



TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Lehrstuhl für Mikrobielle Ökologie

Mikrobiologie von Extended-Shelf-Life Milch-
Populationsdynamik während der Herstellung und Kühlung

Etienne Valerie Doll

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. Ulrich Kulozik

Prüfer der Dissertation: 1. Prof. Dr. Siegfried Scherer
2. Prof. Dr. Rudi F. Vogel

Die Dissertation wurde am 06.09.2017 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 27.11.2017 angenommen.

INHALTSVERZEICHNIS

ZUSAMMENFASSUNG	IV
ABSTRACT	VI
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	VIII
TABELLENVERZEICHNIS	X
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	XI
EINLEITUNG	1
1 Rohmilchmikrobiota	1
2 Extended-Shelf-Life Milch	2
2.1 Herstellungsprozesse von ESL-Milch	3
2.2 Mikrobiologische Qualität von ESL-Milch	6
2.3 Sensorischer Verderb von ESL-Milch	7
3 Taxonomische Einordnung von Bakterienstämmen	8
3.1 Die Gattung <i>Paenibacillus</i>	9
3.2 Die Familie der <i>Paenibacillaceae</i>	10
4 Zielsetzung	12
MATERIAL UND METHODEN	13
1 Medien	13
2 Milchanalysen und Keimisolation	15
2.1 Biodiversitätsanalysen von Rohmilch	15
2.1.1 Biodiversitätsanalyse psychrotoleranter Sporenbildner in Rohmilch	15
2.1.2 Biodiversitätsanalyse High G+C Gram-positiver Keime in Rohmilch	15
2.2 Prozesskontrollen bei der Herstellung von ESL-Milch	16
2.2.1 Prozesskontrollen baktofugierter ESL-Milch	16
2.2.2 Prozesskontrollen mikrofiltrierter ESL-Milch	16
2.3 Endproduktanalysen von baktofugierter und mikrofiltrierter ESL-Milch	17
2.3.1 Endproduktanalysen bei Ablauf der Haltbarkeit	17
2.3.2 Lagerstabilität baktofugierter ESL-Milch	17
3 Allgemeine mikrobiologische Methoden	18
3.1 Stammlagerung	18
3.2 Keimzahlbestimmung	18
3.3 Identifizierung bakterieller Isolate	19
3.3.1 Fourier-Transform-Infrarot-Spektroskopie	19
3.3.2 Identifizierung anhand von DNA-Sequenzen	20
	I

3.3.2.1	DNA-Isolation	20
3.3.2.2	Polymerasekettenreaktion	20
3.3.2.3	Agarosegelelektrophorese	21
3.3.2.4	Sequenzierung	21
3.3.2.5	Sequenzauswertung und Identifizierung	21
3.4	Stammtypisierung mittels RAPD-PCR	22
4	Analyse der bakteriellen Enzymaktivität in ESL-Milch	23
4.1	Agardiffusionsassay	23
4.2	Quantifizierung von Bitterpeptiden mittels Fluorescaminassay	24
5	Charakterisierung bakterieller Taxa	24
5.1	Analyse morphologischer Merkmale	25
5.2	Analysen physiologischer Merkmale	25
5.2.1	Analyse der Wachstumsbedingungen	25
5.2.2	Analyse des anaeroben Wachstums	26
5.3	Analysen biochemischer Merkmale	26
5.3.1	Testsystem API 20 E	27
5.3.2	Analyse der Säurebildung aus Kohlenhydraten	27
5.4	Analysen chemotaxonomischer Merkmale	27
5.4.1	Analyse des Peptidoglykans	28
5.4.2	Analyse respiratorischer Chinone	28
5.4.3	Analyse polarer Lipide	28
5.4.4	Analyse zellulärer Fettsäuren	28
5.5	Phylogenetische Analysen anhand der 16S rRNA	29
6	Statistische Analysen	29
	ERGEBNISSE	30
1	Mikrobiota von Rohmilch	30
1.1	High G+C Gram-positive Bakterien in Rohmilch	30
1.1.1	Prävalenz High G+C Gram-positiver Keime in Rohmilch	30
1.1.2	Biodiversität High G+C Gram-positiver Keime in Rohmilch	31
1.2	Sporenbildner in Rohmilch	32
1.2.1	Prävalenz mesophiler und psychrotoleranter Sporenbildner in Rohmilch	32
1.2.2	Biodiversität psychrotoleranter Sporenbildner in Rohmilch	35
2	Mikrobiota von baktofugierter ESL-Milch	40
2.1	Mikrobielle Qualität baktofugierter ESL-Milch bei Ablauf der Mindesthaltbarkeit	40
2.2	Populationsdynamik der Mikrobiota baktofugierter ESL-Milch während der Kühlung	43
2.3	Einfluss der Prozessschritte auf die Mikrobiota baktofugierter ESL-Milch	46

2.4	Ursprung verderbsinduzierender Bakterien in baktofugierter ESL-Milch	49
3	Mikrobiota von mikrofiltrierter ESL-Milch	51
3.1	Mikrobielle Qualität mikrofiltrierter ESL-Milch bei Ablauf der Mindest-haltbarkeit	51
3.2	Abtrennung psychrotoleranter Sporenbildner bei Herstellung mikrofiltrierter ESL-Milch	54
3.3	Ursprung psychrotoleranter Sporenbildner in mikrofiltrierter ESL-Milch	55
4	Enzymaktivität der Mikrobiota von ESL-Milch	58
5	Beschreibung potentiell neuer, bakterieller Taxa	60
5.1	Beschreibung einer potentiell neuen <i>Paenibacillus</i> Spezies	60
5.1.1	Genetische und phylogenetische Charakterisierung	61
5.1.2	Phänotypische Charakterisierung	63
5.1.3	Chemotaxonomische Charakterisierung	66
5.2	Beschreibung einer potentiell neuen Gattung	68
5.2.1	Genetische und phylogenetische Charakterisierung	68
5.2.2	Phänotypische und chemotaxonomische Charakterisierung	71
5.2.3	Chemotaxonomische Charakterisierung	73
	DISKUSSION	75
1	Hitzeresistente Mikrobiota von Rohmilch	75
1.1	Prävalenz hitzeresistenter Bakterien in Rohmilch	75
1.2	Biodiversität hitzeresistenter Bakterien in Rohmilch	77
2	Mikrobiota und Verderb baktofugierter und mikrofiltrierter ESL-Milch	79
2.1	Potential der Herstellungsverfahren zur Abtrennung von Mikroorganismen	79
2.2	Haltbarkeit von ESL-Milch	83
2.3	Verderbsmikrobiota von ESL-Milch	85
2.4	Eintragsrouten verderbsinduzierender Mikroorganismen in die ESL-Milch	87
3	Beschreibung neuer sporenbildender Taxa	90
3.1	Abgrenzung einer neuen <i>Paenibacillus</i> Spezies aus Milchproben	90
3.2	Abgrenzung einer neuen Gattung der <i>Paenibacillaceae</i> aus Rohmilch	93
	SCHLUSSFOLGERUNG UND AUSBLICK	96
	LITERATURVERZEICHNIS	97
	DANKSAGUNG	115
	EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	116
	LISTE DER VORVERÖFFENTLICHUNGEN	117
	CURRICULUM VITAE	118

ZUSAMMENFASSUNG

Zwei Herstellungsverfahren von Extended-Shelf-Life (ESL) Milch kombinieren die klassische Pasteurisierung mit einem Mikrofiltrationsschritt oder Zentrifugation (Baktofugation) zur zusätzlichen Reduktion der Keimlast. Frühzeitiger Verderb und schwankende Produktqualität stellen für diese Produkte häufig ein Problem dar. Ziel dieser Arbeit war es daher, die Mikrobiologie von ESL-Milch zu untersuchen und durch Analysen beginnend bei der relevanten Rohmilchmikrobiota über den Herstellungsprozess bis hin zum Endprodukt Ansatzpunkte zur Verbesserung der mikrobiologischen Qualität zu finden.

Zunächst wurden Prävalenz und Biodiversität hitzeresistenter Mikroorganismen in Rohmilch analysiert. High G+C Gram-positive Bakterien, vor allem der Gattung *Microbacterium* erreichten durchschnittliche Keimzahlen von 3,9 log KbE/mL. Die Konzentrationen von Sporenbildnern waren mit 90 KbE/mL für mesophile Vertreter und lediglich 0,57 MPN/mL für die psychrotoleranten Spezies wesentlich geringer, wobei Letztere im Verlauf von zwei Analysenjahren saisonal bedingte Schwankungen zeigten und die Zahlen vor allem im Sommer noch weiter absanken. Eine Diversität von 56 Spezies aus 12 Gattungen wurde bei der Identifizierung von 2791 Isolaten psychrotoleranter Sporenbildner detektiert, wovon *Paenibacillus* und *Bacillus* die bedeutendsten Genera darstellten und etwa 14 % potentiell neuen Taxa angehörten.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde die Mikrobiologie von ESL-Milch analysiert. Zu Ablauf der Haltbarkeit traten zwischen einzelnen Packungen große Qualitätsunterschiede auf und 15 % der mikrofiltrierten sowie 63 % der baktofugierten ESL-Milch waren bereits verdorben. Lagerversuche von baktofugierter Milch zeigten, dass dies neben der Wahl eines zu langen Haltbarkeitsdatums auf hohe Ausgangskeimzahlen und die mikrobielle Zusammensetzung zurückzuführen war. Verantwortlich für den Produktverderb waren besonders psychrotolerante Sporenbildner der Gattungen *Bacillus* (v.a. *B. cereus sensu lato*) und *Paenibacillus*. Auch hitzesensitive Postpasteurisierungs-Rekontaminanten trugen zum Verderb bei, wurden in baktofugierter ESL-Milch jedoch häufiger und in breiterer Diversität als in mikrofiltrierter ESL-Milch detektiert. Die Bedeutung von Rekontaminationen in der Anlage zeigte sich auch bei einer detaillierteren Analyse der Eintragsrouten von Verderbsorganismen. Die kombinierte Mikrofiltration und Pasteurisierung trennte fast 4,0 log-Stufen psychrotoleranter Sporenbildner ab und eine Transmission konnte nur in Abhängigkeit von erhöhten Sporenzahlen in der Rohmilch detektiert werden. Auffällige Unterschiede der Prävalenz in Rohmilch und mikrofiltrierter Milch deuteten vielmehr darauf

hin, dass zumindest *B. cereus sensu lato* aus Rekontaminationen während der Verarbeitung stammen. Tatsächlich wurde bei baktofugierter ESL-Milch eine Persistenz von *B. cereus sensu lato* und *Microbacterium lacticum* in der Anlage nachgewiesen. Um die Qualität von ESL-Milch während der gesamten Haltbarkeit zu verbessern stellen daher neben Kontrollen der Rohmilchgüte besonders die sorgfältige Anlagenreinigung und Desinfektion entscheidende Maßnahmen dar.

Bei den Biodiversitätsstudien psychrotoleranter Sporenbildner in Roh- und ESL-Milch wurde eine Vielzahl an Isolaten gewonnen, die keiner bisher beschriebenen Art und zum Teil auch keiner Gattung zugeordnet werden konnten. Im Rahmen dieser Arbeit wurde jeweils eine neue Spezies der Gattung *Paenibacillus* und eine neue Gattung der Familie *Paenibacillaceae* im polyphasischen Ansatz beschrieben und charakteristische Merkmale zur Abgrenzung und Identifizierung erfasst.

ABSTRACT

To produce Extended shelf life (ESL) milk, pasteurization is often combined with either microfiltration or centrifugation (bactofugation). Premature spoilage and varying product quality still constitute major problems for both processes. Thus, this work aimed to understand the microbiota of ESL milk. Analyses of raw milk, production process and end products should reveal possible measures for improving the microbial quality.

First, prevalence and biodiversity of heat-resistant bacteria were analyzed in raw milk. High G+C Gram-positive microorganisms, especially *Microbacterium*, reached counts of 3.9 log cfu/mL. In comparison, spore-counts were low. They totaled up to 90 cfu/mL for mesophilic and 0.57 MPN/mL for psychrotolerant species. Titers of psychrotolerant spores varied depending on the season and a minimum was found in summer and early autumn. Identification of 2791 psychrotolerant isolates revealed a diversity of 56 species and 12 genera. *Paenibacillus* and *Bacillus* were most frequently found and about 14 % of all isolates belonged to presumptive novel taxa.

A second set of experiments addressed the microbiology of ESL milk. Bacterial counts at the end of shelf life were highly diverse. Constituting 15 % of microfiltered and 63 % of bactofuged samples a high percentage was spoiled prematurely. Storage analyses of bactofuged ESL milk showed inadequate shelf lives, elevated basal counts and the microbial composition as main factors causing high spoilage rates. The psychrotolerant spore-forming bacteria *Bacillus* (mainly *B. cereus sensu lato*) and *Paenibacillus* were by far the most important spoilage organisms. Additionally, heat-sensitive post-pasteurization recontaminants contributed to product spoilage. Especially in bactofuged ESL milk those appeared frequently and in high diversity. Detailed analyses addressing potential routes of entry further confirmed the importance of recontamination events within the plant. Through effective microfiltration and pasteurization, almost 4.0 log units of psychrotolerant spores were removed. Transmission from raw milk to end products occurred in rare cases only and was associated with elevated spore-counts in bulk tanks. The conspicuous increase of *B. cereus sensu lato* isolates in end products compared to raw milk samples indicates recontamination. Indeed, persistence of strains in the plant was found for *B. cereus sensu lato* and *Microbacterium lacticum* of bactofuged ESL milk. Thus, apart from controlling the quality of raw milk, the most important measure for improving the quality of ESL milk constitutes an optimization of hygienic conditions and cleaning procedures in pipes, tanks, and the filling machine.

During biodiversity analysis of psychrotolerant spore-forming bacteria in raw and ESL milk several strains were isolated that could not be placed in any described taxon. As part of this thesis eight of those strains were characterized in a polyphasic approach and were assigned to one novel species of the genus *Paenibacillus* and one novel genus of the family of *Paenibacillaceae*. Distinctive traits for demarcation and identification of both taxa were obtained.

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1	Ursprung psychrotoleranter Sporenbildner in Rohmilch	2
Abbildung 2	Herstellungsprozess mikrofiltrierter und pasteurisierter ESL-Milch	3
Abbildung 3	Herstellungsprozess doppelt baktofugierter und pasteurisierter ESL-Milch	5
Abbildung 4	Consensus Maximum-Likelihood-Baum, basierend auf den 16S rRNA Sequenzen aller Typstämme der <i>Paenibacillaceae</i>	11
Abbildung 5	Saisonaler Einfluss auf die Prävalenz von High G+C Gram-positiven Bakterien in Rohmilch aus Molkereistapeltanks	30
Abbildung 6	Keimzahlen psychrotoleranter Sporenbildner Rohmilchproben aus Molkereistapeltanks nach 10, 14 und 21 Tagen Inkubation.....	33
Abbildung 7	Korrelationsanalyse der Keimzahlen mesophiler und psychrotoleranter Sporenbildner in Rohmilchproben aus Molkereistapeltanks	34
Abbildung 8	Saisonaler Einfluss auf die Prävalenz psychrotoleranter und mesophiler Sporenbildner in Rohmilch aus Molkereistapeltanks.....	35
Abbildung 9	Häufigkeitsverteilung der Gesamtkeimzahlen in baktofugierter und pasteurisierter ESL-Milch nach Lagerung bis zum Ende der Haltbarkeit	41
Abbildung 10	Dominante Mikrobiota in baktofugierter und pasteurisierter ESL-Milch nach Lagerung bis zum Ende der Haltbarkeit.....	42
Abbildung 11	Anstieg der Keimzahlen in baktofugierter und pasteurisierter ESL- Milch während der Lagerung	44
Abbildung 12	Populationsdynamik der Mikrobiota von baktofugierter und pasteurisierter ESL-Milch während der Lagerung	46
Abbildung 13	Log-Reduktion der Gesamtkeimzahl während der kombinierten, doppelten Baktofugation und Standardisierung sowie der Pasteurisierung.....	47
Abbildung 14	Einfluss der Prozessstufen auf die Zusammensetzung der Milchmikrobiota entlang des Herstellungsprozesses von baktofugierter und pasteurisierter ESL-Milch.....	48
Abbildung 15	Bandenprofile der RAPD-Typisierung von <i>B. cereus sensu lato</i> Isolaten aus baktofugierter und pasteurisierter ESL-Milch.....	49
Abbildung 16	Häufigkeitsverteilung der Gesamtkeimzahlen in mikrofiltrierter und pasteurisierter ESL-Milch nach Lagerung bis zum Ende der Haltbarkeit	51

Abbildung 17	Dominante Mikrobiota in mikrofiltrierter und pasteurisierter ESL-Milch nach Lagerung bis zum Ende der Haltbarkeit.....	53
Abbildung 18	Log-Reduktion psychrotoleranter Sporen bei der Herstellung von mikrofiltrierter und pasteurisierter ESL-Milch	55
Abbildung 19	Vergleich der Prävalenz psychrotoleranter Sporenbildner in Rohmilch und dazugehöriger mikrofiltrierter und pasteurisierter ESL-Milch	56
Abbildung 20	Bandenprofile der RAPD-Typisierung von <i>Paenibacillus</i> sp. nov. 1 Isolaten aus Rohmilch und mikrofiltrierter und pasteurisierter ESL-Milch.....	57
Abbildung 21	Enzymatische Aktivität von Isolaten aus baktofugierter und pasteurisierter sowie mikrofiltrierter und pasteurisierter ESL-Milch im Agardiffusionsassay	59
Abbildung 22	Konzentration der pH 4,6-löslichen Bitterpeptide in baktofugierter und pasteurisierter sowie mikrofiltrierter und pasteurisierter ESL-Milch	60
Abbildung 23	Maximum-Likelihood-Baum, basierend auf der fast vollständigen 16S rRNA Sequenz der vier <i>Paenibacillus</i> sp. nov. Stämme und nahe verwandter Spezie	62
Abbildung 24	Zellmorphologie von <i>Paenibacillus</i> sp. nov. WS5169 ^T	63
Abbildung 25	Polare Lipide des Stammes <i>Paenibacillus</i> sp. nov. WS5169 ^T	66
Abbildung 26	Maximum-Likelihood-Baum, basierend auf der fast vollständigen 16S rRNA Sequenz der vier Gen. nov. sp. nov. Stämme und nahe verwandter Taxa	70
Abbildung 27	Zellmorphologie von Gen. nov. sp. nov. WS5173 ^T	71
Abbildung 28	Polare Lipide des Stammes Gen. nov. sp. nov. WS573 ^T	73

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1	Oligonukleotide für die Amplifikation mittels PCR und die Sanger-Sequenzierung..	20
Tabelle 2	PCR-Reaktionsbedingungen zur Amplifikation der 16S rRNA und <i>rpoB</i> Sequenz....	21
Tabelle 3	Oligonukleotide für die Stammtypisierung mittels RAPD-PCR	22
Tabelle 4	Amplifikationsbedingungen der RAPD-PCR.....	23
Tabelle 5	Quantitative Zusammensetzung der High G+C Gram-positiven Bakterien in Rohmilch aus Molkersistapeltanks auf Gattungsebene.....	31
Tabelle 6	Biodiversität psychrotoleranter Sporenbildner in Rohmilch aus Molkereistapeltanks auf Gattungsebene	36
Tabelle 7	Biodiversität psychrotoleranter Sporenbildner in Rohmilch aus Molkereistapeltanks auf Speziesebene.....	37
Tabelle 8	Neue Spezies und Gattungen psychrotoleranter Sporenbildner in Rohmilch aus Molkereistapeltanks.....	39
Tabelle 9	Gattungen verderbsinduzierender Bakterien aus baktofugierter und pasteurisierter ESL-Milch nach Lagerung bis zum Ende der Haltbarkeit.....	43
Tabelle 10	RAPD-Typisierung persistierender <i>Bacillus cereus sensu lato</i> und <i>Microbacterium lacticum</i> Stämme in baktofugierter und pasteurisierter ESL-Milch	50
Tabelle 11	Spezies psychrotoleranter Sporenbildner aus mikrofiltrierter und pasteurisierter ESL-Milch.....	53
Tabelle 12	Transmission psychrotoleranter Sporenbildner von Rohmilch in spätere Prozessschritte der Herstellung mikrofiltrierter und pasteurisierter ESL-Milch	58
Tabelle 13	Diskriminative Merkmale des Stamms <i>Paenibacillus</i> sp. nov. WS5169T und Typstämmen ausgewählter <i>Paenibacillus</i> Spezies	65
Tabelle 14	Profil zellulärer Fettsäuren des Stammes WS5169T im Vergleich zu den Typstämmen ausgewählter <i>Paenibacillus</i> Spezies.....	67
Tabelle 15	Diskriminative Merkmale des Stammes Gen. nov. sp. nov. WS5173T und Typstämmen ausgewählter Referenztaxa	72
Tabelle 16	Profil zellulärer Fettsäuren des Stammes WS5173T im Vergleich zu den Typstämmen ausgewählter Referenztaxa	74

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

x g	Zentrifugalkraft
°C	Grad Celsius
μ	mikro-
APT	all-purpose Medium mit Tween
BF+PAST	baktofugiert und pasteurisiert
CASO	Caseinpepton-Sojamehlpepton
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
d	Tag
DC	Dünnschichtchromatographie
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
Dpm	Diaminopimelinsäure
DSMZ	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
equiv	Äquivalent
ESL	extended shelf life
FTIR	Fourier-Transform-Infrarot
g	Gramm
Gen. nov.	<i>genus novum</i>
GKZ	Gesamtkeimzahl
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
H ₂ S	Schwefelwasserstoff
HCl	Chlorwasserstoff
High G+C	<i>Actinobacteria</i> , hoher Guanin und Cytosin Gehalt in der DNA
KbE	Koloniebildende Einheit
L	Liter
Leu-Gly	Leucyl-Glycin
log	Logarithmus
m	Meter
M	molar
Mb	Megabasen
MF+PAST	mikrofiltriert und pasteurisiert
MHD	Mindesthaltbarkeitsdatum
min	Minute

Abkürzungsverzeichnis

MIS	microbial identification system
m	milli-
MTP	Mikrotiterplatte
NaCl	Natriumchlorid
n	nano-
nt	Nukleotide
OD	optische Dichte
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
p	pico-
RAPD	randomly amplified polymorphic DNA
RG	Reaktionsgefäß
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	revolutions per minute
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
sp.	Spezies
sp. nov.	<i>species nova</i>
spp.	<i>species pluralis</i>
TBE	TRIS-Borat-EDTA
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TSA	Trypton-Soja-Agar
TSB	Trypton-Soja-Bouillon
ÜNK	Übernachtskultur
V	Volt
ZnSe	Zinkselenid

Abkürzungen von Gattungsnamen

B.	<i>Bacillus</i>
M.	<i>Microbacterium</i>
P.	<i>Paenibacillus</i>

EINLEITUNG

1 Rohmilchmikrobiota

Aufgrund ihres hohen Nährwerts, des fast neutralen pH und der hohen Wasseraktivität stellt Rohmilch das ideale Wachstumsmedium für eine diverse Mikrobiota dar (Fricker *et al.*, 2011; Quigley *et al.*, 2013a). Während Milch im gesunden Euter steril ist (Tolle, 1980), wird sie bereits während des Melkens mit einer Vielzahl an Mikroorganismen kontaminiert. Die Zusammensetzung der Rohmilchmikrobiota ist dabei sehr komplex und variiert, abhängig von Hygiene, Tankgröße, Saison, Tiergesundheit, Herdengröße und einer Reihe anderer Faktoren, sehr stark (Mallet *et al.*, 2012; Quigley *et al.*, 2013b). Dominant sind meist Gram-negative Keime, wie *Pseudomonas* und *Acinetobacter* sowie Milchsäurebakterien, wie *Lactococcus*, *Streptococcus* oder *Lactobacillus* (Raats *et al.*, 2011; Masoud *et al.*, 2012; Von Neubeck *et al.*, 2015; Vithanage *et al.*, 2016). Diese werden jedoch während der Milchverarbeitung, vor allem der Pasteurisierung, größtenteils inaktiviert.

Relevant für Trinkmilch ist der hitzeresistente Teil der Mikrobiota. Dieser besteht neben Sporenbildnern aus Vertretern der *Actinobacteria*, die aufgrund ihres hohen Anteils an Guanin und Cytosin (G+C) in der DNA auch als High G+C Gram-positive bezeichnet werden. Vor allem Spezies, die über eine gewisse Psychrotoleranz verfügen, d.h. auch bei Temperaturen von ≤ 7 °C proliferieren, während das Wachstumsoptimum über 15 und das Maximum über 20 °C liegen (Collins, 1981; Champagne *et al.*, 1994; Moyer und Morita, 2007), sind in diesem Zusammenhang bedeutend. Sie erreichen in Produkten mit verlängerter Haltbarkeit hohe Keimzahlen und sind oft für den frühzeitigen Verderb verantwortlich (Ranieri *et al.*, 2009; Schmidt *et al.*, 2012).

In den meisten Biodiversitätsstudien wird die Gesamtmikrobiota von Rohmilch (Delbes *et al.*, 2007; Rasolofo *et al.*, 2010; Fricker *et al.*, 2011; Quigley *et al.*, 2013a) oder die Zusammensetzung spezifischer Gruppen wie Milchsäurebakterien und Pathogene analysiert (Kagkli *et al.*, 2007; Lopez-Benavides *et al.*, 2007; Giannino *et al.*, 2009). Obwohl die hitzeresistente und psychrotolerante Mikrobiota von großem Interesse für die Milchindustrie ist, gibt es kaum Arbeiten, die sich gezielt mit ihrer Biodiversität beschäftigen. Typische Gattungen der *Actinobacteria* sind neben *Microbacterium* und *Corynebacterium* auch *Micrococcus*, *Kocuria* und *Arthrobacter* (Meer *et al.*, 1991; Champagne *et al.*, 1994; Sørhaug und Stepaniak, 1997; Ranieri *et al.*, 2009), die als Umweltkeime über Heu und Staub, bei mangelnder Hygiene aber auch über das Melksystem in die Rohmilch gelangen (Vacheyrou *et al.*, 2011). Die Konzentrationen psychrotoleranter Sporenbildner in Rohmilch sind in der

Regel sehr gering. Ihre Zahlen überschreiten nur selten 1 KbE/mL (McGuiggan *et al.*, 2002), was die Isolierung im Rahmen von Biodiversitätsstudien erschwert. Als wichtige Vertreter gelten besonders *Bacillus* (v.a. *Bacillus cereus sensu lato*) und *Paenibacillus*, aber auch *Viridibacillus*, *Lysinibacillus* und *Sporosarcina* werden oft detektiert (Matta und Punj, 1999; Coorevits *et al.*, 2008; Ivy *et al.*, 2012). Mögliche Eintragsrouten psychrotoleranter Sporen sind in Abbildung 1 dargestellt. In den Sommermonaten stellt die Erde, mit der das weidende Vieh in Kontakt kommt, die wichtigste Quelle dar (Christiansson *et al.*, 1999). In den Wintermonaten, oder bei ganzjähriger Stallhaltung aber stammen die Sporen vor allem aus der Einstreu, dem Futter wie z.B. der Silage, oder der Fäzes (Magnusson *et al.*, 2007a; Vissers *et al.*, 2007). Meist kommt es initial zur Kontamination der Euterhaut und über diesen Weg zum Eintrag in die Rohmilch (McKinnon und Pettipher, 1983; Kumari und Sarkar, 2016). Seltener werden auch Melkanlage und Waschwasser als Ursprung aufgeführt oder ein direkter Eintrag aus Stallluft, Heu und Staub (Griffiths und Phillips, 1990; Magnusson *et al.*, 2007a; Vacheyrou *et al.*, 2011). Aufgrund ihres ubiquitären Vorkommens ist eine Kontamination mit Sporenbildnern schwer zu vermeiden, kann aber durch eine gründliche Reinigung von Euter und Melkanlage kontrolliert werden.

