käse 10^3 Coliforme / g nachgewiesen wurden, lagen die Coliformenzahlen im reifen Käse unter der Nachweisgrenze. Dies kann durch eine punktuelle Kontamination der grünen Käseprobe erklärt werden. Die Entwicklung der Gram-negativen Bakterien im Reifungsverlauf war ähnlich der der coliformen Bakterien (Abb. 4).

Die Ergebnisse der durchgeführten Untersuchungen lassen den Schluss zu, dass die Keimzahlen der grünen Käse nach dem Salzbad keinen Hinweis auf das Keimzahlniveau am Ende der Reifung liefern.

Artenspektrum

Von den Käseproben dieses Betriebes wurden 65 Gram-negative Bakterienstämme isoliert und identifiziert (Tab. 11). Zehn Isolate stammten vom grünen, 55 vom reifen Käse. Die isolierten Bakterien wurden sechs verschiedenen Arten zugeordnet. Tabelle 12 zeigt die Verteilung der verschiedenen Gruppen Gram-negativer Bakterien im grünen und reifen Käse. Vom grünen Käse wurden ausschließlich Stämme der Gattung *Pantoea* isoliert, die Gas aus Lactose bildeten und daher zu den Coliformen gezählt wurden. Im reifen Käse wurden überwiegend Coliforme nachgewiesen (82%), die als *Citrobacter freundii*, *Klebsiella oxytoca*, *Pantoea* spp. und *Serratia proteamaculans* subsp. *proteamaculans* identifiziert wurden. Der Anteil der nicht-coliforme Enterobacteriaceae (*Proteus vulgaris*, *Providencia rettgeri*) lag bei 18 %. Andere Gram-negative Bakterien wurden weder im grünen noch im reifen Käse nachgewiesen.

Tab. 11: Zusammensetzung der Gram-negativen Bakterienflora im grünen und reifen Käse (Betrieb B)

Art	Grüner Käse	Reifer Käse	Gesamt
<i>Citrobacter freundii</i>	0	15	15
<i>Klebsiella oxytoca</i>	0	15	15
<i>Pantoea</i> spp.	10	0	10
<i>Proteus vulgaris</i>	0	1	1
<i>Providencia rettgeri</i>	0	9	9
<i>Serratia proteamaculans</i> subsp. <i>proteamaculans</i>	0	15	15

Tab. 12: Gruppenzugehörigkeit der isolierten Bakterienstämme aus Betrieb B [Anzahl (%)]

	Coliforme	Enterobacteriaceae (ohne Coliforme)	Gram-negative (ohne Enterobacteriaceae)	Gesamt
Grüner Käse	10 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	10
Reifer Käse	45 (81,8%)	10 (18,2%)	0 (0%)	55
Gesamt	55 (84,6%)	10 (15,4%)	0 (0%)	65

Abb. 3: Coliformen-Keimzahlen der grünen und reifen Käse aus Betrieb B (n=10)

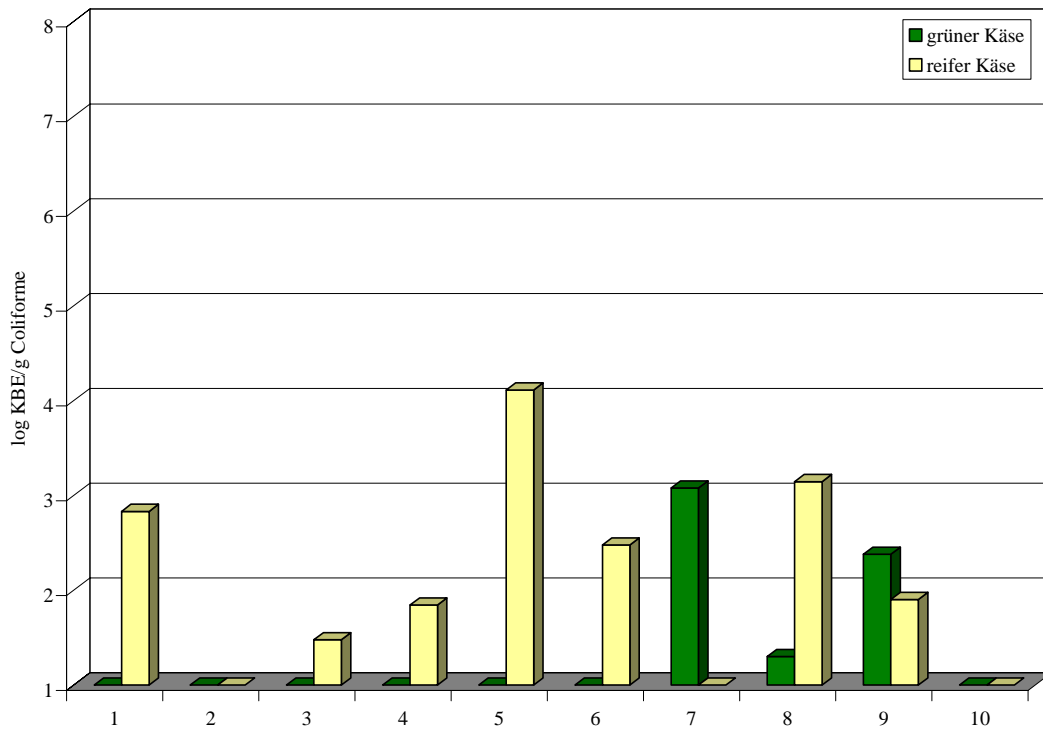
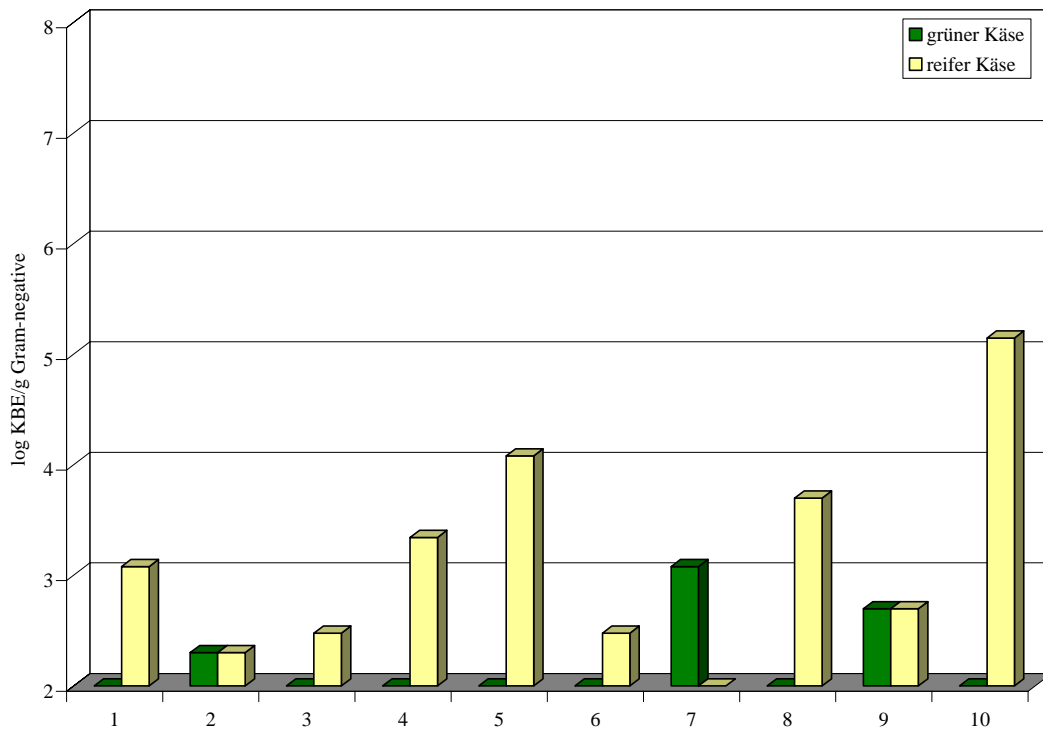


Abb. 4: Gram-negativen-Keimzahlen der grünen und reifen Käse aus Betrieb B (n=10)



Chemische Daten

Die chemischen Parameter sind in Tab. 13 zusammengefasst. Die chemischen Parameter lagen im Normbereich dieses Käses.

Tab. 13: Mittelwerte der chemischen Untersuchungen der grünen und reifen Käse aus Betrieb B

		Grüner Käse	Reifer Käse
pH- Wert	n= 10	5,05 ± 0,06	6,79 ± 0,28
Galactose [g/kg]	n= 10	5,76 ± 0,80	
Lactose [g/kg]	n= 10	1,94 ± 1,08	
Kochsalz [%]	n= 6		2,13 ± 0,28
Trockenmasse [%]	n= 6		48,22 ± 1,51

Betrieb C

Grüner Käse

Coliforme Bakterien konnten bei sechs Proben im verzehrbaren Anteil und bei drei Proben auf der Käseoberfläche gefunden werden. Gram-negative Bakterien konnten bei vier Proben im verzehrbaren Anteil und bei fünf Proben auf der Käseoberfläche gefunden werden (Tab. 14). *E. coli* wurde bei drei der Proben im verzehrbaren Anteil und bei einer Probe auf der Käseoberfläche gefunden. Die hohen Keimzahlen bei Probe neun sind nicht interpretierbar.

Tab. 14: Keimzahlen (KBE/g) im grünen Käse nach Salzbad. p = verzehrbarer Anteil; o= Käseoberfläche (äußerste 2mm).

Probe	Gram- negative p	Gram- negative o	Coliforme p	Coliforme o	E. coli p	E. coli o
1	<100	<100	< 10	< 10	< 10	< 10
2	200	200	40	40	< 10	< 10
3	200	400	60	< 10	50	< 10
4	<100	<100	< 10	< 10	< 10	< 10
5	<100	200	30	50	< 10	< 10
6	<100	<100	< 10	< 10	< 10	< 10
7	<100	<100	< 10	< 10	< 10	< 10
8	100	<100	10	< 10	< 10	< 10
9	530.000	430.000	>300.000	>300.000	80	50
10	<100	100	10	<10	10	< 10

Reifer Käse

Bei den Coliformen wurde der Schwellenwert nur von 1 Probe, der Höchstwert von keiner Probe überschritten (Tab. 15). Der Gehalt an *E. coli* lag bei allen Proben unter dem Schwellenwert. Demgegenüber lagen die Keimzahlen an Gram-negativen in allen Proben bei über 10^4 KBE / g. Die Keimzahlen an Gram-negativen lagen häufig um 2 bis 3 Zehnerpotenzen höher als an Coliformen. Meist lagen die Keimzahlen an Gram-negativen und Coliformen auf der Oberfläche nicht wesentlich höher als im verzehrbaren Anteil.

