

Isolierung anti-listerieller Staphylokokken aus Salzbädern und von Käseoberflächen

Von W. Bockelmann¹, M. Koslowsky¹, P. Hammer² und K.J. Heller¹

- 1) Institut für Mikrobiologie, Bundesforschungsanstalt für Ernährung und Lebensmittel – Standort Kiel, Postfach 60 69, D-24121 Kiel
- 2) Institut für Hygiene und Produktsicherheit, Bundesforschungsanstalt für Ernährung und Lebensmittel – Standort Kiel, Postfach 60 69, D-24121 Kiel

1. Einleitung

Besonders für Käse mit Oberflächenreifung (Rotschmierekäse, Edelschimmelkäse) ist die Gefahr der Kontamination mit der humanpathogenen Spezies *Listeria monocytogenes* immer latent vorhanden. Während gewachste oder Folien-gereifte Käse bei Einsatz von pasteurisierter Milch und einem schnell wirkenden Säurewecker gut vor mikrobieller Kontamination geschützt sind, sind Oberflächen-gereifte Käse gerade zu Beginn der Reifung anfällig für die Kontamination mit unerwünschten Mikroorganismen wie z.B. mit Schimmelpilzen, Enterokokken, Enterobakterien und Pseudomonaden. Diese findet man auch regelmäßig auf der Oberfläche von Rotschmierekäsen (1, 2, 3, 4, 5). Ein Grund dürfte das nach wie vor gängige Alt-Jung Schmierensystem sein, ein Kreislauf, der einerseits die erwünschte Rotschmiere, andererseits aber auch jegliche auf gereiften Käsen vorkommende Kontaminanten auf junge Käse überträgt. Sporadisch kommt es, vermutlich durch den genannten Kontaminationskreislauf begünstigt, zu einer Vermehrung von *L. monocytogenes* (LMO) und damit zu einer gesundheitlichen Gefährdung von Verbrauchern (6, 7, 8). Der aktuellste Fall im November 2006 betraf Saueremilchkäse (Gelbkäse), in dem *L. monocytogenes* in hoher Konzentration nachgewiesen wurde (10^5 KbE/g; Stengel, Lebensmittel-, Veterinär- und Umweltuntersuchungsamt des Landeslabors Schleswig Holstein, Neumünster, persönliche Mitteilung), was zu einer umfangreichen Rückrufaktion des Herstellers führte (Kieler Nachrichten vom 30.11.2006, S. 11). Obwohl keine gesundheitlichen Beeinträchtigungen von Verbrauchern bekannt wurden, ist trotzdem von einem nicht unerheblichen Imageschaden für Rotschmierekäse insgesamt auszugehen.

Als Schutzkulturen für die Käseoberfläche werden klassisch nur *Brevibacterium linens* (Rotkultur) und die Hefe *Debaryomyces hansenii* (syn. *Candida famata*) eingesetzt. In mehreren Forschungsprojekten finanziert durch EU und FEI wurden Grundlagen für die weitere Kulturentwicklung für Oberflächen-gereifte Käse erarbeitet: in 2 EU Projekten für geschmierte Schnittkäse (CT98-4220, 1998-2000; CT02-02461, 2003-2005), in 2 FEI Projekten für geschmierte Weichkäse sowie Saueremilchkäse (FV12780, FV13018, 2001-2003). Als Folge dieser Projekte stehen inzwischen weitere Oberflächenkulturen für Rotschmierekäse bei einem europäischen Kulturenhersteller kommerziell zur Verfügung: die Hefen *Kluyveromyces marxianus* und *Candida krusei* für Saueremilchkäse, *Microbacterium gubbeenense* für Labkäsesorten sowie *Corynebacterium casei* und *Staphylococcus equorum* für alle geschmierten Käsesorten (1, 9, 10).

Als Schutz vor Listerieninfektionen wurden bereits anti-listerielle *B. linens* Stämme isoliert und die Bacteriocine detailliert charakterisiert (11, 12, 13). Da *B. linens* säureempfindlich ist, und erst bei pH Werten >6,0 gut wächst, begrenzt dies die Wirksamkeit vor allem zu Beginn der Reifung, wenn der Käse Oberflächen pH Wert noch unter 6,0 liegt. Der Schwerpunkt der Arbeiten zur Entwicklung neuartiger, anti-listerieller Schutzkulturen wurde auf Hefen und Staphylokokken gelegt, die sowohl salz- als auch säuretolerant sind und sich bereits zu Beginn der Reifung auf dem Käse oder in Salzbadern einsetzen lassen.

In einem neuen Forschungsvorhaben gefördert durch das Bundesministerium für Wirtschaft und Arbeit über den Forschungsbereich der Ernährungsindustrie (FV 14786, 2006-2008) sollen (1) anti-listerielle Staphylokokken von der Bundesforschungsanstalt für Ernährung und Lebensmittel (BfEL), Kiel und (2) anti-listerielle Hefen vom Zentralinstitut für Ernährungs- und Lebensmittelforschung der TU München (ZIEL), Weihenstephan isoliert und in der Praxis getestet werden. Die vorliegende Arbeit beschreibt Ergebnisse des Screenings auf anti-listerielle Staphylokokken isoliert aus Salzbadern und von verschiedenen Käsen.

2. Material und Methoden

2.1 Isolierung und Kultivierung von Bakterien

Zur Isolierung von Bakterien und Hefen aus Salzbadproben wurde verschiedene Verdünnungsstufen auf folgenden Medien nach Hoppe-Seyler et al. (14) ausplattiert: modifizierter Milch Plate Count Agar (mMA) mit Delvocid für Rotschmierebakterien (und Staphylokokken), SK-Selektivagar für Staphylokokken, YGC-Agar für Hefen und Schimmel, Kanamycin-Äskulin-Azid Agar für Enterokokken, VRBD-Agar für Enterobakterien und CFCD-Agar für Pseudomonaden (bis auf mMA, Medien von Merck, Darmstadt).

Zur Isolierung von Staphylokokken von Käse wurden 10 g von der Oberfläche flach abgeschnitten (1-2 mm Dicke) und die Fläche bestimmt (14). Nach Verdünnung in vierstarker Ringerlösung wurden Bakterien auf SK Selektivagar für Staphylokokken ausplattiert. Die Keimzahlen wurden in Kolonie bildende Einheiten (KbE) pro cm² umgerechnet. Alle Mikroorganismen wurden bei Raumtemperatur (22-24°C) bebrütet. Staphylokokken wurden grundsätzlich von SK Agar isoliert. Gewachsene Kolonien wurden mikroskopiert und 40 Einzelkolonien pro Probe mit Impföse auf SK-Agar ausgestrichen und bei 30°C für 48h bebrütet. Reinkulturen wurden auf mMA kultiviert und bei 4°C auf gleichem Medium gelagert.

Als Indikator-Stamm für anti-listerielle Aktivität wurde *Listeria monocytogenes* L129 (syn. SLCC 8683) aus der Stammsammlung der BfEL, Kiel verwendet. Der Stamm war ursprünglich aus dem Weichkäse Vacherin Mont d'Or isoliert worden und war im Jahr 1987 verantwortlich für Listeriosefälle in der Schweiz (6). Der Stamm wurde auf Blut-Agar (Merck, Darmstadt) bei 30°C kultiviert und kühl gelagert.