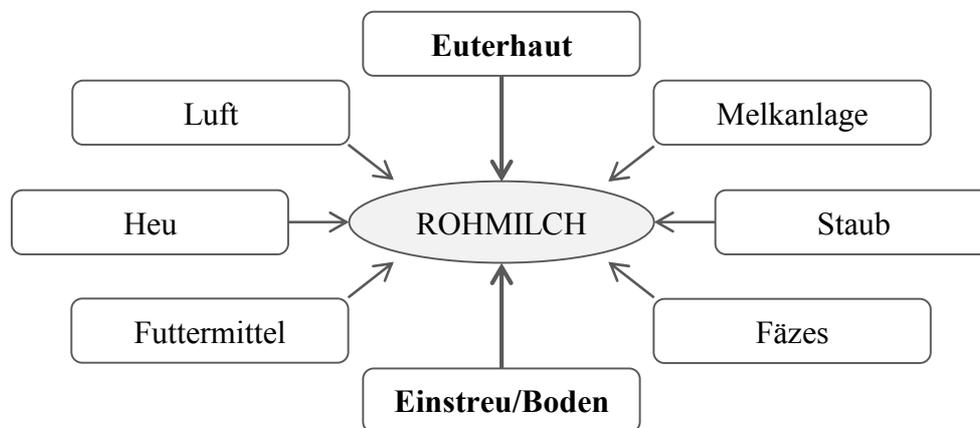


Abbildung 1 Ursprung psychrotoleranter Sporenbildner in Rohmilch. Vor allem über die Euterhaut und Kontakt mit stark kontaminierter Einstreu und Boden kommt es zum Eintrag.

2 Extended-Shelf-Life Milch

Das Verbraucherverhalten tendiert seit Jahren hin zu Produkten mit längerer Haltbarkeit. Im Trinkmilchsektor führt dies zu einer Verdrängung von traditionell pasteurisierten Produkten durch Extended-Shelf-Life (ESL) Milch. Verstärkt wird die Produktakzeptanz auch durch eine minimale, thermische Belastung bei der Herstellung, die einerseits dem Trend hin zu weniger stark verarbeiteten Lebensmitteln folgt und zusätzlich, vor allem im Vergleich zu H-

Milch, die in der Regel 2-3 s bei 135-150 °C erhitzt wird, die organoleptischen Eigenschaften konventionell pasteurisierter Milch erhält (Goff und Griffiths, 2006).

2.1 Herstellungsprozesse von ESL-Milch

Zur Herstellung von ESL-Milch gibt es eine Reihe verschiedener Verfahren. Neben der kurzzeitigen Hoherhitzung, Behandlung mit hohem hydrostatischen Druck (Datta und Deeth, 1999; Chawla *et al.*, 2011) oder gepulsten elektrischen Feldern (Walkling-Ribeiro *et al.*, 2011) werden auch Baktofugations- (Te Giffel und Van Der Horst, 2004) und Mikrofiltrationsprozesse (Fernandez Garcia *et al.*, 2013) eingesetzt. Hydrostatischer Druck und elektrische Felder finden in der kommerziellen Trinkmilchherstellung bisher noch keinen Einsatz. In Deutschland am weitesten verbreitet ist die kurzzeitige Hoherhitzung, gefolgt von Mikrofiltration und Baktofugation, die auch im Fokus dieser Arbeit stehen.

Im kommerziellen Bactocatch-Prozess zur Herstellung von mikrofiltrierter und pasteurisierter (MF+PAST) Milch, der von Holm *et al.* (1986) entworfen und patentiert wurde, wird die Rohmilch zunächst in eine Magermilch- und eine Rahmfraktion separiert (Abbildung 2). Die Magermilch wird dann mikrofiltriert und das Retentat, das einen Großteil der Mikroorganismen enthält entweder verworfen oder mit dem Rahm kombiniert und zur vollständigen Inaktivierung der Bakterien hoherhitzt (135-150 °C, 2-3 s).

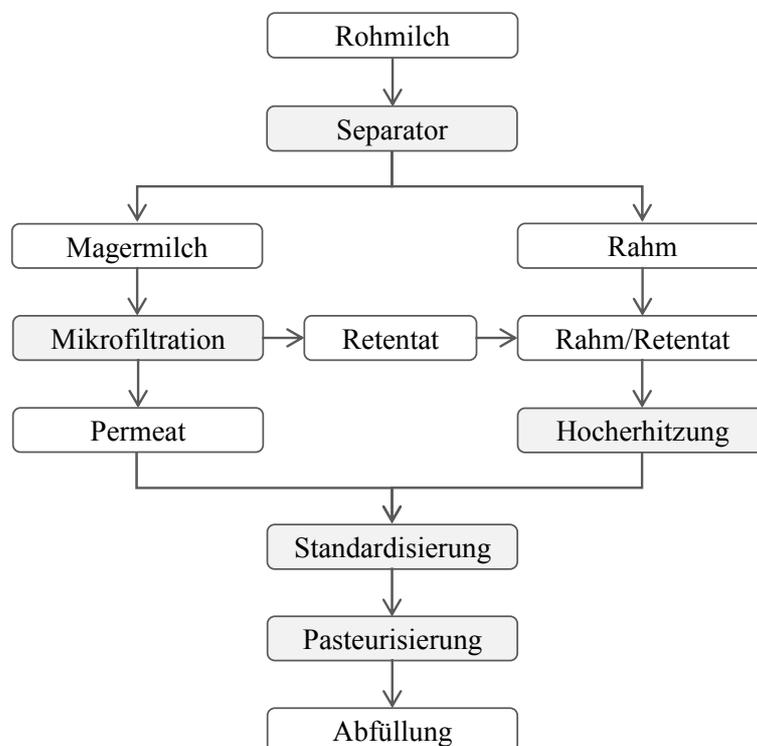


Abbildung 2 Herstellungsprozess mikrofiltrierter und pasteurisierter ESL-Milch im Bactocatch-Verfahren nach Holm *et al.* (1986).

Anschließend wird der Fettgehalt der Milch eingestellt, das Produkt homogenisiert, bei 73 - 75 °C für 15 s pasteurisiert und abgefüllt. Der gesamte Prozess ermöglicht eine Reduktion der Keimzahlen um 4,5 - 5,6 log-Stufen und, abhängig von der Temperatur, eine Lagerstabilität von 22 – 30 d bei 8 °C und sogar 26 – 33 d bei 6 °C (Elwell und Barbano, 2006; Kaufmann *et al.*, 2010; Schmidt *et al.*, 2012; Caplan und Barbano, 2013; Fernandez Garcia *et al.*, 2013).

Das Kernstück des Prozesses stellt die Mikrofiltration dar, die eine physikalische Abtrennung von vegetativen bakteriellen Zellen, Sporen und somatischen Zellen aus der Milch ermöglicht (Gésan-Guiziou, 2010). Filtriert wird in der Regel durch keramische Membranen mit Porengrößen von 1,4 µm, die einen Kompromiss zwischen Weite zum längeren Erhalt hoher Durchflussraten und Enge zur Retention der Mikroorganismen darstellen (Maubois, 2002). Wichtig für die Mikrofiltrationsleistung im Hinblick auf die Durchflussraten ist neben der Porengröße vor allem eine vorhergehende Separation. Ausschließlich Magermilch wird filtriert, da die Größenverteilung von Fettpartikeln der von Mikroorganismen sehr ähnlich ist und es bei Vollmilch bereits nach kurzen Laufzeiten zum Fouling und Verstopfung der Membran kommt (Guerra *et al.*, 1997; Gésan-Guiziou, 2010). Daten zur dezimalen Reduktion von vegetativen Zellen schwanken zwischen 3,7 - 6,0 log-Stufen (Barbano *et al.*, 2006; Elwell und Barbano, 2006; Schmidt *et al.*, 2012), wobei die Mikrofiltrationsleistung gegenüber unterschiedlichen Spezies von deren Zellgröße abhängt und Stäbchen z.B. besser retiniert werden als Kokken oder auch Sporen. Da diese teilweise geringere Durchmesser aufweisen als die Porengröße kann es durchaus zur Permeation kommen (Trouvé *et al.*, 1991; Schmidt *et al.*, 2012). Daten zur Retention von Sporen, die aus Spiking-Versuchen stammen, liegen zwischen 3,0 und 4,5 log-Stufen (Trouvé *et al.*, 1991; Tomasula *et al.*, 2011). Bis heute gibt es jedoch keine Studie, die sich mit der Abtrennung der diversen Sporenpopulation beschäftigt, die natürlicherweise in der Rohmilch vorliegt.

Die Baktofugation stammt ursprünglich aus den Niederlanden, wo Simonart (1959) die sogenannte Superzentrifugation zur Entkeimung entwickelte. Kommerziell eingeführt wurden die Zentrifugen von der Firma Tetra Pak als „Baktofugen“ und werden in Käsereien bereits seit vielen Jahren zur Verminderung des Sporengehalts von *Clostridium tyrobutyricum* und damit verbundenen Spätblähungsdefekten eingesetzt (Bergere *et al.*, 1969; Kessler, 1988). Auch in der Trinkmilchherstellung finden sie in der kombinierten Baktofugation und Pasteurisierung (BF+PAST) Anwendung (Abbildung 3). Im prolong-Verfahren des Anlagenherstellers GEA Westfalia wird die Milch zunächst in zwei aufeinanderfolgenden Baktofugen entkeimt und im Separator in eine Magermilch- und eine Rahmfraktion getrennt.

Nach der Einstellung des Fettgehalts wird bei der Pasteurisierung ein weiterer Teil der Mikroorganismen inaktiviert und das Produkt abschließend abgefüllt.

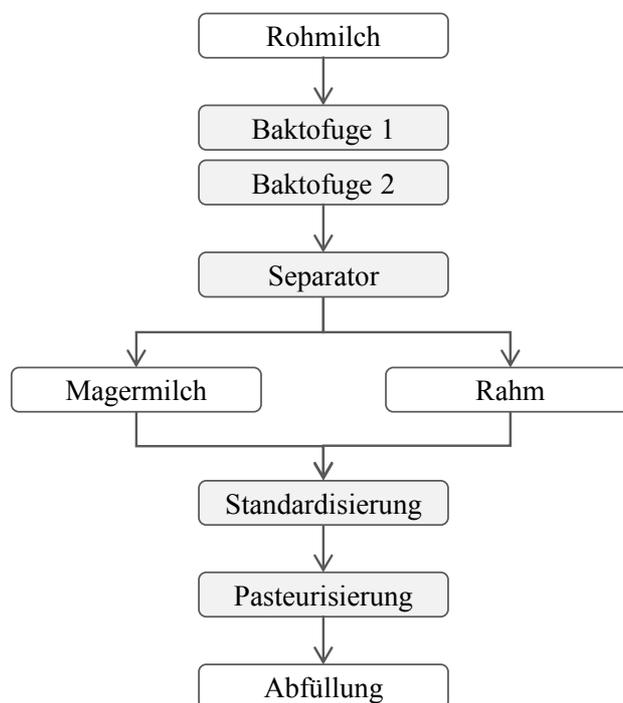


Abbildung 3 Herstellungsprozess doppelt baktofugierter und pasteurisierter ESL-Milch im prolong-Verfahren.

Die Wirkung der Baktofugation zur Reduktion von Keimzahlen beruht auf der Abtrennung von Mikroorganismen aufgrund ihrer höheren Dichte im Vergleich zur Milch. Die spezifische Dichte der Milch liegt dabei mit 1,00 und 1,03 g/mL nur unwesentlich niedriger als die der bakteriellen Zellen. Abhängig von Zellzustand und Wachstumsstadium schwanken die Angaben hier zwischen 1,07 und 1,12 g/mL für vegetative Zellen und 1,16 und 1,45 g/mL für Sporen (Beaman *et al.*, 1982; Carrera *et al.*, 2008; Orsburn *et al.*, 2008; Den Hertog *et al.*, 2009; Lewis *et al.*, 2014). Um eine gute Abtrennleistung zu erzielen, wird die Baktofugation daher meist bei 55 – 60 °C durchgeführt, wo die spezifische Dichte der Milch mit 1,02 g/mL relativ gering ist (Kessler, 1988; Gésan-Guiziou, 2010). Durch eine einfache Baktofugation bei 9.000 – 10.000 x g werden in der Regel 7 - 93 % der vegetativen Zellen und 90,3 und 99,8 % der dichteren Sporen abgetrennt (Kosikowski und Fox, 1968; Te Giffel und Van Der Horst, 2004; Grant *et al.*, 2005; McCarthy, 2011; Faccia *et al.*, 2013). Um den Effekt zu verstärken, wird die Milch im prolong-Verfahren in zwei aufeinanderfolgenden Entkeimungsseparatoren doppelt baktofugiert. Nachvollziehbare Daten für eine Haltbarkeitsverlängerung im Vergleich zu konventionell pasteurisierter Milch sind bisher

nicht publiziert. McCarthy (2011) und Te Giffel *et al.* (2006) berichten aber von einem Gewinn zusätzlicher 3 - 5 d, was einer Lagerstabilität von ca. 13 - 15 d entspricht.

2.2 Mikrobiologische Qualität von ESL-Milch

Für den mikrobiellen Verderb gibt es in Deutschland keine rechtlich verankerten Grenzwerte. Als Richtwert für die Haltbarkeit von Trinkmilchprodukten wird jedoch häufig das Limit von 6,0 log KbE/mL angesetzt (Mayr *et al.*, 2004). Insgesamt ist die Datenlage zur mikrobiologischen Qualität von ESL-Milch sehr dünn. Über Mikrobiota von BF+PAST Milch ist bislang wenig bekannt und auch für MF+PAST Milch gibt es nur eine einzige Studie, die sich nicht nur mit der Bestimmung reiner Keimzahlen begnügt, sondern auch eine Identifizierung der Mikrobiota vornimmt. Schmidt *et al.* (2012) analysierten Endprodukte fünf verschiedener Hersteller bei Ablauf der Haltbarkeit auf ihre Keimzahl und die dominierenden Arten in der Milchmikrobiota und stellten dabei fest, dass die mikrobiologische Qualität von MF+PAST Milch sehr starken Schwankungen unterliegt. Die ermittelten Keimzahlen zeigten eine breite Streuung und lagen zwischen 1,0 und 8,0 log KbE/mL. Insgesamt 8 % aller Proben waren verdorben, was eindeutig darauf hinweist, dass die haltbarkeitsrelevanten Faktoren noch nicht in ausreichendem Maße bekannt und reguliert sind. Die Verderbsmikrobiota setzte sich dabei aus lediglich zwei Gruppen zusammen. Ein Drittel des Verderbs war auf Gram-negative Rekontaminationskeime zurückzuführen und zwei Drittel auf psychrotolerante Sporenbildner, vor allem auf die Vertreter *B. cereus sensu lato* und *Paenibacillus*. Die Ergebnisse decken sich mit Berichten aus der Literatur für konventionell pasteurisierte Milch. Auch hier wurden *Bacillus* und *Paenibacillus* als haltbarkeitslimitierende Faktoren identifiziert, sobald eine Rekontaminationen mit Gram-negativen Keimen vermieden wird (Fromm und Boor, 2004; Huck *et al.*, 2008). Während *Bacillus* vor allem im Verlauf der ersten 14 d aus konventionell pasteurisierter Milch isoliert wird, so kommt es ab 17 d zur Dominanz von *Paenibacillus* (Huck *et al.*, 2008; Ranieri *et al.*, 2009). Generell ist vor allem eine Kontamination mit *Paenibacillus* als kritisch anzusehen, da viele Vertreter über eine ausgeprägte Psychrotoleranz verfügen und zumindest einzelne Stämme sogar bei 4°C innerhalb von 16 d zum Produktverderb führen können (Ivy *et al.*, 2012; Ranieri *et al.*, 2012; Schmidt *et al.*, 2012; Switt *et al.*, 2014).

Hitzesensitive Verderbsorganismen stammen aus Postpasteurisierung-Rekontaminationen, ihr Eintrag ließe sich somit durch optimierte Anlagenhygiene und aseptische Abfüllung vermeiden (Schröder, 1984; Eneroth *et al.*, 1998). Sporen dagegen werden als hitzeresistente

Dauerformen bei den milden Bedingungen der konventionellen Pasteurisierung nicht inaktiviert (Collins, 1981; Andersson *et al.*, 1995) und auch High G+C Gram-positive Keime, wie *Microbacterium*, sind in der Lage diese kurzzeitige Erhitzung zu überdauern (Bramley und McKinnon, 1990; Fromm und Boor, 2004). Für konventionell pasteurisierte Milch ist unstrittig, dass die Haupteintragsquelle die Rohmilch darstellt (Griffiths und Phillips, 1990; Lin *et al.*, 1998; Huck *et al.*, 2007). Werden die hitzeresistenten Keime im Verlauf von Baktofugation oder Mikrofiltration nicht abgetrennt, ist durchaus ein Eintrag aus der Rohmilch möglich. Auf der anderen Seite belegen einige Studien auch die Rekontamination pasteurisierter Milch mit Sporenbildnern und zu einem geringeren Maße auch mit High G+C Gram-positiven Keimen (Svensson *et al.*, 2000; Mayr *et al.*, 2004; Svensson *et al.*, 2004; Huck *et al.*, 2007). Über welche Eintragsrouten verderbsinduzierende Mikroorganismen ihren Eintrag in MF+PAST und BF+PAST Milch finden ist damit nicht klar.

2.3 Sensorischer Verderb von ESL-Milch

Neben dem mikrobiellen Verderb durch Wachstum psychrotoleranter Mikroorganismen stellt auch der frühzeitige sensorische Verderb ein mögliches Qualitätsproblem für MF+PAST und BF+PAST Milch dar. Die Aktivität extrazellulärer, bakterieller Enzyme, die während der Kühlagerung gebildet werden, führt dabei zu strukturellen Defekten, wie z.B. der Süßgerinnung oder zur Entstehung sensorisch relevanter Hydrolyseprodukte (Meer *et al.*, 1991). Der typische Fehlgeschmack, der bei einer stark proteolytischen Mikrobiota auftritt wird als bitter oder ranzig beschrieben, während es bei starker Lipolyse zur Freisetzung von Fettsäuren kommt, die als fruchtig, ranzig, unsauber oder seifig wahrgenommen werden (Santos *et al.*, 2003; Kumari und Sarkar, 2016). Abhängig von der enzymatischen Aktivität können sensorisch relevante Konzentrationen dieser Hydrolyseprodukte schon bei geringen Keimzahlen auftreten. In einer Studie von Schmidt *et al.* (2012) wurde zwar in einem Großteil der untersuchten MF+PAST Proben kein sensorischer Verderb festgestellt, in einigen Packungen wurden jedoch bereits ab Keimzahlen von 4,0 log KbE/mL ein erhöhter Gehalt an freien Fettsäuren und Peptiden detektiert, der oberhalb der Grenzwerte für sensorischen Fehlgeschmack lag (McKellar, 1981; Santos *et al.*, 2003). Die verantwortlichen Gattungen waren vor allem *Bacillus* mit dem Vertreter *B. cereus sensu lato*, sowie *Paenibacillus*. Auch Milchpackungen, die hauptsächlich *Microbacterium* spp. enthielten wurden analysiert, wiesen jedoch bis auf eine Ausnahme keine nennenswerte enzymatische Aktivität auf. Im Verlauf von Studien, in denen einzelne Isolate aus Rohmilch auf ihre proteolytische und lipolytische Aktivität gescreent wurden, besaßen vor allem *Bacillus* spp. und *Paenibacillus* spp. großes enzymatisches Potential (De Jonghe *et al.*, 2010). Die Daten zu *Microbacterium* sind dagegen

nicht einheitlich. Während Von Neubeck *et al.* (2015) für lediglich ein Drittel der 47 getesteten Isolate eine enzymatische Aktivität feststellten, waren bei Hantsis-Zacharov und Halpern (2007) alle 43 getesteten Rohmilchisolate entweder proteolytisch oder lipolytisch aktiv. Da es zum frühzeitigen, sensorischen Verderb von MF+PAST und BF+PAST Milch neben der Studie von Schmidt *et al.* (2012) noch keine Daten gibt, sollte ihre Bedeutung im Rahmen dieser Arbeit eingehender analysiert werden.

3 Taxonomische Einordnung von Bakterienstämmen

Die bakterielle Taxonomie oder systematische Einordnung von Mikroorganismen, setzt sich aus drei Teilgebieten zusammen, der Klassifizierung, Nomenklatur und Identifizierung. Dabei strebt die Klassifizierung danach individuelle Stämme anhand ihrer genetischen, morphologischen, physiologischen und biochemischen Merkmale in sinnvollen Gruppen zu organisieren. Im Rahmen der Nomenklatur werden diese Gruppen dann nach internationalen Richtlinien benannt und für die Identifizierung werden diskriminative Charakteristika eingesetzt, um neue Isolate schnell zu erkennen und bestehenden Gruppen zuzuordnen (Gevers *et al.*, 2006).

Die bedeutendste taxonomische Einheit stellt die Spezies dar, über deren Definition keine einheitliche Meinung herrscht, die in der Regel aber verstanden wird als eine genetisch kohärente Gruppe von individuellen Isolaten (Stämmen), die unter standardisierten Bedingungen einen hohen Übereinstimmungsgrad in der Ausprägung einer Vielzahl unabhängiger Merkmale aufweisen (Rosselló-Mora und Amann, 2001; Stackebrandt *et al.*, 2002). Dem binomialen Code entsprechend wird jede Spezies bereits in ihrem Namen einer Gattung zugeordnet, die wiederum einer Familie, Ordnung, Klasse und einem Phylum als höheren systematischen Rängen angehört (Tindall *et al.*, 2010). Die Häufigkeit mit der neue Taxa beschrieben werden, nimmt mit steigender taxonomischer Ebene ab. Während neue Spezies und Gattungen in hoher Frequenz entdeckt und beschrieben werden, entstehen neue Familien in der Regel im Verlauf taxonomischer Revisionen, in denen bereits beschriebene Taxa neu gruppiert werden.

Den ersten Hinweis darauf, eine neue Art oder Gattung isoliert zu haben, erhält man durch den Abgleich der 16S rRNA Sequenz mit Datenbanken wie NCBI oder EzTaxon (Yoon *et al.*, 2017). Liegt die Übereinstimmung der Sequenz des entsprechenden Stammes unter 98,65 % zur am nächsten verwandten Spezies, so handelt es sich nach großer Wahrscheinlichkeit um eine neue Spezies (Kim *et al.*, 2014), befindet sich der Wert unter 95 %, um eine neue Gattung (Ludwig *et al.*, 1998; Tindall *et al.*, 2010; Yarza *et al.*, 2015). Die Neubeschreibung

selbst erfolgt in der aktuellen taxonomischen Praxis dann in einem polyphasischen Ansatz, in dem neben phänotypischen und chemotaxonomischen Merkmalen auch genotypische und phylogenetische Informationen zu einer Konsensusklassifizierung integriert werden (Vandamme *et al.*, 1996; Gevers *et al.*, 2006). Die Daten sollen dabei neben einer umfassenden Beschreibung der Isolate auch einen Vergleich und anhand typischer Merkmale vor allem die Abgrenzung von bereits beschriebenen Taxa ermöglichen (Tindall *et al.*, 2010). Für viele taxonomische Großgruppen existieren Minimalstandards, die eine Richtlinie mit essentiellen und empfohlenen Versuchen enthalten und die Neubeschreibung vereinfachen und vor allem vereinheitlichen. Auch für aerobe Sporenbildner veröffentlichten Logan *et al.* (2009) eine entsprechende Anleitung. Entscheidend ist dabei für jede Neubeschreibung die Auswahl geeigneter Referenzstämme. Im Falle einer Speziesbeschreibung werden dafür Typstämme aller oder der am nächsten verwandten Arten innerhalb einer Gattung eingesetzt, bei Gattungsbeschreibungen die Typspezies aller oder der am nächsten verwandten Genera einer Familie (Logan *et al.*, 2009; Tindall *et al.*, 2010). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde nach diesen Richtlinien eine neue Spezies des Genus *Paenibacillus*, sowie eine weitere, neue Gattung der *Paenibacillaceae* beschrieben.

3.1 Die Gattung *Paenibacillus*

Die Gattung *Paenibacillus* stellt ein weit verbreitetes, Gram-positives und sporenbildendes Taxon dar. Die Beschreibung des Genus geht auf eine Arbeit von Ash *et al.* (1991) zurück, die bei phylogenetischen Studien der Gattung *Bacillus* fünf separate Abstammungslinien feststellten. Eine dieser Linien, die 11 Arten beherbergte, wurde wenig später von den *Bacilli* abgespalten und mit der Typspezies *Paenibacillus polymyxa* als neue Gattung *Paenibacillus* beschrieben (Ash *et al.*, 1993). Der Name *Paenibacillus* kommt dabei aus dem Lateinischen und setzt sich zusammen aus *paene*, fast und *Bacillus*, dem Gattungsnamen *Bacillus* (Stäbchen) und spielt auf den engen Verwandtschaftsgrad an.

In den letzten Jahren erfuhr die Gattung ein enormes Wachstum. Während sie 1997 nur 13 Spezies umfasste (Shida *et al.*, 1997a), waren es 2009 bereits 86 und heute ganze 210 valide beschriebene Arten. Wie bei vielen speziesreichen Gattungen sind die Eigenschaften ihrer Vertreter sehr divers, kaum ein phänotypisches Merkmal ist allen Spezies gemein und auch genetisch herrscht große Heterogenität (Kämpfer *et al.*, 2006; Vos *et al.*, 2009; Mayilraj und Stackebrandt, 2014). Aktuell sind bei NCBI die Genome von 75 Spezies, darunter 55 Typstämme, veröffentlicht. Der G+C Gehalt reicht dabei von 41 -63 % und auch die Genomgrößen variieren extrem. Sie schwanken zwischen 3,8 Mb bei *Paenibacillus popilliae*,

einem Insektenpathogen, bis hin zu 8,3 Mb bei der Umweltspezies *Paenibacillus alginolyticus*.

Typische Habitate von *Paenibacillus* stellen Böden und Teile der Rhizosphäre dar (Vos *et al.*, 2009; Grady *et al.*, 2016), wo einige Arten unter anderem durch die Fixierung von Stickstoff (Xie *et al.*, 2014) oder Lösung von Phosphaten (Xie *et al.*, 2016) das Pflanzenwachstum fördern. Andere Spezies treten als Pathogene verschiedener Invertebraten auf (Harrison *et al.*, 2000; Genersch *et al.*, 2005) oder wurden aus Lebensmitteln, vor allem im Molkereiumfeld, als verderbsinduzierende Mikroorganismen isoliert (Switt *et al.*, 2014; Gopal *et al.*, 2015; Trmčić *et al.*, 2015; Grady *et al.*, 2016).

3.2 Die Familie der *Paenibacillaceae*

Die Familie der *Paenibacillaceae* stellt innerhalb der Ordnung *Bacillales* ein heterogenes Taxon meist sporenbildender, Gram-positiver Bakterien dar. Sie setzt sich aus den elf Gattungen *Paenibacillus* (Ash *et al.*, 1993), *Brevibacillus* (Shida *et al.*, 1996), *Thermobacillus* (Touzel *et al.*, 2000), *Cohnella* (Kämpfer *et al.*, 2006), *Saccharibacillus* (Rivas *et al.*, 2008), *Fontibacillus* (Saha *et al.*, 2010), den erst kürzlich beschriebenen *Ammoniibacillus* (Sakai *et al.*, 2015) und *Marinicrinis* (Guo *et al.*, 2016), sowie *Aneurinibacillus* (Shida *et al.*, 1996), *Oxalophagus* (Collins *et al.*, 1994) und *Ammoniphilus* (Zaitsev *et al.*, 1998) zusammen. Letztere drei Genera, die eine monophyletische Abstammungslinie, separat von den anderen Gattungen bilden, werden zur *Aneurinibacillus* Gruppe zusammengefasst oder sogar als *Aneurinibacillus* Familie abgegrenzt (Vos *et al.*, 2009; Mayilraj und Stackebrandt, 2014).

Insgesamt 281 Spezies sind als Vertreter der *Paenibacillaceae* zusammengefasst, wobei die Typgattung *Paenibacillus* mit 210 Spezies das artenreichste und zugleich diverseste Genus der Familie darstellt. Weitere große Gattungen stellen *Cohnella* und *Brevibacillus* dar, die jeweils 25 und 22 Arten umfassen. Die übrigen Genera setzen sich jeweils nur aus wenigen Arten zusammen und *Ammoniibacillus*, *Marinicrinis* und *Oxalophagus* beinhalten sogar nur die jeweilige Typspezies. Die Komplexität der Familie wird bei Betrachtung ihrer Phylogenie in Abbildung 4 klar. In schwarzer Schrift dargestellt sind hier alle Vertreter der Gattung *Paenibacillus*, in blau alle anderen Gattungen der *Paenibacillaceae*. Angesichts ihrer polyphyletischen Abstammung, ihrer breiten Streuung und starken Unterteilung in mehrere Cluster scheint eine Revision der Taxonomie und vor allem eine Subdivision des Genus *Paenibacillus* sinnvoll. Neben den DNA-Sequenzen der 75 *Paenibacillus* spp. sind auch Genome weiterer 23 Arten (17 Typstämme) bei NCBI verfügbar, die einen G+C-Gehalt von 41 -60 % besitzen und deren Größen zwischen 3,7 und 6,9 Mb schwankt.