Gram-negative Bakterien in oberflächengereiften Weichkäsen

Tab. 15: Keimzahlen (KBE/g) im Käse nach dreiwöchiger Reifung. p = verzehrbare Anteil; o= Käseoberfläche (äußerste 2mm).

Probe	Gram- negative p	Gram- negative o	Coliforme p	Coliforme o	E. coli p	E. coli o
1	28.000	140.000	16.000	28.000	< 10	< 10
2	70.000	140.000	4.000	9.000	< 10	< 10
3	2.100.000	3.400.000	80	4.000	20	30
4	18.000	44.000	< 10	140	< 10	70
5	22.000	90.000	10	< 10	< 10	< 10
6	140.000	130.000	8.000	9.600	< 10	< 10
7	28.000	20.000	2.200	7.000	10	20
8	720.000	2.500.000	1.200	4.200	< 10	< 10
9	18.000	100.000	4.200	48.000	20	40
10	22.000	46.000	< 10	<10	< 10	< 10

Vergleich der Keimzahlen der grünen und reifen Käse

Im grünen Käse wurden nur vereinzelt Coliforme in geringen Mengen ($< 10^2/g$) nachgewiesen (Abb. 5). Die Coliformenzahlen im reifen Käse sind normalerweise mit etwa 10^3-10^4 KBE/g ebenfalls sehr gering. Demgegenüber wurden hohe Zahlen von $>10^4$ Gram-negativen/g im reifen Käse festgestellt, während die grünen Käse maximal $10^2/g$ aufwiesen (Abb. 6). Eine Ausnahme war Probe 9, bei der im grünen Käse sehr hohe Keimzahlen sowohl Gram-negativer als auch coliformer Bakterien vorhanden waren.

Artenspektrum

Insgesamt wurden 60 verschiedene Stämme Gram- negativer Bakterien isoliert und identifiziert. Zwanzig Stämme wurden vom grünen und 40 vom reifen Käse isoliert. Insgesamt konnten die isolierten Bakterien vier verschiedenen Arten zugeordnet werden (Tab. 16). Im grünen Käse wurden nur Bakterien der Gattung *Klebsiella* identifiziert. Auch im reifen Käse konnte diese Art gefunden werden. Der überwiegende Anteil der Isolate wurde als *Proteus vulgaris* und *Morganella morganii* identifiziert und somit den nicht-coliformen Enterobakterien zugeordnet.

Gram-negative Bakterien in oberflächengereiften Weichkäsen

Tab. 16: Zusammensetzung der Gram-negativen Bakterienflora im grünen und reifen Käse (Betrieb C)

Art	Grüner Käse	Reifer Käse	Gesamt
<i>Klebsiella oxytoca</i>	15	5	20
<i>Klebsiella</i> spp.	5	2	7
<i>Morganella morganii</i>	0	13	13
<i>Proteus vulgaris</i>	0	15	15
<i>Serratia proteamaculans</i> subsp. <i>proteamaculans</i>	0	5	5

Abb. 5: Coliformen-Keimzahlen der grünen und reifen Käse aus Betrieb C (n=10)

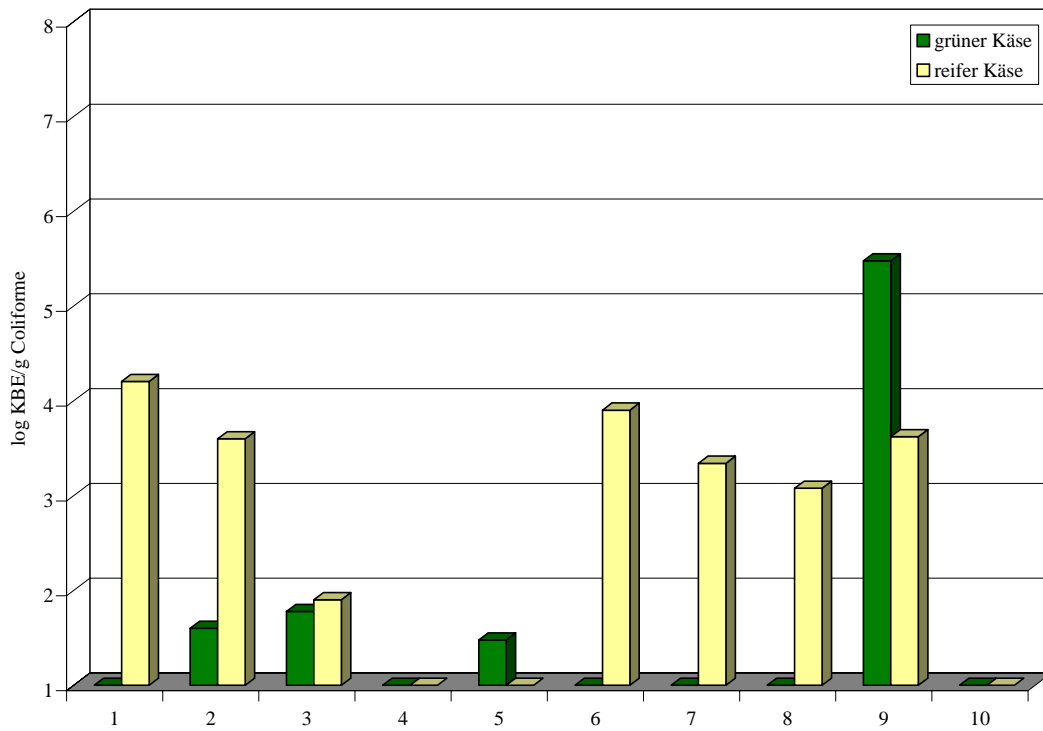
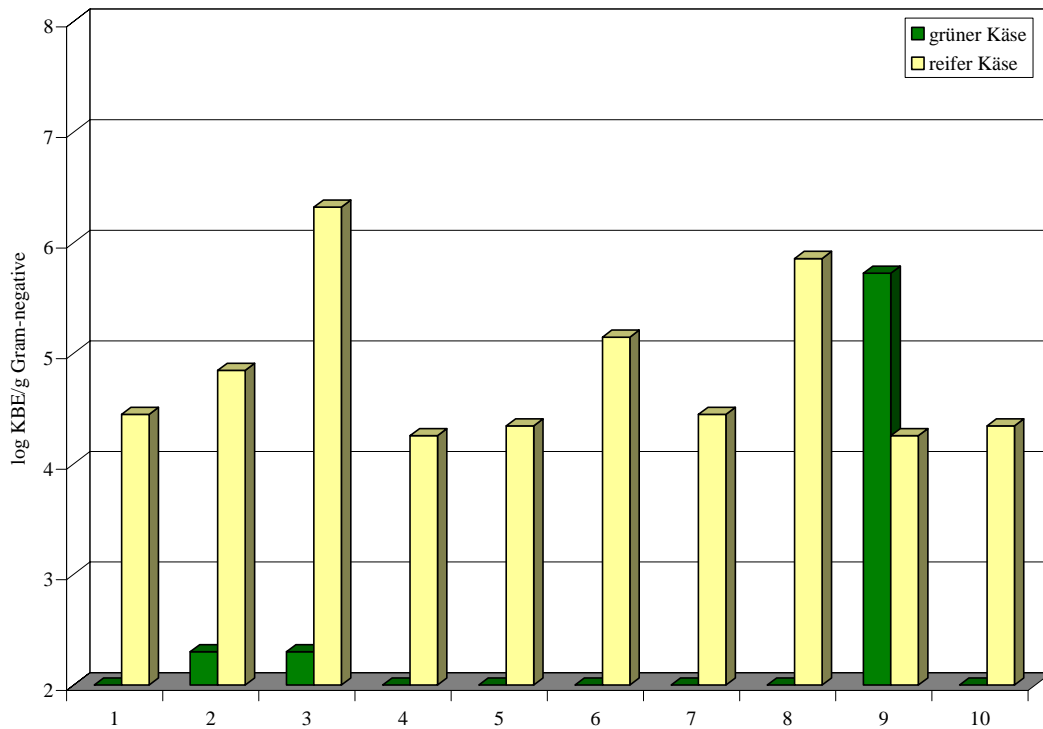


Abb. 6: Gram-negativen-Keimzahlen der grünen und reifen Käse aus Betrieb C (n=10)



Die vom grünen Käse isolierten Bakterien gehörten alle zu den coliformen Bakterien, während im reifen Käse nur noch 30% der Bakterien zu den Coliformen gehörten; die anderen 70% waren nicht-coliforme Enterobakterien (Tab. 17). Andere Gram-negative Bakterien, die nicht zu den Enterobacteriaceae gehören, wurden nicht isoliert.

Tab. 17: Gruppenzugehörigkeit der isolierten Bakterienstämme aus Betrieb C [Anzahl (%)]

	Coliforme	Enterobacteriaceae (ohne Coliforme)	Gram-negative (ohne Enterobacteriaceae)	Gesamt
Grüner Käse	20 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	20
Reifer Käse	12 (30%)	28 (70%)	0 (0%)	40
Gesamt	32 (53,3%)	28 (46,7%)	0 (0%)	60

Chemische Daten

Die chemischen Parameter sind in Tab. 18 zusammengefasst. Die chemischen Parameter lagen im Normbereich dieses Käses.