2.2 Identifizierung von Staphylokokken auf Spezies und Stammebene.

Die Identifizierung erfolgte zuerst über die Zellmorphologie in der Phasenkontrastmikroskopie. Typische „Haufenkokken“ wurden mit ID 32 Staph (Bio Mérieux, Marcy l'Etoile, Frankreich) und der Online Datenbank „Api-Web“ (Bio Mérieux) über biochemische Reaktionen identifiziert. Die Klassifizierung wurde abgesichert mittels „Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis“ (ARDRA) nach Hoppe-Seyler et al. (15). Zur

Speziesidentifizierung wurden die Enzyme HindIII und XmnI eingesetzt. Zur Stammidentifizierung wurde chromosomale DNA mit Smal verdaut und die Isolate mit Pulsfeld Gelelektrophorese analysiert (15).

2.3 Hemmung von *L. monocytogenes* im Agardiffusionstest

Für Hemmstofftests wurden Staphylokokken-Isolate von Agar in 3 ml Hirn-Herz-Bouillon überimpft und 24h bei 30°C bebrütet. Der Listerien Indikator-Stamm L129 wurde in 10 ml Hirn-Herz Bouillon (Merck, Darmstadt) beimpft und über 16-18 h bei 30°C bebrütet. Für die Bereitung einer Indikator-Platte wurden 100 µl einer 10⁻² Verdünnung von *L. monocytogenes* mit 15 ml flüssigem Tryptose-Softagar (Tryptose Bouillon, Merck, mit 0.8 % Agar, temperiert auf 47°C) vermischt und in eine Petri-Schale gegossen. Je 10 µl der unverdünnten Staphylokokken Suspensionen wurden auf die Agaroberfläche getropft (5 Isolate pro Agarplatte) und bei 30 °C inkubiert. Die Bildung klarer Inhibitorzonen wurde nach 24h, 48h und 72h kontrolliert.

2.4 Hemmung von *L. monocytogenes* durch Co-Kultivierung

In Anlehnung an Verhältnisse auf der Käseoberfläche wurde von Goerges et al. (2006, (16)) ein Co-Kultivierungs Assay beschrieben, der von den Autoren für die Quantifizierung der Hemmwirkung von Hefen auf *L. monocytogenes* genutzt wurde. Für die Anwendung auf Staphylokokken wurde die Methode geringfügig modifiziert: Eine Listerien Vorkultur (siehe Agardiffusionstest) wurde 10⁻⁶ verdünnt. 100 µl Suspension (ca. 300 KbE/ml) wurden mit 100 µl Staphylokokken Suspension (ca. 3x10⁷ KbE/ml) gemischt, mit 15 ml Trypton- Soja Agar in eine Petrischale gegossen und bei 30°C für 24h kultiviert. Dann wurde der gesamte Agar aus der Petrischale in einem sterilen Beutel mit 90 ml, ca. 45°C warmer, Natriumcitrat Lösung im Stomacher Homogenisator zerkleinert. Anschließend wurden Listerien Keimzahlen durch Ausplattieren auf Palcam-Agar (Merck) und Inkubation bei 37°C für 24 h bestimmt. Staphylokokken Keimzahlen wurden auf SK Agar bestimmt (30°C, 24 h). Als Kontrolle wurde anstatt einer Staphylokokken-Suspension 100 µl viertelstarke Ringerlösung zugegeben.

3. Ergebnisse und Diskussion

Durch ihre Salz- und Säuretoleranz findet man Staphylokokken nicht nur in der Oberflächenflora von Rotschmierenkäsen, sondern auch in praktisch allen industriellen Salzbadern von Käseereien (17, 18, 19). Obwohl in älteren Arbeiten meist Mikrokokken für Rotschmierenkäse beschrieben wurden, ist durch die geänderte Taxonomie davon auszugehen, dass Isolate aus Salzbadern und von Rotschmierenkäsen überwiegend zur lebensmitteltauglichen Spezies *Staphylococcus equorum* gehören. Eine Ausnahme bilden Harzer Käse, bei denen die nicht lebensmitteltaugliche Spezies *Staphylococcus saprophyticus* bis zu 100% der Kokkenflora ausmachen kann. Diese Spezies ist nach neueren Untersuchungen auch ein häufiger Bestandteil der Salzbad Mikroflora (19).

Da es nur wenige Veröffentlichungen über die Mikrobiologie von Salzbadern gibt, wurden für das Screening auf antilisterielle Staphylokokken die mikrobiologischen Analysen auf Rotschmierenbakterien, Hefen und Schimmel sowie Enterokokken, Enterobakterien und Pseudomonaden ausgedehnt. Aus einer vorliegenden Arbeit war bekannt, dass Salzbadern unabhängig vom produzierten Käse ähnliche Florenzusammensetzungen zeigten (20). Dies konnte auch in der vorliegenden Analyse bestätigt werden.

Die Salzbadmikroflora der untersuchten 11 Salzläder (SB) von 7 Käsereien waren alle ähnlid (Tabelle 1a-c). Die untersuchten Salzläder reichten vom Kleinstmaßstab einer Bio-Hofkäserei mit der Produktion von Rotschmiere- und Schimmelkäsen aus Rohmilch (SB1, SB2) bis hin zu sehr großen Salzlädern konventioneller Schnittkäsereien, in denen keine oberflächengereiften Käse produziert werden (SB4, SB7). Alle Salzläder besaßen eine Rotschmiere-Mikroflora. Nach Zell- und Kolonimorphologie wurden beigefarbene Corynebakterien als *Corynebacterium*-Spezies, orangefarbene Kolonien als *Brevibacterium linens* und gelbe Kolonien als *Microbacterium gubbeenense*/*Arthrobacter nicotianae* klassifiziert. Für einzelne Isolate wurde diese Klassifizierung nach Hoppe-Seyler et al. (2003, 2004, (21, 15)) mittels ARDRA bestätigt. Wie erwartet, ergab sich bei der Hefemikroflora eine Dominanz von *Debaryomyces hansenii* (*Candida famata*). Daneben traten weitere Hefekolonietypen auf, die nicht weiter identifiziert wurden. In den meisten Salzlädern waren auch niedrige bis mittlere Keimzahlen von Enterokokken und Enterobakterien nachzuweisen. Bis auf eine Ausnahme wurden in allen Salzlädern auch Staphylokokken nachgewiesen. Einzelne Isolate wurden mittels ARDRA als *Staphylococcus equorum* identifiziert.

Aus den Salzlädern wurden jeweils bis zu 40 Staphylokokkenkolonien isoliert und im Agar-Diffusionsverfahren auf Hemmung von *Listeria monocytogenes* getestet (Tabelle 2). In Reinkultur zeigten zwei Isolate eine deutliche Hemmung. Beide Isolate gehörten zur nicht lebensmitteltauglichen Spezies *Aerococcus viridans*. Die Identifizierung wurde mit dem biochemischen Testkit von Bio-Meriéux ID32Staph durchgeführt (74,7 %ID, „geringe Selektivität“). Eine Klassifizierung mittels ARDRA ergab ein für Staphylokokken untypisches PCR Produkt (Doppelbande, Abb. 1, Bahn 2) und untypische Restriktionsmuster (Abb. 2a+b; 15). PCR und Restriktionsverdau waren vergleichbar mit dem Typstamm *Aerococcus viridans* DSM 20340^T (Daten nicht gezeigt). Damit ergab das Screening auf antilisterielle Staphylokokken aus Salzlädern keine für die Käsebereitung einsetzbaren antilisteriellen Stämme.