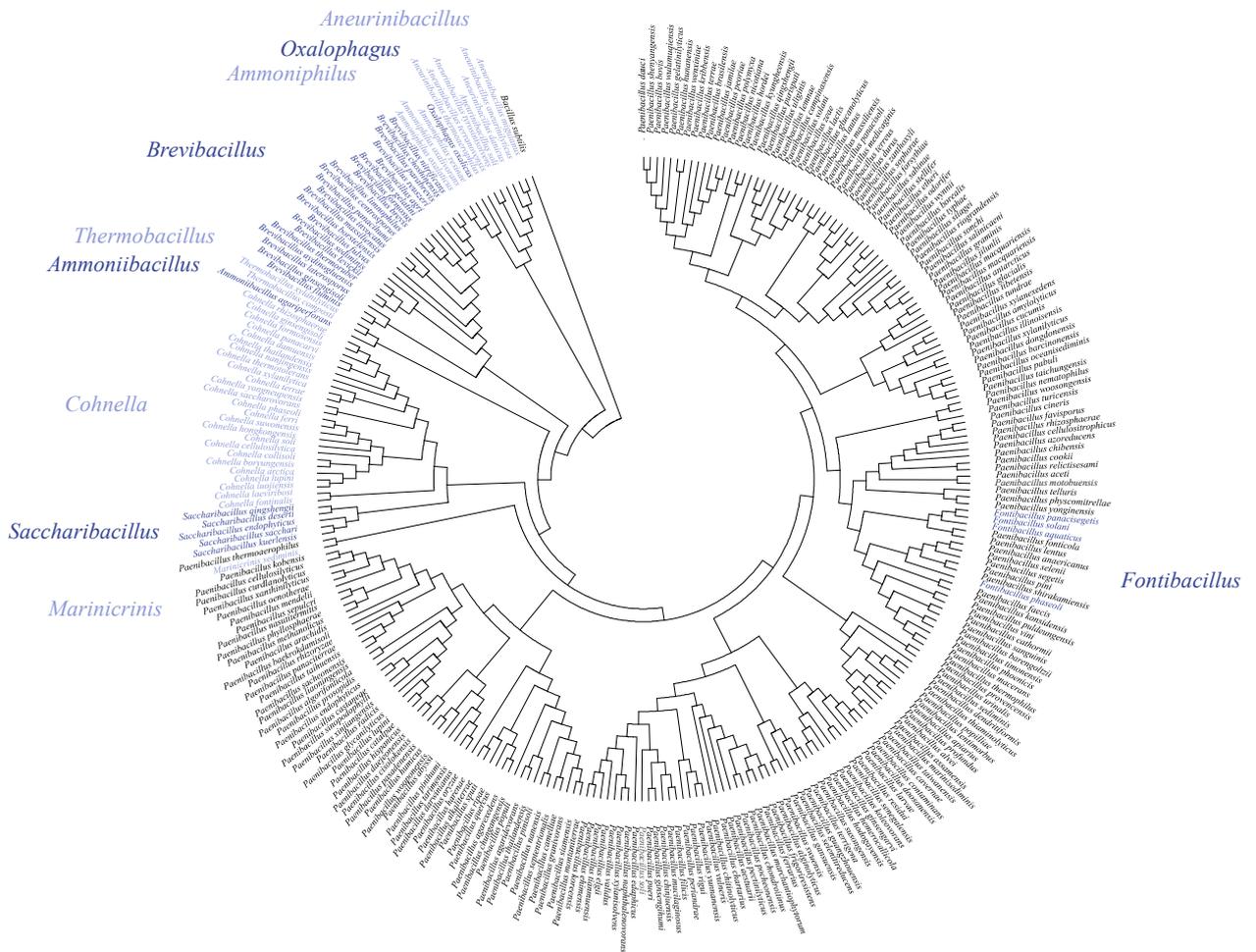


Abbildung 4 Consensus Maximum-Likelihood-Baum, basierend auf den 16S rRNA Sequenzen der Typstämme aller 281 Spezies, die den elf Gattungen der *Paenibacillaceae* angehören. Die Darstellung beruht auf 100 Bootstrap-Replikationen. schwarz: *Paenibacillus*; blau: weitere Gattungen der *Paenibacillaceae*.

Isoliert werden Stämme der *Paenibacillaceae*, wie auch für *Paenibacillus* spp. beschrieben, aus bodenassoziierten Habitaten, Pflanzenmaterial und Kompost. Seltener finden sie sich jedoch auch in Lebensmitteln, Wasser, und Blut oder Fäzes (Vos *et al.*, 2009; Mayilraj und Stackebrandt, 2014) und kommen somit ubiquitär vor.

4 Zielsetzung

Das Ziel dieser Arbeit war eine umfassende Analyse der Mikrobiologie von BF+PAST und MF+PAST Milch, beginnend bei der Rohmilch über die Herstellung bis hin zum Endprodukt.

Die hitzeresistente Rohmilchmikrobiota setzt sich aus Sporenbildern und High G+C Gram-positiven Mikroorganismen zusammen. Da sie die Pasteurisierung überdauern können, stellen sie ein Risiko für den Verderb von Trinkmilch dar. Um das Potential für einen Eintrag in das Endprodukt besser abschätzen zu können, wurde im ersten Teil dieser Arbeit sowohl ihre Prävalenz als auch ihre Biodiversität umfassend analysiert.

Der zweite Teil dieser Studie setzt sich mit BF+PAST und MF+PAST Milch auseinander. Dafür sollte zunächst in Stufenkontrollen die erreichbare Keimabtrennung aller Prozessstufen bestimmt und somit das technologische Potential beider Verfahren erfasst werden. Da zur Haltbarkeit von BF+PAST Milch noch keine wissenschaftlichen Arbeiten existieren, sollten hier Lagerversuche zusätzlich einen Einblick in die Populationsdynamik während der Kühllagerung geben und Informationen über die mögliche Haltbarkeit und Stellschauben für eine verbesserte Lagerstabilität gewonnen werden. Auch die mikrobielle Qualität von MF+PAST und BF+PAST Milch zu Ablauf der Haltbarkeit sollte anhand von Keimzahlen und Identifizierung der dominanten Mikrobiota analysiert werden. Ein weiteres Ziel der Endpunktanalysen war zudem die Erfassung der verderbsinduzierenden Mikrobiota. Daneben sollte die enzymatische Aktivität der Mikrobiota und damit ihr Potential frühzeitigen sensorischen Verderb zu induzieren bestimmt werden. Dafür wurden sowohl Agardiffusionsassays mit einzelnen Endproduktisolaten als auch die fluorimetrische Quantifizierung von Proteolyseprodukten in BF+PAST und MF+PAST Milch durchgeführt. Um effektive Strategien zur Eliminierung der verderbsrelevanten Mikroorganismen zu entwickeln, spielt schließlich das Wissen über ihre Eintragsrouten eine entscheidende Rolle. Anhand von Prävalenzvergleichen und Typisierungen von Stämmen, die entlang des Herstellungsprozesses oder aus verschiedenen Endproduktchargen gewonnen wurden, sollte daher die Rolle von Rohmilch und der Prozessanlage als möglichen Kontaminationsquellen untersucht werden.

Im Rahmen der Biodiversitätsanalysen wurde eine Vielzahl an psychrotoleranten, sporenbildenden Isolaten gewonnen, die keiner bisher beschriebenen Spezies oder Gattung zugeordnet werden konnten. Im letzten Teil dieser Arbeit sollten eine potentiell neue Spezies und eine potentielle neue Gattung im polyphasischen Ansatz charakterisiert und differenzierende Merkmale zur Identifizierung und Abgrenzung extrahiert werden.

MATERIAL UND METHODEN

1 Medien

Die Komponenten wurden in destilliertem H₂O gelöst und alle Medien dann bei 121°C 15 min autoklaviert.

APT-Agar (Evans und Niven Jr, 1951)	Fertigmedium (Merck KGaA) 59,5 g/L APT-Agar pH 6,7 ± 0,2	
Caseinagar (Reddy <i>et al.</i> , 2007)	100,0 g/L Magermilchpulver 10,0 g/L Pepton aus Casein 6,0 g/L Fleischextrakt 30,0 g/L Agar-Agar pH 7,0 ± 0,2 <i>A und B nach dem Autoklavieren 1:1 mischen</i>	<i>Komponente A</i> <i>Komponente B</i>
CASO-Agar	Fertigmedium (Carl Roth GmbH & Co. KG) 40,0 g/L CASO-Agar pH 7,3 ± 0,2	
Glucoseagar (Logan und Vos, 2015)	5,0 g/L Pepton aus Casein 3,0 g/L Fleischextrakt 10,0 g/L Glucose 15,0 g/L Agar-Agar pH 7,0 ± 0,2	
Glycerinmedium	10,0 g/L Natriumglutamat 16,0 g/L Laktose 1,0 g/L Ascorbinsäure 1,0 g/L Agar-Agar 120 g/L Glycerin	
Nitratagar (Reddy <i>et al.</i> , 2007)	5,0 g/L Pepton aus Casein 3,0 g/L Fleischextrakt 1,0 g/L Kaliumnitrat 1,7 g/L Agar-Agar pH 7,0 ± 0,2	

Tributyrimagar (Willis, 1960)	2,5 g/L	Pepton aus Fleisch	
	2,5 g/L	Pepton aus Casein	
	3,0 g/L	Hefeextrakt	
	12,0 g/L	Agar-Agar	
		pH 7,5 ± 0,2	
	10,0 mL/L	Tributyrim	
Sporulationsmedium (Harwood und Cutting, 1990)	5,00 g/L	Pepton aus Casein	
	3,00 g/L	Fleischextrakt	
	1,00 g/L	Kaliumchlorid	
	0,12 g/L	Magnesiumsulfat (x 7 H ₂ O)	
	20,00 g/L	Agar-Agar	
		pH 7,6 ± 0,2	
		Nach dem Autoklavieren:	
	1,00 mL/L	Calciumnitrat 1,0 M	
	1,00 mL/L	Mangandichlorid 0,1 M	
	1,00 mL/L	Eisensulfat 1,0 mM	
Stärkeagar (Reddy <i>et al.</i> , 2007)	5,0 g/L	Pepton aus Casein	
	3,0 g/L	Fleischextrakt	
	2,0 g/L	lösliche Stärke	
	15,0 g/L	Agar-Agar	
		pH 7,2 ± 0,2	
TS-Agar		Fertigmedium (Oxoid GmbH)	
	40,0 g/L	CASO-Agar	
		pH 7,3 ± 0,2	
TS-Bouillon		Fertigmedium (Merck KGaA)	
	30,0 g/L	TSB-Pulver	
		pH 7,3 ± 0,2	
R2A-Medium (Reasoner und Geldreich, 1985)	0,50 g/L	Hefeextrakt	<i>Bouillon</i>
	0,50 g/L	Pepton aus Casein	
	0,50 g/L	Caseinhydrolysat	
	0,50 g/L	lösliche Stärke	
	0,30 g/L	Dikaliumhydrogenphosphat	
	0,30 g/L	Natriumpyruvat	
	0,05 g/L	Magnesiumsulfat (x 7 H ₂ O)	
		pH 7,2 ± 0,2	
	15,00 g/L	Agar-Agar	<i>Agar</i>

2 Milchanalysen und Keimisolation

2.1 Biodiversitätsanalysen von Rohmilch

2.1.1 Biodiversitätsanalyse psychrotoleranter Sporenbildner in Rohmilch

Für die Biodiversitätsanalyse psychrotoleranter Sporenbildner aus Rohmilch wurden insgesamt 28 Proben aus den Stapeltanks von neun Molkereien untersucht. Aufgrund ihrer geringen Konzentrationen erfolgte die Isolation psychrotoleranter Sporenbildner im Anreicherungsverfahren. Bei 18 Rohmilchproben wurden dafür 160 Röhrchen mit 7 mL Trypton-Soja-Bouillon (TSB; Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) befüllt und mit einem Probenvolumen beimpft, das rechnerisch 0,9 Sporen enthielt. Eingeschlossen wurden außerdem vier Rohmilchproben, die zu Chargen mit psychrotoleranten Sporenbildnern im Endprodukt gehörten (Ansatz jeweils 300 Röhrchen), sowie sechs Rohmilchproben aus Stufenkontrollen von MF+PAST Milch (Ansatz jeweils 100 Röhrchen). Die Proben wurden im Wasserbad bei 80 °C 10 min pasteurisiert, abgekühlt und nach Zugabe von 100 µL 10 % L-Alanin (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland; w/v in Phosphatpuffer, pH 7.2, 0,01 M) bei 6 °C 21 d inkubiert. Anschließend wurden 10 µL jedes Röhrchens auf CASO-Agar (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) ausgestrichen und die Platten bei 30 °C 2 d bebrütet. Alle Stämme, die psychrotolerantes Wachstum aufwiesen (mindestens 5 Kolonien einer Morphologie) wurden auf CASO-Agar isoliert und bei 30 °C 2 d inkubiert bevor sie mittels Fourier-Transform-Infrarot (FTIR) Spektroskopie identifiziert wurden (vgl. 3.3.1). Repräsentative Isolate wurden zusätzlich anhand ihrer 16S rRNA oder *rpoB* Sequenz identifiziert (vgl. 3.3.2).

2.1.2 Biodiversitätsanalyse High G+C Gram-positiver Keime in Rohmilch

Um die Biodiversität High G+C Gram-positiver Keime zu erfassen, wurden insgesamt elf Rohmilchproben von vier Molkereien untersucht. 10 mL Milch wurden auf 75 °C erhitzt und sofort abgekühlt bevor dezimale Verdünnungen in 9 mL Ringer-Lösung (Merck KGaA) erstellt und auf CASO-Agar ausplattiert wurden. Nach 5 d bei 30 °C wurden je Probe 30 Kolonien randomisiert gepickt, auf CASO-Agar bei 30°C 5 d kultiviert und abschließend mittels FTIR-Spektroskopie identifiziert (vgl. 3.3.1).

2.2 Prozesskontrollen bei der Herstellung von ESL-Milch

2.2.1 Prozesskontrollen baktofugierter ESL-Milch

Um die Prozesseffizienz des prolong-Verfahrens zur Herstellung von BF+PAST Milch zu analysieren, wurden bei zwei Herstellern (A+B) insgesamt sechs Stufenkontrollen (konventionell n=3, Bio n=3) durchgeführt. Je 20 mL Rohmilch, doppelt baktofugierter und standardisierter, sowie pasteurisierter Milch wurden dafür beprobt. Bei Hersteller A wurden zusätzlich Milchproben nach Baktofuge 1 und Baktofuge 2 gezogen. Um zunächst die Keimabtrennung während der einzelnen Prozessschritte zu erfassen wurde die Gesamtkeimzahl (GKZ) aller Proben bestimmt (vgl. 3.2). Zur Analyse der mikrobiellen Zusammensetzung aller Stufen wurden dann je Prozessschritt und Charge 20 Isolate randomisiert gepickt, bei 30 °C 5 d auf CASO-Agar kultiviert und anschließend mittels FTIR-Spektroskopie identifiziert (vgl. 3.3.1).

2.2.2 Prozesskontrollen mikrofiltrierter ESL-Milch

Um die Abtrennung psychrotoleranter Sporenbildner entlang des Herstellungsprozesses von MF+PAST Milch zu erfassen, wurden insgesamt sechs Stufenkontrollen der Biomilchproduktion zweier Hersteller (D+G) durchgeführt. Die Produktion erfolgte in modifizierten Bactocatch-Prozessen, wobei die Rohmilch zunächst entrahmt, die Magermilch dann durch keramische Membranen mit einer Porengröße von 1,4 µm gefiltert wurde. Der Fettgehalt des Permeats wurde anschließend mit hochohitzter Suspension aus zusammengeführtem Rahm und Retentat (Hersteller D) oder hochohitztem Rahm (Hersteller G) auf 1,5 % (n=5) oder 3,5 % (n=1) eingestellt, pasteurisiert und abgefüllt. Beprobte wurden Rohmilch, Magermilch, Permeat und pasteurisierte Milch. Aufgrund der geringen Keimzahlen in Rohmilch und ihrer weiteren Reduktion während des Prozesses, wurden große Probenvolumina aliquotiert und angereichert: 100 x 1 mL (D) oder 150 x 2 mL (G) Rohmilch in 7 mL TSB, 100 x (D) oder 150 x (G) 10 mL Magermilch, jeweils 75 x 150 mL (D) oder 90 x 200 mL (G) Permeat und pasteurisierte Milch. Alle Proben, ausgenommen der pasteurisierten Milch wurden bei 80 °C 10 min erhitzt und die Aliquots vollständig bei 6 °C 21 d inkubiert. Aus jeder Anreicherung wurden dann 10 µL auf CASO-Agar ausgestrichen und die Platten bei 30 °C 2 d inkubiert. Die Sporenzahlen wurden anhand der Anzahl von Aliquots mit bakteriellem Wachstum unter Beachtung der Anzahl verschiedener Morphologien und des eingesetzten Probenvolumens bestimmt. Alle Isolate wurden dann mittels FTIR-Spektroskopie gemessen und ausgewählte Stämme

psychrotoleranter Sporenbildner zusätzlich anhand ihrer 16S rRNA oder *rpoB* Gensequenz identifiziert (vgl. 3.3) oder für Stammtypisierungen herangezogen (vgl. 3.4).

2.3 Endproduktanalysen von baktofugierter und mikrofiltrierter ESL-Milch

2.3.1 Endproduktanalysen bei Ablauf der Haltbarkeit

Für die Analyse der mikrobiellen Qualität von ESL-Milch bei Ablauf der Haltbarkeit wurden insgesamt 190 Packungen (19 Chargen à 10 Packungen) BF+PAST-Milch von drei Herstellern, Hersteller A (n=70), B (n=60) und C (n=60) über einen Zeitraum von 18 Monaten und 287 Packungen aus 39 Chargen MF+PAST-Milch von vier Herstellern, Hersteller D (n=111), E (n=53), F (n=74), G (n=49) über einen Zeitraum von 20 Monaten untersucht. Ein Großteil der BF+PAST Milch wurde konventionell hergestellt (n=120) und hatte einen Fettgehalt von 3,5 % (n=120), jeweils ein Drittel der Proben war teilentrahmt (2,5 % Fett) und biologisch produziert. Unter den MF+PAST Proben waren ebenfalls konventionelle (n=103) und biologische (n=184) Produktionen, mit Fettgehalten von 1,5 % (n=117), 3,5% (n=151) und 3,8 % (n=19). Alle Proben wurden bis zum Ablauf der Haltbarkeit bei 8 °C, der in Deutschland empfohlenen Lagertemperatur, inkubiert. Die Mindesthaltbarkeit entsprechend des Packungsaufdrucks lag bei 24 d für MF+PAST Milch (alle Hersteller) und bei 21 d (Hersteller A), 18 d (Hersteller B) und 17 d (Hersteller C) für BF+PAST Milch. Zunächst wurde die GKZ aller Packungen (vgl. 3.2) bestimmt. Für die Analyse der dominanten Mikrobiota wurde dann die Häufigkeit der einzelnen Morphologien geschätzt und je Morphologie, die mindestens 10 % der GKZ ausmachte eine Kolonie auf CASO-Agar isoliert. Alle Reinkulturen wurden nach 5 d bei 30 °C mittels FTIR-Spektroskopie und Isolate psychrotoleranter Sporenbildner zusätzlich anhand ihrer 16S rRNA oder *rpoB* Sequenz identifiziert (vgl. 3.3). Ein Teil der Endprodukte und daraus gewonnenen Isolate wurden zudem, wie unter 3.4 und 4 aufgeführt, zur Analyse der bakteriellen Enzymaktivität in ESL-Milch und zu Stammtypisierungen herangezogen.

2.3.2 Lagerstabilität baktofugierter ESL-Milch

Um die Haltbarkeit von BF+PAST Milch zu erfassen, wurde die Populationsdynamik der Mikrobiota während der Kühlagerung bei 8 °C untersucht. Dafür wurden nach 2 oder 3 d (direkt nach Ankunft der Proben), 7, 10, 14, 17, 18 und 21 d jeweils drei bzw. zu Ablauf der Haltbarkeit jeweils zehn Packungen geöffnet und analysiert. Insgesamt wurden so 167 Milchpackungen aus 6 Chargen der Hersteller A, B und C auf ihre GKZ (vgl. 3.2) und

mikrobielle Zusammensetzung hin untersucht. Die dominante Mikrobiota wurde wie unter 2.3.1 beschrieben isoliert und identifiziert.

3 Allgemeine mikrobiologische Methoden

3.1 Stammlagerung

Für die Langzeitlagerung ausgewählter Isolate wurden Kryokulturen bei -80 °C angelegt. Dafür wurde eine dichte Suspension der Reinkultur in 1,5 mL Glycerinmedium hergestellt und vor dem Einfrieren bei 6 °C 24 h inkubiert. Zur vollständigen, metabolischen Reaktivierung der Stämme wurden diese nach dem Auftauen und vor dem Einsatz in weitere Versuche mindestens 2 Mal passagiert.

3.2 Keimzahlbestimmung

Die Bestimmung der GKZ, des Gehalts an High G+C Gram-positiven Bakterien und mesophilen Sporenbildnern erfolgte im Spatelplattenverfahren. Für die Keimzahlanalyse mesophiler Sporenbildner und High G+C Gram-positiver Keime wurden die Proben zunächst im Wasserbad bei 80 °C 10 min laborpasteurisiert (Sporenbildner) oder auf 75 °C erhitzt und sofort abgekühlt (High G+C). In Ringer-Lösung wurden dann dezimale Verdünnungsstufen der (erhitzten) Probe hergestellt und jeweils 100 μL der homogenen Suspension im Doppelansatz auf CASO-Agar ausplattiert. Nach 2 d (mesophile Sporenbildner) oder 5 d (GKZ, High G+C) bei 30 °C wurden abschließend die koloniebildenden Einheiten (KbE) gezählt und das gewichtete Mittel berechnet.

Da die Zahlen psychrotoleranter Sporenbildner in Milchproben unterhalb der Detektionsgrenze klassischer Verfahren liegen, wurde ihr Gehalt mittels Anreicherung im Flüssigmedium, mit der Most Probable Number (MPN) Technik bestimmt (McGuiggan et al., 2002). Dafür wurden jeweils fünf sterile Röhren mit 10 mL, 1 mL und 0,1 mL der Probe beimpft und das Endvolumen mit TSB auf 10 mL eingestellt. Zusätzlich wurden zweimal 10 mL TSB als Negativkontrollen mitgeführt. Alle Proben wurden im Wasserbad bei 80 °C 10 min pasteurisiert. Nach Zugabe von 100 μL 10 % L-Alanin zu den Rohmilchverdünnungen und einer der Negativkontrollen, wurden die Röhren bei 6 °C inkubiert und auf CASO-Agar ausgestrichen. Über die Anzahl der Röhren mit psychrotolerantem Wachstum, definiert durch das Auftreten von mindestens 5 Kolonien einer Morphologie, wurde abschließend die Sporenzahl aus MPN-Tabellen abgelesen (Harrigan und McCance, 1976). Für die Optimierung der Inkubationszeit bei 6 °C wurde die MPN aus 35 Rohmilchproben

nach 7, 14, 21 und 28 d verglichen. Für alle weiteren Anreicherungen dieser Studie wurden 21 d als Inkubationszeitraum festgelegt.

3.3 Identifizierung bakterieller Isolate

3.3.1 Fourier-Transform-Infrarot-Spektroskopie

Die Identifizierung bakterieller Isolate erfolgte zunächst mittels FTIR-Spektroskopie. Dabei handelt es sich um eine physikochemische Methode, die auf der spezifischen Absorption infraroter Strahlung durch molekulare Bindungen basiert. Bei der Messung eines Isolates addiert sich dabei die Absorption aller Atome zu einem Absorptionsspektrum auf, das, ähnlich einem Fingerabdruck, hoch stammspezifisch ist (Naumann, 2000).

Alle 6213 Reinisolate dieser Studie wurden mittels FTIR-Spektroskopie identifiziert (Oberreuter *et al.*, 2002; Wenning *et al.*, 2014). Die Stämme wurden $24,0 \text{ h} \pm 0,5$ unter folgenden, standardisierten Bedingungen inkubiert: Sporenbildner aerob bei $25 \text{ }^\circ\text{C}$ auf Trypton-Soja-Agar (TSA; Oxoid GmbH, Wesel, Deutschland), Milchsäurebakterien anaerob bei $34 \text{ }^\circ\text{C}$ auf All Purpose Tween (APT; Merck KGaA) Agar, alle übrigen Isolate aerob bei $30 \text{ }^\circ\text{C}$ auf TSA. Eine Öse des resultierenden, konfluenten Bakterienrasens wurde dann in $10 \text{ } \mu\text{L}$ sterilem Wasser suspendiert, $25 \text{ } \mu\text{L}$ der homogenen Suspension auf einen 96-Well ZnSe-Probenträger transferiert und die Proben bei $42 \text{ }^\circ\text{C}$ 45 min getrocknet. Die Infrarotspektren wurden im Tensor 27 Spektrometer mit Kopplung an ein HTS-XT-Gerät für hohen Probendurchsatz (beides Bruker Optik, Ettlingen, Deutschland) aufgezeichnet und nach Oberreuter *et al.* (2002) ausgewertet. Die abschließende Identifizierung erfolgte durch Abgleich mit drei Datenbanken, die 8000 Spektren von 1000 Spezies aus 240 Gattungen enthalten, unter Anwendung der Software OPUS V7.2 (Bruker Optik).

Neben der Identifizierung wurden die FTIR-Spektren auch für die hierarchische Clusteranalyse (Wenning und Scherer, 2013) zur Auswahl repräsentativer Isolate psychrotoleranter Sporenbildner für die Sequenzierung eingesetzt. Je Cluster wurde mindestens ein Isolat für die Identifizierung anhand der Gensequenz ausgewählt und die Ergebnisse dann auf das ganze Cluster übertragen um die Häufigkeiten aller Spezies zu erfassen

3.3.2 Identifizierung anhand von DNA-Sequenzen

Repräsentative Isolate psychrotoleranter Sporenbildner aus Biodiversitätsanalysen von Rohmilch und Stufenkontrollen von MF+PAST Milch wurden anhand ihrer Gensequenz identifiziert. Als Marker dienten die 16S rDNA oder, für Vertreter der Gattung *Paenibacillus*, die höher auflösende *rpoB* Sequenz. Zellen wurden lysiert, die entsprechenden Gensegmente amplifiziert und sequenziert. Die Identifizierung erfolgte dann durch einen Sequenzabgleich mit verschiedenen Datenbanken.

3.3.2.1 DNA-Isolation

Für die Isolation bakterieller DNA wurden die Zellen zunächst mechanisch aufgeschlossen. Eine gehäufte Öse Zellmaterial wurde in sterilem MilliQ suspendiert und mit Zirkonium/Silica-Beads (Carl Roth GmbH & Co. KG) mit einem Durchmesser von 0,1 mm versetzt. Die Zellyse erfolgte im FastPrep® (MP Biomedicals, Eschwege, Germany), zwei Mal für 45 s bei einer Geschwindigkeit von 6,5 m/s. Um DNAsen zu inaktivieren, wurden die Proben anschließend bei 95 °C 5 min erhitzt. Zelltrümmer wurden dann 3 min bei 15.000 x g, RT abzentrifugiert und 80 µL des Überstands für weitere Analysen in ein neues Reaktionsgefäß (RG) überführt.

3.3.2.2 Polymerasekettenreaktion

Die Amplifikation der 16S rRNA und *rpoB* Template-Sequenzen für die anschließende Sequenzierung erfolgte mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR). Dafür wurden die in Tabelle 1 aufgeführten Primer (Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland) eingesetzt.