Tab. 18: Mittelwerte der chemischen Untersuchungen der grünen und reifen Käse aus Betrieb C

		Grüner Käse	Reifer Käse
pH- Wert	n= 10	4,92 ± 0,06	6,35 ± 0,21
Galactose [g/kg]	n= 9	4,68 ± 1,70	
Lactose [g/kg]	n= 9	2,13 ± 1,61	
Kochsalz [%]	n= 6		3,55 ± 0,31
Trockenmasse [%]	n= 6		47,43 ± 2,00

Betrieb D

Grüner Käse

Coliforme Bakterien konnten bei sieben Proben im verzehrbaren Anteil und bei neun Proben auf der Oberfläche nachgewiesen werden. Die Keimzahlen der coliformen Bakterien waren allerdings niedrig (Tab. 19). Gram-negative Bakterien konnten bei vier Proben im verzehrbaren Anteil und bei acht Proben auf der Oberfläche gefunden werden. *E. coli* konnte einmal auf der Käseoberfläche nachgewiesen werden. Die Keimzahlen der coliformen Bakterien im verzehrbaren Anteil waren gleich groß wie auf der Käseoberfläche. Bei den Gram-negativen wurden in drei Proben auf der Oberfläche um eine Zehnerpotenz höhere Keimzahlen festgestellt als im verzehrbaren Anteil.

Reifer Käse

Bei den Coliformen wurde der Höchstwert von einer Probe überschritten (Tab. 20). Bei zwei Proben lag der Gehalt an *E. coli* über dem Schwellenwert. Drei Proben wiesen über 10^4 Gram-negative / g auf.

Die Coliformenkeimzahlen und die Gram-negativen-Keimzahlen waren auf der Oberfläche nicht wesentlich höher als im verzehrbaren Anteil. Der Gehalt an Gram-negativen lag entweder in der gleichen Größenordnung als der der Coliformen oder eine Zehnerpotenz höher.

Gram-negative Bakterien in oberflächengereiften Weichkäsen

Tab. 19: Keimzahlen (KBE/g) im grünen Käse nach Salzbad. p = verzehrbarer Anteil; o= Käseoberfläche (äußerste 2mm).

Probe	Gram- negative p	Gram- negative o	Coliforme p	Coliforme o	E. coli p	E. coli o
1	800	6.800	230	320	<10	<10
2	300	200	20	30	<10	<10
3	<100	300	40	10	<10	<10
4	2.200	11.000	30	10	<10	<10
5	<100	100	10	50	<10	<10
6	<100	<100	20	20	<10	<10
7	<100	<100	<10	10	<10	10
8	<100	100	<10	<10	<10	<10
9	<100	100	<10	10	<10	<10
10	2.800	22.000	120	550	<10	<10

Tab. 20: Keimzahlen (KBE/g) im Käse nach dreiwöchiger Reifung. p = verzehrbarer Anteil; o= Käseoberfläche (äußerste 2mm).

Probe	Gram- negative p	Gram- negative o	Coliforme p	Coliforme o	E. coli p	E. coli o
1	6.000	10.000	600	1.000	<10	<10
2	9.000	18.000	5.400	12.000	<10	<10
3	<100	100	10	80	<10	<10
4	200	300	<10	<10	<10	<10
5	1.200	4.000	800	800	<10	<10
6	<100	700	<10	<10	<10	<10
7	4.000	42.000	1.400	2.600	980	1.200
8	16.000	10.000	50	30	<10	<10
9	14.000	22.000	3.200	12.000	<10	<10
10	2.400.000	3.000.000	2.000.000	3.000.000	180	820

Vergleich der Keimzahlen der grünen und reifen Käse

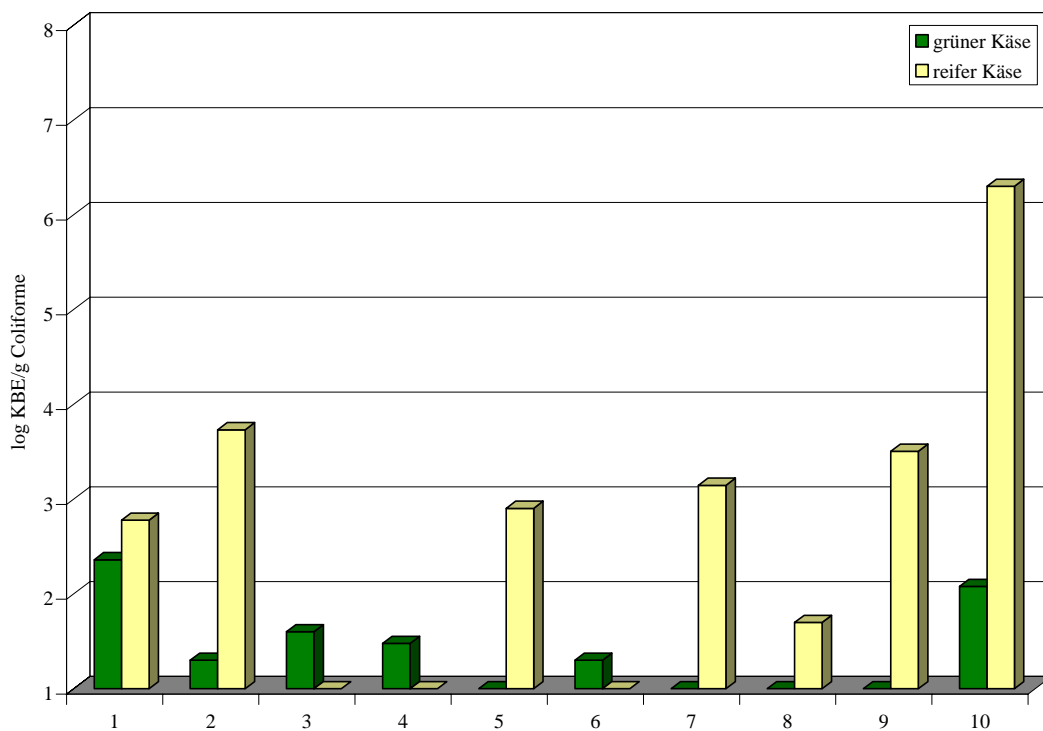
Aus Abbildung 7 und Abbildung 8 ist ersichtlich, dass zwischen den Keimzahlen der grünen und reifen Käse kein Zusammenhang festgestellt werden konnte. Geringfügige Kontaminationen mit Coliformen im grünen Käse im Bereich von unter 100 KBE/g führten nicht zu hohen Coliformenzahlen im reifen Käse. Dies könnte durch technologische Gegebenheiten, in die wir keinen Einblick haben, bedingt sein, oder auf

den nachfolgend beschriebenen Florawechsel zurückzuführen sein.

Artenspektrum

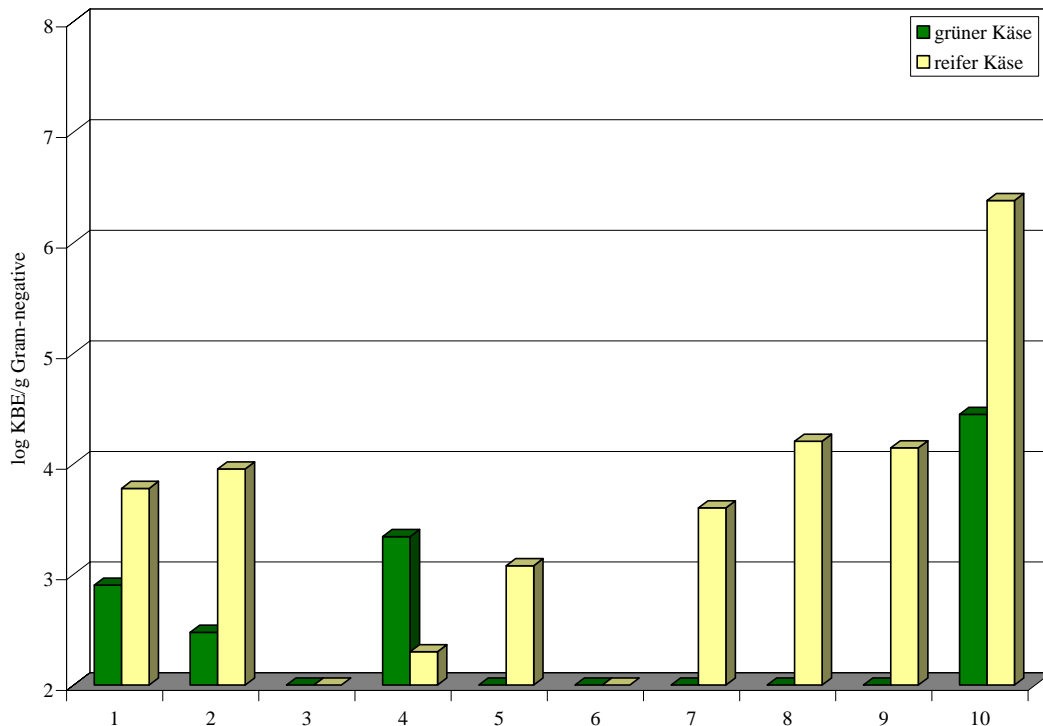
Von den untersuchten Proben wurden insgesamt 80 Bakterienstämme isoliert und identifiziert, davon 30 vom grünen und 50 vom reifen Käse. Die Isolate konnten acht verschiedenen Arten zugeordnet werden (Tab. 21). Bakterien der Arten *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella oxytoca* und *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneunomiae* konnten nur im grünen Käse gefunden werden. *Enterobacter cloacae* und *Pantoea* spp. konnten sowohl vom grünen als auch vom reifen Käse isoliert werden, wogegen *Citrobacter freundii* und *Serratia* spp. ausschließlich vom reifen Käse isoliert werden konnten.