In einem zweiten Versuch wurden Staphylokokken von verschiedenen europäischen Käsen isoliert. Die meisten Käse waren Rotschmierekäse, jedoch wurden auch Schimmelkäse und konventionelle gewachste Käse mit einbezogen (Tabelle 3). Der Nachweis von Staphylokokken nicht nur auf Rotschmiere- und Schimmelkäsen sondern auch auf einem Gouda und einem Emmentaler zeigte deutlich, dass Staphylokokken zur normalen Käseflora gehören. Im Agar-Diffusionstest erwiesen sich zunächst sieben Isolate als antilisteriell; nach Reinigung und mehrfachem Überimpfen verblieben nur ein Isolat aus Schimmelkäse und zwei Isolate aus Rotschmierekäse, die weiterhin antilisterielle Eigenschaften aufwiesen. Zwei Isolate (19-25 und 25-28) konnten mittels ARDRA eindeutig als *Staphylococcus equorum* und damit als lebensmitteltauglich identifiziert werden (Abb. 2a+b). Die Identifizierung eines anti-listeriellen, kokkoiden Isolates (25-21) ergab mit ID32 Staph keine verwertbaren Ergebnisse und mit ARDRA keine Übereinstimmung mit bekannten Restriktionsmustern von 14 Staphylokokken Spezies (Hoppe-Seyler et al., 2004, Daten nicht gezeigt). Die Isolate 19-25 und 25-28 konnten eindeutig als verschiedene Stämme der Spezies *S. equorum* klassifiziert werden (Abb. 3). Das für Staphylokokken untypische Restriktionsprofil von Isolat 25-21 in der Pulsfeld-Gelelektrophorese wies auch darauf hin, dass es sich bei diesem Isolat wohl nicht um eine *Staphylococcus* Spezies handelt (Abb. 3). Eine Erweiterung des Screenings um 16 Weich- und Schnittkäseproben mit zusätzlichen 918 getesteten Isolaten ergab 12 neue Isolate mit anti-listerieller Wirkung (Tabelle 4, Werte in Klammern). Die Aktivität war jedoch nur gering, so dass von weiteren Untersuchungen abgesehen wurde.

Tab. 1a: Salzbadmikroflora einer Bio- Hofkäserei mit großer Vielfalt produzierter Käse (Kuh- und Ziegenkäse aus Rohmilch) isoliert aus 4 verschiedenen Salzbadern (8-11)*

Kolonie- morphologie	Identifi- zierung	Keimzahl [KbE*ml ⁻¹]			
		Salzbad 8 WK, RS, PC pH 5, 12°C	Salzbad 9 SK, WK, RS pH 4,9, 12°C	Salzbad 10 SK, ZK, RS, pH 5,0, 12°C	Salzbad 11 WK, PC, PR, pH 5,0, 12°C
Rotschmiere (mMA)	Gesamt- keimzahl	8,7 x 10⁵	2,5 x 10⁴	5,4 x 10⁵	1,3 x 10⁵
mittelgroß/groß, beige, glänzend	<i>Coryne- bacterium</i>	4,5 x 10 ⁵	2,0 x 10 ²	4,1 x 10 ⁵	8,1 x 10 ⁴
klein, beige, glänzend	<i>Coryne- bacterium</i>	2,1 x 10 ⁵			
groß, beige, matt	<i>Coryne- bacterium</i>		4,0 x 10 ²		
mittelgroß, orange, glänzend	<i>B. linens</i>	1,9 x 10 ⁵	3,7 x 10 ³	5,0 x 10 ⁴	1,2 x 10 ⁴
mittelgroß, gelb, glänzend	<i>Microbac- terium/ Arthrobacter</i>	2,0 x 10 ⁴	2,0 x 10 ²	2,0 x 10 ⁴	
weiß, teils mit Proteolyse (Kokken)	<i>Lacto- coccus ? Micro- coccus ?</i>		2,0 x 10 ⁴	6,0 x 10 ⁴	4,2 x 10 ⁴
Staphylo- kokken (SK)	Gesamt- keimzahl	2,2 x 10⁴	1,1 x 10²	2,6 x 10³	2,4 x 10³
groß, orange, glänzend	<i>Staphylo- coccus</i>	1,0 x 10 ⁴	6,0 x 10 ¹	1,0 x 10 ²	
groß, weiß, glänzend	<i>Staphylo- coccus</i>		2,2 x 10 ¹	2,5 x 10 ²	
klein, orange, glänzend	<i>Staphylo- coccus</i>		3,0 x 10 ¹		2,2 x 10 ²
groß, beige, glänzend	<i>Staphylo- coccus</i>	1,0 x 10 ⁴		2,3 x 10 ³	1,9 x 10 ³
klein, weiß, glänzend	<i>Staphylo- coccus</i>	2,0 x 10 ³			2,5 x 10 ²
Hefen / Schimmel (YGC)	Gesamt- keimzahl	8,8 x 10⁴	4,5 x 10⁴	1,6 x 10⁵	3,2 x 10³
weißlich, glänzend	<i>C. famata</i>	8,0 x 10 ⁴	4,5 x 10 ⁴	1,6 x 10 ⁵	3,2 x 10 ³
groß, beige, matt	Candida Hefen	2,0 x 10 ³			1,5 x 10 ¹
weißlich, matt	Candida Hefen	6,0 x 10 ³			

Fortsetzung zu Tab. 1a

Kolonie-morphologie	Identifi-zierung	Keimzahl [KbE*ml ⁻¹]			
		Salzbad 8 WK, RS, PC pH 5, 12°C	Salzbad 9 SK, WK, RS pH 4,9, 12°C	Salzbad 10 SK, ZK, RS, pH 5,0, 12°C	Salzbad 11 WK, PC, PR, pH 5,0, 12°C
weißlich, matt, faltig	<i>Candida</i> Hefen				
rot-orange, glänzend	<i>Rhodoto- rula</i> sp.				
Enterokokken (KAA)	Gesamt- keimzahl	1,0 x 10¹	4,5 x 10¹	5,0 x 10¹	4,0 x 10¹
Enterobakterien (VRBD)	Gesamt- keimzahl	1,5 x 10¹	< 10	9,5 x 10¹	< 10

* verwendete Abkürzungen: **WK** Weichkäse, **SK** (halb feste) Schnittkäse, **RK** Rohmilchkäse, **ZK** Ziegenkäse, **RM** Rohmilchkäse, **RS** Rotschmiere, **PC** *Penicillium camemberti*, **PR** *Penicillium roqueforti*, **RT** Raumtemperatur, **mMA** modifizierter Milchagar, **SK** Agar Staphylokokken Agar, **YGC** Hefeextrakt Glucose Chloramphenicol Agar, **KAA** Kanamycin Äsculin Azid Agar, **VRBD** Violet Red Bile Glucose Agar.

