

# Keimzahlergebnisse aus Ziegentankmilchproben: Ein Vergleich zwischen kultureller Methode und Bactoscan-Technik

C. Zweifel<sup>1</sup>, S. Corti<sup>1</sup>, S. Hartnack<sup>2</sup>, R. Stephan<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institut für Lebensmittelsicherheit und -hygiene und <sup>2</sup>Abteilung für Epidemiologie der Universität Zürich

Gemäss Milchprüfungsverordnung (MiPV) sind die Milchproduzenten für die hygienische Milchproduktion und die nationalen Organisationen der Produzenten und Milchverarbeiter für die Durchführung der Milchprüfung verantwortlich (Anonym, 2010). Die Verordnung des Eidgenössischen Volkswirtschaftsdepartements (EVD) über die Hygiene bei der Milchproduktion (VHyMP) legt fest, dass nur einwandfreie Milch mit unverändertem Gehalt, die von Tieren mit gutem allgemeinem Gesundheitszustand stammt, abgeliefert werden darf (Anonym, 2005). Zudem sind in der VHyMP Untersuchungskriterien und Anforderungen für Kuhmilch (Keimzahl bei 30 °C: < 80'000/ml; somatische Zellen: < 350'000/ml; Hemmstoffe: nicht nachweisbar) und für die Milch von anderen Tierarten (Keimzahl bei 30 °C: < 1'500'000/ml bzw. < 500'000/ml sofern die Milch für die Herstellung von Rohmilcherzeugnissen ohne Hitzebehandlung bestimmt ist; Hemmstoffe: nicht nachweisbar) festgelegt. In jedem Monat, in dem Milch produziert wird, muss diese mindestens zweimal auf die Einhaltung dieser Kriterien untersucht werden. Die Keimzahl ist dabei von den Prüflaboratorien mit einem fluoreszenzoptischen Durchflusszytometrie-Verfahren, zum Beispiel der Bactoscan-Technik, zu bestimmen (Anonym, 2011). Um KbE (Kolonie-bildende Einheiten)-Äquivalente zu deklarieren, wurden vom nationalen Referenzlaboratorium Umrechnungsformeln für Kuhmilch evaluiert (Agroscope, Forschungsanstalt ALP-Haras; <http://www.agroscope.admin.ch>).

Im Rahmen eines an Preisabzüge gekoppelten Qualitätsüberwachungssystems einer Milchgenossenschaft wurden in Ziegentankmilchproben einzelner Betriebe mit der Bactoscan-Technik vermehrt erhöhte Keimzahlen festgestellt. Allerdings lagen diese Werte in der Regel unterhalb der oben aufgeführten VHyMP-Anforderungen. Es stellte sich daher die Frage, inwieweit sich die in Ziegentankmilchproben mit der Bactoscan-Methode ermittelten Keimzahlen zur Qualitätsüberwachung eignen. In der vorliegenden Arbeit wurden daher mittels kultureller Methode und der Bactoscan-Technik ermittelte Keimzahlen aus Ziegentankmilchproben verglichen und untersucht, ob der Gehalt an somatischen Zellen einen Einfluss auf mögliche Messunterschiede hat.