Abb. 7: Coliformen-Keimzahlen der grünen und reifen Käse aus Betrieb D (n=10)



Gram-negative Bakterien in oberflächengereiften Weichkäsen

Abb. 8: Gram-negativen-Keimzahlen der grünen und reifen Käse aus Betrieb D (n=10)



Tab. 21: Zusammensetzung der Gram-negativen Bakterienflora im grünen und reifen Käse (Betrieb D)

Art	Grüner Käse	Reifer Käse	Gesamt
<i>Citrobacter freundii</i>	0	14	14
<i>Enterobacter cloacae</i>	5	1	6
<i>Klebsiella oxytoca</i>	4	0	4
<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i>	2	0	2
<i>Pantoea</i> spp.	1	11	12
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	18	0	18
<i>Serratia proteamaculans</i> subsp. <i>proteamaculans</i>	0	15	15
<i>Serratia</i> spp.	0	9	9

Wurden vom grünen Käse vor allem Gram-negative Bakterien isoliert, die nicht den Enterobakterien zugeordnet werden (*Pseudomonas aeruginosa*), war diese Gruppe am Ende der Reifung verschwunden (Tab. 22). Coliforme Bakterien kamen im grünen und im reifen Käse vor (*Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae*) Etwa die Hälfte der isolierten Bakterien im reifen Käse bildete kein Gas aus Lactose und wurde daher zu den nicht-coliformen

Gram-negative Bakterien in oberflächengereiften Weichkäsen

Enterobakterien gezählt (*Serratia proteamaculans* subsp. *proteamaculans*, *Serratia* spp. *Pantoea* spp.)

Tab. 22: Gruppenzugehörigkeit der isolierten Bakterienstämme aus Betrieb D [Anzahl (%)]

	Coliforme	Enterobacteriaceae (ohne Coliforme)	Gram-negative (ohne Enterobacteriaceae)	Gesamt
Grün	12 (40%)	0 (0%)	18 (60%)	30
Reif	21 (42%)	29 (58%)	0 (0%)	50
Gesamt	33 (41,3%)	29 (36,2%)	18 (22,5%)	80

Chemische Daten

Die chemischen Parameter sind in Tab. 23 zusammengefasst. Die chemischen Parameter lagen im Normbereich dieses Käses.

Tab. 23: Mittelwerte der chemischen Untersuchungen der grünen und reifen Käse aus Betrieb D

		Grüner Käse	Reifer Käse
pH- Wert	n= 10	5,08 ± 0,08	5,56 ± 0,19
Galactose [g/kg]	n= 10	7,62 ± 0,80	
Lactose [g/kg]	n= 10	3,05 ± 1,79	
Kochsalz [%]	n= 6		1,78 ± 0,15
Trockenmasse [%]	n= 6		54,68 ± 2,31

Betrieb E

Grüner Käse

Coliforme Bakterien konnten im verzehrbaren Anteil bei sechs und auf der Käseoberfläche bei acht Proben gefunden werden (Tab. 24). Gram-negative Bakterien wurden im verzehrbaren Anteil bei acht und auf der Käseoberfläche bei allen Proben gefunden. Die Keimzahlen der Gram-negativen Bakterien waren häufig um 1 bis 3 Zehnerpotenzen höher als die der coliformen Bakterien. Zum Teil waren die Kontaminationen mit Gram-negativen Keimen mit über 10^4 KBE/g sehr hoch. *E. coli* konnte bei keiner der zehn Proben nachgewiesen werden.

Tab. 24: Keimzahlen (KBE/g) im grünen Käse nach Salzbad. p = verzehrbarer Anteil; o= Käseoberfläche (äußerste 2mm).

Probe	Gram- negative p	Gram- negative o	Coliforme p	Coliforme o	E. coli p	E. coli o
1	5.000	10.000	10	30	<10	<10
2	100.000	10.000	10	10	<10	<10
3	<100	100	<10	10	<10	<10
4	26.000	17.000	20.000	18.000	<10	<10
5	1.600	2.800	690	3.000	<10	<10
6	<100	500	<10	260	<10	<10
7	160.000	320.000	120.000	200.000	<10	<10
8	500	600	<10	<10	<10	<10
9	2.600	300	2.000	500	<10	<10
10	100	400	<10	<10	<10	<10

Reifer Käse

Keine Probe erfüllte die in der MHVO festgesetzten Anforderungen hinsichtlich des Coliformengehaltes (9 Proben überschritten den Höchstwert, eine Probe überschritt den Schwellenwert). In sechs der 10 Proben lagen die Coliformengehalte über 10^6 / g (Tab. 25). Alle Proben wiesen mehr als 10^5 Gram-negative / g auf, wobei 8 Proben den Wert 10^6 / g erreichten oder überschritten. *E. coli* war nur einmal nachweisbar, diese Probe überschritt den in der MHVO festgesetzten Höchstwert für *E.coli*. Die Käse waren zum Teil auf der Oberfläche deutlich stärker kontaminiert als im verzehrbaren Anteil.

Gram-negative Bakterien in oberflächengereiften Weichkäsen

Tab. 25: Keimzahlen (KBE/g) im Käse nach dreiwöchiger Reifung. p = verzehrbare Anteil; o= Käseoberfläche (äußerste 2mm).

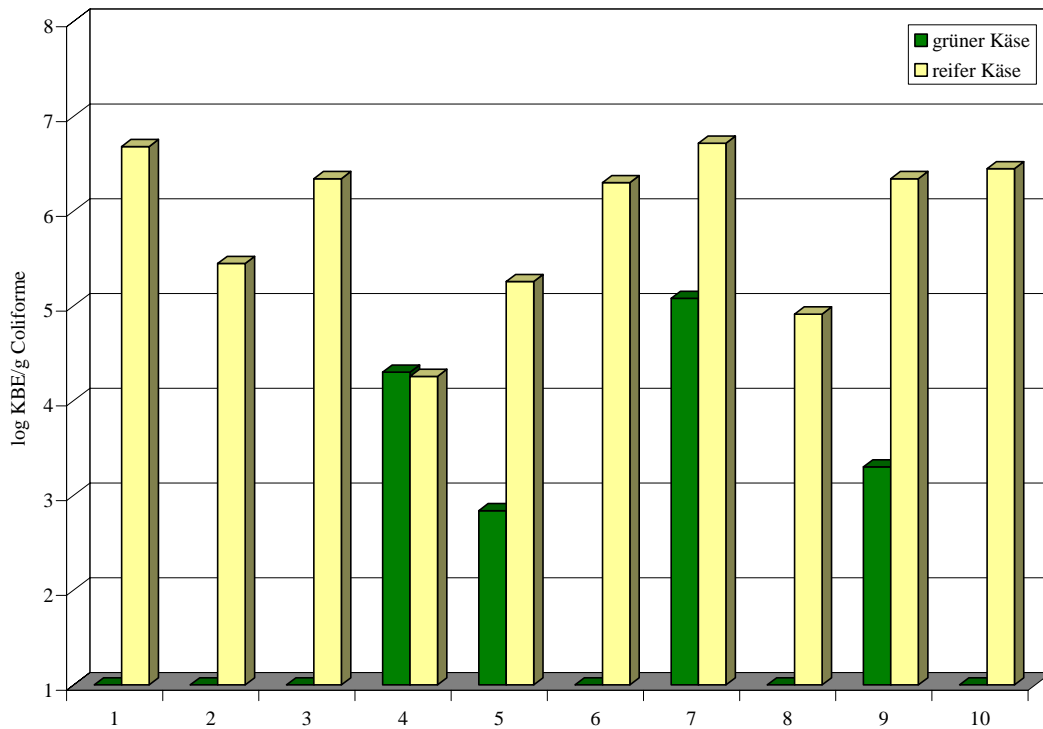
Probe	Gram- negative p	Gram- negative o	Coliforme p	Coliforme o	E. coli p	E. coli o
1	14.000.000	100.000.000	4.800.000	40.000.000	<10	<10
2	1.000.000	740.000	280.000	2.400.000	<10	<10
3	7.400.000	40.000.000	2.200.000	14.000.000	2.200	76.000
4	340.000	1.500.000	18.000	500.000	<10	<10
5	2.100.000	10.000.000	180.000	500.000	<10	<10
6	16.000.000	20.000.000	2.000.000	3.400.000	<10	<10
7	8.200.000	36.000.000	5.200.000	14.000.000	<10	<10
8	880.000	560.000	140.000	82.000	<10	<10
9	2.600.000	30.000	2.200.000	12.000	<10	<10
10	3.200.000	4.400.000	2.800.000	1.800.000	<10	<10

Vergleich der Keimzahlen der grünen und reifen Käse

Die Keimzahlen der grünen Käse nach dem Salzbad geben keinen Hinweis auf das Keimzahlniveau am Ende der Reifung (Abb. 9). Auch wenn im grünen Käse keine nachweisbare Rekontamination mit Coliformen vorhanden war, lagen sehr hohe Keimzahlen im reifen Käse vor. Bei den Gram-negativen Bakterien war eine deutliche Vermehrung der im grünen Käse vorhandenen Bakterien erkennbar (Abb. 10).

Bei den Käseproben dieses Betriebes konnten zum Teil im grünen Käse schon sehr hohe Rekontaminationen festgestellt werden. Während der Reifung kam es zu einer starken Vermehrung der Bakterien. Auch eine zusätzliche Rekontamination durch die Schmierung ist aufgrund der hohen Keimzahlen im reifen Käse nicht auszuschließen.