Tab. 1b: Salzbadmikroflora einer Bio- Hofkäserei (Kuhmilchkäse aus Rohmilch, 1, 2) und zweier Rotschmierekäsereien (Kuhmilchkäse aus pasteurisierter Milch, 3, 6)*

Kolonie-morphologie	Identifi-zierung	Keimzahl [KbE*ml ⁻¹]			
		Salzbad 1 WK, RM, PC pH 4,8, RT 17% NaCl	Salzbad 2 SK, RM, RS pH 5,2, 16°C 22% NaCl	Salzbad 3 SK, RS pH 5,3, 12°C 18-19% NaCl	Salzbad 6 ZK, SK, RS pH 5,0, 12°C 18% NaCl
Rotschmiere (mMA)	Gesamt- keimzahl	2,9 x 10⁴	1,2 x 10⁶	>3,3 x 10⁶	2,9 x 10⁵
mittelgroß / groß, beige, glänzend	<i>Coryne- bacterium</i>	1,3 x 10 ³	1,6 x 10 ⁵	5,0 x 10 ⁴	
klein, beige, glänzend	<i>Coryne- bacterium</i>				2,5 x 10 ⁴
groß, beige, matt	<i>Coryne- bacterium</i>		4,0 x 10 ²		
klein, beige, glänzend	<i>Coryne- bacterium</i>				2,5 x 10 ⁴
groß, beige, matt	<i>Coryne- bacterium</i>		4,0 x 10 ²		
mittelgroß, orange, glänzend	<i>B. linens</i>	1,3 x 10 ⁴	3,1 x 10 ⁵	>3,1 x 10 ⁶	6,0 x 10 ³
mittelgroß, gelb, glänzend	<i>Microbac- terium/ Arthrobacter</i>		2,0 x 10 ²	1,6 x 10 ⁵	
weiß, teils m. Proteolyse (Kokken)	<i>Lacto-? Micro-? Staphylo- coccus ?</i>	1,3 x 10 ⁴	7,3 x 10 ⁵		2,6 x 10 ⁵

Fortsetzung zu Tab. 1b

Kolonie- morphologie	Identifi- zierung	Keimzahl [KbE*ml ⁻¹]			
		Salzbad 1 WK, RM, PC pH 4,8, RT 17% NaCl	Salzbad 2 SK, RM, RS pH 5,2, 16°C 22% NaCl	Salzbad 3 SK, RS pH 5,3, 12°C 18-19% NaCl	Salzbad 6 ZK, SK, RS pH 5,0, 12°C 18% NaCl
Staphylokokken (SK Agar)	Gesamt- keimzahl	1,6 x 10²	1,8 x 10⁴	3,2 x 10⁴	6,8 x 10⁴
groß, orange, glänzend	<i>Staphylo- coccus</i>	1,4 x 10 ²			
groß, weiß, glänzend	<i>Staphylo- coccus</i>		4,0 x 10 ³		
klein, orange, glänzend	<i>Staphylo- coccus</i>		8,0 x 10 ³	2,9 x 10 ⁴	3,0 x 10 ⁴
groß, beige, glänzend	<i>Staphylo- coccus</i>				
klein, weiß, glänzend	<i>Staphylo- coccus</i>	2,5 x 10 ¹	8,0 x 10 ³	4,0 x 10 ³	3,8 x 10 ⁴
Hefen / Schimmel (YGC)	Gesamt- keimzahl	8,8 x 10⁴	7,6 x 10³	1,2 x 10⁴	1,6 x 10⁵
weißlich, glänzend	<i>C. famata</i>	3,9 x 10 ⁴	6,6 x 10 ³	4,7 x 10 ³	1,6 x 10 ⁵
groß, beige, matt	Candida Hefen				
weißlich, matt	Candida Hefen		1,0 x 10 ³	6,9 x 10 ³	
weißlich, matt, faltig	Candida Hefen		1,0 x 10 ²		2,3 x 10 ³
rot-orange, glänzend	<i>Rhodoto- rula</i> sp.				
Enterokokken (KAA)	Gesamt- keimzahl	9,8 x 10²	1,4 x 10³	3,3 x 10²	1,3 x 10³
Enterobakterien (VRBD)	Gesamt- keimzahl	1,0 x 10²	< 10	9,0 x 10²	3,0 x 10¹

*Abkürzungen siehe Tabelle 1a

Zur Quantifizierung der Hemmwirkung der Staphylokokkenisolate gegenüber *Listeria monocytogenes* wurde ein Co-Kultivierungsassay modifiziert nach Goerges et al. (2006) durchgeführt. Eine niedrige Konzentration von *L. monocytogenes* und eine hohe Konzentration von Staphylokokken wurden in Trypton-Soja-Agar gegossen. Nach 24 h Inkubation zeigte die Reinkultur von *L. monocytogenes* als Kontrolle Wachstum bis knapp 10⁸ KbE*cm⁻² (Abb. 4). Das kokkoide Isolat 25-21 und *S. equorum* 25-28 zeigten nur eine geringfügige Reduktion der Listerienkeimzahlen auf ca. 10⁷ KbE*cm⁻². *S. equorum* 19-25 zeigte eine deutliche Reduktion der Listerienkeimzahlen über drei Zehnerpotenzen. Als noch besser erwies sich *S. equorum* 91032 aus der Stammsammlung des Instituts (22 *S. equorum* Stämme getestet).

Tab. 1c: Salzbadmikroflora einer Käserei mit konventionellen und Biokäsen (Kuhmilchkäse aus Rohmilch und pasteurisierter Milch, 5) und zweier Käseereien (Kuhmilchkäse aus pasteurisierter Milch ohne Oberflächenreifung, 4, 7)*

Kolonie-morphologie	Identifizierung	Keimzahl [KbE*ml ⁻¹]		
		Salzbad 4 SK pH 4,4, 12°C 19% NaCl	Salzbad 5 SK, RS pH 4,9, RT 18% NaCl	Salzbad 7 SK pH 5,1, 14°C 17% NaCl
Rotschmiere (mMA)	Gesamtkeimzahl	2,1 x 10³	4,5 x 10⁵	4,9 x 10⁵
mittelgroß / groß, beige, glänzend	<i>Corynebacterium</i>	5,0 x 10 ²		3,4 x 10 ⁴
klein, beige, glänzend	<i>Corynebacterium</i>			3,3 x 10 ⁴
groß, beige, matt	<i>Corynebacterium</i>			
mittelgroß, orange, glänzend	<i>B. linens</i>	6,1 x 10 ²	3,2 x 10 ⁵	4,0 x 10 ⁵
mittelgroß, gelb, glänzend	<i>Microbacterium/ Arthrobacter</i>			8,0 x 10 ³
weiß, teils mit Proteolyse (Kokken)	<i>Lacto-? Micro-? Staphylococcus ?</i>	1,0 x 10 ³	1,4 x 10 ⁵	
Staphylokokken (SK Agar)	Gesamtkeimzahl	< 10	1,4 x 10²	3,2 x 10³
groß, orange, glänzend	<i>Staphylococcus</i>		1,0 x 10 ²	5,5 x 10 ¹
groß, weiß, glänzend	<i>Staphylococcus</i>		4,0 x 10 ¹	1,2 x 10 ²
klein, orange, glänzend	<i>Staphylococcus</i>			
groß, beige, glänzend	<i>Staphylococcus</i>			
klein, weiß, glänzend	<i>Staphylococcus</i>			1,2 x 10 ²
Hefen / Schimmel (YGC)	Gesamtkeimzahl	1,6 x 10³	2,2 x 10⁴	5,7 x 10³
weißlich, glänzend	<i>C. famata</i>	9,4 x 10 ²	2,2 x 10 ⁴	5,7 x 10 ³
groß, beige, matt	Candida Hefen			
weißlich, matt	Candida Hefen	6,8 x 10 ²		
weißlich, matt, faltig	Candida Hefen			
rot-orange, glänzend	<i>Rhodotorula</i> sp.			5,0 x 10 ¹
Enterokokken (KAA)	Gesamtkeimzahl	< 10	< 10	5,5 x 10¹
Enterobakterien (VRBD)	Gesamtkeimzahl	< 10	< 10	< 10

*Abkürzungen siehe Tabelle 1a

Tab. 2: Screening von Staphylokokken aus Salzbädern norddeutscher Käsereien auf Aktivität gegen *Listeria monocytogenes* 129. Staphylokokken wurden von SK Agar isoliert.