Tabelle 1 Oligonukleotide für die Amplifikation mittels PCR und die Sanger-Sequenzierung.

Zielgen	Primername	Sequenz [5'-3']	Amplikonlänge
16S rRNA	16S_27 for ¹	AGAGTTTGATCCTGGCTCA	1465 nt
	16S_1492 rev ¹	CGGCTACCTTGTTACGAC	
	16S_519 for ²	CAGCAGCCGCGGTAATAC	
	16S_907 rev ²	CCGTCAATTCMTTTGAGTTT	
	16S_926 rev ²	CCGTCAATTCCTTTGAGTTT	
	16S_1061 rev ²	CRRCACGAGCTGACGAC	
<i>rpoB</i>	rpoB_Pae for ^{1,2,#}	AARYTIGGMCCTGAAGAAAT	740 nt
	rpoB_Pae rev ^{1,#}	TGIARTTTRTCATCAACCATGTG	

¹ Oligonukleotid für PCR-Reaktion

² Oligonukleotid für Sanger-Sequenzierung

Drancourt *et al.* (2004)

Jede Reaktion setzte sich aus 2,5 µL 10x Reaktionspuffer, 2,5 µL dNTPs (2 mM), 1,5 µL MgCl₂ (25 mM), 0,25 µL beider Primer, 0,15 µL Thermo Start Taq Polymerase (Thermo Scientific, Waltham, USA) und 16,85 µL MilliQ zusammen. Die Amplifikation erfolgte dann im 48-Well Thermocycler (T 3000, Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland) unter den in Tabelle 2 aufgeführten Bedingungen.

Tabelle 2 PCR-Reaktionsbedingungen zur Amplifikation der 16S rRNA und *rpoB* Sequenz.

Zyklusschritt	16Sr RNA			<i>rpoB</i>		
	Temperatur	Zeit	Zyklen	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	95 °C	15 min	1	94°C	15 min	1
Denaturierung	95 °C	20 s		94°C	60 s	
Annealing	52 °C	40 s	30	60-50 / 50 °C	30 s	TD / 30
Elongation	72 °C	100 s		72°C	1 min	
Finale Elongation	72 °C	5 min	1	72°C	7 min	1
Kühlung	4 °C	∞	-	4°C	∞	-

TD: Touchdown-PCR, Absenken der Reaktionstemperatur um 0,5 °C je Zyklus

3.3.2.3 Agarosegelelektrophorese

PCR-Reaktion und Amplikonlänge wurden mittels Agarosegelelektrophorese überprüft. Dafür wurde das 1 %ige Agarosegel (Carl Roth GmbH & Co. KG) mit 3 % 10x SafeRedTM (Applied Biological Materials Inc., Richmond, Kanada) als interkalierenden DNA-Farbstoff versetzt. Die PCR-Produkte wurden dann bei 110 V 35 min in 1x TBE-Puffer (pH 8) elektrophoretisch aufgetrennt und im UV-Licht visualisiert (UVsolo Imaging System, Biometra GmbH). Als Längenstandard wurde der GeneRulerTM DNA Ladder (Thermo Scientific) eingesetzt.

3.3.2.4 Sequenzierung

Die Sanger-Sequenzierung von 16SrRNA und *rpoB* Amplikons wurde bei LGC Genomics GmbH (Berlin, Deutschland) oder GATC Biotech AG (Köln, Deutschland) durchgeführt. Die Primer 16S_519 for und 16S_907 rev wurden für die Erstellung fast vollständiger 16S rRNA Sequenzen für die Charakterisierung bakterieller Taxa eingesetzt, die übrigen Oligonukleotide zur Standardidentifizierung aller Isolate.

3.3.2.5 Sequenzauswertung und Identifizierung

Die Sequenzauswertung zur Identifizierung der Isolate erfolgte für die 16S rDNA mittels EzTaxon (Kim *et al.*, 2012) und für die *rpoB* Daten mit Hilfe des BLAST-Algorithmus (Altschul *et al.*, 1990). Für die Artzuordnung der *Paenibacillus* Isolate wurde eine *rpoB*-

Sequenzdatenbank mit 44 milchassoziierten Spezies inklusive 12 Typstämmen erstellt. Die Daten dafür wurden aus zuvor identifizierten Eigenisolaten und Typstämmen der DSMZ gewonnen oder von NCBI bezogen. Grenzwerte für die Sequenzübereinstimmung zur eindeutigen Identifikation liegen für die Spezies- und Gattungszuordnung mittels 16S rRNA-Sequenzen bei 98,65 % und 95 % (Kim *et al.*, 2014) und für die Speziesallokation mittels *rpoB*-Sequenz bei 97 % (Adékambi *et al.*, 2008). Alle potentiell neuen Arten und Gattungen wurden entsprechend ihres Vorkommens, beginnend bei dem häufigsten Taxon, konsekutiv nummeriert.

3.4 Stammtypisierung mittels RAPD-PCR

Um horizontale und vertikale (Rekontamination) Transmission von Bakterienstämmen entlang der Produktionskette zu verifizieren, wurden Stammtypisierungen mittels randomly amplified polymorphic DNA (RAPD)-PCR durchgeführt. Diese beruht auf dem Einsatz kurzer, unspezifischer Primer, die, abhängig von der Gensequenz des vorliegenden Stammes, an mehreren Stellen der Template-DNA binden. Die Amplifikationsprodukte werden bei der Agarosegelelektrophorese zu stammspezifischen Bandenprofilen aufgetrennt (Williams *et al.*, 1990).

Für die RAPD-PCR wurden zunächst Zelllysate hergestellt (vgl. 3.3.2.1). Die DNA-Konzentration wurde dann mittels NanoDrop® ND-1000 (Peqlab, Darmstadt, Deutschland) spektrophotometrisch gemessen und auf 50 ng/µL eingestellt. Alle Isolate wurden in unabhängigen Reaktionen mit jeweils zwei Primern (Eurofins MWG Operon) amplifiziert, die zu diskriminativen Bandenmustern führten (Tabelle 3).

Tabelle 3 Oligonukleotide für die Stammtypisierung mittels RAPD-PCR.

Primername	Sequenz [5´-3´]	Annealing	Literatur	für Gattung
N5	CGGCCACTGT	30 °C	Nilsson <i>et al.</i> (1998)	<i>Bacillus</i> <i>Paenibacillus</i>
OPA7	GAAACGGGTG	32 °C	Lechner <i>et al.</i> (1998)	<i>Bacillus</i> <i>Microbacterium</i>
OPB18	CCACAGCAGT	35 °C	Lechner <i>et al.</i> (1998)	<i>Bacillus</i> <i>Microbacterium</i> <i>Paenibacillus</i>

Die Amplifikation wurde unter Verwendung des KAPA2G™ Robust Hot Start DNA Polymerase Kits (Peqlab, Darmstadt) durchgeführt. Für jede Reaktion wurden 5,0 µL 5x Enhancer, 5,0 µL 5x Buffer A, 0,5 µL dNTPs (10 mM), 2,0 µL Primer (50 µM), 12,3µL

MilliQ, 0,1 µL DNA-Polymerase und 1 µL des Zelllysates eingesetzt. Die PCR-Bedingungen der sind in Tabelle 4 zusammengefasst. Für jeden Stammvergleich wurde als Outgroup ein Stamm der gleichen Spezies aus einer anderen Quelle mitgeführt.

Tabelle 4 Amplifikationsbedingungen der RAPD-PCR.

Zyklusschritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	94 °C	3 min	1
Denaturierung	94 °C	1 min	} 30
Annealing	Tabelle 3	40 s	
Elongation	72 °C	3 min	
Finale Elongation	72 °C	8 min	1
Kühlung	4 °C	∞	-

Visualisiert wurden die PCR-Produkte auf 2 % Agarosegelen nach Gelelektrophorese bei 150 V für 2 h in 0,5x TBE-Puffer. Die Auswertung der resultierenden Bandenmuster erfolgte visuell.

4 Analyse der bakteriellen Enzymaktivität in ESL-Milch

Um das Potential der ESL-Milchmikrobiota für frühzeitigen, sensorischen Verderb zu analysieren wurden zunächst Einzelisolate aus beiden Milchsorten auf ihre proteolytische und lipolytische Aktivität gescreent und dann ganze Milchproben auf den Gehalt sensorisch relevanter Proteolyseprodukte untersucht.

4.1 Agardiffusionsassay

Das Screening auf proteolytische und lipolytische Aktivität wurde mittels Agardiffusionsassay durchgeführt. Der Test ermöglicht eine Kategorisierung der Enzymaktivität von Einzelisolaten und basiert auf der Bildung unterschiedlich großer, klarer Hydrolysehöfe bakterieller Proteasen oder Lipasen im sonst opaquen Medium (Willis, 1960; Logan und Vos, 2015).

Aus Reinkulturen von 217 Endproduktisolaten aus 13 Chargen BF+PAST und 11 Chargen MF+PAST Milch (vgl. 2.3.1) wurden Zellsuspensionen in 100 µL sterilem H₂O hergestellt und jeweils 15 µL im Doppelansatz auf Casein- (Proteolyse) und Tributyrinagar (Lipolyse) aufgetropft. Nach Inkubation bei 8°C für 14 Tage, wurde die proteolytische bzw. lipolytische Aktivität der bakteriellen Enzyme als stark, mittel, schwach oder nicht vorhanden beurteilt und kategorisiert.

4.2 Quantifizierung von Bitterpeptiden mittels Fluorescaminassay

Um die proteolytische Aktivität der Mikrobiota im Endprodukt zu erfassen wurde die Konzentration sensorisch relevanter Hydrolyseprodukte, der pH 4,6-löslichen Bitterpeptide mittels Fluorescaminassay bestimmt (Beeby, 1980; Kocak und Zadow, 1985; Stoeckel *et al.*, 2016). Dabei reagiert Fluorescamin unter Bildung fluoreszierender Pyrolinone mit den primären Aminogruppen der Peptide und ermöglicht so deren fluorimetrische Quantifizierung.

Insgesamt wurden die Peptidkonzentrationen in 163 Packungen aus drei BF+PAST und 12 MF+PAST Produktionen gemessen. Je Charge wurde eine Probe als Referenz direkt nach Herstellung analysiert, alle anderen Packungen wurden zuvor bis zum Ablauf der Haltbarkeit bei 8 °C gelagert. Um größere Peptide und Proteine auszufällen wurden zunächst 25 mL ESL-Milch mit 10 % Essigsäure auf pH 4.6 eingestellt und 20 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Das Präzipitat aus 4 mL Probe wurde dann 15 min bei 9.000 x g, RT abzentrifugiert und 2 mL des Überstands mit den sensorisch relevanten, pH 4,6-löslichen Bitterpeptiden durch PVDF-Filter mit einer Porengröße von 0,45 µm (Pall GmbH, Dreieich, Deutschland) weiter aufgereinigt. Anschließend wurden 20 µL des Permeats mit 600 µL Phosphatpuffer (pH 8, 0,1 M) und 200 µL Fluorescamin (0,2 mg/mL in Aceton, Alfa Aesar GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland) homogenisiert, 200 µL der Mischung im Doppelansatz in 96-Well Mikrotiterplatten (MTP; µClear® weiß mit F-Boden, Greiner bio one GmbH, Kreismünster, Österreich) transferiert und die Proben 20 min bei RT inkubiert. Die Messung erfolgte dann im Fluorometer Victor2 (PerkinElmer Inc., Waltham, USA) bei einer Exzitation von 350 nm und Emission von 460 nm. Für die Quantifizierung wurde eine Standardkurve des Dipeptids Leu-Gly mit neun Datenpunkten von 0,2 bis 2,0 mmol/L angelegt und Phosphatpuffer als Negativkontrolle eingesetzt. Die Geschmacksschwelle der pH 4,6-löslichen Peptide liegt bei 2 equiv. Tyr-Leu mmol/L (McKellar, 1981).

5 Charakterisierung bakterieller Taxa

Die Beschreibung potentiell neuer, bakterieller Taxa erfolgte entsprechend der Standards für aerobe Sporenbildner nach Logan *et al.* (2009). Charakterisiert wurden dafür neben dem Phänotyp mit Morphologie, Physiologie und Biochemie, auch chemotaxonomische und genetische Merkmale. Alle phänotypischen Charakteristika wurden in zwei unabhängigen, biologischen Replikaten untersucht.

5.1 Analyse morphologischer Merkmale

Zunächst wurde die Typstammmorphologie der potentiell neuen Taxa charakterisiert. Dafür wurden junge Kulturen nach 18 h bei 30°C auf CASO-Agar der Gram-Färbung (Reddy *et al.*, 2007) unterzogen und der Gram-Typ nach Gregersen (1978) mit 3 % KOH bestätigt. Für die Beschreibung der Zellmorphologie wurden Übernachtskulturen (ÜNK; 30°C, 18 h, 250 rpm) in 50 mL TSB angesetzt. Die Bakterien wurden 10 min bei 9.000 x g, RT abzentrifugiert und das Pellet mit 5 mL Ringer-Lösung gewaschen, bevor es in 100 µL Ringer-Lösung resuspendiert und die Zellen im Fluoreszenzmikroskop (BX51RTF, Olympus GmbH, Hamburg, Deutschland) mit 100-facher Vergrößerung visualisiert wurden. Die Bildung von Lagereinschlüssen wurde nach Kultivierung auf Glucoseagar bei 30 °C über einen Zeitraum von 5 d täglich mikroskopisch überprüft (Logan und Vos, 2015) und die Motilität der Zellen in halbfestem TSA (TSB+0,3 % Agar-Agar) bei 30°C nach 3 -7 d bewertet. Für die Beschreibung der Sporenmorphologie wurden die Stämme 2 d bei 30 °C auf Sporulationsmedium kultiviert und im Phasenkontrastmikroskop (Laborlux S, Leitz, Wetzlar, Deutschland) 100-fach vergrößert betrachtet. Die Beschreibung der makroskopischen Koloniemorphologie erfolgte nach 3-tägiger Inkubation bei 30 °C auf CASO-Agar.

5.2 Analysen physiologischer Merkmale

5.2.1 Analyse der Wachstumsbedingungen

Für die Beschreibung der Wachstumsbedingungen wurden zunächst die Toleranz gegenüber Temperatur, NaCl und pH untersucht. Die Temperaturminima der Stämme wurden dafür bei 4,0 °C, 5,5 °C, 8,0 °C und 9,0 °C getestet, die Temperaturoptima und -maxima bei 23 – 45 °C in 2 °C-Schritten, die NaCl-Toleranz bei 0,5 % sowie von 1,0 - 6,0 % in 1,0 %-Schritten und die pH-Toleranz bei pH 4,5 - 9,0 in Schritten von 0,5. Alle Versuche wurden in TSB durchgeführt, wobei die entsprechenden Salzkonzentrationen und pH-Bedingungen mit NaCl bzw. mit Hilfe des Puffersystem von Xu *et al.* (2005) eingestellt wurden. Charakterisiert wurden alle acht Stämme der potentiell neuen Taxa, sowie die sechs Referenzstämme der Speziesbeschreibung.

Für standardisierte Versuchsbedingungen wurden zunächst Reinigungsausstriche auf CASO-Agar angefertigt und bei 30 °C 3 d inkubiert. ÜNK (30 °C, 24,0 h±0,5) aus diesen Ausstrichen wurden dann, entsprechend ihrer Wachstumsgeschwindigkeit entweder 1:1000 (*Paenibacillus* sp. nov. und Referenzen) oder 1:500 (Gen. nov. sp. nov. und Referenzen) verdünnt und im Doppel- (pH und NaCl) oder Dreifachansatz (Temperatur) in die

Wachstumsversuche eingesetzt. Zunächst wurden die Optima im Wachstumskurvenleser Bioscreen C (Oy Growth Curves AB Ltd., Helsinki, Finnland) bestimmt. Je Vertiefung der 100-Well Platte wurden dafür 200 µL der verdünnten Kultur eingesetzt. Die Entwicklung der OD₆₀₀ (optische Dichte bei 600 nm) wurde dann nach 3 min Aufheizphase über 48 h unter kontinuierlichem Schütteln in Intervallen von 20 min gemessen und aufgezeichnet. Als Temperatur für alle pH- und NaCl-Versuche wurde entsprechend dem Wachstumsoptimum 30 °C gewählt. Die Wachstumsgrenzen wurden in Röhrchen verifiziert. Eine Auswertung des Keimwachstums erfolgte hierfür visuell nach 7 d bei 30 °C, bzw. nach 21 d für das Temperaturminimum und nach 3 d für das Temperaturmaximum.

5.2.2 Analyse des anaeroben Wachstums

Das Wachstum unter anaeroben Bedingungen wurde mit Hilfe von Anaerocult A (Merck KGaA) entsprechend der Herstellerangaben untersucht. Die Kultivierung erfolgte dafür bei 30 °C auf CASO-Agar (*P. aestuarii* auf R2A) und wurde nach 7 d ausgewertet. Der Test auf Cytochromoxidase als Schlüsselenzym der Atmungskette erfolgte mittels Baccident[®] Oxidase-Teststreifen (Merck KGaA) nach Anweisungen des Herstellers. Die Katalaseaktivität zur Hydrolyse reaktiver Produkte des aeroben Metabolismus wurde mit Hilfe von 3 % H₂O₂ (v/v) nachgewiesen (Reddy *et al.*, 2007). Die Versuche erfolgten mit allen 17 Stämmen dieser Studie.

5.3 Analysen biochemischer Merkmale

Zur Analyse biochemischer Charakteristika wurde neben der Substratverwertung unter Säurebildung auch die Aktivität verschiedener Enzyme und die Bildung spezieller Stoffwechselprodukte untersucht. Dafür wurden Einzeltests auf Indikatormedien sowie das miniaturisierte Testsystem API 20 E (bioMérieux GmbH, Nürtingen, Deutschland) und Versuche entsprechend API 50 CHB/E (bioMérieux GmbH) eingesetzt. Charakterisiert wurden neben den acht Stämmen der potentiell neuen Taxa auch die sechs Referenzstämme der Speziesbeschreibung.

Die Hydrolyse von Casein und Stärke wurde nach Reddy *et al.* (2007) auf Casein- bzw. Stärkemedium nach Kultivierung bei 30 °C untersucht. Positiv gewertet wurden die Bildung eines klaren Hydrolysehofs im opaken Medium nach 14 d bzw. die ausbleibende Schwarzfärbung bei Zugabe von 1 mL Lugolscher Lösung nach 5 d Inkubation. Für den Test auf Nitratreduktion wurden ÜNK (30 °C, 48 h) in 5 mL halbfestem Nitratagar angesetzt. Jeweils 1 mL der Kultur wurden dann in ein neues RG überführt und entsprechend API 20 NE

(bioMérieux GmbH) mit den Reagenzien Nit1, Nit2 und Zinkpulver versetzt. Nachgewiesen wurde die Nitratreduktion dabei durch Rotfärbung des Mediums oder Blasenbildung, die innerhalb 5 min nach Auftropfen von Nit1 und Nit2 erfolgten und die ausbleibende Rotfärbung bei anschließender Zinkzugabe.

5.3.1 Testsystem API 20 E

Das Testsystem API 20 E wurde zur Analyse der Enzymaktivität von β -Galactosidase, Urease, Gelatinase, Arginin-Dihydrolase, Lysin-Decarboxylase, Ornithin-Decarboxylase und Tryptophan-Desaminase herangezogen. Außerdem wurden damit die Bildung von Indol, H₂S und Acetoin in der Voges-Proskauer Reaktion, sowie die Metabolisierung von Citrat untersucht. Zunächst wurden alle Stämme bei 30 °C, 3d auf CASO-Agar kultiviert. Die Reaktionen fakultativ anaerobe Stämme wurden dann nach Herstellerangaben getestet, wobei lediglich die Inkubationsbedingungen auf 30 °C und 72 h angepasst wurden. Für Stämme mit obligat aerobem Wachstum wurden die Reagenzien im Teststreifen zunächst mit der Kultursuspension gelöst und anschließend vollständig in MTP transferiert. Die Vertiefungen wurden dann, ohne die Reaktionen mit Paraffinöl zu überschichten, mit Breathe-Easy Folien (Diversified Biotech Inc., Dedham, USA) versiegelt und vor Auswertung bei RT und 250 rpm 3 d inkubiert.

5.3.2 Analyse der Säurebildung aus Kohlenhydraten

Die Verwertung von 47 Kohlenhydraten unter Säurebildung wurde unter Verwendung des API 50 CHB/E in MTP untersucht. Dafür wurden in destilliertem H₂O sterilfiltrierte Lösungen der Substrate hergestellt, wobei Auswahl und Konzentrationen der Kohlenhydrate den ersten 47 Kohlenhydraten des API 50 entsprachen und lediglich Amidon durch Harnstoff (15,2 mg/mL) ersetzt wurde. Alle Stämme wurden auf CASO-Agar bei 30 °C 3 d angezogen und entsprechend der Herstellerangaben in API 50 CHB/E-Medium suspendiert. Jeweils 100 μ L der 47 Zucker, sowie einer Negativkontrolle (100 μ L H₂O) wurden in MTP vorgelegt und mit 100 μ L der Bakteriensuspension homogenisiert. Die Platten wurden dann mit Breathe-Easy Folien versiegelt und bei RT und 250 rpm 7 d inkubiert. Ein Farbumschlag des Indikators von Rot nach Gelb zeigte eine positive Reaktion an. Eine Auswertung erfolgte täglich, im Ergebnisteil angegeben sind die Resultate nach 7 d.

5.4 Analysen chemotaxonomischer Merkmale

Alle chemotaxonomischen Merkmale, die Peptidoglykanstruktur, respiratorische Chinone, polare Lipide und zelluläre Fettsäuren, wurden vom Identifizierungsdienst der Deutschen

Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig, Deutschland) durchgeführt. Neben frischen Kulturen wurde dafür auch gefriergetrocknetes Zellmaterial benötigt. Zu diesem Zweck wurden jeweils 4 L Kultur (TSB, 30 °C, 48 h, 200 rpm) 10 min bei 9.000 x g, RT abzentrifugiert und lyophilisiert.

5.4.1 Analyse des Peptidoglykans

Für die Analyse der diagnostischen Diaminosäure wurden jeweils 5 mg gefriergetrockneter Zellen der Typstämme beider potentiell neuer Taxa in 4 N HCl bei 100 °C für 16 h der Totalhydrolyse unterzogen. Die Hydrolysate wurden dann im Lösungsmittelsystem nach Rhuland *et al.* (1955) mittels Dünnschichtchromatographie (DC) aufgetrennt und die vorhandenen Isomere der Diaminopimelinsäure (Dpm) identifiziert. Die detektierten Dpm erlauben Rückschlüsse auf die Mureinstruktur des vorliegenden Taxons (Schumann, 2011).

5.4.2 Analyse respiratorischer Chinone

Für die Analyse respiratorischer Chinone wurden diese zunächst in einem zweistufigen Ansatz aus 100 mg gefriergetrocknetem Zellmaterial der Typstämme beider potentiell neuer Taxa extrahiert (Tindall, 1990a; b). Die Extraktion erfolgte dabei zunächst mittels Methanol: Hexan (2:1, v/v) aus den Zellen und im Verlauf der Phasenseparation weiter in die Hexanphase. Anschließend wurden die Lipochinone mittels Dünnschichtchromatographie (DC) aufgetrennt und die unterschiedlichen Chinonklassen anhand einer HPLC-Analyse identifiziert.

5.4.3 Analyse polarer Lipide

Die polaren Lipide der Typstämme beider potentiell neuen Taxa wurden zunächst aus 100 mg gefriergetrocknetem Zellmaterial extrahiert. Dafür wurden die Zellen in einem modifizierten Protokoll nach Bligh und Dyer (1959) über Nacht mit 1:2:0,8 Chloroform: Methanol: 0,3 % wässriger NaCl-Lösung (v/v/v) behandelt. Zelltrümmer wurden abzentrifugiert und die polaren Lipide anschließend aus der Chloroformphase gewonnen. Nach Auftrennung in zweidimensionaler DC wurden die polaren Lipide abschließend unter Einsatz von Molybdätophosphorsäure und Reagenzien zur spezifischen Detektion verschiedener, funktioneller Gruppen identifiziert (Tindall *et al.*, 2007).

5.4.4 Analyse zellulärer Fettsäuren

Die Zusammensetzung der zellulären Fettsäuren wurde für die Typstämme der potentiell neuen Taxa und alle acht Referenzspezies mit Hilfe des Sherlock Microbial Identification

Systems (MIS, MIDI Inc., Newark, USA) analysiert. Dafür wurden aus 40 mg Bakterienkultur die Methylester aller Fettsäuren gewonnen (Miller, 1982; Kuykendall *et al.*, 1988) und diese gaschromatographisch aufgetrennt. Die resultierenden Peaks wurden dann automatisch integriert und alle zellulären Fettsäuren sowie deren Anteile am Gesamtprofil mit Hilfe der MIS Standard Software ausgewertet (Kämpfer und Kroppenstedt, 1996).

5.5 Phylogenetische Analysen anhand der 16S rRNA

Eine phylogenetische Einordnung der potentiell neuen Taxa erfolgte mit Hilfe der 16S rRNA Sequenzen. Für die Erstellung einer fast vollständigen 16S rRNA Sequenz wurden dafür zunächst Sequenzierungsdaten der Primer 16S_519 for und 16S_907 rev (vgl. 3.3.2.4) gewonnen und anschließend durch ein Alignment der überlappenden Regionen zu einer Gesamtsequenz kombiniert. Zusätzlich wurden Vergleichssequenzen valide beschriebener Typstämme (Euzéby, 1997; Parte, 2014) von NCBI bezogen. Ein Alignment aller 16S rRNA Sequenzen wurde mittels ClustalW (Sievers *et al.*, 2011) erstellt und zur Berechnung des Maximum-Likelihood-Baums, basierend auf dem Tamura-Nei-Modell herangezogen (Hall, 2013). Beide Programme sind in *MEGA* Version 6 (Tamura *et al.*, 2013) eingebettet.

6 Statistische Analysen

Statische Analysen wurden in dieser Arbeit vor allem für Korrelationsanalysen, aber auch zur Bestimmung des saisonalen Einflusses auf die Keimzahlen eingesetzt. Alle statistischen Analysen wurden unter Verwendung von R V3.2.1 durchgeführt. Signifikante Ergebnisse lagen bei $p < 0,05$, hochsignifikante Ergebnisse bei $p < 0,01$ vor.

Um den jahreszeitlichen Einfluss auf die Prävalenz mesophiler und psychrotoleranter Sporenbildner sowie high G+C Gram-positiver Bakterien in Rohmilch zu bewerten, wurden die Keimzahlen aller Monate mittels Kruskal-Wallis-Test auf Unterschiede in der zentralen Tendenz untersucht. Ein paarweiser Vergleich der Monate wurde dann mit Hilfe des Wilcoxon Rank-Sum-Tests durchgeführt. Für die Analyse des Zusammenhangs zwischen Zahlen psychrotoleranter und mesophiler Sporenbildnern in Rohmilch, wurden beide Datensets zunächst mit dem Shapiro-Wilk-Test auf ihre statistische Verteilung überprüft. Da keine Normalverteilung vorlag, wurden Stärke und Signifikanz der Korrelation nach dem Spearman Rangkorrelationskoeffizienten analysiert. Der Chi-Quadrat-Test von Pearson wurde zur Überprüfung der Korrelation zwischen (i) der Mikrobiota von ESL-Milch und den GKZ bei Ablauf der Haltbarkeit ($< 6,0 \log \text{KbE/mL}$ vs. $\geq 6,0 \text{ KbE/mL}$) und (ii) dem Auftreten verschiedener Spezies psychrotoleranter Sporenbildner in Roh- und ESL-Milch angewandt.

ERGEBNISSE

1 Mikrobiota von Rohmilch

High G+C Gram-positive Bakterien und Sporenbildner stellen die hitzeresistente Mikrobiota in Rohmilch dar. Da sie die Pasteurisierung überdauern können, bedeuten sie ein potentielles Risiko für die Haltbarkeit von ESL-Milch. Um die Ausgangssituation in der Rohware zu bewerten wurde die Prävalenz und Biodiversität beider Keimgruppen in Rohmilch analysiert.