Abb. 9: Coliformen-Keimzahlen der grünen und reifen Käse aus Betrieb E (n=10)

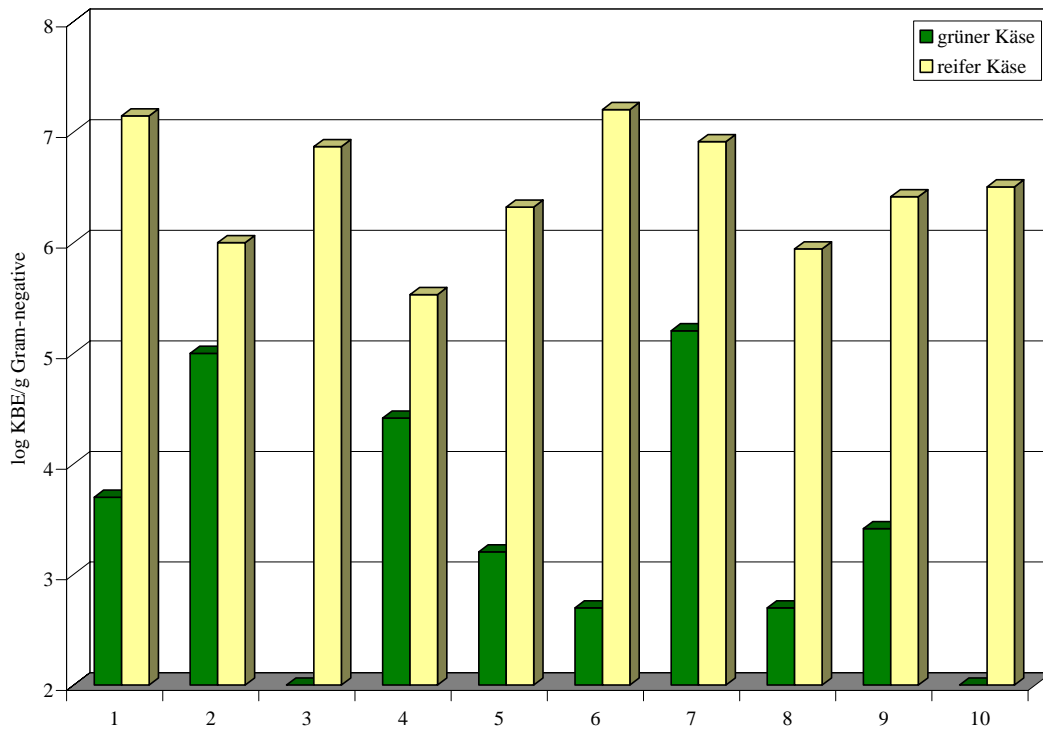


Artenspektrum

Von den Käseproben wurden insgesamt 80 Bakterienstämme isoliert, davon stammten 30 vom grünen und 50 vom reifen Käse. Diese Isolate konnten zehn Arten zugeordnet werden (Tab. 26). Während der dreiwöchigen Reifung ist eine Verschiebung in der Zusammensetzung der Bakterien erkennbar (Tab. 27). Im grünen Käse dominierten Gram-negative Bakterien die nicht zu den Enterobakterien gehören (*Pseudomonas* spp.). Im reifen Käse wurden diese nicht mehr nachgewiesen, es dominierten vor allem coliforme Bakterien der Gattung *Enterobacter*. Daneben kam noch die Art *Morganella morganii* vor, die zu den nicht-coliformen Enterobakterien gezählt wird (16 %).

Gram-negative Bakterien in oberflächengereiften Weichkäsen

Abb. 10: Gram-negativen-Keimzahlen der grünen und reifen Käse aus Betrieb E (n=10)



Tab. 26: Zusammensetzung der Gram-negativen Bakterienflora im grünen und reifen Käse aus Betrieb E

Art	Grüner Käse	Reifer Käse	Gesamt
<i>Enterobacter aerogenes</i>	0	8	8
<i>Enterobacter amnigenus</i>	0	6	6
<i>Enterobacter cloacae</i>	5	7	12
<i>Enterobacter intermedius</i>	0	17	17
<i>Enterobacter spp.</i>	0	1	1
<i>Morganella morganii</i>	0	8	8
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10	0	10
<i>Pseudomonas fluorescens/ putida</i>	10	0	10
<i>Pseudomonas luteola</i>	5	0	5
<i>Serratia spp.</i>	0	3	3

Gram-negative Bakterien in oberflächengereiften Weichkäsen

Tab. 27: Gruppenzugehörigkeit der isolierten Bakterienstämme aus Betrieb E [Anzahl (%)]

	Coliforme	Enterobacteriaceae (ohne Coliforme)	Gram-negative (ohne Enterobacteriaceae)	Gesamt
Grüner Käse	5 (16,7%)	0 (0%)	25 (83,3%)	30
Reifer Käse	42 (84%)	8 (16%)	0 (0%)	50
Gesamt	47 (58,8%)	8 (10%)	25 (31,2%)	80

Chemische Daten

Die chemischen Parameter sind in Tab. 28 zusammengefasst. Die chemischen Parameter lagen im Normbereich dieses Käses.

Tab. 28: Mittelwerte der chemischen Untersuchungen der grünen und reifen Käse aus Betrieb E

		Grüner Käse	Reifer Käse
PH- Wert	n= 10	5,02 ± 0,10	5,87 ± 0,66
Galactose [g/kg]	n= 8	0,34 ± 0,33	
Lactose [g/kg]	n= 8	0,51 ± 0,76	
Kochsalz [%]	n= 5		2,22 ± 0,12
Trockenmasse [%]	n= 6		50,23 ± 1,72

Betrieb F

Grüner Käse

Bei drei Produktionen waren die grünen Käseproben im verzehrbaren Anteil geringfügig mit coliformen Bakterien kontaminiert (Tab. 29). Auf der Oberfläche konnten keine coliformen Bakterien gefunden werden. Gram-negative Bakterien waren bei zwei Käseproben im verzehrbaren Anteil und bei einer Probe auf der Käseoberfläche zu finden. Das Kontaminationsniveau war generell sehr niedrig, nur bei einer Probe kam es zu einer stärkeren Kontamination auf der Oberfläche.

Tab. 29: Keimzahlen (KBE/g) im grünen Käse nach Salzbad. p = verzehrbarer Anteil; o= Käseoberfläche (äußerste 2mm).

Probe	Gram- negative p	Gram- negative o	Coliforme p	Coliforme o	E. coli p	E. coli o
1	100	<100	<10	<10	<10	<10
2	<100	<100	10	<10	<10	<10
3	<100	<100	<10	<10	<10	<10
4	<100	<100	<10	<10	<10	<10
5	<100	<100	<10	<10	<10	<10
6	<100	<100	30	<10	<10	<10
7	<100	<100	<10	<10	<10	<10
8	100	5.600	10	<10	<10	<10
9	<100	<100	<10	<10	<10	<10
10	<100	<100	<10	<10	<10	<10

Reifer Käse

Die Gehalte an Coliformen lagen im Allgemeinen bei unter 10^4 KBE/g. Eine Höchstwertüberschreitung war nur bei einer Probe gegeben (Tab. 30). Die Anzahl der Gram-negativen Bakterien ist häufig um 1 bis 3 Zehnerpotenzen höher als die Anzahl der Coliformen. Die Käseoberfläche war im Allgemeinen stärker mit Keimen belastet als der verzehrbare Anteil. In keiner Probe konnte *E. coli* nachgewiesen werden.

Vergleich der Keimzahlen der grünen und reifen Käse

Obwohl in den grünen Käsen nur in einer Probe coliforme Bakterien nachweisbar waren, konnten in den reifen Käsen bei allen Produktionen Coliforme nachgewiesen werden (Abb. 11). Die Coliformenzahlen lagen allerdings meist sehr niedrig ($< 10^3$ KBE/g), in zwei Proben konnten Coliforme nur auf der Oberfläche in geringen Mengen ($< 10^2$ KBE/g) nachgewiesen werden. Eine Ausnahme stellt die Produktion 5 dar, bei der im grünen Käse keine Coliformen nachgewiesen werden konnten, im reifen Käse jedoch über 10^6 KBE/g festgestellt wurden. Ähnlich stellte sich die Situation bei den Gram-negativen dar. Die grünen Käse waren kaum mit Gram-negativen kontaminiert, im Verlauf der Reifung war ein Anstieg zu erkennen (Abb. 12).

Tab. 30: Keimzahlen (KBE/g) im Käse nach dreiwöchiger Reifung. p = verzehrbare Anteil; o= Käsoberfläche (äußerste 2mm).

Probe	Gram- negative p	Gram- negative o	Coliforme p	Coliforme o	E. coli p	E. coli o
1	4.600	40.000	820	10.000	<10	<10
2	2.800	22.000	2.600	22.000	<10	<10
3	10.000	22.000	1.200	1.200	<10	<10
4	10.000	22.000	5.600	12.000	<10	<10
5	1.200.000	15.000.000	1.200.000	700.000	<10	<10
6	960	5.600	600	1.200	<10	<10
7	1.000	3.800	260	1.000	<10	<10
8	1.400	10.000	<10	10	<10	<10
9	1.000	2.800	<10	30	<10	<10
10	44.000	480.000	30	3.600	<10	<10

Abb. 11: Coliformen-Keimzahlen der grünen und reifen Käse aus Betrieb F (n=10)