Salzbad	Anzahl Isolate	LMO Hemmung	LMO Hemmung nach Reinigung	Identifizierung ID32-Staph / ARDRA
1	36	Nr.14	+	<i>Aerococcus viridans</i> **
		Nr.16	+	<i>Aerococcus viridans</i>
		Nr.28	-*	
2	40			
3	40	0	-	
4	0	0	-	
5	40	0	-	
6	40	0	-	
7	40	0	-	
8	40	0	-	
9	24	0	-	
10	40	0	-	
11	40	0	-	

* Nach einem Reinigungsausstrich auf SK Agar waren alle 12 untersuchten Isolate von Nr. 28 weiterhin negativ; die Identifizierung basiert auf der Klassifizierung durch ID32-Staph von Bio Mérieux (sehr gute Identifizierung). Ein Typstamm zum Absicherung mit ARDRA stand nicht zur Verfügung.

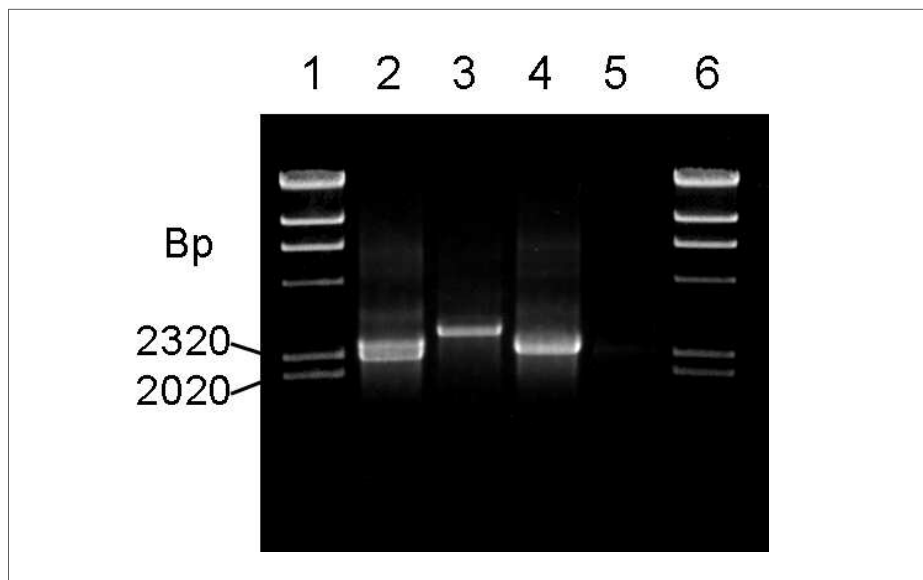


Abb. 1: PCR Produkte für die ARDRA der Isolate mit anti listerieller Aktivität; Bahn 1+6 Lambda HindIII Standard, Bahn 2 Isolat 1-14 *Aerococcus viridans*, Bahn 3 Isolat 25-21, Bahn 4 Isolat 19-25 *S. equorum*.

Tab. 3: Screening von Staphylokokken isoliert von SK Agar auf Aktivität gegen *Listeria monocytogenes* 129 im Agardiffusionstest.

Käse	Keimzahl Staphylokokken [KbE*cm ²]	Anzahl Isolate	LMO Hemmung	LMO Hemmung nach Reinigung	Identifizierung ARDRA
Weichkäse					
12 ^R (F)	3,6 x 10 ⁸	40	12 - 1	-	<i>S. equorum</i>
15 ^S (D)	1,7 x 10 ³	32	15 - 27	-	<i>S. equorum</i>
17 ^{RS} (I)	2,3 x 10 ⁷	40			
18 ^R (D)	< 100	0			
19 ^S (F)	2,2 x 10 ⁶	40	19 - 25	+	<i>S. equorum</i>
20 ^R (F)	2,3 x 10 ⁷	40			
21 ^S (F)	4,7 x 10 ⁷	40			
22 ^R (F)	2,9 x 10 ⁶	40			
23 ^S (F)	7,5 x 10 ⁷	40			
26 ^{RS} (D)	4,0 x 10 ⁴	40			
27 ^S (F)	8,2 x 10 ⁴	40			
37 ^{RS} (F)	< 10				
Schnittkäse					
13 ^R (DK)	1,7 x 10 ⁷	40	13 - 19 13 - 26	- -	<i>S. equorum</i> <i>S. equorum</i>
14 ^R (D)	6,0 x 10 ⁷	40			
16 ^R (CH)	2,6 x 10 ⁵	40			
24 ^R (DK)	1,8 x 10 ⁵	40			
25 ^R (D)	8,9 x 10 ⁵	40	25 - 21 25 - 28	+ +	? <i>S. equorum</i>
28 ^R (DK)	3,3 x 10 ⁷	40			
29 ^R (NL)	4,3 x 10 ⁴	40			
30 ^{**} (NL)	1,1 x 10 ⁴	40			
31 ^R (DK)	2,7 x 10 ⁵	40			
32 ^R (CH)	2,7 x 10 ⁵	40			
33 ^{***} (CH)	2,2 x 10 ³	40			
34 ^{**} (NL)	4,6 x 10 ⁴	40			
35 ^R (AU)	6,5 x 10 ⁷	40			
36 ^R (F)	3,5 x 10 ⁵	40			

*^R Rotschmierkäse, ^S Schimmelkäse, ^{RS} Mischflora aus Rotschmiere und Schimmel; ** alter Gouda; ***Emmentaler