1.1 High G+C Gram-positive Bakterien in Rohmilch

1.1.1 Prävalenz High G+C Gram-positiver Keime in Rohmilch

Insgesamt wurden 197 Rohmilchproben aus den Stapeltanks von acht Molkereien auf ihren Gehalt an High G+C Gram-positiven Bakterien untersucht. Die Keimzahlen dabei lagen bei durchschnittlich $3,9 \log \text{KbE/mL}$, wobei zwischen den einzelnen Proben große Schwankungen auftraten. Die Werte bewegten sich zwischen $<1,0$ und $4,6 \log \text{KbE/mL}$ und einige extreme Ausreißer erreichten bis zu $5,7 \log \text{KbE/mL}$. Um saisonale Einflüsse auf das Vorkommen High G+C Gram-positiver Bakterien zu erfassen, wurde ihre Prävalenz über den Verlauf eines ganzen Jahres beobachtet (Abbildung 5).

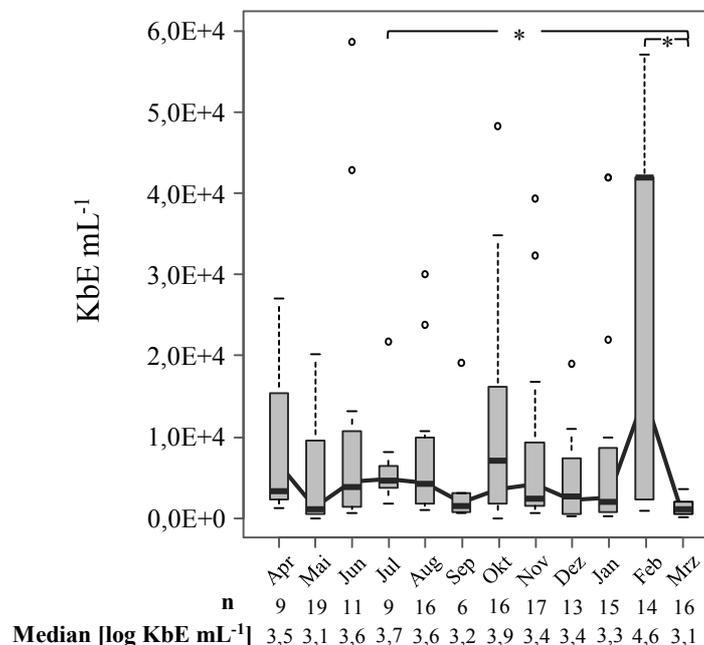


Abbildung 5 Saisonaler Einfluss auf die Prävalenz von High G+C Gram-positiven Bakterien in Rohmilch aus Molkereistapeltanks. Whisker: milde Ausreißer; offene Kreise: extreme Ausreißer; —Verlauf des geometrischen Mittels; * $p < 0,05$.

Insgesamt wurde dabei jedoch kein Trend ausgemacht und der Median schwankte neben einem Ausreißer von 4,6 log KbE/mL im Februar, zufällig zwischen 3,1 und 3,9 log KbE/mL. Signifikante Unterschiede lagen lediglich zwischen März und Juli, den Monaten mit den geringsten Keimzahlschwankungen sowie zwischen März und Februar vor ($p < 0,05$).

1.1.2 Biodiversität High G+C Gram-positiver Keime in Rohmilch

Für die Bestimmung der Biodiversität High G+C Gram-positiver Keime in Rohmilch wurden insgesamt 330 Isolate aus elf Rohmilchproben von vier Herstellern isoliert und mittels FTIR-Spektroskopie identifiziert.

Neben 318 High G+C Gram-positiven Keimen wurden dabei 12 Bakterien anderer taxonomischer Gruppen isoliert, die nicht in die Auswertung miteinbezogen wurden. Zwei dieser Isolate gehörten den hitzesensitiven Gattungen *Moraxella* und *Staphylococcus* an und stammten aus Rekontaminationen. Neun weitere Isolate wurden den Milchsäurebakterien (*Enterococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Vagococcus*) und ein Isolat der Gattung *Bacillus* zugeordnet. Mit 12 Gattungen lag in Rohmilch eine recht geringe Diversität High G+C Gram-positiver Keime vor (Tabelle 5).

Tabelle 5 Quantitative Zusammensetzung der High G+C Gram-positiven Bakterien in elf Rohmilchproben aus den Stapeltanks von vier Molkereien auf Gattungsebene (n=318).

	Gattung	Anteil der Isolate
1	<i>Microbacterium</i>	87,7 %
2	<i>Clavibacter</i>	2,8 %
3	<i>Rathayibacter</i>	1,9 %
4	<i>Kocuria</i>	1,6 %
5	<i>Curtobacterium</i>	0,9 %
6	<i>Leifsonia</i>	0,9 %
7	<i>Arthrobacter</i>	0,6 %
8	<i>Brachybacterium</i>	0,6 %
9	<i>Corynebacterium</i>	0,6 %
10	<i>Micrococcus</i>	0,6 %
11	<i>Agreia</i>	0,3 %
12	<i>Cellulomonas</i>	0,3 %
13	<i>Cellulosimicrobium</i>	0,3 %
14	<i>Plantibacter</i>	0,3 %
15	<i>Pseudoclavibacter</i>	0,3 %

Auffällig dabei war die klare Dominanz einer einzigen Gattung. Fast 90 % aller Isolate gehörten dem Genus *Microbacterium* an. Daneben traten lediglich *Clavibacter* (9 Isolate), *Rathayibacter* (6 Isolate), und *Kocuria* (5 Isolate) mit Häufigkeiten über 1 % auf. Die übrigen elf Gattungen waren jeweils nur mit einem bis drei Isolaten vertreten, somit extrem selten und machten zusammen lediglich 6 % der Stichprobe aus. Die eindeutige Identifizierung auf Speziesebene mittels FTIR-Spektroskopie war nur bei 38 % der Isolate möglich. Ganze 115 davon gehörten der Art *Microbacterium lacticum* an, die somit den wichtigsten Vertreter High G+C Gram-positiver Bakterien in Rohmilch darstellte.

1.2 Sporenbildner in Rohmilch

1.2.1 Prävalenz mesophiler und psychrotoleranter Sporenbildner in Rohmilch

Zur Erfassung der Zahlen mesophiler und psychrotoleranter Sporenbildner in Rohmilch wurden insgesamt 360 Proben aus den Stapeltanks von zehn Molkereien auf ihren Gehalt hin untersucht.

Da die Konzentration psychrotoleranter Sporenbildner in Rohmilch unterhalb der Detektionsgrenze herkömmlicher Methoden liegt, wurden ihre Zahlen mit Hilfe eines Anreicherungsverfahrens, der MPN Technik, bei 6 °C bestimmt. Zur Methodenoptimierung sollte zunächst die Inkubationsdauer ermittelt werden, die Auskeimen und Proliferation und somit die Detektion aller vorhandener, psychrotoleranter Sporen ermöglicht. Dafür wurden die MPN von 35 Rohmilchproben jeweils nach 10, 14, 21 und 28 d bei 6 °C verglichen (Abbildung 6). Während nach 10-tägiger Inkubation nur geringe Sporenzahlen detektiert wurden (0,04 MPN/mL), stiegen sie nach 14 d bereits hochsignifikant auf durchschnittlich 0,23 MPN/mL an ($p < 0,01$). Eine weitere, hochsignifikante Zunahme der detektierten Sporenzahl erfolgte bei einer Inkubationszeit von 21 Tagen ($p < 0,01$). Durchschnittlich lag der Sporengehalt hier bei 0,50 MPN/mL. Eine noch längere Inkubation (28 Tage) dagegen zeigte keine Verbesserung des Detektionsgrades (Daten nicht gezeigt, $p > 0,05$). Alle folgenden Anreicherungen zur Keimzahlbestimmung oder Isolation psychrotoleranter Sporenbildner wurden daher 21 Tage bei 6 °C inkubiert.

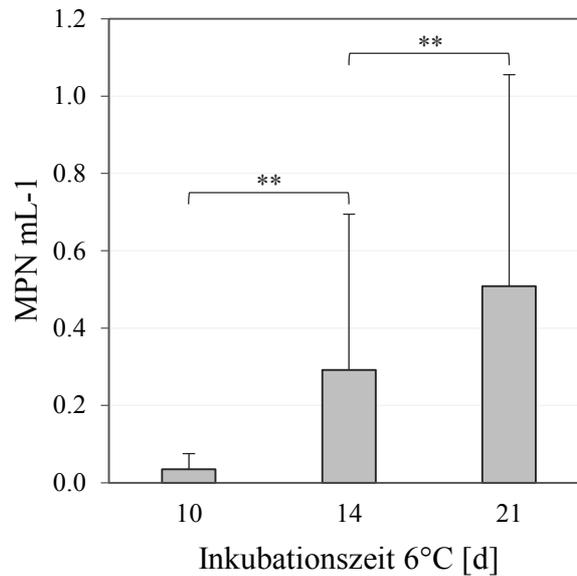


Abbildung 6 Keimzahlen psychrotoleranter Sporenbildner in 35 Rohmilchproben aus Molkereistapeltanks nach 10, 14 und 21 Tagen Inkubation bei 6 °C. ** p<0,01.

Insgesamt wurden 360 Rohmilchproben auf ihren Sporengehalt untersucht. Die Zahlen psychrotoleranter Sporenbildner hierbei waren extrem gering und lagen bei lediglich $0,57 \pm 0,80$ MPN/mL. Dabei wurde eine enorme Spanne von weniger als 0,02 MPN/mL bis hin zu 3,50 MPN/mL detektiert, zwei Ausreißer enthielten sogar 9,00 bzw. 16,00 Sporen je mL. Die Werte mesophiler Sporenbildner lagen mit einer Streuung von <10 bis 900 Kbe/mL und einem Mittelwert von 90 ± 80 Kbe/mL um den Faktor 150 höher.

Eine indirekte Bestimmung psychrotoleranter Sporenzahlen über den Gehalt an mesophilen Sporen wäre aufgrund der wesentlich kürzeren Analysendauer eine große Erleichterung für die Betriebe. Die Ergebnisse der Korrelationsanalyse sind in Abbildung 7 dargestellt. Wie im Dotplot zu erkennen, bestand lediglich ein minimaler, positiver Zusammenhang ($r_s=0,2$; $p<0,01$). Eine Probe mit 50 mesophilen Sporen je mL enthielt im gleichen Volumen zwischen 0,02 und 2,20 psychrotolerante Sporen. Aufgrund dieser enormen Schwankungen ist es nicht möglich den Zusammenhang zwischen mesophilen und psychrotoleranten Sporenbildnern zu quantifizieren und der Gehalt an mesophilen Sporen kann nicht als Marker für die Zahl der psychrotoleranten Sporen herangezogen werden.

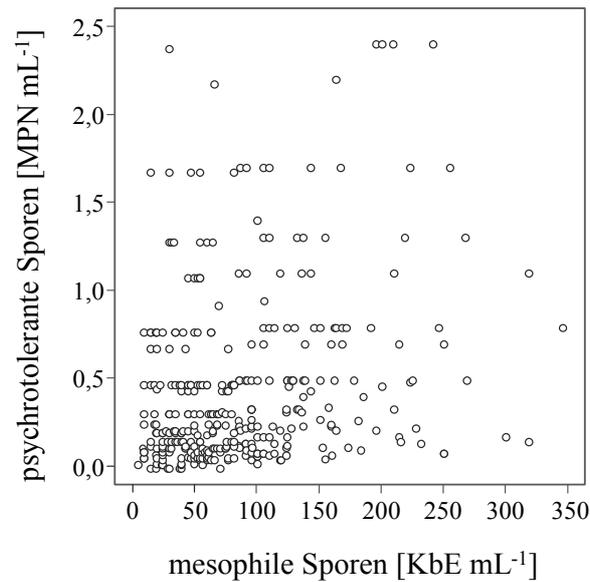


Abbildung 7 Korrelationsanalyse der Keimzahlen mesophiler und psychrotoleranter Sporenbildner in 334 Rohmilchproben aus Molkereistapel tanks. $r_s=0,2$; $p<0,01$.

Binnen zwei voller Jahre wurden saisonale Einflüsse auf die Sporenzahlen beobachtet. Jeden Monat wurden dafür durchschnittlich 15 Rohmilchproben auf ihren Gehalt an mesophilen und psychrotoleranten Sporen untersucht (Abbildung 8). Folgt man den Zahlen psychrotoleranter Sporen so fällt auf, dass im Sommer und frühen Herbst deutlich geringere Konzentrationen vorlagen als im Rest des Jahres. Während von Februar bis April 0,5 bis 0,6 Sporen/mL detektiert wurden, erreichte der Median der Zweijahreserhebung von Juli bis September lediglich 0,1 MPN/mL und damit nur ein Fünftel der Frühjahrswerte. Dieser Trend wurde in beiden Analysenjahren bestätigt. Vor allem im August und September war die Abnahme des Sporengehalts im Vergleich zu den Winter- und Frühjahrswerten (Dezember, Januar, März) signifikant ($p<0,05$). Neben den Konzentrationen fielen für die psychrotoleranten Sporen im Sommer auch die Abweichungen zwischen den einzelnen Proben wesentlich geringer aus. Im Gegensatz dazu zeigten die Zahlen mesophiler Sporenbildner aus den gleichen Rohmilchproben sowohl in den Mittelwerten als auch in der Streuung keine Saisonalität. Die Mediane aus beiden Jahren schwankten hier im Jahresverlauf zufällig zwischen 50 und 95 KbE/mL ($p>0,05$).

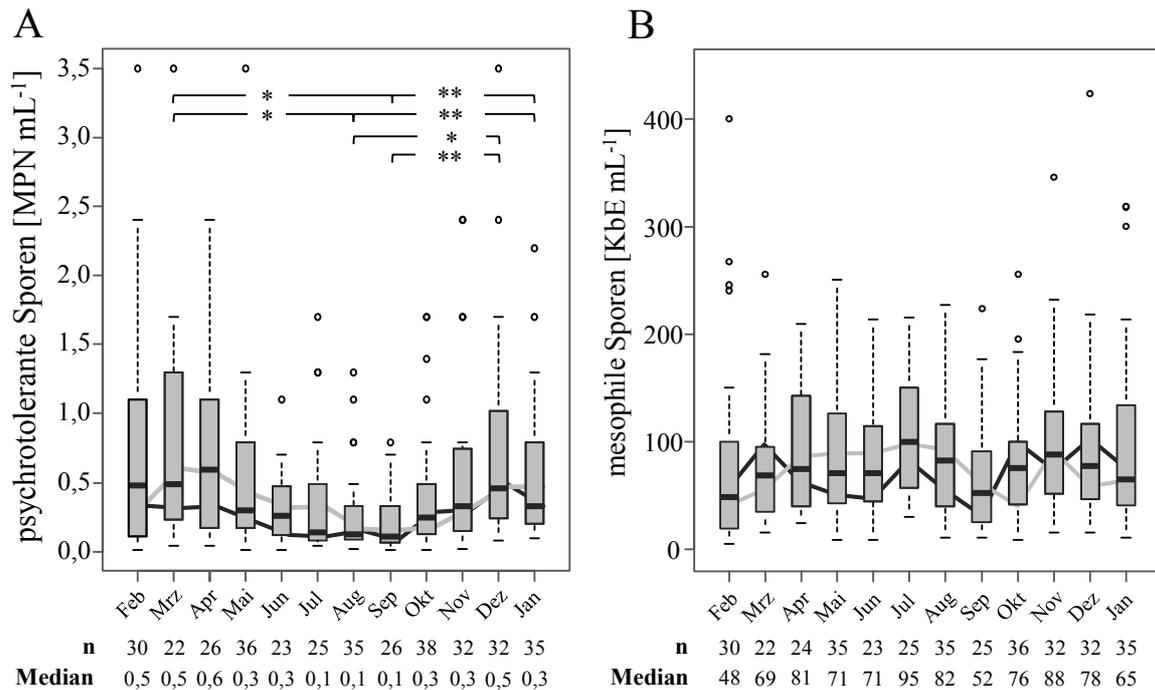


Abbildung 8 Saisonaler Einfluss auf die Prävalenz psychrotoleranter (A) und mesophiler (B) Sporenbildner in Rohmilch aus Molkereistapeltanks. Boxplot aus allen Werten der Zweijahreserhebung von Februar 2014 bis Januar 2017. Whisker: milde Ausreißer; offene Kreise: extreme Ausreißer; — Verlauf des geometrischen Mittels in Jahr 1; — Verlauf des geometrischen Mittels in Jahr 2; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; modifiziert nach Doll *et al.* (2017).

1.2.2 Biodiversität psychrotoleranter Sporenbildner in Rohmilch

Um einen Einblick in die Diversität psychrotoleranter Sporenbildner in Rohmilch zu bekommen, wurden insgesamt 2791 Isolate mit Hilfe von FTIR-Spektroskopie und 938 repräsentative Isolate weiter anhand ihrer 16S rRNA und *rpoB* Sequenzen identifiziert. 28 Rohmilchproben aus den Stapeltanks von neun Molkereien wurden hierfür analysiert. Insgesamt lag dabei mit 56 Spezies aus 12 Gattungen eine enorme Biodiversität vor.

Die mit Abstand häufigste Gattung war *Paenibacillus*. Mit mehr als 2300 Isolaten machte sie ganze 84 % aus und stellte damit fast die gesamte Stichprobe. Neben der hohen Prävalenz wies *Paenibacillus* auch die breiteste Diversität auf. 31 verschiedene Spezies wurden diesem Genus zugeordnet. Quantitativ relevant war daneben nur *Bacillus*, der 10 % aller Isolate ausmachte und durch neun Arten vertreten war. Die übrigen zehn Gattungen, darunter auch drei bisher nicht beschriebene, repräsentierten zusammengenommen lediglich 6 % der Stichprobe. Außer *Sporosarcina* (2,8 %) und *Virgibacillus* (0,6 %), die eine Diversität von sechs und zwei verschiedenen Spezies aufwiesen, waren alle dieser seltenen Gattungen mit nur einer einzigen Art vertreten.

Tabelle 6 Biodiversität psychrotoleranter Sporenbildner in 28 Rohmilchproben aus den Stapeltanks von neun Molkereien auf Gattungsebene (n=2791).

	Genus	Anteil Isolate	Anzahl Arten
1	<i>Paenibacillus</i>	84,09 %	31
2	<i>Bacillus</i>	9,92 %	9
3	<i>Sporosarcina</i>	2,83 %	6
4	<i>Viridibacillus</i>	1,25 %	1
5	<i>Lysinibacillus</i>	0,68 %	1
6	<i>Virgibacillus</i>	0,61 %	2
7	Gen. nov. 1	0,32 %	1
8	<i>Filibacter</i>	0,11 %	1
9	Gen. nov. 2	0,07 %	1
10	<i>Cohnella</i>	0,04 %	1
11	Gen. nov. 3	0,04 %	1
12	<i>Psychrobacillus</i>	0,04 %	1

Die 2791 Rohmilchisolate gehörten 56 verschiedenen Spezies an, die in Tabelle 7 aufgelistet sind. Für einige Arten war dabei aufgrund der hohen Übereinstimmungen von 16S rRNA und *rpoB* Sequenzen keine eindeutige Identifizierung möglich, sodass mehrere Ergebnisse als Speziesgruppen angegeben werden. Insgesamt wurde die Mikrobiota von einigen wenigen Arten dominiert, während ein Großteil der Spezies sehr selten auftrat. Der mit Abstand dominanteste Vertreter psychrotoleranter Sporenbildner war dabei die Gruppe *Paenibacillus amylolyticus/xylanexedens*. Sie alleine machte mit 1320 Isolaten bereits fast die Hälfte der gesamten Stichprobe aus. Weitere, häufige Arten waren *Paenibacillus odorifer* (9,2 %), *Paenibacillus taichungensis/tundrae* (7,2 %), *Paenibacillus* sp. nov. 1 (6,8 %) und *Bacillus pumilus/safensis* (6,2 %). Die übrigen 51 Spezies traten mit Anteilen von lediglich <0,1 bis 3,2 % auf und die 30 seltensten Arten, die jeweils nur mit ein bis vier Isolaten vertreten waren, entsprachen zusammen 1,7 % der Isolate. Auch *Bacillus weihenstephanensis/mycoides*, der als wichtiger psychrotoleranter Sporenbildner in Rohmilch gilt, wurde lediglich 17 Mal isoliert.

Tabelle 7 Biodiversität psychrotoleranter Sporenbildner in 28 Rohmilchproben aus den Stapeltanks von neun Molkereien auf Speziesebene (n=2791).

	Spezies	Anteil Isolate
1	<i>Paenibacillus amylolyticus/xylanexedens</i>	47,29 %
2	<i>Paenibacillus odorifer</i>	9,21 %
3	<i>Paenibacillus taichungensis/tundrae</i>	7,20 %
4	<i>Paenibacillus</i> sp. nov. 1	6,81 %
5	<i>Bacillus pumilus/safensis</i>	6,16 %
6	<i>Paenibacillus taohuashanense</i>	3,22 %
7	<i>Paenibacillus</i> sp. nov. 2	3,19 %
8	<i>Paenibacillus anaericanus</i>	3,08 %
9	<i>Bacillus simplex</i>	2,40 %
10	<i>Viridibacillus arenosi/arvi</i>	1,25 %
11	<i>Sporosarcina globispora/psychrophila</i>	1,22 %
12	<i>Sporosarcina newyorkensis</i>	1,22 %
13	<i>Paenibacillus</i> sp. nov. 3	0,79 %
14	<i>Lysinibacillus parviboronicapiens</i>	0,68 %
15	<i>Bacillus mycoides/weihenstephanensis</i>	0,61 %
16	<i>Paenibacillus terrae</i>	0,61 %
17	<i>Virgibacillus</i> sp. nov.	0,57 %
18	<i>Paenibacillus xylanilyticus</i>	0,54 %
19	<i>Paenibacillus</i> sp. nov. 4	0,47 %
20	<i>Paenibacillus lautus</i>	0,36 %
21	Gen. nov. 1 sp. nov.	0,32 %
22	<i>Bacillus subtilis</i>	0,25 %
23	<i>Paenibacillus</i> sp. nov. 5	0,25 %
24	<i>Bacillus plakoritidis</i>	0,21 %
25	<i>Paenibacillus</i> sp. nov. 6	0,21 %
26	<i>Sporosarcina</i> sp. nov. 1	0,21 %
27	<i>Bacillus licheniformis</i>	0,14 %
28	<i>Filibacter limicola</i>	0,11 %
29	<i>Paenibacillus</i> sp. nov. 7	0,11 %
30	<i>Bacillus psychrosaccharolyticus</i>	0,07 %
31	Gen. nov. 2 sp. nov.	0,07 %
32	<i>Paenibacillus borealis</i>	0,07 %
33	<i>Paenibacillus castaneae</i>	0,07 %
34	<i>Paenibacillus oceanisediminis</i>	0,07 %
35	<i>Paenibacillus</i> sp. nov. 8	0,07 %
36	<i>Paenibacillus tibetensis</i>	0,07 %
37	<i>Sporosarcina</i> sp. nov. 2	0,07 %
38	<i>Sporosarcina ureae</i>	0,07 %

Fortsetzung Tabelle 3

	Spezies	Anteil Isolate
39	<i>Bacillus drentenis</i>	0,04 %
40	<i>Bacillus oleronius</i>	0,04 %
41	<i>Cohnella</i> sp. nov.	0,04 %
42	Gen. nov. 3 sp. nov.	0,04 %
43	<i>Paenibacillus barcinonensis</i>	0,04 %
44	<i>Paenibacillus dongdonensis</i>	0,04 %
45	<i>Paenibacillus graminis</i>	0,04 %
46	<i>Paenibacillus illinoisensis</i>	0,04 %
47	<i>Paenibacillus lactis</i>	0,04 %
48	<i>Paenibacillus</i> sp. nov. 9	0,04 %
49	<i>Paenibacillus</i> sp. nov. 10	0,04 %
50	<i>Paenibacillus</i> sp. nov. 11	0,04 %
51	<i>Paenibacillus</i> sp. nov. 12	0,04 %
52	<i>Paenibacillus</i> sp. nov. 13	0,04 %
53	<i>Paenibacillus</i> sp. nov. 14	0,04 %
54	<i>Psychrobacillus</i> sp. nov.	0,04 %
55	<i>Sporosarcina luteola</i>	0,04 %
56	<i>Virgibacillus</i> sp. nov. 2	0,04 %

Beachtlich war die große Zahl an Stämmen, die keinen beschriebenen Arten und Gattungen zugeordnet werden konnten. Bei ganzen 13,5 % aller Isolate lag die Übereinstimmung der 16S rRNA Sequenz unterhalb der Spezies- bzw. Genusgrenzen (98,65 %, bzw. 95,00 % nach Kim *et al.* (2014)). Insgesamt wurden ganze 20 neue Spezies und sogar drei neue Gattungen ausgemacht (Tabelle 8). Die drei neuen Genera, die jeweils nur durch eine Spezies vertreten waren, gehörten zu den seltenen Taxa und machten zusammen nur 0,4 % der Stichprobe aus. Von der häufigsten Gattung Gen. nov. 1, wurden jedoch sieben Isolate aus vier unabhängigen Proben von drei Herstellern gewonnen. Sie wurde deshalb für die Neubeschreibung im Rahmen dieser Arbeit ausgewählt. Der am nächsten verwandte Genus war *Paenibacillus* mit der Art *Paenibacillus aestuarii*, wobei die Sequenzübereinstimmung der sieben Isolate zum Typstamm von 94,9 % bis 95,3 % reichte. Zwei weitere, neue Gattungen wurden jeweils aus lediglich einer einzigen Rohmilchprobe gewonnen. Phylogenetisch gehören auch sie zu den *Paenibacillaceae*. Ihre nächsten Verwandten sind *Paenibacillus* und *Gorillibacterium*.

Tabelle 8 Neue Spezies und Gattungen psychrotoleranter Sporenbildner in 28 Rohmilchproben aus den Stapeltanks von neun Molkereien. Identity: Übereinstimmung der 16S rRNA Sequenz, Mittelwert aus allen Isolaten; * phylogenetische Einordnung anhand der *rpoB* Sequenz.

Neues Taxon	Anteil Isolate	Phylogenetische Einordnung	
		Bester Hit	Identity [%]
<i>Paenibacillus</i> sp. nov. 1	6,81 %	<i>Paenibacillus borealis</i>	98,27
<i>Paenibacillus</i> sp. nov. 2	3,19 %	<i>Paenibacillus peoriae</i> *	91,00
<i>Paenibacillus</i> sp. nov. 3	0,79 %	<i>Paenibacillus odorifer</i> *	83,00
<i>Virgibacillus</i> sp. nov. 1	0,57 %	<i>Virgibacillus halotolerans</i>	97,69
<i>Paenibacillus</i> sp. nov. 4	0,47 %	<i>Paenibacillus turicensis</i>	98,25
<i>Paenibacillus</i> sp. nov. 5	0,25 %	<i>Paenibacillus tibetensis</i>	98,22
<i>Paenibacillus</i> sp. nov. 6	0,21 %	<i>Paenibacillus doosanensis</i>	97,50
<i>Sporosarcina</i> sp. nov. 1	0,21 %	<i>Sporosarcina globispora</i>	98,15
<i>Paenibacillus</i> sp. nov. 7	0,11 %	<i>Paenibacillus donghaensis</i>	98,20
<i>Paenibacillus</i> sp. nov. 8	0,07 %	<i>Paenibacillus odorifer</i>	97,92
<i>Sporosarcina</i> sp. nov. 2	0,07 %	<i>Sporosarcina aquimarina</i>	98,52
<i>Cohnella</i> sp. nov.	0,04 %	<i>Cohnella arctica</i>	97,08
<i>Paenibacillus</i> sp. nov. 9	0,04 %	<i>Paenibacillus anaericus</i>	98,50
<i>Paenibacillus</i> sp. nov. 10	0,04 %	<i>Paenibacillus anaericus</i>	98,56
<i>Paenibacillus</i> sp. nov. 11	0,04 %	<i>Paenibacillus harenae</i>	95,92
<i>Paenibacillus</i> sp. nov. 12	0,04 %	<i>Paenibacillus odorifer</i>	98,21
<i>Paenibacillus</i> sp. nov. 13	0,04 %	<i>Paenibacillus tibetensis</i>	98,05
<i>Paenibacillus</i> sp. nov. 14	0,04 %	<i>Paenibacillus tibetensis</i>	98,44
<i>Psychrobacillus</i> sp. nov.	0,04 %	<i>Psychrobacillus psychrodurans</i>	98,25
<i>Virgibacillus</i> sp. nov. 2	0,04 %	<i>Virgibacillus carmonensis</i>	98,49
Gen. nov. 1	0,32 %	<i>Paenibacillus aestuarii</i>	95,21
Gen. nov. 2	0,07 %	<i>Paenibacillus vulneris</i>	93,81
Gen. nov. 3	0,04 %	<i>Gorilibacterium massiliense</i>	92,91

Die zwanzig neuen Spezies machten mit 13,1 % einen wesentlich größeren Anteil der Rohmilchisolate aus. Ihre Mehrheit gehörte der Gattung *Paenibacillus* an, die mit ganzen 15 verschiedenen, unbeschriebenen Spezies vertreten war. Jeweils zwei neue Spezies wurden den Gattungen *Virgibacillus* und *Sporosarcina* zugeordnet und mit jeweils einer neuen Art waren *Cohnella* und *Psychrobacillus* vertreten. Technologische Relevanz kam dabei vor allem *Paenibacillus* sp. nov. 1 zu, der mit 6,8 % die viertdominanteste Art psychrotoleranter Sporenbildner in Rohmilch darstellte und aus 25 der 28 untersuchten Rohmilchproben isoliert wurde. Sie wurde auch für eine Neubeschreibung im Rahmen dieser Arbeit ausgewählt. Daneben spielte nur *Paenibacillus* sp. nov. 2 mit 3,2 % quantitativ eine Rolle, alle anderen

neuen Arten machten jeweils lediglich <1 % der Isolate aus. Im Gegensatz zu den anderen neuen Spezies, beruht die taxonomische Abgrenzung der Arten *Paenibacillus* sp. nov. 2 und *Paenibacillus* sp. nov. 3 auf ihrer *rpoB* Sequenz. Während die 16S rDNA eine hohe Übereinstimmung mit den Typstammsequenzen der Arten *P. amylolyticus/xylanexedens* bzw. *Paenibacillus peoriae* aufwies (99,3 % und 99,5 %), machten die großen Diskrepanzen der *rpoB* Sequenz (9 % und 17 %) eine Speziesabgrenzung unbedingt erforderlich.