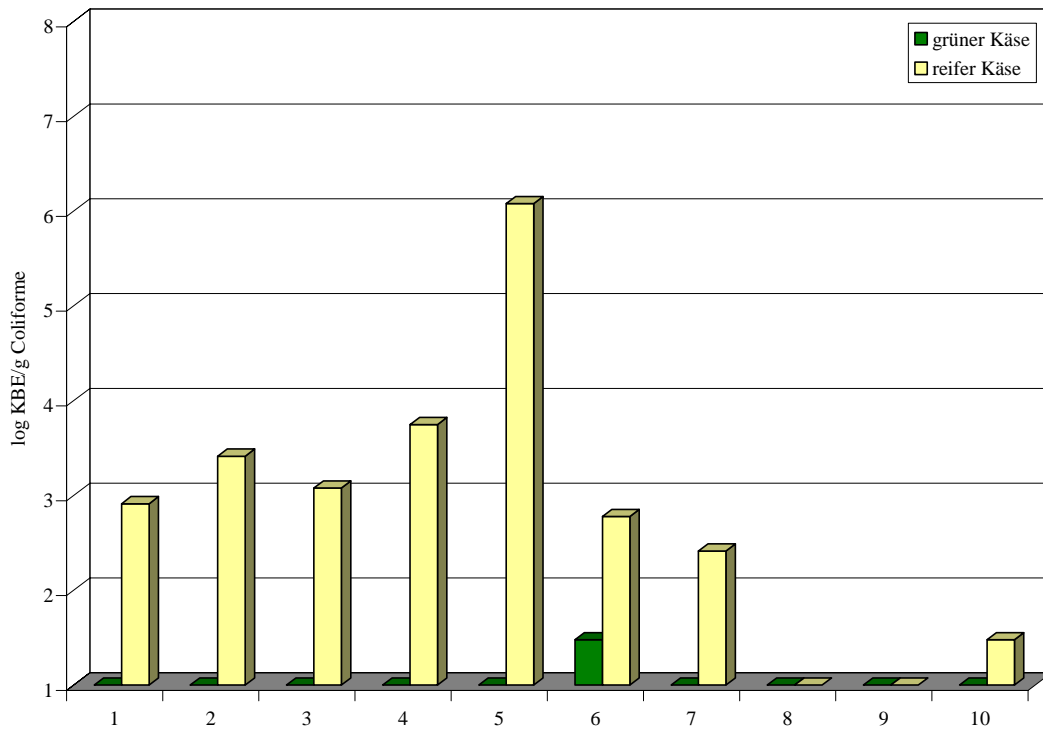
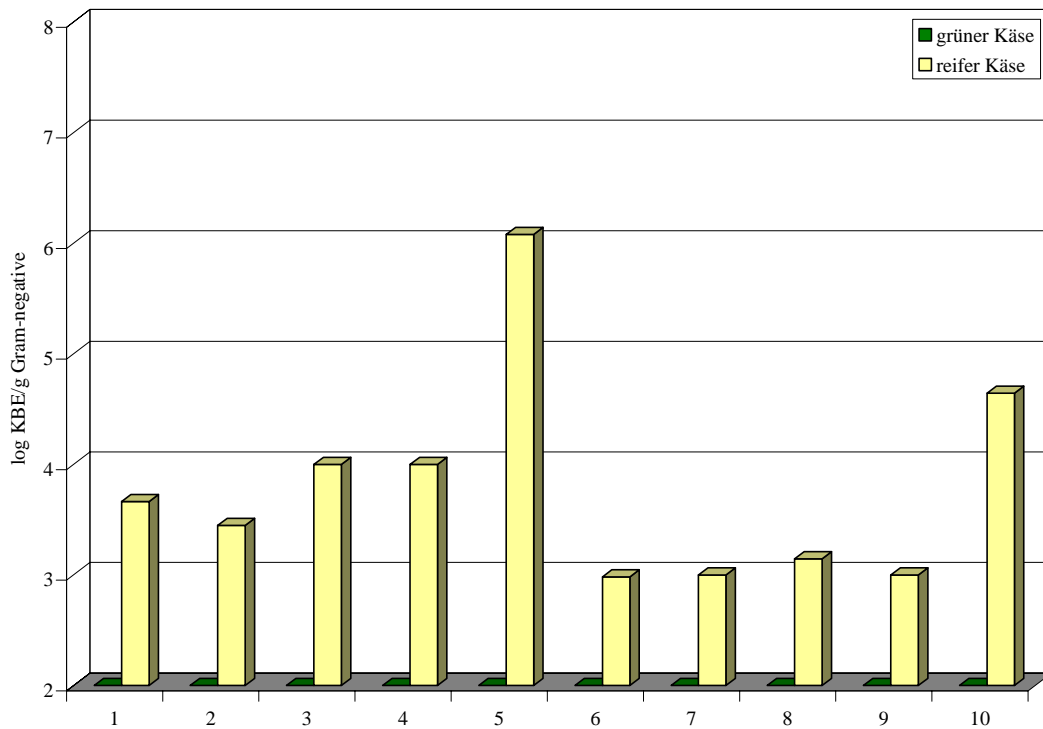


Abb. 12: Gram-negativen-Keimzahlen der grünen und reifen Käse aus Betrieb F (n=10)



Artenspektrum

Da die grünen Käse kaum belastet waren, wurden 25 Bakterienstämme nur vom reifen Käse isoliert. Es konnten insgesamt sechs Arten differenziert werden (Tab. 31). Die Coliformenflora (*Enterobacter* sp. und *Serratia* sp.) wies einen Anteil von 18 % auf (Tab. 32). Überwiegend wurden Stämme der Gattung *Pantoea*, die kein Gas aus Lactose bildeten und daher zu den nicht-coliformen Enterobakterien gezählt wurden, nachgewiesen. Andere Gram-negative Bakterien die nicht zu den Enterobacteriaceen gezählt werden, waren nicht feststellbar.

Tab. 31: Zusammensetzung der Gram-negativen Bakterienflora im reifen Käse aus Betrieb F

Art	Anzahl
<i>Enterobacter cloacae</i>	1 (4%)
<i>Enterobacter</i> spp.	2 (8%)
<i>Pantoea</i> spp.	16 (64%)
<i>Rahnella aquatilis</i>	1 (4%)
<i>Serratia proteamaculans</i> subsp. <i>proteamaculans</i>	1 (4%)
<i>Serratia</i> spp.	4 (16%)

Tab. 32: Gruppenzugehörigkeit der isolierten Bakterienstämme aus Betrieb F [Anzahl (%)]

	Coliforme	Enterobacteriaceae (ohne Coliforme)	Gram-negative (ohne Enterobacteriaceae)	Gesamt
Reifer Käse	7 (18%)	18 (72%)	0 (0%)	25

Chemische Daten

Die chemischen Parameter sind in Tab. 33 zusammengefasst. Die chemischen Parameter lagen im Normbereich dieses Käses.

Tab. 33: Mittelwerte der chemischen Untersuchungen der grünen und reifen Käse aus Betrieb F

		Grüner Käse	Reifer Käse
PH- Wert	n= 10	5,14 ± 0,07	5,25 ± 0,17
Galactose [g/kg]	n= 10	6,47 ± 1,20	
Lactose [g/kg]	n= 10	0,61 ± 0,47	
Kochsalz [%]	n= 6		1,46 ± 0,19
Trockenmasse [%]	n= 6		57,80 ± 1,71

4. Diskussion

Beim Vergleich der Keimzahlen im grünen und reifen Käse zeigte sich, dass das Fehlen einer nachweisbaren Rekontamination sowohl mit coliformen als auch Gram-negativen Bakterien im grünen Käse kein Hinweis für ein hygienisch einwandfreies Endprodukt war. Die Keimzahlen im grünen Käse waren, von wenigen Ausnahmen abgesehen, niedrig. Dagegen waren im reifen Käse zum Teil sehr hohe Keimzahlen feststellbar. Ein ähnliches Ergebnis ergab auch die Untersuchung von BOTZENHARDT (2004), wo bei allen untersuchten Weichkäsen (Rotschmierkäse und Edelschimmelkäse) eine Zunahme der Keimzahlen sowohl der coliformen Bakterien als auch der Enterobakterien um bis zu vier Zehnerpotenzen während der Reifung erfolgte. Ebenso wie bei der vorliegenden Untersuchung wurde eine gute mikrobiologische Qualität der Käse nach dem Salzbad festgestellt.

Demgegenüber wurde in verschiedenen, Mitte der achtziger Jahre durchgeführten Stufenkontrollen im Zeitraum zwischen Salzbad und Packtag kein oder nur ein geringer Anstieg der Keimzahlen der coliformen Bakterien nachgewiesen (SPILLMANN und SCHMIDT-LORENZ 1986, HÜFNER 1984, SONNENMOSER und KESSLER 1984). SPILLMANN und SCHMIDT-LORENZ (1986) stellten bei Stufenkontrollen in einer Camembertkäserei den größten Anstieg der Keimzahlen coliformer Bakterien bis zum Salzbad fest. Anschließend wurde ein geringer Rückgang der Keimzahlen bis zum Packtag beobachtet. Nachdem in der untersuchten Käserei Sanierungsmaßnahmen auf der Basis dieser Stufenkontrollen durchgeführt worden waren, ging die Höhe der Rekontamination mit coliformen Bakterien zwar insgesamt zurück, der größte Anstieg der coliformen Keimzahlen konnte immer noch bis zum Salzbad festgestellt werden. Während der Reifung gingen die Bakterienkeimzahlen auch nach den Sanierungsmaßnahmen zurück (SPILLMANN und SCHMIDT-LORENZ 1987b). HÜFNER (1984) führte Stufenkontrollen in drei Camembertproduktionsbetrieben und drei Rotschmierkäseproduktionsbetrieben durch. Auch hier kam es während der Produktion zu Rekontaminationen mit coliformen Bakterien. Während der Reifung wurde bei den Rotschmierkäsen eine geringe Abnahme der Keimzahlen der coliformen Bakterien festgestellt, während bei der Reifung von Camembert eine Zunahme der Keimzahlen um rund eine Zehnerpotenz beobachtet wurde. Bei SONNENMOSER und KESSLER (1984) wurde zwischen Salzbad und dem Ende der dreiwöchigen Reifung eine

Abnahme der Keimzahlen der coliformen Bakterien in Camembertkäsen von rund zwei Zehnerpotenzen festgestellt.

Aussagen über die Herkunft der Rekontaminationen können nicht durch Endproduktuntersuchungen sondern nur durch systematisch durchgeführte Stufenkontrollen getroffen werden (SPILLMANN und SCHMIDT-LORENZ 1986, HÜFNER 1984, TOLLE et al. 1984, SONNENMOSER und KESSLER 1984). Durch die erwähnten Untersuchungen wurde das Coliformenproblem Mitte der achtziger Jahre erstmals systematisch bearbeitet. In der EU-Richtlinie 92/46/EWG wurden mikrobiologische Kriterien für coliforme Bakterien und *E. coli* bei Weichkäse aus pasteurisierter Milch festgesetzt. Dadurch wurden die Verarbeitungsbetriebe gezwungen, Maßnahmen zur Beherrschung der coliformen Bakterien zu setzen. Neben der Umsetzung einer guten Herstellungs- und Hygienepraxis, die auch ein entsprechendes hygienisches Design der Anlagen und Geräte sowie effektive Reinigungs- und Desinfektionsverfahren voraussetzt, trug auch die Einführung von HACCP- Systemen (Hazard Analysis and Critical Control Point) zur Absenkung der Keimzahlen coliformer Bakterien bei. Eine Kontrolle der Vermehrung der coliformen Rekontaminationskeime kann durch gezielte Temperaturführung während Reifung und Lagerung erzielt werden. Eine Vermehrung der coliformen Bakterien nach dem Abpacken kann nur bei Temperaturen von unter 5°C unter Kontrolle gehalten werden; Temperaturen von über 10°C führen zu einem drastischen Anstieg der Keimzahlen coliformer Bakterien (SPILLMANN und SCHMIDT-LORENZ 1987b).