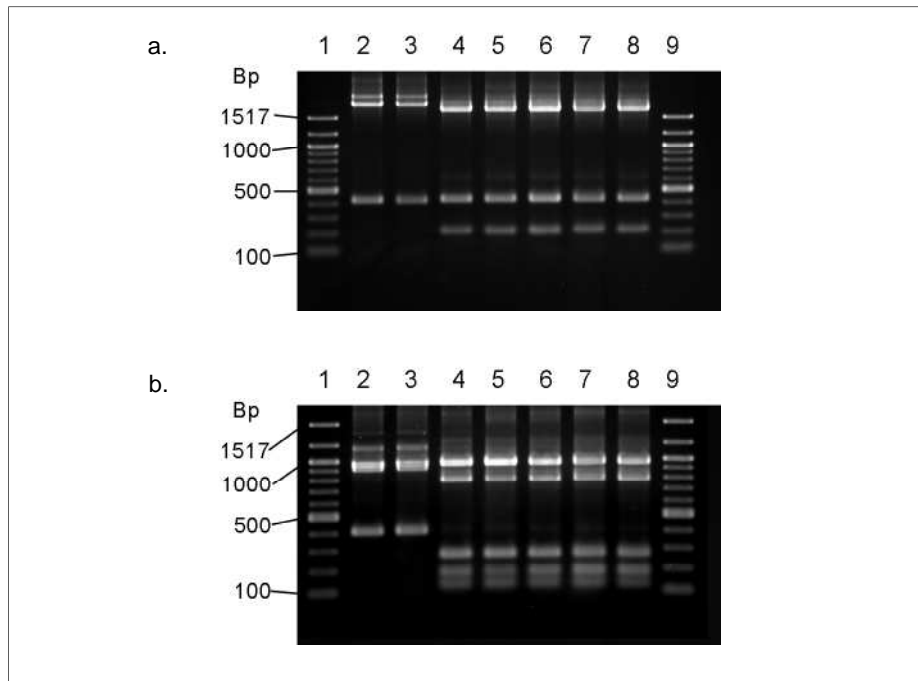


Abb. 2: ARDRA der Isolate mit anti listerieller Aktivität, **a.** Hind III Verdau, **b.** Xmn I Verdau; Bahn 1+9 Lambda HindIII Standard; Bahn 2+3 Isolate 1-14, 1-16 *Aerococcus viridans*; Bahn 4-7 *S. equorum* Isolate 19-25, 25-28, 12-1, 15-27; Bahn 8 *S. equorum* 91032.

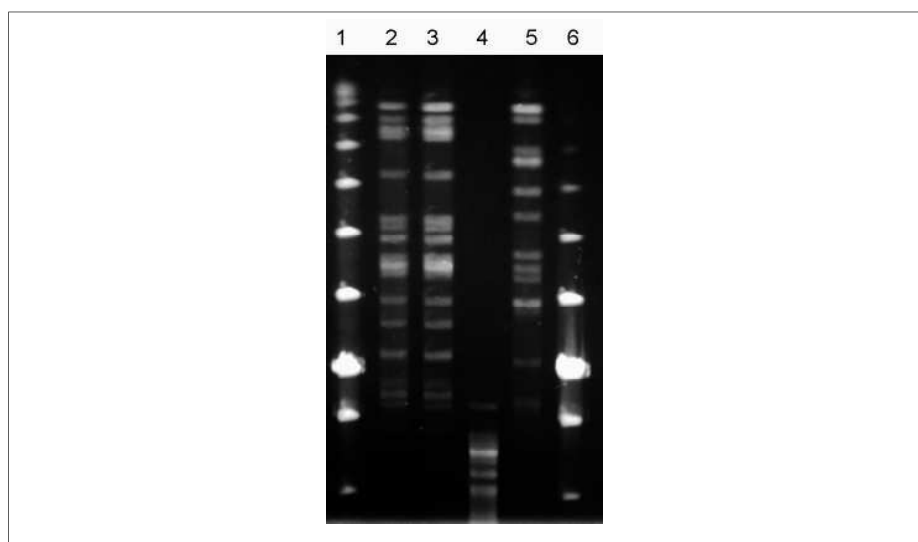


Abb. 3: Pulsfeld Gelelektrophorese der Staphylokokken Isolate mit anti- listerieller Aktivität, die chromosomale DNA wurde mit SmaI verdaut; Bahn 1+6, DNA Standards; Bahn 2+3, *S. equorum* Isolat 19-25; Bahn 4, Isolat 25-21; Bahn 5, *S. equorum* Isolat 25-28.

Tab. 4: Screening von Staphylokokken isoliert aus Salzbädern und von Käseoberflächen auf Hemmwirkung gegen *Listeria monocytogenes* SLCC 8683 (LMO). In Klammern sind Ergebnisse eines weiteren Screenings beschrieben. Da die Hemmwirkung gegen LMO nur gering ausgeprägt war, wurde diese Isolate nicht weiter untersucht.

Quelle	Anzahl Proben	Anzahl Isolate ^a	Hemmung LMO	Hemmung LMO Reinkultur	Identifizierung ^b
Salzbad	11	380	3	2	<i>Aerococcus viridans</i>
Weichkäse	17 (+10)	494 (+593)	3 (+12)	1	<i>Staphylococcus equorum</i>
Schnittkäse	15 (+6)	600 (+325)	4 (+4)	1	<i>Staphylococcus equorum</i>

^a Salzbad- und Käseproben wurden auf einem Selektivmedium für Staphylokokken ausplattiert. Einzelkolonien wurden im Agardiffusionstest auf anti listerielle Aktivität getestet. Positive Ergebnisse wurden nach Reinigung der Isolate ein weiteres Mal geprüft. ^b Isolate wurde mit ID32-Staph (BioMérieux) und mit „Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis“ (ARDRA) identifiziert.

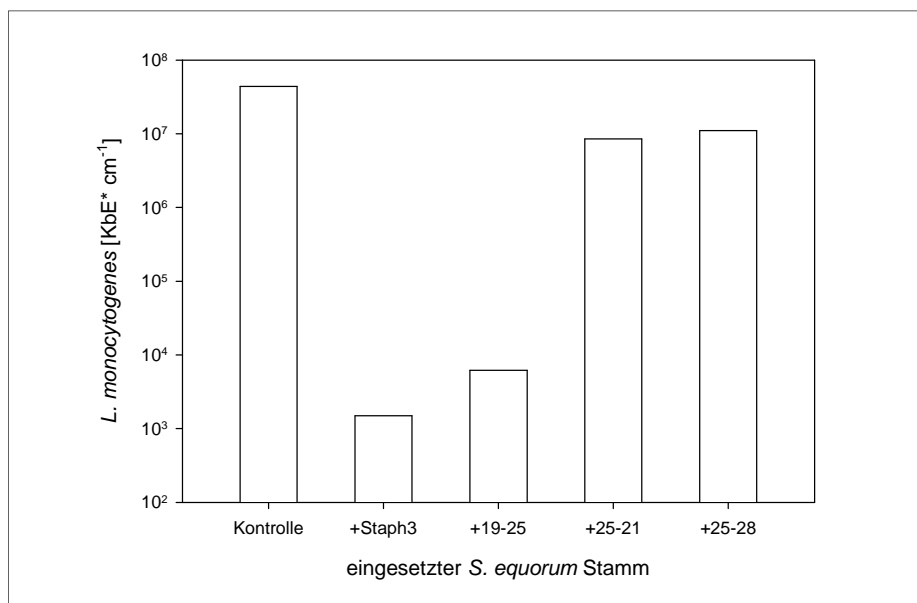


Abb. 4: Cokultivierung von *S. equorum* Stämmen (ca. 10⁷ KbE*ml⁻¹) und *L. monocytogenes* (ca. 30 KbE*ml⁻¹) in Trypton Soja Agar. Die Inkubation erfolgte im Plattengussverfahren über 24 h bei 30°C. Für die Keimzahl-bestimmung wurde der gesamte Agar in Ringerlösung homogenisiert und auf SK Agar (Staphylokokken) bzw auf Palcam Agar (Listerien) ausplattiert.