2 Mikrobiota von baktofugierter ESL-Milch

Im zweiten Teil der Arbeit wurde die Mikrobiologie von BF+PAST Milch analysiert. Neben Qualität und Haltbarkeit der Endprodukte wurde auch die Prozesseffizienz im Hinblick auf die Keimabtrennung ermittelt. Abschließend wurden Eintragsrouten verderbsinduzierender Mikroorganismen untersucht.

2.1 Mikrobielle Qualität baktofugierter ESL-Milch bei Ablauf der Mindesthaltbarkeit

Um zunächst einen Einblick in die mikrobielle Qualität von BF+PAST Milch zu erhalten, wurden Keimzahlen und vornehmliche Mikrobiota zu Ablauf der Haltbarkeit bestimmt. 190 Packungen dreier Hersteller mit unterschiedlichen MHDs (A: 21 Tage, B: 18 Tage, C: 17 Tage) wurden dafür nach Lagerung bei 8 °C analysiert.

Die Häufigkeitsverteilung der Keimzahlen ist in Abbildung 9 dargestellt. Insgesamt wiesen die Endprodukte mit <1,0 bis 8,6 log KbE/mL eine extreme Streuung der Keimzahlen auf. Während die Werte in 57 % der untersuchten Packungen unterhalb der Verderbsgrenze von 6,0 log KbE/mL lag und insgesamt ein Drittel aller Proben eine exzellente Qualität besaß (< 1,0 - 3,9 log KbE/mL), war ein hoher Anteil von 43 % mikrobiell verdorben. Dabei traten zwischen den Herstellern erhebliche Qualitätsunterschiede auf. Während die Keimzahlen bei Hersteller C in Dreiviertel der Proben unter 4,0 log KbE/mL lagen und lediglich 3 % der Packungen verdorben waren, waren es bei Hersteller A mit 21-tägiger Haltbarkeit ganze 80 %. In einem Viertel dieser Packungen wurden sogar Werte zwischen 8,0 und 8,6 log KbE/mL erreicht. Auch die Produktqualität des Herstellers B ist mit einem Verderbsanteil von 40 % noch zu optimieren und der des Herstellers A unterlegen.

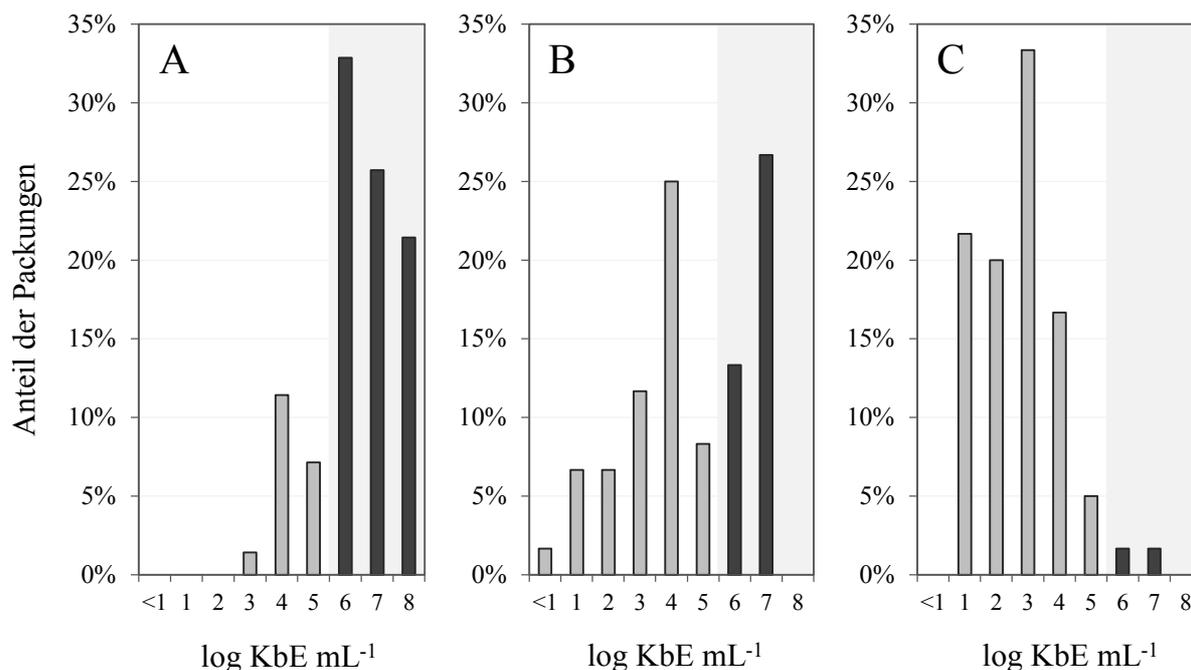


Abbildung 9 Häufigkeitsverteilung der Gesamtkeimzahlen in 190 Packungen baktofugierter und pasteurisierter ESL-Milch dreier Hersteller nach Lagerung bei 8 °C bis zum Ende der Haltbarkeit. Hersteller **A**: MHD 21 d, n=70; Hersteller **B**: MHD 18 d, n=60; Hersteller **C**: MHD 17 d, n=60. Schwarze Säulen: mikrobieller Verderb $\geq 6,0$ log Kbe/mL.

Für Biodiversitätsstudien wurden mittels FTIR-Spektroskopie 539 Isolate aus 174 Packungen BF+PAST Milch identifiziert. Fünf taxonomische Großgruppen wurden dabei detektiert: Psychrotolerante Sporenbildner, Milchsäurebakterien, High G+Cs, andere Gram-positive und Gram-negative Keime (Abbildung 10). Die zwei mit Abstand häufigsten Gruppen waren High G+C Gram-positive Bakterien und Sporenbildner, welche in 43 % und 41 % der Proben dominant waren und somit fast die gesamte Mikrobiota stellten. Die drei übrigen Gruppen waren hitzesensitive Bakterien, die vermutlich aus einer Rekontamination nach der Pasteurisierung stammten. Quantitativ spielten sowohl Gram-negative als auch Milchsäurebakterien und andere Gram-positive Keime mit 4 - 6 % eine untergeordnete Rolle.

Beim Vergleich der Mikrobiota verdorbener und nicht-verdorbener Packungen fielen große Unterschiede auf (Abbildung 10). Proben mit geringen Keimzahlen von 1,0 bis 5,9 log Kbe/mL enthielten vor allem High G+C Gram-positive Bakterien (70 %). Daneben waren lediglich Sporenbildner von Bedeutung, die aus 27 % der Proben isoliert wurden. Mit steigenden Keimzahlen jedoch kam es zu einer signifikanten Verschiebung der Mikrobiota. High G+C Gram-positive kamen lediglich in 9 % der verdorbenen Packungen vor, während jeweils 10 % der Proben Gram-negative, Milchsäurebakterien und andere Gram-positive Keime enthielten, die in Milch guter Qualität keine Rolle spielten. Auch das Vorkommen

psychrotoleranter Sporenbildner verdoppelte sich im Vergleich zu den Packungen mit geringen Keimzahlen auf ganze 57 %. Sie stellten damit die wichtigste Gruppe verderbsinduzierender Bakterien dar. Während High G+C Gram-positive Keime also trotz ihrer insgesamt hohen Prävalenz nur einen geringen Beitrag zum Verderb leisteten, war der Eintrag vor allem von psychrotoleranten Sporenbildnern, aber auch von Gram-negativen, Milchsäurebakterien und anderen Gram-positiven Bakterien signifikant mit dem Produktverderb assoziiert.

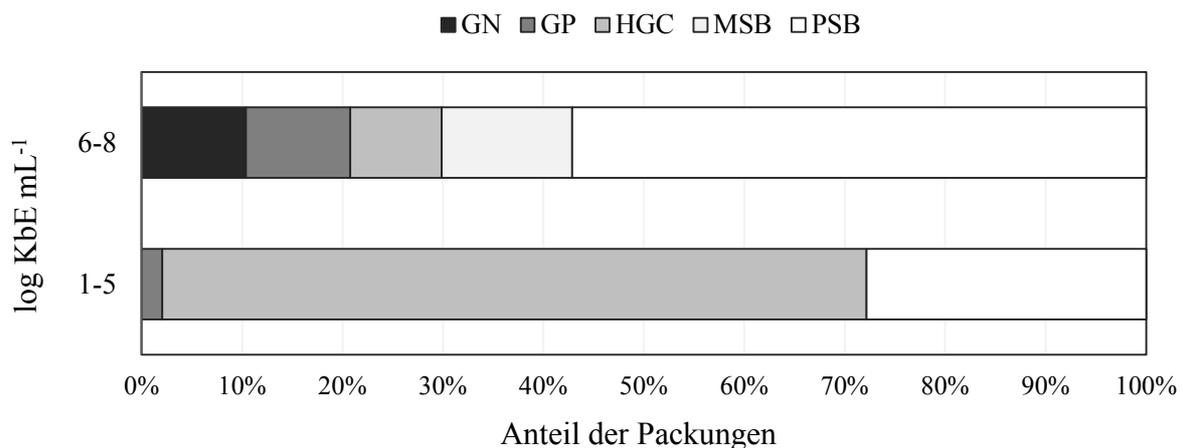


Abbildung 10 Dominante Mikrobiota in baktofugierter und pasteurisierter ESL-Milch in Abhängigkeit der Gesamtkeimzahl nach Lagerung bei 8 °C bis zum Ende der Haltbarkeit ($n_{1-5}=97$; $n_{6-8}=77$). GN: Gram-negative, GP: andere Gram-positive, HGC: High G+C Gram-positive, MSB: Milchsäurebakterien; PSB: psychrotolerante Sporenbildner.

Um einen tieferen Einblick in die Verderbsmikrobiota zu gewinnen, wurden die Isolate aus 77 Packungen BF+PAST Milch mit Keimzahlen $\geq 6,0$ log KBE/mL detaillierter analysiert und dabei insgesamt 15 verschiedene Gattungen identifiziert (Tabelle 9). Viele dieser Genera traten in lediglich ein oder zwei Packungen auf und hatten somit nur eine geringe technologische Relevanz. *Bacillus* dagegen wurde aus den verdorbenen Packungen aller drei Hersteller und aus acht Chargen, damit fast aus der Hälfte aller Produktionen dieser Studie isoliert. Wichtigster Vertreter war *Bacillus cereus sensu lato*, der für 30% des gesamten Verderbs verantwortlich war. Mit *Paenibacillus* und *Microbacterium* wurden zwei weitere hitzeresistente Gattungen in mehreren Chargen detektiert und auch die Gram-negativen Postpasteurisierungskontaminanten *Pseudomonas* und *Acinetobacter* wurden aus Endprodukten jeweils zweier Hersteller isoliert. Insgesamt wies die Verderbsmikrobiota des Herstellers A die größte Diversität auf. Während bei Hersteller B und C jeweils nur zwei Gattungen isoliert wurden, waren in den Proben von Hersteller A alle 15 Genera vertreten.

Besonders ausgeprägte Psychrotoleranz wiesen dabei die *Weissella* und *Citrobacter* sowie 3 *Kurthia* Stämme auf, die jeweils Keimzahlen von mehr als 8,0 log KbE/mL erreichten.

Tabelle 9 Gattungen verderbsinduzierender Bakterien aus 77 Packungen baktofugierter und pasteurisierter ESL-Milch mit Keimzahlen zwischen 6,0 und 8,6 log KbE/mL nach Lagerung bei 8 °C bis zum Ende der Haltbarkeit. n.i.: nicht weiter identifiziert; PSB: psychrotolerante Sporenbildner; HGC: High G+C Gram-positive; GN: Gram-negative; MSB: Milchsäurebakterien; GP: andere Gram-positive.

Genus	Taxonomische Zuordnung	Anzahl Chargen	Anzahl Packungen	Hersteller
<i>Bacillus</i>	PSB	8	25	A, B, C
<i>Paenibacillus</i>	PSB	5	28	A
<i>Microbacterium</i>	HGC	3	9	A
<i>Acinetobacter</i>	GN	3	4	A, B
<i>Weissella</i>	MSB	2	10	A
<i>Kurthia</i>	HGC	2	8	A
<i>Lactococcus</i>	MSB	2	4	A
<i>Citrobacter</i>	GN	2	3	A
<i>Pseudomonas</i>	GN	2	2	A, C
<i>Staphylococcus</i>	GP	1	7	A
<i>Leuconostoc</i>	MSB	1	2	A
<i>Lysinibacillus</i>	PSB	1	2	A
<i>Micrococcus</i>	HGC	1	2	A
<i>Macrococcus</i>	GP	1	1	A
<i>Paracoccus</i>	GN	1	1	A
n.i.	GN	1	1	A

2.2 Populationsdynamik der Mikrobiota baktofugierter ESL-Milch während der Kühlung

Um Aussagen über ein geeignetes Haltbarkeitsdatum zu treffen, wurde die Entwicklung der Mikrobiota in BF+PAST Milch während der Kühlung analysiert. In sechs Lagerversuchen bei 8 °C wurden im Verlauf von 21 Lagertagen in regelmäßigen Abständen jeweils drei und bei Ablauf des MHDs zehn Packungen geöffnet und die Keimzahlen sowie die vornehmliche Mikrobiota bestimmt. Insgesamt wurden so 167 Packungen der drei Hersteller A-C untersucht.

Die Entwicklung der Keimzahlen in Abhängigkeit der Hersteller ist in Abbildung 11 dargestellt. Sowohl der Mittelwert als auch die Streuung der Keimzahlen nahm in allen sechs Lagerversuchen über die Inkubation kontinuierlich zu, wobei zwischen den Herstellern große Unterschiede auftraten. Endprodukte des Herstellers C wiesen während

der gesamten Lagerdauer die beste Qualität auf. So lagen ihre Keimzahlen bereits direkt nach Produktion mit 1,4 - 1,9 log KbE/mL fast 1 log-Stufe niedriger als bei den anderen Herstellern (2,0 - 2,7 log KBE/mL). Dieser Trend setzte sich fort und innerhalb von 21 d verderben bei 8 °C lediglich 3 Packungen, während es bei Hersteller B und C jeweils 17 der 56 untersuchten Endprodukte waren. Auch die Wahl des Haltbarkeitsdatums war bei Hersteller C am besten geeignet. Am MHD von 17 d überschritten die Keimzahlen hier in lediglich einer Packung die Verderbsgrenze. Bei Hersteller B waren es zu Ablauf der 18-tägigen Haltbarkeit ganze 40 % und bei Hersteller A mit 21 d MHD sogar 55 %. Während erste Proben des Herstellers A nach 17 d mikrobiellen Verderb aufwiesen, überschritten die durchschnittlichen Keimzahlen bei Hersteller B die Verderbsgrenze bereits nach 12 d. Schon nach 7 d Lagerung setzte hier ein sprunghaftes Wachstum ein. Um eine einwandfreie Qualität zu gewährleisten, müsste die Haltbarkeit der Hersteller A und B dementsprechend auf 16 bzw. 12 d angepasst werden. Während der Keimzahlverlauf bei Hersteller C in beiden Produktionschargen konsistent war, wurde bei Hersteller A und B im zweiten Versuch eine klare Qualitätsverbesserung festgestellt. Vor allem bei Hersteller A lagen die Keimzahlen in der zweiten Charge durchschnittlich um 0,5 -2,0 log-Stufen niedriger und selbst nach 21 d war lediglich eine Packung verdorben, doch auch bei Hersteller B wies die zweite Charge, besonders zwischen 17 und 21 d, eine bessere Qualität auf.

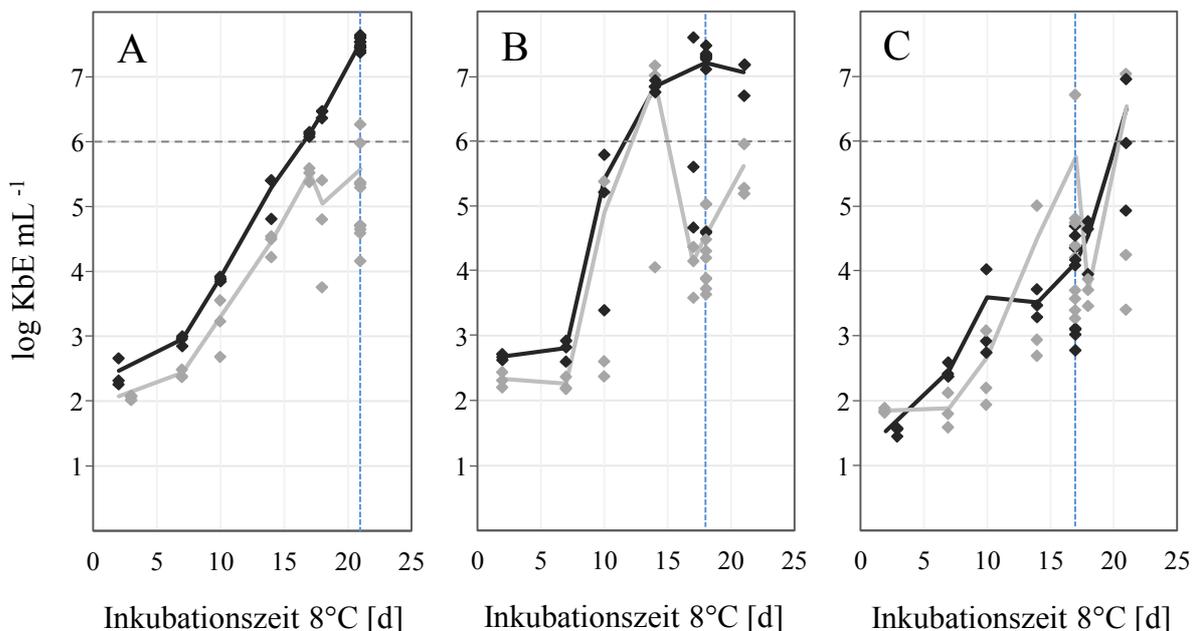


Abbildung 11 Anstieg der Keimzahlen in baktofugierter und pasteurisierter ESL- Milch während der Lagerung bei 8 °C in Abhängigkeit von den Herstellern (A, B, C). ♦ Milchpackung Charge 1; ◆ Milchpackung Charge 2; — — Verlauf arithmetisches Mittel; - - - - Verderbsgrenze $\geq 6,0$ log KbE/mL; - - - - vom Hersteller festgelegte Mindesthaltbarkeit von (A) 21 d, (B) 18 d und (C) 17 d.

Um die Entwicklung der mikrobiellen Zusammensetzung während der Lagerung zu analysieren, wurden insgesamt 642 Isolate mittels FTIR-Spektroskopie identifiziert. Dabei wurden High G+C Gram-positive Bakterien und psychrotolerante Sporenbildner, die einen Großteil der Mikrobiota stellten, sowie Gram-negative Bakterien ausgemacht. Letztere wurden aus lediglich 13 Proben isoliert und spielten damit quantitativ eine untergeordnete Rolle. Vor allem im Verlauf der ersten Tage kam es zur Verschiebung der mikrobiellen Zusammensetzung (Abbildung 12 C). Während die Mikrobiota zu Beginn der Lagerung fast ausschließlich aus High G+C Gram-positiven Bakterien bestand, sank ihr Anteil binnen 14 d bei 8 °C kontinuierlich ab, während das Vorkommen psychrotoleranter Sporenbildner von Tag 7 bis 14 von 16 auf 40% anstieg. Danach blieben die Anteile beider Gruppen mit 60 – 70 % High G+C Gram-positiven und 30 – 40 % psychrotoleranten Sporenbildnern annähernd konstant.

Insgesamt war der Keimzahlanstieg während der Kühlagerung stark abhängig von der Mikrobiota (Abbildung 12 A+B). Während die Werte High G+C Gram-positiver Bakterien in 115 Packungen linear zunahmen und die Verderbsgrenze an Tag 17 und Tag 18 nur von einigen schnell wachsenden Stämmen erreicht wurde, stiegen die Keimzahlen psychrotoleranter Sporenbildner (n=43) bereits nach 7-tägiger Inkubation sprunghaft an und schon nach 14 d bei 8°C war ein Großteil der Packungen verdorben. Besonders *B. cereus sensu lato* stellte dabei ein Qualitätsproblem dar. Während andere Sporenbildner wie *B. simplex* oder *Paenibacillus* spp. auch nach 17 und 18 d lediglich Keimzahlen von 4,0 - 5,0 log KbE/mL erreichten, waren ab 14-tägiger Lagerung bis auf zwei Ausnahmen alle Packungen mit *B. cereus sensu lato* verdorben.

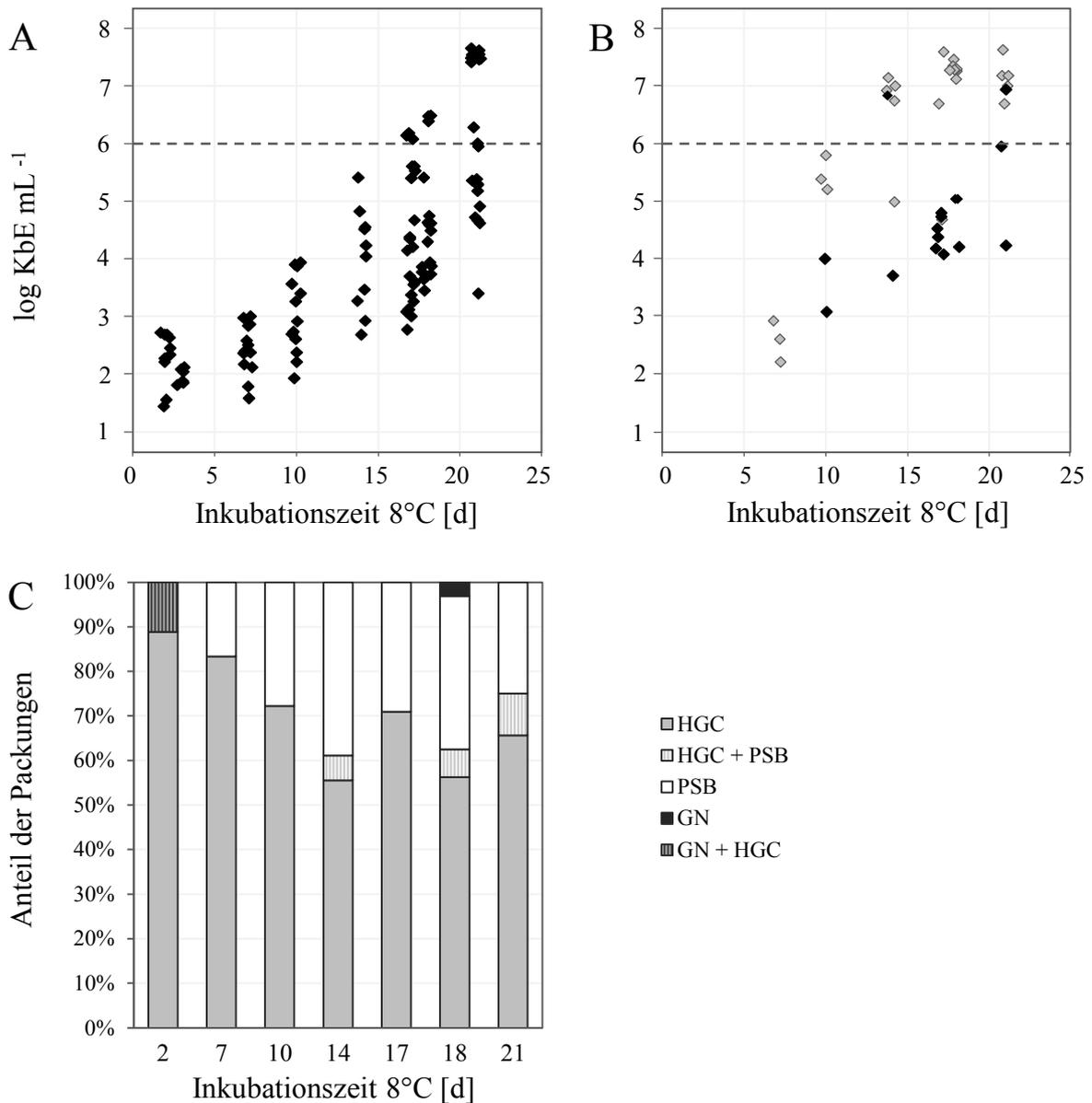


Abbildung 12 Populationsdynamik der Mikrobiota von baktofugierter und pasteurisierter ESL-Milch während der Lagerung bei 8 °C. **A+B** Entwicklung der Keimzahlen in Abhängigkeit der Mikrobiota. **A** Keimzahlentwicklung in Packungen mit High G+C Gram-positiven Bakterien (n=115); **B** Keimzahlentwicklung in Packungen mit psychrotoleranten Sporenbildnern (n=43); ♦ Milchpackung; ◆ Milchpackung mit *Bacillus cereus sensu lato*. **C** Zusammensetzung der Mikrobiota in taxonomischen Großgruppen. HGC: High G+C Gram-positive; PSB: psychrotolerante Sporenbildner, GN: Gram-negative.

2.3 Einfluss der Prozessschritte auf die Mikrobiota baktofugierter ESL-Milch

In vier Stufenkontrollen wurde die Keimabtrennung im Verlauf des BF+PAST Prozesses analysiert. Dafür wurden von jeweils zwei Produktionschargen der Hersteller A und B Proben der Rohmilch, standardisierten und pasteurisierten Milch gezogen und hinsichtlich ihrer Keimzahlen und mikrobiellen Zusammensetzung untersucht. Bei Hersteller A wurden zusätzlich Baktofuge 1 und Baktofuge 2 beprobt.

Wie in Abbildung 13 dargestellt, ermöglichte der BF+PAST Prozess insgesamt eine Keimreduktion von 2,9 log-Stufen. Ausgehend von etwa 5 log KbE/mL in der Rohmilch, lag im frischen Endprodukt also eine Keimzahl von 2 log KbE/mL vor. Während die Pasteurisierung dabei lediglich eine Inaktivierung von durchschnittlich 0,6 log-Stufen erreichte und somit für die Milchqualität nur eine untergeordnete Rolle spielte, wurden im Verlauf der doppelten Baktofugation, Separation und Standardisierung ganze 2,3 log-Stufen abgetrennt. Die zusätzliche Beprobung beider Baktofugen bei Hersteller A zeigte, dass Baktofuge 1 dabei mit durchschnittlich 1,1 log-Stufen den größten Beitrag zur Keimreduktion leistete, während Baktofuge 2 sowie die kombinierte Separation und Standardisierung jeweils nur 0,1 und 0,3 log-Stufen abtrennen.