Hierfür wurden 83 Tankmilchproben von 11 Ziegenmilch-produzierenden Betrieben erhoben. Diese verteilten sich auf 10 Probenentnahme-Serien (eine Serie entspricht einem Probenentnahmetag). Jede Serie umfasste 5 bis 10 Tankmilchproben, die von verschiedenen Betrieben stammten. Transport und Lagerung erfolgten gekühlt. Die Proben wurden kulturell-bakteriologisch auf die aerobe mesophile Gesamtkeimzahl untersucht (in Anlehnung an ISO 4833:2003). Mittels Spatelverfahren wurden dabei jeweils 0.1 ml Milch (Verdünnungsstufen  $10^0$  bis  $10^{-3}$ ) auf Plate Count-Agar (Oxoid AG, Pratteln, CH) ausplattiert und die Nährmedien anschliessend während 72 h bei 30 °C inkubiert. Ausserdem erfolgte in den Tankmilchproben eine fluoreszenzoptische Keimzahlbestimmung im offiziellen Prüflaboratorium (Suisselab AG, Zollikofen, CH) mittels BactoScan™ FC (FOSS GmbH, Rellingen, D) und eine Zellzahlbestimmung mittels Fos-somatic™ FC (FOSS GmbH). Der direkte Vergleich der beiden Methoden zur Keimzahlbestimmung sowie ein möglicher Einfluss der Zellzahl auf potentielle Messunterschiede wurden mithilfe von linearen gemischten Modellen durchgeführt und getestet. Zielvariablen für den direkten Vergleich waren die Differenz der Keimzahlmessungen jeder Probe und der prozentuale Anteil der Keimzahldifferenz ausgehend von den Bactoscan-Werten. Feste Effekte im Modell waren die Zellzahl, die Probenentnahme-Serie und Interaktionen. Zufallseffekt war der einzelne Betrieb. Die Modellauswahl erfolgte mittels AIC (Akaike's Information Criterion). Zur Modellvalidierung wurden die Residuen auf Homogenität und Unabhängigkeit visuell getestet. Die Auswertung wurde mithilfe des Statistikprogramms R Version 2.14.0 (<http://www.r-project.org>) und dem nlme-package (Pinheiro et al., 2011) durchgeführt.

## Ergebnisse

Die in den 83 Ziegentankmilchproben ermittelten Keimzahlen lagen bei der kulturellen Methode zwischen 170 und 760'000 KbE/ml ( $\log_{10}$ : 2.2–5.9) und bei der Bactoscan-Technik zwischen 1'000 und 831'000/ml ( $\log_{10}$ : 3.0–5.9). Die Darstellung der logarithmierten Keimzah-

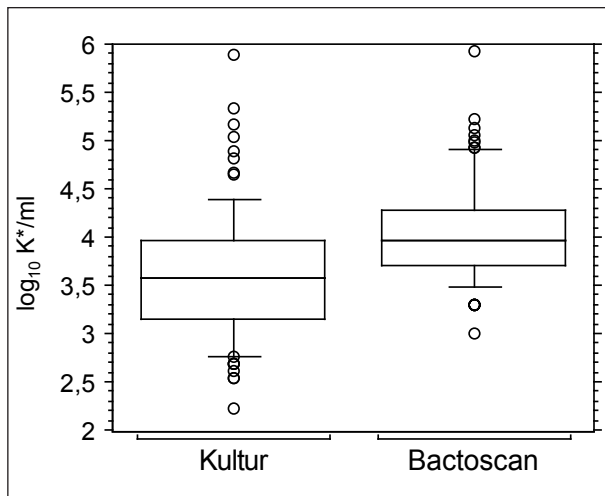


Abbildung 1: Ergebnisse ( $\log_{10}$ ) der kulturellen Keimzahlbestimmung und der Bactoscan-Technik bei 83 Tankmilchproben von Ziegenmilch-produzierenden Betrieben (K\*: KBE bei der kulturellen Methode, Keimzahl bei der Bactoscan-Methode).

len als Boxplot (Abb. 1) ermöglicht einen Vergleich der beiden Methoden, ein einfaches Ablesen des Medians, der Quartile (50%-Bereich), des 10. und 90. Perzentils (80%-Bereich) sowie der Extremwerte. Die in der VHyMP (Anonym, 2005) aufgeführte Keimzahl-Anforderung von  $< 1'500'000/\text{ml}$  wurde von keiner und die Anforderung von  $< 500'000/\text{ml}$  von lediglich einer Tankmilchprobe überschritten. Die in den 83 Tankmilchproben ermittelten Zellzahlen (Fossomatic) lagen zwischen  $65'000$  und  $4'510'000/\text{ml}$ . Eine Auswahl von Ergebnissen aus 3 der 10 untersuchten Probenreihen ist in Tabelle 1 aufgeführt.

Im direkten Vergleich lieferte die Bactoscan-Technik in 74 Proben (89.2%) höhere Werte als die kulturelle Methode. Eine nähere Betrachtung dieser Proben zeigte, dass bei kulturell bestimmten Keimzahlen von  $< 1'000$  KBE/ml tendenziell grössere Unterschiede zwischen den Ergebnissen der beiden Methoden vorlagen. Von 18 Proben mit einem kulturell bestimmten Wert von  $< 1'000$  KBE/ml wiesen dabei 16 einen Unterschied von über 0.5  $\log_{10}$ -Stufen

Tabelle 1: Keimzahl- und Zellzahlergebnisse in Ziegentankmilchproben aus 3 der insgesamt 10 untersuchten Probenreihen.