Um Käse- ähnliche Bedingungen einzustellen wurde der Co-Kultivierungs Assay weiter modifiziert. *L. monocytogenes* (6 KbE*cm⁻²) und *S. equorum* (ca. 10⁶ KbE*cm⁻²) wurden gemeinsam auf modifiziertem Milchagar ausplattiert (Hoppe-Seyler et al., 2000) und über 24 h inkubiert. Gegenüber der Kontrolle (Reinkultur LMO) ergab sich eine Listerien

Hemmung über 5 Zehnerpotenzen für *S. equorum* 91032 und 3 Zehnerpotenzen für *S. equorum* 19-25 (Tabelle 5). Bei einer Co-Kultivierung von anfangs 350 Listerien zu 10^6 Staphylokokken konnte *S. equorum* 91032 die Listerien Keimzahlen unter die Nachweisgrenze von 10^{-1} KbE*cm⁻² reduzieren (Anreicherung in Fraser Bouillon, Daten nicht gezeigt). Dies war bei *S. equorum* 19-25 nur mit einer niedrigeren Konzentration von 35 Listerien zu 10^6 Staphylokokken zu erreichen. Weitere Versuche in echter Käseumgebung (Schnittkäse, Weichkäse, Harzer Käse) werden zur Zeit mit *S. equorum* 91032 durchgeführt.

Tab. 5: Screening von Staphylokokken isoliert von SK Agar auf Aktivität gegen *Listeria monocytogenes* 129 mittels Cokultivierung im Käse Oberflächenmodell (modifizierter Milch Plate Count Agar). (Keimzahlen in KbE*cm⁻²)

Vorkultur SE 91032	Vorkultur LMO L129	Co-Kultur 24h SE 91032	Co-Kultur 24h LMO L129
0,3 x 10 ⁶	6	3,4 x 10 ⁸	< 30
Vorkultur SE 19-25	Vorkultur LMO L129	Co-Kultur 24h SE 19-25	Co-Kultur 24h LMO L129
2,1 x 10 ⁶	6	0,8 x 10 ⁸	3,9 x 10 ²
	Vorkultur LMO L129		Reinkultur 24h LMO L129
	6		3,0 x 10 ⁵

4. Schlussfolgerungen und Ausblick

Staphylokokken gehören zur natürlichen Mikroflora von Salzbädern und vielen Käsesorten. Antilisterielle Eigenschaften waren bei fast 2000 untersuchten Isolaten nur selten zu finden. Sollten sich die *in vitro* nachgewiesenen antilisteriellen Wirkungen der *S. equorum* Stämme auch auf Käse zeigen, besteht nicht nur die Möglichkeit, diese natürlich gewonnenen Isolate im Sprüh- oder Bürstenautomaten von Rotschmierkäsen einzusetzen, sondern generell in Salzbädern aller Käsesorten. Da durch das große Volumen von Salzbädern nur niedrige Konzentrationen von 100 bis 1.000 KbE/ml wirtschaftlich einsetzbar sind, wird eine der zu beantwortenden Fragen sein, ob auch mit diesen niedrigen Konzentrationen im Salzbad sich ein antilisterieller Effekt in der Käserei erzielen lässt. Diese Arbeiten sind Schwerpunkt des zur Zeit laufenden FEI Forschungsprojektes FV 14786 (2006-2008).

5. Literatur

- (1) Bockelmann W., Hoppe-Seyler T., Krusch U., Hoffmann W., Heller K. J.: (The microflora of Tilsit cheese. part 2. Development of a surface smear starter culture. *Nahrung* **41** (4) 213-218 (1997a)
- (2) Bockelmann, W., Krusch U., Engel G., Klijn N., Smit G., Heller K. J.: The microflora of Tilsit cheese. Part 1. Variability of the smear flora. *Nahrung* **41** 208-212 (1997b)
- (3) Bockelmann, W., Hoppe-Seyler T.: The surface flora of bacterial smear-ripened cheeses from cow's and goat's milk. *International Dairy Journal* **0** 1-8 (2001)
- (4) Bockelmann, W.: Smear-Ripened Cheeses. in: *Encyclopedia of dairy sciences*, Eds. Roginski, H., Fuquay, J.W. & Fox, P.F., 391-401 (2002)

- (5) Brennan, N. M., Ward, A. C., Beresford, T. P., Fox, P. F., Goodfellow, M., Cogan, T. M.: Biodiversity of the bacterial flora on the surface of a smear cheese. *Appl. Environ. Microbiol.* **68** 820-830 (2002)
- (6) Schönberg, A.: Zur aktuellen Situation der Listeriose - eine Übersicht. *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.* **101** 82-84 (1988)
- (7) Rudolf, M., Scherer, S.: Incidence of *Listeria* and *Listeria monocytogenes* in acid curd cheese. *Archiv für Lebensmittelhygiene* **51** (4/5) 118-120 (2000)
- (8) Rudolf, M., Scherer, S.: High incidence of *Listeria monocytogenes* in European red smear cheese. *International Journal of Food Microbiology* **63** (1-2) 91-98 (2001)
- (9) Bockelmann, W., Willems, P., Jäger, B., Hoppe-Seyler, T.S., Engel, G., Heller, K.J.: Reifung von Harzer Käse. *Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte* **54** (4) 317-335 (2002)
- (10) Bockelmann, W., Willems, P., Rademaker, J., Noordman, W., Heller, K.J.: Kulturen für die Oberflächenreifung geschmierter Weichkäse. *Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte* **55** (4) 277-299 (2003)
- (11) Maisnier-Patin, S., Richard, J.: Activity and purification of linenscin OC2, an antibacterial substance produced by *Brevibacterium linens* OC2, an orange cheese coryneform bacterium. *Applied and Environmental Microbiology* **61** (5) 1847-1852 (1995)
- (12) Motta, A. S., Brandelli, A.: Characterization of an antibacterial peptide produced by *Brevibacterium linens*. *Journal of Applied Microbiology* **92** (1) 63-70 (2002)
- (13) Valdes-Stauber, N., Scherer, S.: Nucleotide sequence and taxonomical distribution of the bacteriocin gene *lin* cloned from *Brevibacterium linens* M18. *Applied and Environmental Microbiology* **62** (4) 1283-1286 (1996)
- (14) Hoppe-Seyler, T., Jaeger, B., Bockelmann, W., Heller, K. J.: Quantification and identification of microorganisms from the surface of smear cheeses. *Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte* **52** (4) 294-305 (2000)
- (15) Hoppe-Seyler, T., Jaeger, B., Bockelmann, W., Noordman, W., Geis, A., Heller, K.J. Molecular Identification and differentiation of *Staphylococcus* species and strains of cheese origin; *Systematic and Applied Microbiology* **27** (2) 211-218 (2004)
- (16) Goerges, S., Aigner, U., Silakowski, B., Scherer, S.: Inhibition of *Listeria monocytogenes* by food-borne yeasts. *Applied and Environmental Microbiology* **72** (1) 313-318 (2006)
- (17) Bockelmann, W.: The production of smear cheeses, in: Maximising quality, Eds. Smit, G., Dodds, F., Woodhead Publishing Ltd., Cambridge, GB, 470-491 (2003)
- (18) Jaeger, B., Hoppe-Seyler, T., Bockelmann, W., Heller, K. J.: The influence of the brine microflora on the ripening of smear cheeses. *Milchwissenschaft* **57** (11/12) 645-648 (2002)
- (19) Mounier, J., Goerges, S., Gelsomino, R., Vancanneyt, M., Vandemeulebroecke, K., Hoste, B., Brennan, N., Scherer, S., Swings, J., Fitzgerald, G., Cogan, T.: Sources of the adventitious microflora of a smear-ripened cheese. *Journal of Applied Microbiology* **101** (3) 668-681 (2006)
- (20) Bockelmann, W., Willems, K.P., Neve, H., Heller, K.J.: Cultures for the ripening of smear cheeses, *International Dairy Journal* **15** 719-732 (2005)
- (21) Hoppe-Seyler, T., Jaeger, B., Bockelmann, W., Noordman, W., Geis, A., Heller, K. J.: Identification and Differentiation of species and strains of *Arthrobacter* and *Microbacterium barkeri* isolated from smear cheeses with Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis (ARDRA) and Pulsed Field Gel electrophoresis (PFGE); *Systematic and Applied Microbiology* **26** 438-444 (2003)

Danksagungen

Dieses Vorhaben wurde aus Mitteln der industriellen Gemeinschaftsforschung (Bundesministerium für Wirtschaft und Arbeit / AiF) über den Forschungskreis der Ernährungsindustrie (FEI) gefördert. Projekt Nr. AiF-FV 14786 N.