SPILLMANN und SCHMIDT-LORENZ (1987a) und SONNENMOSER und KESSLER (1984) haben die Rekontaminationsquellen und die Prozessschritte, bei denen gute Vermehrungsbedingungen für Gram-negative Bakterien während der Weichkäseproduktion herrschen, erarbeitet. Als häufigste Rekontaminationsursache werden die Käseausformanlagen und Käseformen genannt. Bei einer unzureichenden Reinigung und Desinfektion der Ausformanlagen kann es bei langen Betriebs- und Standzeiten zu einer unkontrollierten Vermehrung Gram-negativer Bakterien kommen. Bei SPILLMANN und SCHMIDT-LORENZ (1986) wurde ein 100-mal höherer Coliformengehalt in der von der Portionieranlage ablaufenden Molke festgestellt als im Bruch-Molke-Gemisch vor der Ausformung. Die Kunststoff-Käseformen sind durch die ständige Desinfektion und Reinigung mit heißem Wasser enormen Beanspruchungen ausgesetzt, wodurch es schnell zur Bildung von Haarrissen kommen kann, in denen sich

Bakterien festsetzen und den Bruch bei der Abfüllung kontaminieren können.

Bei der Trennung von Bruch und Molke wird der Großteil der Bakterien im Casein-Netzwerk des Bruches zurückgehalten, wodurch es zu einer Aufkonzentrierung coliformer Bakterien um ca. eine Zehnerpotenz im Bruch kommt (HÜFNER 1984, SPILLMANN und SCHMIDT-LORENZ 1986). Zu einer unvermeidbaren Vermehrung der Rekontaminationskeime kommt es durch die während der gesamten Käsung für das Wachstum der Mikroorganismen optimalen Temperaturen (SPILLMANN und SCHMIDT-LORENZ 1986). Die Vermehrung unerwünschter Mikroorganismen wird durch den Stoffwechsel der Milchsäurebakterien (Bildung von antimikrobiellen Substanzen und Milchsäure bzw. Absenkung des Redoxpotential und des pH- Wertes) gehemmt (ASPERGER 1986).

Der Vergleich der Ergebnisse der Keimzahlen der grünen Käse bzw. reifen Käse sowie auf der Oberfläche bzw. im verzehrbaren Anteil der untersuchten Käse ermöglicht Aussagen über die Herkunft der Rekontaminationen. Auf der Käseoberfläche waren häufig höhere Keimzahlen als im verzehrbaren Anteil feststellbar. Dies ist bei den reifen Käsen auf die besseren Wachstumsbedingungen auf der Käseoberfläche zurückzuführen (GIANOTTI 1999, GRIEM 1982, HÜFNER 1984, WYDER 2000). Bei den Käsen, die nach Salzbad hohe Keimzahlen Gram-negativer Bakterien nur auf der Oberfläche aufgewiesen haben, kann auf eine Rekontamination durch nicht ausreichend gereinigte und desinfizierte Käseformen geschlossen werden. Waren im grünen Käse die Oberfläche und das Käseinnere in etwa gleich stark kontaminiert, hat die Rekontamination vermutlich unmittelbar nach der Pasteurisierung, in der Käsereiwanne oder bei der Bruchabfüllung stattgefunden. Mögliche Rekontaminationsquellen im Reifungskeller sind unzureichend desinfizierte Käsehorden, Kühl- und Befeuchtungsanlagen oder das Personal (KESSLER 1988, TODT 1993, SONNENMOSER und KESSLER 1984). Eine Vermehrung der Rekontaminationskeime kann aufgrund der hohen pH-Werte auf der Käseoberfläche kaum vermieden werden.

Eine besondere Stellung innerhalb der coliformen Bakterien nimmt *E. coli* ein. Für Weichkäse gelten momentan die in der MHVO festgesetzten Grenzwerte von $m= 100$ KBE/g und $M= 1.000$ KBE/g. Bei der hier durchgeführten Untersuchung konnten bei den Käsen nach Salzbad in vier von sechzig Proben *E. coli* bei einer Nachweisgrenze von 10 KBE/g gefunden werden, die Keimzahlen waren mit unter 100 KBE/g gering. Im reifen Käse konnten bei zwei Proben Keimzahlen zwischen Schwellen- und Höchstwert und bei

drei Proben Keimzahlen über dem Höchstwert gefunden werden. Ähnliche Ergebnisse wurden von BOTZENHARD (2004) erhalten, wo *E. coli* nur in einzelnen Proben gefunden werden konnte und bei diesen Proben nur in geringen Keimzahlen vorkam.

Die Ergebnisse der Keimzahlbestimmungen und der Analyse des Artenspektrums bestätigen die Annahme, dass es durch das größere Keimspektrum, das im Rahmen des neuen EU-Hygienerechts diskutiert wird, zu einer deutlichen Verschärfung der Anforderungen an die Produzenten kommen würde. Ausgehend vom momentan gültigen Höchstwert für coliforme Bakterien in Weichkäse (M= 100.000), entsprachen 21,67% der Proben bei der Untersuchung auf coliforme Bakterien nicht, während 31,67% der Proben bei der Untersuchung auf Gram-negative Bakterien nicht entsprächen, würden sie nach diesem Grenzwert beurteilt. Zwischen dem Schwellenwert (m=10.000) und dem Höchstwert lagen bei der Untersuchung auf coliforme Bakterien 8,3% der Käse, während bei der Untersuchung auf Gram-negative Bakterien 23,3% der Proben in diesem Bereich lagen. Dieser Unterschied zwischen der Höhe der Keimzahlen der Gram-negativen und coliformen Bakterien war bei den von BOTZENHARDT (2004) durchgeführten Untersuchungen zwar auch erkennbar aber nicht so deutlich ausgeprägt. In der Zwischenzeit ist für Käse aus erhitzter Milch im Entwurf für die mikrobiologischen Kriterien der Europäischen Union nur mehr *E. coli* als Parameter vorgesehen (SANCO/4198/2001 Rev. 15, 2005).

In der Vergangenheit wurden verschiedene Analysen zur Artzusammensetzung von coliformen Bakterien und der Enterobakterien bei Weichkäsen durchgeführt. Bei der von SCHMIDT-LORENZ et al. (1986) durchgeführten Analyse der Artzusammensetzung in Camembertkäsen wurde am Beginn der Käseherstellung vor allem *Pantoea agglomerans* (früher: *Enterobacter agglomerans*) gefunden. Diese Art konnte sich im Reifungsverlauf nicht durchsetzen und verschwand fast vollständig bis zum verkaufsfertigen Käse. Im verkaufsfertigen Produkt dominierte *Citrobacter freundii*, daneben wurde noch ein geringer Prozentsatz *Klebsiella pneumoniae* gefunden. Bei GRIEM (1982) konnte bei Käsen vom Camemberttyp im verkaufsfertigen Käse vor allem *Citrobacter freundii* identifiziert werden. Daneben kamen noch *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Hafnia alvei*, *Enterobacter cloacae* und *Serratia proteamaculans* subsp. *proteamaculans* (früher: *Serratia liquefaciens*) in den verkaufsfertigen Käsen vor. Im Rahmen dieser Untersuchung wurden auch rotgeschmierte Weichkäse untersucht, wobei im reifen Käse die Gattung *Proteus* dominierte. Außerdem wurden auch hier *Citrobacter freundii* und

Hafnia alvei nachgewiesen. Auf der Oberfläche von Weichkäsen waren bei der Untersuchung von GIANOTTI (1999) *Proteus vulgaris* und *Serratia proteamaculans* subsp. *proteamaculans* die häufigsten Arten; daneben wurden noch *Klebsiella pneumoniae*, *Providencia stuartii* und *Morganella morganii* identifiziert.

Auch bei der hier durchgeführten Arbeit waren *Citrobacter freundii*, *Klebsiella* spp. und *Serratia* spp. häufige Rekontaminationskeime im reifen Käse, daneben wurden noch *Enterobacter* sp. und *Pantoea* sp. in größerer Anzahl isoliert.

Im grünen Käse gehörte der Großteil der isolierten Bakterien zu den Gram-negativen Bakterien, die nicht zu den Enterobacteriaceae gehören (50%). Daneben wurden noch coliforme Bakterien (49%) gefunden, nicht-coliforme Enterobacteriaceae (1%) waren dagegen nur vereinzelt nachweisbar. Im reifen Käsen wurden fast ausschließlich coliforme Bakterien (60%) und nicht-coliforme Enterobacteriaceae (38%) gefunden, während andere Gram-negativen Bakterien nur vereinzelt nachweisbar waren (2%). Im grünen Käse dominieren Gram-negative Bakterien der Gattungen *Pseudomonas* und *Acinetobacter* die im Verlauf der Reifung von den Enterobacteriaceae verdrängt wurden. Eine Verschiebung des Artenspektrums der Enterobacteriaceae während der Reifung ist aus der Literatur bekannt (SCHMIDT-LORENZ et al. 1986, GRIEM 1982). Der Wechsel des Bakterienspektrums von anderen Gram-negativen Bakterien hin zu den Enterobacteriaceae ist bei Weichkäsen bisher nicht beschrieben worden.

Schon seit längerem wird über den Einfluss vor allem der coliformen Bakterien auf die Geschmacksbildung bei Käsen diskutiert. Die Meinungen sind hier sehr kontrovers. Zum Teil werden Gram-negative Bakterienstämme wie *Hafnia alvei* als Bestandteil von Kulturen, die den typischen Rohmilchgeschmack bewirken sollen, vertrieben (z.B. Firma Danlac; www.danlac.com). Im Rahmen eines von der Europäischen Union geförderten Projektes (SCM- project QLK1-CT-2001-02228) wurden verschiedene Gram-negative Bakterien als Bestandteil der typischen Reifungsflora in rotgeschmierten Käse identifiziert (LARPIN 2004). Im Gegensatz dazu stehen die Ergebnisse der von GIANOTTI (1999) durchgeführten Untersuchungen. Hier wurden verschiedene Gram-negative Bakterien, die von der Oberfläche verschiedener Rotschmierekäse isoliert wurden, auf verschiedene physiologische Parameter (Antibiotikaresistenzen, hämolytische Aktivität) und den Einfluss auf die Käsereifung getestet. Aufgrund des hohen Potentials der untersuchten Bakterienstämme Antibiotikaresistenzen auszubilden, wurde in dieser Arbeit ausdrücklich darauf hingewiesen, dass Enterobacteriaceae als

unerwünschte Schadkeime betrachtet werden können. Außerdem konnten keine Hinweise auf einen positiven Einfluss bei der Reifung nachgewiesen werden.