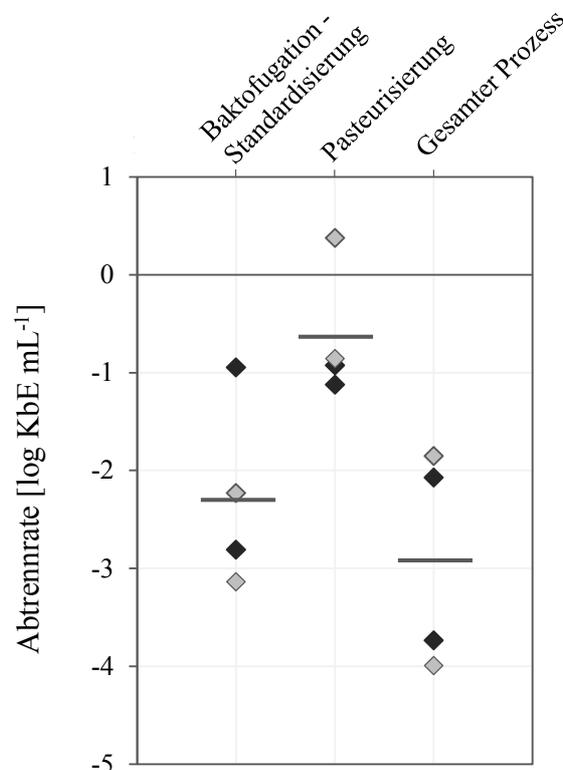


Abbildung 13 Log-Reduktion der Gesamtkeimzahl während der kombinierten, doppelten Baktofugation und Standardisierung sowie der Pasteurisierung bei der Herstellung von vier Chargen BF+PAST Milch (n=4). ◆ Hersteller A; ◆ Hersteller B.

Auffällig waren große Effizienzunterschiede zwischen den einzelnen Produktionschargen. Sowohl bei Hersteller A als auch bei Hersteller B variierte die Gesamtleistung des Prozesses zwischen beiden Läufen um 2 log-Stufen zwischen -2 und -4 log KbE/mL, wobei es vor allem in den ersten Produktionsschritten zu großen Diskrepanzen kam. Im effizientesten Prozess wurden durch die kombinierte Baktofugation, Separation und Standardisierung über 3 log-Stufen, im ineffizientesten lediglich 1 log-Stufe abgetrennt. Die Inaktivierungsleistung der

Pasteurisierung war in drei Läufen konsistent, lediglich bei einer Stufenkontrolle des Herstellers B kam es durch Rekontamination oder Sporenaktivierung zu einem Anstieg der Keimzahlen um 0,4 log-Stufen.

Um den Einfluss des Herstellungsprozesses auf die Milchmikrobiota zu erfassen, wurden je Stufenkontrolle und Prozessschritt 20 Isolate mittels FTIR-Spektroskopie identifiziert. Dabei wurden, wie auch bei den Endproduktanalysen, fünf taxonomische Großgruppen detektiert: Gram-negative, High G+C Gram-positive, Milchsäurebakterien, Sporenbildner und andere Gram-positive. Insgesamt trat entlang des Herstellungsprozesses eine signifikante Verschiebung der Mikrobiota von Gram-negativen hin zu High G+C Gram-positiven Keimen auf (Abbildung 14).

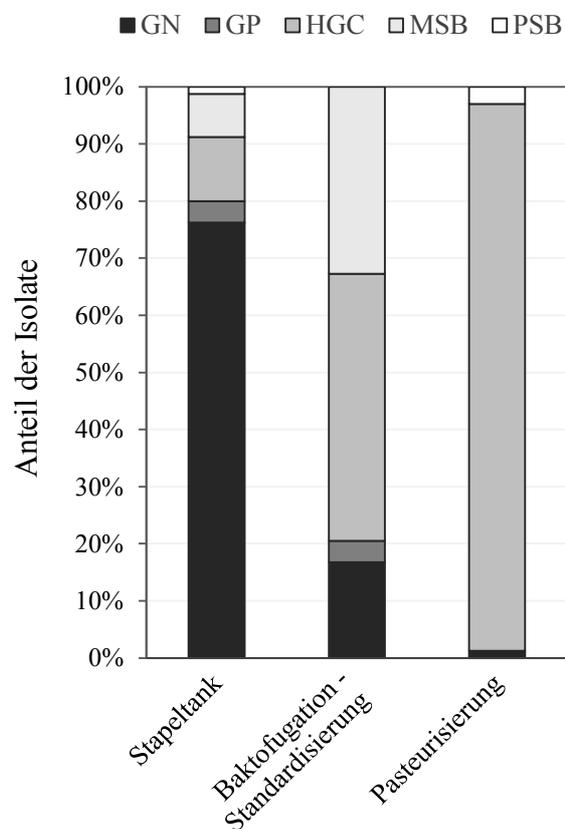


Abbildung 14 Einfluss der Prozessstufen auf die Zusammensetzung der Milchmikrobiota in taxonomischen Großgruppen entlang des Herstellungsprozesses in vier Chargen baktofugierter und pasteurisierter ESL-Milch der Hersteller A und B. GN: Gram-negative, GP: andere Gram-positive, HGC: High G+C Gram-positive, MSB: Milchsäurebakterien; PSB: psychrotolerante Sporenbildner; je Prozessstufe: n=120.

Während Gram-negative ganze 76 % der Rohmilchisolate ausmachten und *Pseudomonas* die mit Abstand häufigste Gattung darstellte (84 % der Gram-negativen), kam es im Verlauf von Baktofugation, Standardisierung und Separation zur selektiven Abtrennung. Der Anteil der

Gram-negativen wurde dabei um mehr als 50 % reduziert, während die Bedeutung gram-positiver Bakterien stark zunahm. Mit 47 % und 33 % wurden aus standardisierter Milch vornehmlich High G+C (v.a. *Microbacterium*) und Milchsäurebakterien (v.a. *Streptococcus*) isoliert. Im Verlauf der Pasteurisierung wurden abschließend sowohl Milchsäurebakterien als auch Gram-negative Keime quantitativ inaktiviert, sodass die Mikrobiota abgefüllter ESL-Milch neben Sporenbildnern (3 %) fast ausschließlich aus High G+C Gram-positiven Keimen (95 %) der Gattung *Microbacterium* bestand.

2.4 Ursprung verderbsinduzierender Bakterien in baktofugierter ESL-Milch

Etwa ein Drittel des Verderbs von BF+PAST Milch war auf hitzesensitive Bakterien zurückzuführen, die aus Postpasteurisierungskontaminationen stammen müssen. Mittels Stammtypisierung von 89 Isolaten der Spezies *B. cereus sensu lato* (n=37), *P. amylolyticus/xylanexedens* (n=17) und *M. lacticum* (n=35), die aus verschiedenen Endproduktchargen isoliert wurden, sollte daher untersucht werden, ob es sich auch bei diesen hitzeresistenten Spezies um Rekontaminanten handelt. Werden identische Stämme über einen längeren Zeitraum in mehrere ESL-Milchchargen eingetragen, deutet dies auf eine Persistenz in der Produktionsanlage hin. Abbildung 15 zeigt hierfür exemplarisch die Bandenmuster der Typisierung von *B. cereus sensu lato* des Herstellers C. Der Eintrag identischer Stämme wurden hier in Bahn 1, 3 und 6 sowie in Bahn 4 und 10 nachgewiesen.

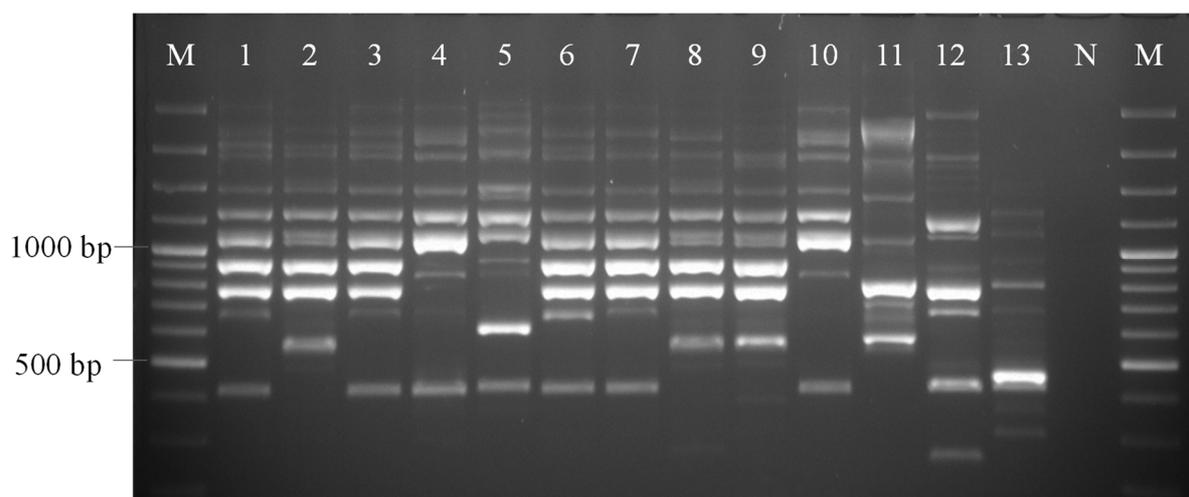


Abbildung 15 Bandenprofile der RAPD-Typisierung von *B. cereus sensu lato* Isolaten aus baktofugierter und pasteurisierter ESL-Milch. Bahn 1 – 11: Isolate aus drei Chargen von Hersteller C, identische Isolate jeweils in Bahn 1, 3 und 6 sowie in Bahn 4 und 10; Bahn 12, 13: *B. cereus* DSM 31^T und *B. mycoides* DSM 2048^T als zusätzliche Outgroups; N: Negativkontrolle; M: Längenmarker; Primer: OPB18.

Ein Großteil aller Isolate (12 *B. cereus sensu lato*, 13 *M. lacticum* und alle 15 *P. amylolyticus/xylanexedens* Stämme - zwei Stämme waren jeweils mit zwei Isolaten in einer Charge vertreten), wurde nur in einzelnen Produktionen detektiert und stammte somit aus der Rohmilch oder aus einer einmaligen Rekontamination. Alle positiven Typisierungsergebnisse sind in Tabelle 10 zusammengefasst. Einige *M. lacticum* Stämme und ein *B. cereus* Stamm wurden jeweils aus zwei Chargen aller drei Hersteller isoliert und deuten auf eine kurzzeitige Persistenz in deren Anlagen hin. Von Interesse waren vor allem zwei *M. lacticum* Stämme (M4 und M5) und ein *B. cereus* Stamm (B1) des Herstellers B. Sie wurden aus vier bzw. sogar sieben verschiedenen Chargen über mehrere Wochen hinweg isoliert.

Tabelle 10 RAPD-Typisierung persistierender *Bacillus cereus sensu lato* und *Microbacterium lacticum* Stämme als Rekontaminanten in baktofugierter und pasteurisierter ESL-Milch. Nur Stämme mit übereinstimmenden RAPD-Typen in mindestens zwei Endproduktchargen sind aufgeführt. Weitere 12 *Bacillus cereus sensu lato*, 13 *Microbacterium lacticum* und 15 *Paenibacillus* Stämme wurden typisiert und kamen jeweils nur in einer Charge vor.

Spezies	Hersteller	RAPD -Typ	Anzahl Chargen
<i>Bacillus cereus sensu lato</i>	B	B1	7
	C	B2	2
		B3	2
<i>Microbacterium lacticum</i>	A	M1	2
		M2	2
		M3	2
	B	M4	4
		M5	4
	C	M6	3
		M7	2
		M8	2
		M9	2
		M10	2

3 Mikrobiota von mikrofiltrierter ESL-Milch

Im Rahmen des dritten Arbeitspakets wurden Daten zur Haltbarkeit und mikrobiellem Verderb von MF+PAST Milch gewonnen. Außerdem wurde die Sporenabtrennung, die während der Herstellung zu erzielen ist für die einzelnen Prozessschritte analysiert und die Eintragsrouten psychrotoleranter Sporenbildner in das Endprodukt untersucht. Ein Großteil der Ergebnisse wurde bereits publiziert in Doll *et al.* (2017).

3.1 Mikrobielle Qualität mikrofiltrierter ESL-Milch bei Ablauf der Mindesthaltbarkeit

Für die Untersuchung der mikrobiellen Qualität von MF+PAST Milch wurden insgesamt 287 Packungen analysiert, die aus 39 Produktionschargen von 4 Herstellern (D, E, F, G) stammten. Nach Ablauf der 24-tägigen Haltbarkeit wurde von jeder Packung die Gesamtkeimzahl bestimmt und die detektierten Organismen zusätzlich nach Morphologie gepickt sowie identifiziert. So wurden Keime mit besonders ausgeprägter Psychrotoleranz und Verderbspotential erfasst.

Die Häufigkeitsverteilung der Gesamtkeimzahlen ist in Abbildung 16 dargestellt. Insgesamt 85 % aller Proben hatten zum Ende des MHD eine sehr gute mikrobielle Qualität.

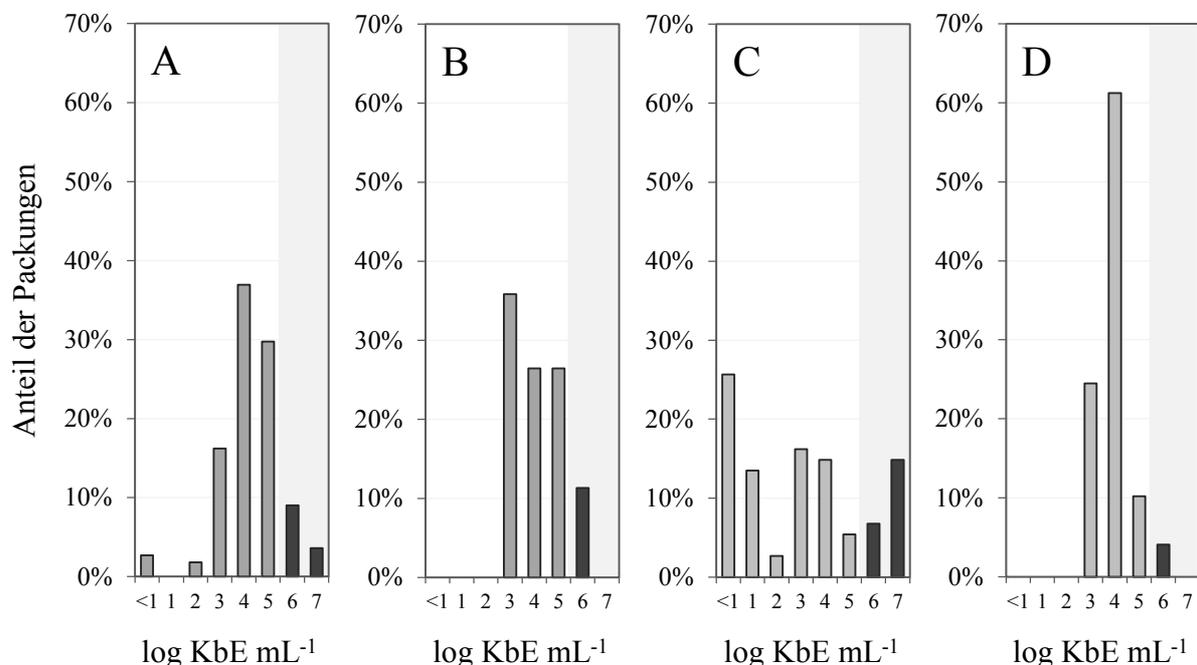


Abbildung 16 Häufigkeitsverteilung der Gesamtkeimzahlen in 287 Packungen mikrofiltrierter und pasteurisierter ESL-Milch nach Lagerung bei 8 °C bis zum Ende der Haltbarkeit von 24 d. (A) Hersteller D, n=111; (B) Hersteller E, n=53; (C) Hersteller F, n=74; (D) Hersteller G: n=49; schwarze Säulen: mikrobieller Verderb; modifiziert nach Doll *et al.* (2017).

So befanden sich die Keimzahlen in fast zwei Dritteln aller Milchpackungen im Bereich zwischen 3,0 und 5,9 log KbE/mL und 13 % enthielten sogar lediglich <1,0 - 2,9 log KbE/mL. Mit mehr als 6,0 log KbE/mL waren jedoch 15 % aller Endprodukte verdorben. Dabei gab es zwischen den vier Herstellern große Qualitätsunterschiede. Bei Hersteller F wurde neben der größten Keimzahlstreuung von <1,0 bis 7,8 log KbE/mL zugleich der höchste Anteil sowohl von Proben mit sehr geringen Zellzahlen als auch verdorbener Packungen detektiert, 22 % der Proben überschritten hier die Verderbsgrenze. Die Endprodukte von Hersteller G zeigten die beste Milchqualität und wiesen neben geringen Keimzahlunterschieden (3,3 - 6,2 log KbE/mL) auch den niedrigsten Verderbsanteil von 4 % auf.

Für die Biodiversitätsanalyse der Mikrobiota von MF+PAST Milch wurden insgesamt 1551 Isolate aus 264 Packungen mittels FTIR-Spektroskopie identifiziert. Dabei war die Diversität mit lediglich drei taxonomischen Großgruppen gering und neben High G+C Gram-positiven und psychrotoleranten Sporenbildnern wurden lediglich Gram-negative Bakterien ausgemacht. Dominant waren dabei High G+Cs, die aus 232 Packungen und damit aus fast 90% aller Proben isoliert wurden. Ihren wichtigsten Vertreter stellte *Microbacterium*, vor allem *Microbacterium lacticum* dar. Psychrotolerante Sporenbildner (*Bacillus* spp. und *Paenibacillus* spp.), sowie Gram-negative Rekontaminanten, die hauptsächlich durch *Pseudomonas* spp. vertreten waren, kamen wesentlich seltener vor und traten in lediglich 8 % bzw. 4 % der Proben in Reinkultur auf. Um das Verderbspotential der drei Gruppen genauer zu analysieren wurde ihre Prävalenz in verdorbenen (n=226) und unverdorbenen Milchpackungen (n=38) gegenübergestellt (Abbildung 17). Während die Mikrobiota der Packungen mit geringen und mittleren Keimzahlen fast ausschließlich aus High G+C Gram-positiven Bakterien bestand, kam es in verdorbenen Proben zu einem hochsignifikanten Shift der mikrobiellen Zusammensetzung ($p < 0.01$). Der Anteil der High G+Cs sank hier von etwa 90 % auf gerade einmal 30 % ab. Damit wiesen lediglich 5 % der Proben mit High G+Cs frühzeitigen Verderb auf. Die wichtigste Gruppe verderbsinduzierender Bakterien dagegen stellten psychrotolerante Sporenbildner dar. Sie konnten aus 55 % aller Packungen mit erhöhten Keimzahlen isoliert werden und waren in 50 % alleine für den Verderb verantwortlich. Ihr Vorkommen war zu 90% und damit hochsignifikant assoziiert mit dem vorzeitigen Produktverderb ($p < 0,01$). Gram-negative Rekontaminanten erreichten in einem Viertel der positiv getesteten Packungen Keimzahlen $\geq 6,0$ log KbE/mL und besaßen somit ebenfalls ein größeres Verderbspotential als die häufigeren High G+Cs. Sie waren (allein oder in Mischkultur) für 24% des Produktverderbs verantwortlich.

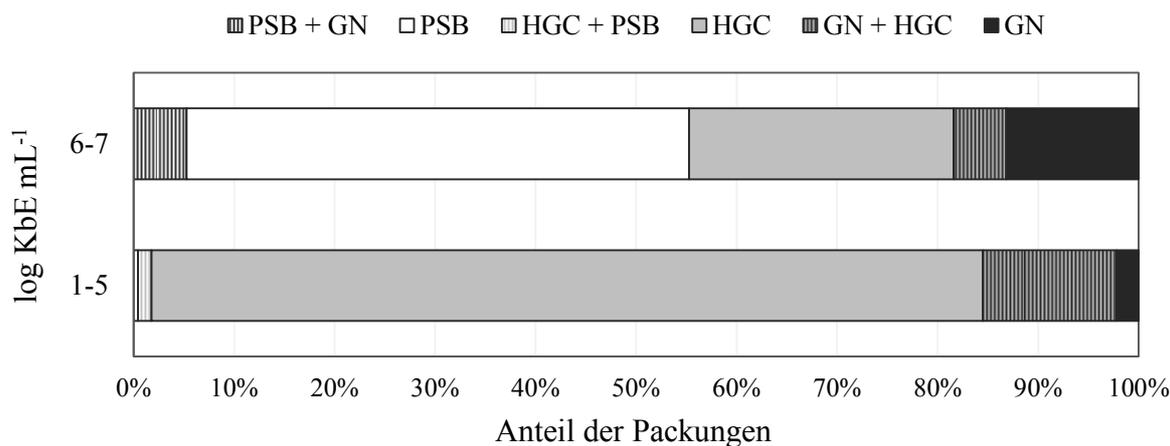


Abbildung 17 Dominante Mikrobiota in mikrofiltrierter und pasteurisierter ESL-Milch in Abhängigkeit der Gesamtkeimzahl nach Lagerung bei 8 °C bis zum Ende der Haltbarkeit ($n_{1-5}=226$; $n_{6-8}=38$). GN: Gram-negative, GP: andere Gram-positive, HGC: High G+C Gram-positive, PSB: psychrotolerante Sporenbildner.

Als wichtigste Gruppe von Verderbsorganismen in MF+PAST Milch wurde das Vorkommen psychrotoleranter Sporenbildner genauer analysiert. Insgesamt wurden 25 Packungen aus sieben Produktionschargen positiv auf Sporenbildner getestet und 36 Isolate gewonnen, die anhand ihrer 16S rRNA und *rpoB* Sequenzen identifiziert wurden. Neun Spezies waren darunter vertreten, die alle den Gattungen *Bacillus* und *Paenibacillus* angehören (Tabelle 11). Die wichtigste Artgruppe dabei war *B. cereus sensu lato*, die aus 13 Packungen von vier Produktionschargen und damit aus mehr als der Hälfte aller positiv getesteten Gebinde isoliert wurde. Weitere häufige Arten stellten *P. odorifer* (33 %), der in 12 Endprodukten und drei Chargen vorkam, sowie interessanterweise eine potentiell neue Spezies, *Paenibacillus* sp. nov. 1 (6 %), dar. Letztere wurde allerdings nur aus einer Charge isoliert und war somit von geringerer technologischer Relevanz.

Tabelle 11 Spezies psychrotoleranter Sporenbildner aus 25 Packungen und sieben Chargen mikrofiltrierter und pasteurisierter ESL-Milch ($n=36$).

Spezies	Anzahl Packungen	Anzahl Chargen
<i>Bacillus cereus sensu lato</i>	13	4
<i>Paenibacillus odorifer</i>	12	3
<i>Paenibacillus</i> sp. nov. 1	5	1
<i>Paenibacillus taichungensis/tundrae</i>	2	1
<i>Bacillus circulans</i>	1	1
<i>Bacillus pumilus/safensis</i>	1	1
<i>Bacillus simplex</i>	1	1
<i>Paenibacillus algorifonticola</i>	1	1

3.2 Abtrennung psychrotoleranter Sporenbildner bei der Herstellung mikrofiltrierter ESL-Milch

Im Verlauf von sechs Stufenkontrollen (P1 – 6) wurde der Gehalt psychrotoleranter Sporenbildner entlang der Herstellung von MF+PAST untersucht und die Abtrennleistung der einzelnen Prozessschritte analysiert. Beprobte wurden hierfür bei Hersteller D und G jeweils Rohmilch, Magermilch, Permeat und pasteurisierte Milch.

Wie in Abbildung 18 dargestellt, ermöglichte der gesamte Prozess eine Reduktion der psychrotoleranten Sporen um insgesamt fast 4 log-Stufen. Ausgehend von anfänglichen Sporenzahlen von durchschnittlich 570 Sporen/L, würde dies bedeuten, dass am Ende des Prozesses ca. 0,05 Sporen/L verbleiben und somit statistisch gesehen ungefähr jede zwanzigste Literpackung einen psychrotoleranten Sporenbildner enthält. Während durch Separation und Pasteurisierung jeweils 0,9 und 1,2 log-Stufen abgetrennt wurden, war die Mikrofiltration mit einer durchschnittlichen Reduktion von 2,2 log-Stufen der wichtigste Prozessschritt. Vor allem bei dieser Stufe kam es jedoch zwischen einzelnen Durchläufen zu großen Effizienzunterschieden (0,6 – 3,1 log-Stufen), die sich auch auf die Abtrennleistung der Pasteurisierung auswirkten. In den zwei Chargen mit geringster Mikrofiltrationsleistung (P2, P5), lag die Abtrennrate der Pasteurisierung mit mindestens 1,4 und 2,2 log-Stufen extrem hoch, während in P3 nach effizienter Mikrofiltration keine weitere Reduktion erzielt wurde. Da die Temperaturbedingungen während der Pasteurisierung keine Inaktivierung von Sporen ermöglichen, sind die hohen Abtrennraten in P2 und P5 wahrscheinlich auf eine Unterschätzung der Mikrofiltrationsleistung und die daraus folgende Überschätzung der Pasteurisierung zurückzuführen. In beiden Chargen wurden Proben des Permeats während der ersten Laufstunde gezogen, in der die Retentionsleistung aufgrund noch fehlender Deckschichten oft geringer ausfällt. Die Proben der pasteurisierten Milch wurden nach 3 – 4 h Laufzeit gezogen.

Einschränkend für die Daten waren geringe Sporenzahlen, die nach Mikrofiltration und Pasteurisierung trotz der enormen Probenvolumina von 16 bzw. 18 L teilweise unterhalb der Detektionsgrenze lagen. Die Abtrennraten dieser Prozessschritte konnten daher nicht in allen Chargen exakt bestimmt werden, sondern ergeben sich in diesen Fällen aus Differenz des zuletzt bestimmten Sporengehalts und des Detektionslimits von 0,06 bzw. 0,08/L. Die tatsächliche Reduktion kann durchaus höher liegen. Für eine genaue Bestimmung wären jedoch zusätzliche Analysen mit weitaus größeren Probenvolumina notwendig, um eine

breitere Datenbasis zu erstellen. Dies ist im Labormaßstab nicht möglich und war damit im Rahmen dieses Projektes nicht durchführbar.

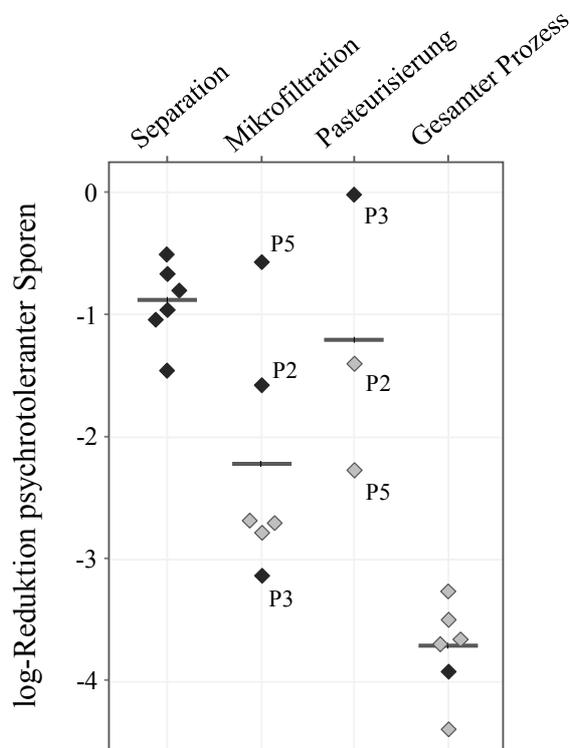


Abbildung 18 Log-Reduktion psychrotoleranter Sporen bei der Herstellung von mikrofiltrierter und pasteurisierter ESL-Milch (n=6). ♦ Reduktion; ◆ Mindestwert der Reduktion, Abtrennung u.U. größer, da Sporenzahlen unter Detektionsgrenze von $0,06 \text{ L}^{-1}$ bzw. $0,08 \text{ L}^{-1}$ lagen. Wert ergibt sich aus der Differenz der im vorhergehenden Prozessschritt bestimmten Sporenzahl und dem Detektionslimit; modifiziert nach Doll *et al.* (2017).