6. Zusammenfassung

Bockelmann, W., Koslowsky, M., Hammer, P., Heller, K.J.: **Isolierung anti-listerieller Staphylokokken aus Salzbädern und von Käseoberflächen.** Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte **58** (4) 187-202 (2006)

26 Mikrobiologie (*Listeria monocytogenes*, Listerienhemmung, Staphylokokken, *Staphylococcus equorum*, Rotschmiere)

Staphylokokken, meist *S. equorum*, gehören zur typischen Salzbad- und Käsemikroflora, nicht nur von Rotschmierekäsen sondern auch von Schimmelkäsen und konventionellen (gewachsenen) Käsesorten. Aus 11 industriellen Salzbädern und 48 verschiedenen Käsesorten wurden fast 2000 kokkoide Isolate auf anti-listerielle Eigenschaften getestet. Von 27 im Agardiffusionsassay positiv getesteten Isolaten war die anti-listerielle Aktivität von 23 Isolaten nur gering. Von gut hemmenden Isolaten wurden zwei als *Aerococcus viridans*, einer nicht Lebensmittel-tauglichen Spezies identifiziert; zwei *S. equorum* Stämme konnten die Keimzahlen von *Listeria monocytogenes* SLCC 8683 in einem Co-Kultivierungsverfahren in Trypton Soja Agar um mehr als 3 (bzw. 4) Zehnerpotenzen reduzieren. Im Käse-Oberflächen Modell (modifizierter Milch Plate Count Agar) wurde die Hemmwirkung beider Stämme auf *L. monocytogenes* bestätigt. Bei einer Co-Kultivierung von anfangs 350 Listerien zu 10^6 Staphylokokken konnte ein *S. equorum* Stamm die Listerien Keimzahlen unter die Nachweisgrenze von 10^{-1} KbE*cm⁻² reduzieren. Bei einer Anfangskonzentration von $3,5 \times 10^4$ Listerien zu 10^6 Staphylokokken ergab sich nach 24 h Inkubation eine Reduktion der Listerien um mehr als 5 Zehnerpotenzen gegenüber der Kontrolle. Die getesteten Listerien Konzentrationen dürften deutlich über den auf Käsen sporadisch nachgewiesenen Konzentrationen liegen und somit besteht eine gute Wahrscheinlichkeit, dass die anti-listeriellen Eigenschaften des ausgewählten *S. equorum* Stammes auch in echter Käseumgebung nutzbar sind.

Summary

Bockelmann, W., Koslowsky, M., Hammer, P., Heller, K.J.: **Isolation of antilisterial staphylococci from salt brines and cheese surfaces.** Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte **58** (4) 187-202 (2006)

26 Microbiology (*Listeria monocytogenes*, listerial inhibition, staphylococci, *Staphylococcus equorum*, red smear)

Staphylococci, most *S. equorum*, belong to the typical microflora of brine baths and cheeses, not only of red smear cheeses but also of mould cheeses and conventional (waxed) cheese varieties. Almost 2000 coccoid isolates from 11 industrial brine baths and 48 different cheese varieties were tested on antilisterial characteristics. 27 isolates were positively tested in agar diffusion assay. In 23 of the isolates the antilisterial activity was low. Among strongly inhibitory isolates 2 were identified as *Aerococcus viridans*, a non-food grade species. Two *S. equorum* strains could reduce the bacterial counts of *Listeria monocytogenes* SLCC 8683 in a co-cultivation method in trypton soya agar by more than 3 to 4 orders of magnitude. In the cheese surface model (modified milk plate count agar) the inhibiting effect of both strains on *L. monocytogenes* was confirmed. In the case of co-cultivation of initially 350 listeria to 10^6 staphylococci one *S. equorum* strain could reduce the listerial bacterial counts under the detection limit of 10^{-1} cfu*cm⁻². An initial concentration of 3.5×10^4 listeria at 10^6 staphylococci of this strain resulted in a listerial reduction by more

than 5 orders of magnitude vs. the control after a 24 h incubation. The tested listerial concentrations might be clearly above the concentrations sporadically detected in cheeses. Thus, there is a high probability that the antilisterial characteristics of the selected *S. equorum* strain can also be applied in a real cheese environment.

Résumé

Bockelmann, W., Koslowsky, M., Hammer, P., Heller, K.J.: **Isolement des staphylocoques antilistériens de bains de saumure et de la surface des fromages.** Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte **58** (4) 187-202 (2006)

26 Microbiologie (*Listeria monocytogenes*, inhibition listérienne, staphylocoques, *Staphylococcus equorum*, morge rouge)

Les staphylocoques, souvent *S. equorum*, font partie de la microflore typique des fromages et des bains de saumure, non seulement des fromages à morge rouge mais aussi des fromages à croûte fleurie et des fromages conventionnels (à la surface cirée). A peu près 2000 isolats en forme coccoidale provenant de 11 bains de saumure industriels et de 48 différentes variétés de fromage étaient testés sur des caractéristiques antilistériennes. Soumis au test de diffusion en gélose, 27 isolats étaient positifs, dont 23 à faible activité antilisterienne. Parmi les isolats fortement inhibiteurs, 2 étaient identifiés comme *Aerococcus viridans*, une espèce non-alimentaire. Deux souches de *S. equorum* pouvaient réduire de 3 à 4 puissances de dix le nombre de colonies bactériennes *Listeria monocytogenes* SLCC 8683 lors d'une procédure de co-cultivation sur gélose tryptone soja. Dans le modèle de surface fromagère (de lait modifié sur gélose pour numération en plaque), l'action inhibitrice des deux souches à *L. monocytogenes* était confirmée. Pendant une co-cultivation de 350 listéries sur 10^6 staphylocoques, une souche de *S. equorum* pouvait réduire la charge bactérienne en-dessous de la limite de détection de 10^{-1} ufc*cm⁻². Lors d'une concentration initiale de 3.5×10^4 listéries sur 10^6 staphylocoques de cette souche, une réduction des listéries de plus de 5 puissances de dix était enregistrée par rapport au contrôle. Les concentrations listériennes testées devraient être clairement au-dessus de celles identifiées sporadiquement sur des fromages. Ainsi il est fort probable que les caractéristiques antilistériennes de la souche *S. equorum* soient utilisables dans un environnement fromager authentique.