Probenreihe <sup>a</sup>	Keimzahlbestimmung <sup>b</sup>				Zellzahlbestimmung	
	Kulturell KBE/ml ( $\log_{10}$ )		Bactoscan Keimzahl/ml ( $\log_{10}$ )		Fossomatic Zellzahl/ml ( $\log_{10}$ )	
1	670	(2.83)	8'000	(3.90)	1'118'000	(6.05)
1	2'100	(3.32)	3'000	(3.48)	65'000	(4.81)
1	3'600	(3.56)	7'000	(3.85)	459'000	(5.66)
1	4'700	(3.67)	12'000	(4.08)	572'000	(5.76)
1	44'000	(4.64)	102'000	(5.01)	788'000	(5.90)
7	810	(2.91)	3'000	(3.48)	527'000	(5.72)
7	970	(2.99)	2'000	(3.30)	390'000	(5.59)
7	1'400	(3.15)	3'000	(3.48)	358'000	(5.55)
7	2'000	(3.30)	7'000	(3.85)	789'000	(5.90)
7	3'900	(3.59)	6'000	(3.78)	448'000	(5.65)
7	4'400	(3.64)	15'000	(4.18)	265'000	(5.42)
7	5'900	(3.77)	16'000	(4.20)	203'000	(5.31)
7	12'000	(4.08)	38'000	(4.58)	773'000	(5.89)
7	13'000	(4.11)	11'000	(4.04)	1'188'000	(6.07)
7	47'000	(4.67)	84'000	(4.92)	589'000	(5.77)
10	590	(2.77)	2'000	(3.30)	534'000	(5.73)
10	650	(2.81)	6'000	(3.78)	423'000	(5.63)
10	780	(2.89)	5'000	(3.70)	466'000	(5.67)
10	5'300	(3.72)	11'000	(4.04)	372'000	(5.57)
10	5'800	(3.76)	8'000	(3.90)	356'000	(5.55)
10	9'700	(3.99)	13'000	(4.11)	724'000	(5.86)
10	66'000	(4.82)	86'000	(4.93)	1'549'000	(6.19)
10	148'000	(5.17)	132'000	(5.12)	819'000	(5.91)

<sup>a</sup> Die 5 bis 10 Tankmilchproben je Serie stammten von verschiedenen Ziegenmilch produzierenden Betrieben.

<sup>b</sup> KBE, Kolonie-bildende Einheiten

## 422 Keimzahl aus Ziegentankmilchproben: Kultur und Bactoscan-Technik

(praktisch bedeutsam) zur Bactoscan-Technik auf. Aber lediglich bei 20 von 56 Proben mit kulturellen Werten  $> 1'000$  KbE/ml wurden Unterschiede von über  $0.5 \log_{10}$ -Stufen zwischen den Ergebnissen der beiden Methoden gefunden. Andererseits lieferte die kulturelle Methode in 9 Proben höhere Keimzahl-Ergebnisse als die Bactoscan-Technik. Anzumerken ist, dass bei 7 dieser Proben die kulturellen Ergebnisse  $> 10'000$  KbE/ml lagen.

Die statistische Auswertung zeigte, dass sich die Ergebnisse der kulturellen Methode und der Bactoscan-Technik signifikant unterschieden ( $p < 0.001$ ). Die geschätzten Keimzahl-Unterschiede zwischen den Methoden lagen bei  $5'633/\text{ml}$  (95 % Konfidenzintervall [3136; 8130]). Der festgestellte Unterschied zwischen der Bactoscan-Technik und der kulturellen Keimzahlbestimmung machte geschätzte 50.4 % (Standardfehler: 5.5) des Bactoscan-Wertes aus ( $p < 0.001$ ). Lediglich ein schwach signifikanter Zusammenhang zeigte sich zwischen den Keimzahlen (gemessen durch beide Methoden) und der Zellzahl ( $p = 0.03$ ). Allerdings konnte kein signifikanter Einfluss der Zellzahl auf die gemessenen Keimzahl-Unterschiede (kulturell, Bactoscan) festgestellt werden ( $p = 0.9$ ).