5. Zusammenfassung

Von je zehn Produktionschargen von oberflächengereiften Weichkäsen aus pasteurisierter Milch aus sechs Herstellungsbetrieben wurde das Vorkommen von *Escherichia coli*, Coliformen und Gram-negativen Bakterien auf der Käseoberfläche und im gesamten verzehrbaren Anteil untersucht. Von jeder Charge wurden ein grüner Käse nach Salzbad und ein verkaufsfertiger Käse nach dreiwöchiger Reifung untersucht um eine Aussage über die Entwicklung der Keimzahlen während der Reifung zu erhalten. Im grünen Käse wurden nur geringe Keimzahlen sowohl coliformer als auch Gram-negativer Bakterien gefunden, während im reifen Käse zum Teil hohe Keimzahlen festgestellt werden konnten. Die Keimzahlen auf der Käseoberfläche waren höher als die Keimzahlen im verzehrbaren Anteil. Ausgehend vom Höchstwert für coliforme Bakterien in Weichkäse aus pasteurisierter Milch ($M=100.000$), entsprachen 21,7% der Proben nicht, zwischen dem Schwellenwert ($m=10.000$) und dem Höchstwert lagen 8,3% der Proben. In den Proben von zwei der sechs Herstellungsbetriebe wurden häufig Grenzwertüberschreitungen festgestellt, während die Coliformenkeimzahlen der Proben aus den restlichen vier Betrieben nur vereinzelt über den Grenzwerten lagen. Der Vergleich der Coliformenkeimzahlen im grünen und reifen Käse zeigte, dass das Fehlen einer nachweisbaren Rekontamination im grünen Käse keinen Hinweis auf das Keimzahlniveau am Ende der Reifung gab. Von den reifen Käsen mit Coliformenkeimzahlen über dem Höchstwert war zu 38 % im grünen Käse in 0,1 g noch keine nachweisbare Rekontamination mit Coliformen vorhanden.

Um die Bedeutung der verschiedenen Gruppen gram-negativer Bakterien in oberflächengereiften Weichkäsen einschätzen zu können, wurden 115 Isolate gram-negativer Bakterien von den grünen und 260 Isolate von den reifen Käsen identifiziert. Die isolierten Stämme konnten insgesamt 21 Arten zugeordnet werden. Die Artzusammensetzung war betriebsspezifisch. Es wurde eine Verschiebung des Artenspektrums während der Reifung beobachtet. Im grünen Käse gehörte der Großteil der isolierten Bakterien zu den gram-negativen Bakterien, die nicht zu den Enterobacteriaceae gehören (50%). Daneben wurden noch coliforme Bakterien (49%) gefunden; nicht-coliforme Enterobacteriaceae (1%) waren dagegen nur vereinzelt nachweisbar. Die dominierenden Gattungen im grünen Käse waren *Pseudomonas*, *Klebsiella* und *Enterobacter*. Im reifen Käse gehörten 60% aller Bakterien zu den

coliforme Bakterien und 38% zu den nicht-coliformen Enterobacteriaceae. Andere gram-negative Bakterien waren nur in Einzelisolaten (2%) nachweisbar. Die dominierenden Gattungen im reifen Käse waren *Enterobacter*, *Pantoea* und *Serratia*.

6. Literatur

- Anonymus. 1996. Nachweis von gram-negativen Bakterien in Milch und Milchprodukten. VDLUFA Methodenbuch VI, M7.19. Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten, Darmstadt, Deutschland
- Anonymus. 1993. Bestimmung des pH-Wertes in Milch und Milchprodukten. VDLUFA Methodenbuch VI, C8.2. Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten, Darmstadt, Deutschland
- Anonymus. 1985. Bestimmung des Trockenmassegehaltes von Käse. Folienmethode. VDLUFA Methodenbuch VI, C35.4. Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten, Darmstadt, Deutschland
- Asperger, H. (1986). Wirkungen von Milchsäurebakterien auf andere Mikroorganismen - Ein Überblick. Österreichische Milchwirtschaft Beilage 1: 1-22.
- Becker, H. und G. Terplan (1987). Bedeutung und Systematik von Enterobacteriaceae in Milch und Milchprodukten. Deutsche Molkerei-Zeitung 108(8): 204- 210.
- Botzenhardt, A. E. (2004). Entwicklung eines aktuellen Hygienekonzeptes für die Weichkäseherstellung. Dissertation, Tierärztliche Fakultät, Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Busse, M. (1986). Enterobakterien als Indikatorkeime für Lebensmittel - Eine kritische Betrachtung. Forum Mikrobiologie 1, 18-22
- Chapman, H. und E. Sharpe (1990). Microbiology of Cheese. The Microbiology of Milk Products. R. Robinson. Crown House Linton Road, Barking, Essex, Elsevier Science Publishers LTD: 203-290.
- Desmaures, N., F. Bazin und M. Gueguen (1997). Microbiological composition of raw milk from selected farms in the Camembert region of Normandy. Journal of Applied Microbiology 83: 53- 58.
- Garrity, G. M., J. A. Bell und T. G. Lilburn (2004). Taxonomic outline of the Prokaryotes Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Springer Verlag, New York.
- Gianotti, S. (1999). Microbiology and biochemistry of the Enterobacteriaceae flora of the surface of typical Swiss cheeses. Dissertation, Swiss Federal Institute of Technology, ETH, Zürich.

- Griem, E. (1982). Die Enterobakterienflora von Käse. Dissertation, Bakteriologisches Institut der Süddeutschen Versuchs- und Forschungsanstalt für Milchwirtschaft, Technische Universität München – Weihenstephan.
- Hüfner, J. (1984). Herkunft und Entwicklung von coliformen Keimen bei der Herstellung von Weichkäse. Dissertation, Bakteriologisches Institut der Süddeutschen Versuchs- und Forschungsanstalt für Milchwirtschaft., Technische Universität München - Weihenstephan.
- IDF standard 122C (1996). IDF standard 122C. Milk and Milk Products. Preparation of Samples and Dilutions for Microbiological Examination.
- ISO/DIS 5541-1 (1999). ISO/DIS 5541-1: Milk and milk products -Enumeration of coliforms - Part 1: Colony count technique at 30°C without resuscitation. ISO/DIS 5541-1.
- Keßler, W. (1988). Möglichkeiten der Rekontamination bei der Weichkäseherstellung überwiegend unter dem Aspekt der Anlagenkonzeption. Deutsche Molkerei-Zeitung 109(27): 826- 832.
- Larpin, S., C. Bonaiti, N. Bora, R. Gelsomino, S. Goerges und N. Desmasures (2004). Surface microflora of Livarot, a traditional smear ripened cheese. SCM project QLK1-CT-2001-02228.
- Manafi, M. (2002). Enterobakterien, Coliforme und Escherichia coli (Indikator- und Index- Keime: (K)ein zeitgemäßes Konzept?). Vortrag 1.10.2002, Wien.
- Rajmohan, S., C. E. R. Dodd und W. M. Waites (2002). Enzymes from isolates of Pseudomonas fluorescens involved in food spoilage. Journal of Applied Microbiology 93: 205- 213.
- Riemelt, I., B. Bartel und M. Malczan (2003). Milchwirtschaftliche Mikrobiologie. Hamburg, Behr's Verlag.
- Schmidt-Lorenz, W., U. Schuler-Schmid und H. Spillmann (1986). Coliformen-Situation in einer Camembert Käserei II. Veränderung der Artenzusammensetzung der Coliformen-Flora während der Käseherstellung. Deutsche Molkerei-Zeitung 107: 1152 – 1157; 1633 - 1636.
- Sonnenmoser, H. und W. Keßler (1984). Technische Möglichkeiten zur Kontrolle der Coliformen- Flora. Deutsche Molkerei-Zeitung 105(38): 1231- 1237.

- Spillmann, H. und W. Schmidt-Lorenz (1986). Coliformen-Situation in einer Camembert Käserei I Quantitative Veränderung während der Fabrikation, Reifung und Lagerung. Deutsche Molkerei-Zeitung 107(5): 108-116.
- Spillmann, H. und W. Schmidt-Lorenz (1987a). Coliformen-Situation in einer Camembert Käserei V. Erkenntnisse und Folgerungen aus den Coliformenuntersuchungen. Schweizer. Milchw. Forschung 16(2): 45 - 50.
- Spillmann, H. und W. Schmidt-Lorenz (1987b). Coliformen-Situation in einer Camembert Käserei III. Artenzusammensetzung der Coliformen-Flora der verpackungsfertigen Käse nach Sanierung und unter verschiedenen Lagerbedingungen. Deutsche Molkerei-Zeitung 108(4): 44 - 53.
- Ternström, A., A. M. Lindberg und G. Molin (1993). Classification of the spoilage flora of raw and pasteurized bovine milk, with special reference to Pseudomonas and Bacillus. Journal of Applied Bacteriology 75: 25- 34.
- Todt, W. (1993). Reinraumtechnik in der Weichkäseherstellung. Schweizerische Milchzeitung 119 (7): 3,5.
- Tolle, A., G. Suhren und G. Hahn (1984). Coliforme Keime in Weichkäse. Deutsche Molkerei-Zeitung 105(38): 1226- 1231.
- Tschager und Jager (1979). Titrimetrische und photometrische Endpunktbestimmung. Deutsche Molkerei-Zeitung 100(47): 1658- 1669.
- Wyder, M., R. Amrein und H. Winkler (2000). Die Schmiere, ein komplexes System!
http://www.sar.admin.ch/fam/docu/kdg_halfhart/dghhk_01.pdf
Diskussionsgruppen-Stoff FAM 2000.