Anzumerken ist, dass die Aussagen nur für die ermittelten Wertebereiche gelten und dass sich die Ergebnisse nicht ohne weiteres auf andere, zum Beispiel höhere Keimzahlen extrapolieren lassen. Die Ursachen für die beobachteten Messunterschiede zwischen den beiden Methoden bleiben abzuklären. Dabei sollten wiederholte Messungen (Replikate) durchgeführt werden, um zu untersuchen, ob sich die beiden Methoden auch hinsichtlich ihrer Variabilität unterscheiden. Näher zu betrachten sind auch die Eignung des bei der Bactoscan-Technik verwendeten Umrechnungsfaktors (um KbE-Äquivalente zu erhalten) für Ziegenmilch und die Eignung der Bactoscan-Technik bei geringen Keimzahlen. Ein weiterer Aspekt ist, dass die kulturelle Methode, im Gegensatz zur Bactoscan-Technik, nur die aerobe Keimzahl erfasst, während anaerobe Keime nicht nachgewiesen werden können. In der Literatur wird zudem auf den Einfluss der Lagerdauer und Lagertemperatur von Ziegenmilch auf die Bactoscan-Ergebnisse hingewiesen (Sierra et al., 2009; Ramsahoi et al., 2011).

### Schlussfolgerung

Auffällig waren die teilweise deutlichen Unterschiede zwischen den Ergebnissen der beiden Methoden. Dabei lagen in der Regel bei der Bactoscan-Technik höhere Werte als bei der kulturellen Keimzahlbestimmung vor. Ein Einfluss der Zellzahl auf die Unterschiede konnte jedoch

nicht festgestellt werden. Basierend auf den ermittelten Wertebereichen zeigen die vorliegenden Ergebnisse von Ziegentankmilchproben, dass sich mit der Bactoscan-Methode bestimmte Keimzahlen nur unter Vorbehalt zur Qualitätsüberwachung eignen. Dies gilt insbesondere, wenn Werte weit unter den VHyMP-Anforderungen (Anonym, 2005) vorliegen und im Rahmen eines Qualitätsüberwachungssystems Preisabzüge auch bei Werten unter den VHyMP-Bestandungsgrenzen vorgesehen sind.

### Literatur

*Anonym:* Verordnung des EVD vom 23. November 2005 über die Hygiene bei der Milchproduktion (VHyMP) vom 23. November 2005 (Stand 1. Januar 2011). Eidg. Druck und Materialzentrale, Bern, <http://www.admin.ch/ch/d/sr/sr.html>, 2005.

*Anonym:* Milchprüfungsverordnung (MiPV) vom 20. Oktober 2010 (Stand 1. Januar 2012). Eidg. Druck und Materialzentrale, Bern, <http://www.admin.ch/ch/d/sr/sr.html>, 2010.

*Anonym:* Technische Weisung für die Durchführung der Milchprüfung vom 14. März 2011. Bundesamt für Veterinärwesen (BVET), <http://www.bvet.admin.ch>, 2011.

*Pinheiro P., Bates D., DebRoy S., Sarkar D., and the R Development Core Team:* Nlme: linear and nonlinear mixed effects models. R package version 3.1–102, 2011.

*Ramsahoi L., Gao A., Fabri M., Odumeru J. A.:* Assessment of the application of an automated electronic milk analyzer for the enumeration of total bacteria in raw goat milk. *J. Dairy Sci.* 2011, 94: 3279–3287.

*Sierra D., Sánchez A., Contreras A., Luengo C., Corrales J. C., de la Fe C., Guirao I., Morales C. T., Gonzalo C.:* Effect of storage and preservation on total bacterial counts determined by automated flow cytometry in bulk tank goat milk. *J. Dairy Sci.* 2009, 92: 4841–4845.

### Korrespondenz

PD Dr. Claudio Zweifel  
Institut für Lebensmittelsicherheit und -hygiene  
Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich  
Winterthurerstr. 272  
8057 Zürich  
Tel.: +41 (0)44 635 86 51  
Fax: +41 (0)44 635 89 08  
[zweifelc@fsafety.uzh.ch](mailto:zweifelc@fsafety.uzh.ch)

*Manuskripteingang:* 4. Oktober 2012

*Angenommen:* 31. Oktober 2012