3.3 Ursprung psychrotoleranter Sporenbildner in mikrofiltrierter ESL-Milch

Um die Haupteintragsrouten psychrotoleranter Sporenbildner als wichtigste Verderbsorganismen in MF+PAST Milch aufzudecken, wurde ihr Auftreten entlang des Herstellungsprozesses auf Spezies- und auf Stammebene genauer analysiert. Findet eine Transmission der Sporen aus der Rohmilch in das Endprodukt statt, so sollten sie in beiden Milcharten zu etwa gleichen Anteilen vorliegen. Zunächst wurde daher die Häufigkeit psychrotoleranter Sporenbildner in sechs Chargen Rohmilch (n=819; Teilergebnis aus 1.2.2) und daraus hergestellter MF+PAST Milch (n=35, Teilergebnis aus 2.1) auf Speziesebene gegenübergestellt. Auswahlkriterien dieser sechs Chargen waren positiv auf Sporenbildner getestete Endprodukte und die Verfügbarkeit der eingefrorenen, dazugehörigen Rohmilch. Das Ergebnis ist in Abbildung 19 dargestellt.

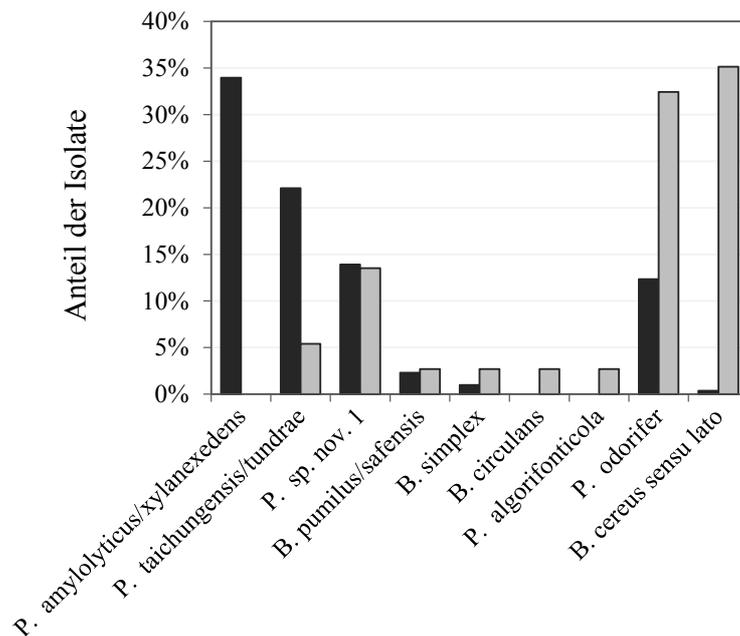


Abbildung 19 Vergleich der Prävalenz psychrotoleranter Sporenbildner in Rohmilch (schwarze Säulen, n=819) und dazugehöriger mikrofiltrierter und pasteurisierter ESL-Milch (graue Säulen, n=35) aus sechs Produktionschargen. *P. Paenibacillus*; *B. Bacillus*; modifiziert nach Doll *et al.* (2017).

Bei vier der neun Arten traten zwischen Endprodukt und Rohmilch signifikante Unterschiede auf und die Häufigkeiten waren nicht miteinander assoziiert ($p < 0,01$). So wurde *P. amylolyticus/xylanexedens*, die mit 34 % häufigste Spezies in Rohmilch im Verlauf des MF+PAST Prozesses vollständig abgetrennt und im Endprodukt kein einziges Mal detektiert. Im Gegensatz dazu stieg die Prävalenz von *B. cereus sensu lato* im Endprodukt im Vergleich zur Rohmilch sehr stark an und lag 190-fach höher. *Bacillus circulans* und *Paenibacillus algorifonticola* wurden sogar ausschließlich aus Endprodukten isoliert. Andere Spezies psychrotoleranter Sporenbildner dagegen traten in Rohware und Endprodukt mit vergleichbarer Häufigkeit auf. Sowohl für *P. odorifer*, als auch für *P. taichungensis/tundrae*, *Paenibacillus sp. nov. 1* und *B. pumilus/safensis* wurde ein Zusammenhang der Prävalenz in Roh- und ESL-Milch durch den Pearson's Chi-squared Test bestätigt ($p = 0,17$). Inwiefern tatsächlich eine Transmission von der Rohware in das Endprodukt stattfand, sollte die RAPD-Typisierung von 88 Isolaten aus verschiedenen Prozessstufen von MF+PAST Milch aufdecken. Die Stämme stammten aus 10 Chargen: Sechs Stufenkontrollen (P1-P6) sowie vier der sechs oben beschriebenen Biodiversitätsstudien von Roh- und dazugehöriger ESL-Milch, bei denen in beiden Milchsorten identische Spezies detektiert wurden. Von diesen zehn untersuchten Chargen wurde in lediglich fünf eine Transmission von Sporen über mehrere Produktionsschritte hinweg festgestellt und nur in drei Produktionen konnte diese tatsächlich

von der Rohmilch bis ins Endprodukt verfolgt werden (Tabelle 12). Auffällig dabei war, dass in zwei Produktionen (1 und 5) mit 1,84 MPN/mL und 1.70 MPN/mL im Vergleich zu den durchschnittlichen 0.6 MPN/mL stark erhöhte Sporenkonzentrationen in der Rohmilch vorlagen. Die Bandenprofile der Typisierung von *Paenibacillus* sp. nov. 1 aus Charge 5 sind in Abbildung 20 exemplarisch dargestellt. Identische Stämme wurden hier in Rohmilch (Bahn 1 – 6) und Endprodukt (Bahn 8 und 9) nachgewiesen.

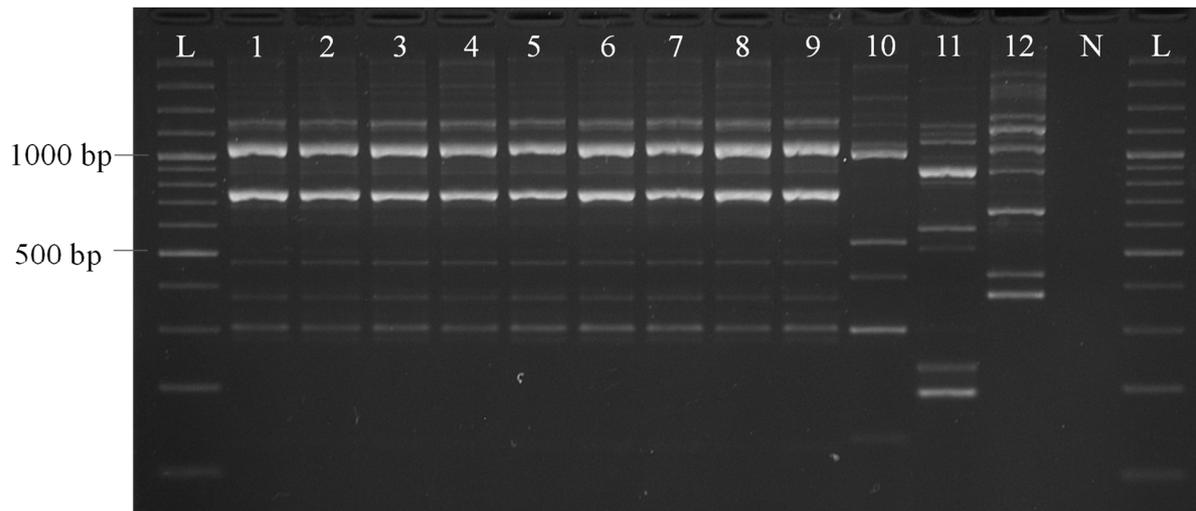


Abbildung 20 Bandenprofile der RAPD-Typisierung von *Paenibacillus* sp. nov. 1 Isolaten aus Rohmilch und mikrofiltrierter und pasteurisierter ESL-Milch. Bahn 1-9: identische Stämme aus Rohmilch (Bahn 1-7) und dem Endprodukt (Bahn 8, 9) einer Produktionscharge; Bahn 10 - 12: *Paenibacillus* sp. nov. 1 Isolate aus Rohmilch anderer Hersteller als Outgroup; N: Negativkontrolle; M: Längenmarker; Primer: OPA7.

Eine Transmission von *P. odorifer* aus der Rohmilch bis in das Permeat fand in Charge 2 statt. Tatsächlich war genau in dieser Produktion eine unzureichende Mikrofiltrationsleistung erzielt worden (P5 der Stufenkontrollen). Ausnahmen stellten Charge 3 und 4 dar. Hier fand ein Eintrag von *B. cereus sensu lato* und *B. pumilus/safensis* (5%) von der Rohmilch bis in späte Produktionsstufen oder sogar das Endprodukt statt, obwohl beide Spezies in Rohmilch mit geringen Sporenzahlen nur einen geringen Anteil von 5% der Sporen ausmachten und in Charge 3 (=P3 der Stufenkontrollen) die Mikrofiltration eine Abtrenneffizienz von ganzen 3,1 log-Stufen erreichte. Interessanterweise wurde aus den Endprodukten der Charge 3 ein weiterer *B. cereus sensu lato* Stamm isoliert, der in keinem der vorhergehenden Prozessschritte detektiert wurde.

Tabelle 12 Transmission psychrotoleranter Sporenbildner (PSB) von Rohmilch in spätere Prozessschritte der Herstellung mikrofiltrierter und pasteurisierter ESL-Milch. Alle positiven Ergebnisse der RAPD-Typisierung von 90 Isolaten aus 10 Produktionschargen sind angegeben. RM: Rohmilch; MM: Magermilch; PE: Permeat; PA: pasteurisierte Milch; EP: Endprodukt; modifiziert nach Doll *et al.* (2017).

Charge	Spezies	isoliert aus	PSB Rohmilch	
			Anteil Isolate	MPN/mL
1	<i>P. taichungensis/tundrae</i>	RM MM PE EP	90 %	1,84
2	<i>P. odorifer</i>	RM MM PE	5 %	0,17
3	<i>B. cereus sensu lato</i>	RM PA	5 %	0,63
4	<i>B. pumilus/safensis</i>	RM EP	5 %	0,33
5	<i>P. sp. nov. 1</i>	RM EP	42 %	1,70
	<i>P. odorifer</i>	RM EP	31 %	

4 Enzymaktivität der Mikrobiota von ESL-Milch

Abschließend wurde das Potential der Mikrobiota aus BF+PAST und MF+PAST Milch für frühzeitigen sensorischen Verderb analysiert. Dafür wurden zunächst Einzelisolate aus beiden Milchsorten auf ihre proteolytische und lipolytische Aktivität gescreent und anschließend Endprodukte auf den Gehalt sensorisch relevanter Bitterpeptide untersucht.

In Agardiffusionsassays wurden insgesamt 217 Isolate aus Endprodukten auf ihre proteolytische und lipolytische Aktivität bei 8 °C gescreent. Abhängig vom Grad der enzymatischen Aktivität (keine, leicht, mittel, stark) entstanden dabei um die Bakterienkultur im opaquen Casein- und Tributyrinmedium klare Hydrolysehöfe unterschiedlicher Größe. Die so ermittelte Enzymatik der drei häufigsten Gattungen, *Bacillus*, *Paenibacillus* und *Microbacterium* ist in Abbildung 21 dargestellt. Ein Großteil ihrer Isolate war enzymatisch inaktiv oder wies eine geringe Aktivität auf (jeweils 76-98%). Vor allem *Microbacterium* war nur durch einen geringen Anteil hydrolytisch aktiver Stämme vertreten. Höhere Aktivitäten wurden in nennenswertem Maße lediglich für die Proteasen der Gattung *Bacillus* (24 % der Isolate) und die Lipasen der Gattung *Paenibacillus* (22 % der Isolate) festgestellt. Nur zwei *B. cereus sensu lato* Stämme und ein *P. amylolyticus/xylanexedens* Stamm waren stark hydrolytisch. Auch von den übrigen 31 Isolaten aus 18 Gattungen, wiesen nur drei Stämme (*Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Lysinibacillus*) mittlere und hohe lipolytische und ein einziger *Macroccoccus* Stamm eine hohe proteolytische Aktivität auf.

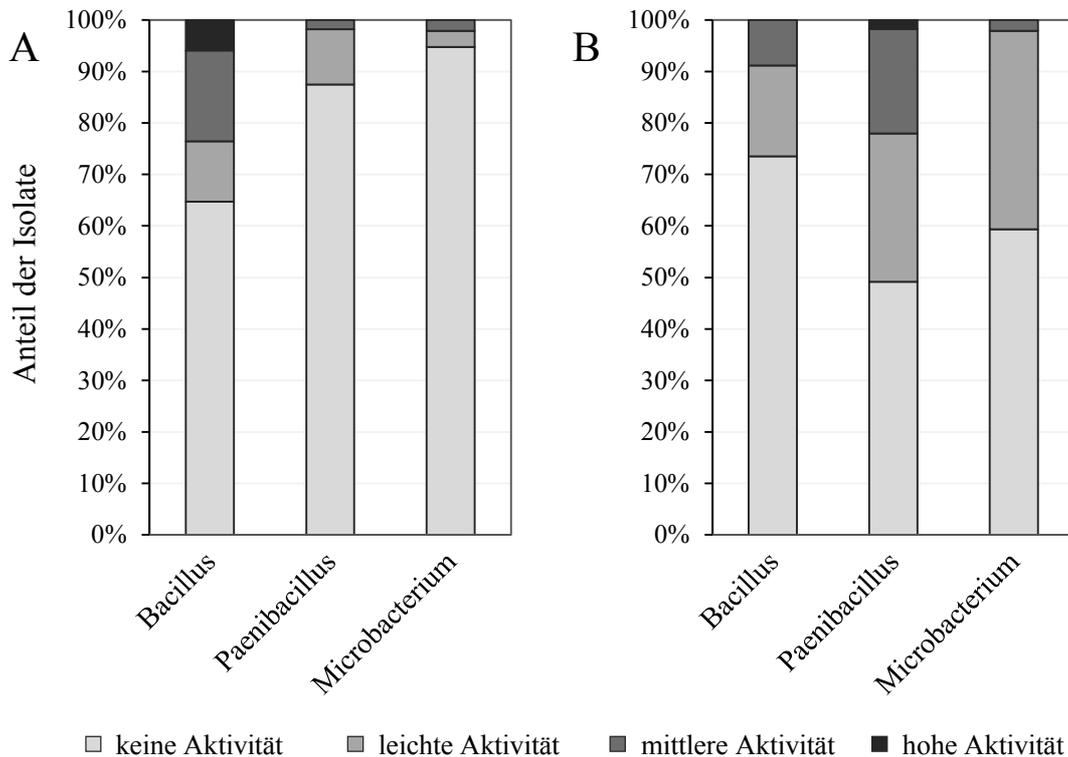


Abbildung 21 Enzymatische Aktivität von 186 Isolatn aus baktofugierter und pasteurisierter sowie mikrofiltrierter und pasteurisierter ESL-Milch im Agardiffusionsassay auf Casein- und Tributyrinagar nach 14 d bei 8 °C. **A** proteolytische Aktivität; **B** lipolytische Aktivität; *Bacillus* n=34; *Paenibacillus* n=59; *Microbacterium* n=96.

Zur Analyse der Enzymaktivität im Endprodukt wurde die Konzentration von Bitterpeptiden in BF+PAST und MF+PAST Milch am Ende des MHDs nach Lagerung bei 8°C bestimmt. Die Quantifizierung der bei pH 4,6-löslichen Bitterpeptide erfolgte dafür fluorimetrisch, mittels Fluorescamin-Assay. 163 Packungen aus 15 Chargen wurden untersucht. Insgesamt lag die Peptidkonzentration dabei jedoch in nur einer einzigen Probe über der Geschmacksschwelle von 2,0 equiv. Tyr-Leu mmol/L, in der ein proteolytisch aktiver *B. cereus sensu lato* Stamm hohe Konzentrationen von $1,7 \times 10^6$ KbE/mL erreicht hatte. In allen anderen Proben war zwar ein leichter Anstieg des Peptidgehalts über die Lagerung festzustellen, es trat allerdings, unabhängig von den Keimzahlen, kein sensorischer Verderb auf.

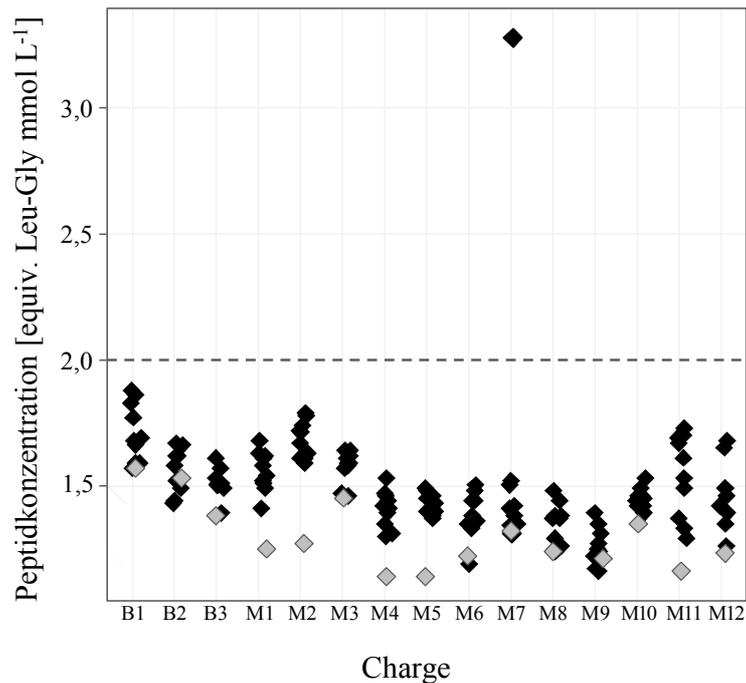


Abbildung 22 Konzentration der pH 4,6-löslichen Bitterpeptide in 163 Endprodukten aus drei Chargen baktofugierter und pasteurisierter (B1-B3) und 12 Chargen mikrofiltrierter und pasteurisierter (M1-M12) ESL-Milch im Fluorescaminassay. - - - - Geschmacksschwelle von 2,0 equiv. Leu-Gly mmol/L (McKellar, 1981); ♦ Konzentrationen in Referenzmilch direkt nach Produktion; ◆ Konzentration in Milchpackungen nach Lagerung bei 8 °C bis zum Ende der Haltbarkeit.

5 Beschreibung potentiell neuer, bakterieller Taxa

5.1 Beschreibung einer potentiell neuen *Paenibacillus* Spezies

Im Zuge der Biodiversitätsanalysen psychrotoleranter Sporenbildner in Roh- und ESL-Milch wurden insgesamt 95 Isolate einer Spezies gewonnen, die anhand ihrer partiellen 16S rRNA Gensequenz keiner bereits beschriebenen Art zugeordnet werden konnte (Sequenzübereinstimmung <98,50 %). Es handelte sich um eine potentiell neue Spezies. Diese war mit 7 % der vierthäufigste Vertreter psychrotoleranter Sporenbildner in Rohmilch, wurde aus 5 Packungen MF+PAST und mindestens 9 Packungen BF+PAST Milch isoliert. Für ihre Beschreibung wurden in einem polyphasischen Ansatz genetische, morphologische, physiologische, biochemische und chemotaxonomische Charakterisierungen durchgeführt. Vier nicht-klonale Stämme des neuen Taxons wurden für die Versuche ausgewählt, die aus einem BF+PAST Endprodukt und drei Rohmilchproben vier verschiedener Hersteller stammten.

5.1.1 Genetische und phylogenetische Charakterisierung

Um die vier *Paenibacillus* sp. nov. Stämme WS5169^T, WS5170, WS5171 und WS5172 phylogenetisch einzuordnen, wurden zunächst ihre fast vollständigen 16S rRNA Sequenzen ermittelt (1401 nt). Untereinander wiesen diese eine Sequenzübereinstimmung zwischen 99,5 % (WS5170 und WS5172) und 99,9 % (WS5169^T und WS5171) auf, wobei Abweichungen von mehr als drei Nukleotiden nur in Vergleichen mit Stamm WS5170 auftraten. Mittels RAPD-Typisierung wurde sichergestellt, dass es sich um vier verschiedene Stämme handelt. Ein Datenbankabgleich der Typstammsequenz WS5169^T mit den 16S rRNA Sequenzen aller valide beschriebenen Spezies in EzTaxon zeigte ausschließlich Treffer innerhalb der Gattung *Paenibacillus*. Die Taxa deren Sequenz die höchste Übereinstimmung mit WS5169^T aufwies, waren dabei *Paenibacillus borealis* DSM 13188^T (97,6 %), *Paenibacillus jilunlii* Be17^T (97,4 %), *Paenibacillus riograndensis* SBR5^T (97,3 %) und *Paenibacillus sonchi* X-19^T (97,2 %). Die Ähnlichkeit zu allen anderen Spezies lag unter 97,0 %.

Im Maximum-Likelihood-Baum, der mit Typstammsequenzen der 25 am nächsten verwandten Spezies (nach EzTaxon), sowie der *Paenibacillus* Typspezies *Paenibacillus polymyxa* und *Bacillus subtilis* als Outgroup berechnet wurde, ist die phylogenetische Einordnung der vier Stämme WS5169^T, WS5170, WS5171 und WS5172 dargestellt (Abbildung 23). Diese bildeten eine eigene, eindeutig abgegrenzte Abstammungslinie innerhalb des Clusters mit *P. jilunlii* Be17^T, *P. graminis* DSM 15220^T, *P. sonchi* X-19^T und *P. riograndensis* SBR5^T, die durch hohe Bootstrapwerte unterstützt wurde. *P. borealis* DSM 13188^T, der Stamm mit der höchsten 16S rRNA Sequenzübereinstimmung zu WS5169^T war ebenfalls lose an dieses Cluster angegliedert. Die Typstämme dieser fünf Spezies wurden daher als Referenzen zur eindeutigen Abgrenzung der neuen Art ausgewählt: *P. borealis* DSM 13188^T (Elo *et al.*, 2001), *P. graminis* DSM 15220^T (Berge *et al.*, 2002), *P. jilunlii* DSM 23019^T (Jin *et al.*, 2011), *P. sonchi* LMG 24727^T (Hong *et al.*, 2009), *P. riograndensis* DSM 28159^T (Beneduzi *et al.*, 2010) und *P. polymyxa* DSM 36^T (Claus und Berkeley, 1986; Ash *et al.*, 1993) als Typspezies der Gattung *Paenibacillus*.

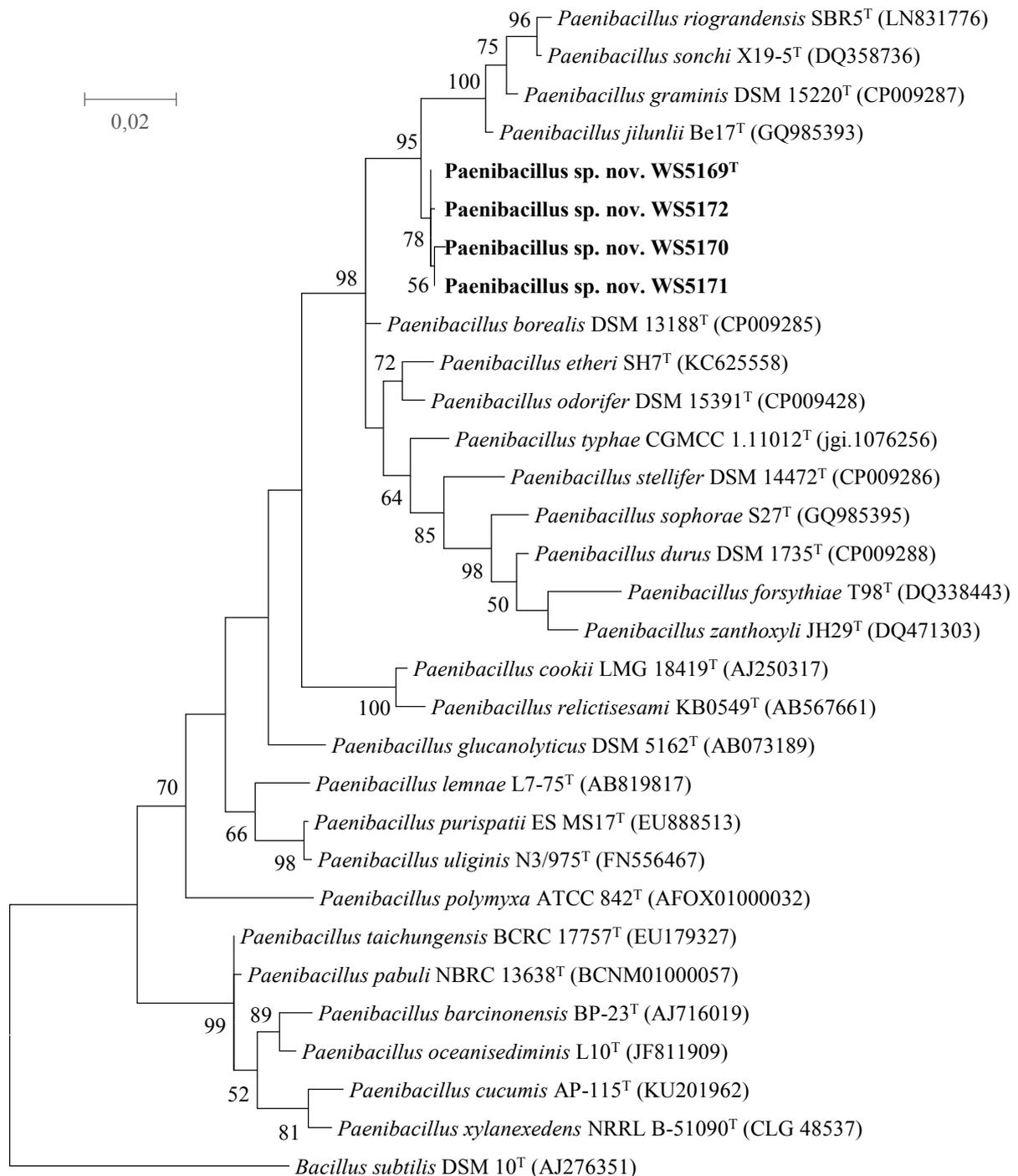


Abbildung 23 Maximum-Likelihood-Baum, basierend auf der fast vollständigen 16S rRNA Sequenz (1401 Nukleotidpositionen) zur phylogenetischen Einordnung der vier *Paenibacillus* sp. nov. Stämme WS5169^T, WS5170, WS5171, WS5172 und der Typstämme der 25 am nächsten verwandten Spezies, sowie *Paenibacillus polymyxa* ATCC 842^T als Typstamm der Gattung *Paenibacillus* und *Bacillus subtilis* DSM 10^T als Outgroup. Bootstrapwerte >50 % bei 1000 Replikationen werden in Prozent an den entsprechenden, internen Knoten angegeben. Accession Nummern der Sequenzen sind in Klammern angeführt. Balken: 0,02 Substitutionen je Nukleotidposition.

5.1.2 Phänotypische Charakterisierung

Zur genaueren Charakterisierung der potentiell neuen Art, wurden die morphologischen Merkmale des Stammes *Paenibacillus* sp. nov. WS5169^T beschrieben. Um eine Abgrenzung der Spezies zu ermöglichen und gleichzeitig innerartliche Diskrepanzen zu erfassen, wurden zusätzlich die physiologischen und chemotaxonomischen Charakteristika der Stämme WS5169^T, WS5170, WS5171, WS5172 und der Typstämme aller am nächsten verwandten Arten, *P. borealis*, *P. graminis*, *P. jilunlii*, *P. sonchi* und *P. riograndensis*, sowie *P. polymyxa*, der *Paenibacillus* Typspezies erfasst und verglichen.

Paenibacillus sp. nov. WS5169^T war ein Gram-positives, bewegliches und sporenbildendes Bakterium (Abbildung 24). Die stäbchenförmigen, vegetativen Zellen erreichten eine durchschnittliche Größe von $0,9 \times 5,8 \mu\text{m}$ ($0,7 - 1,1 \mu\text{m} \times 4,2 - 8,9 \mu\text{m}$) und ellipsoide Sporen waren terminal lokalisiert. Weitere zelluläre Einschlüsse wurden nicht gebildet.

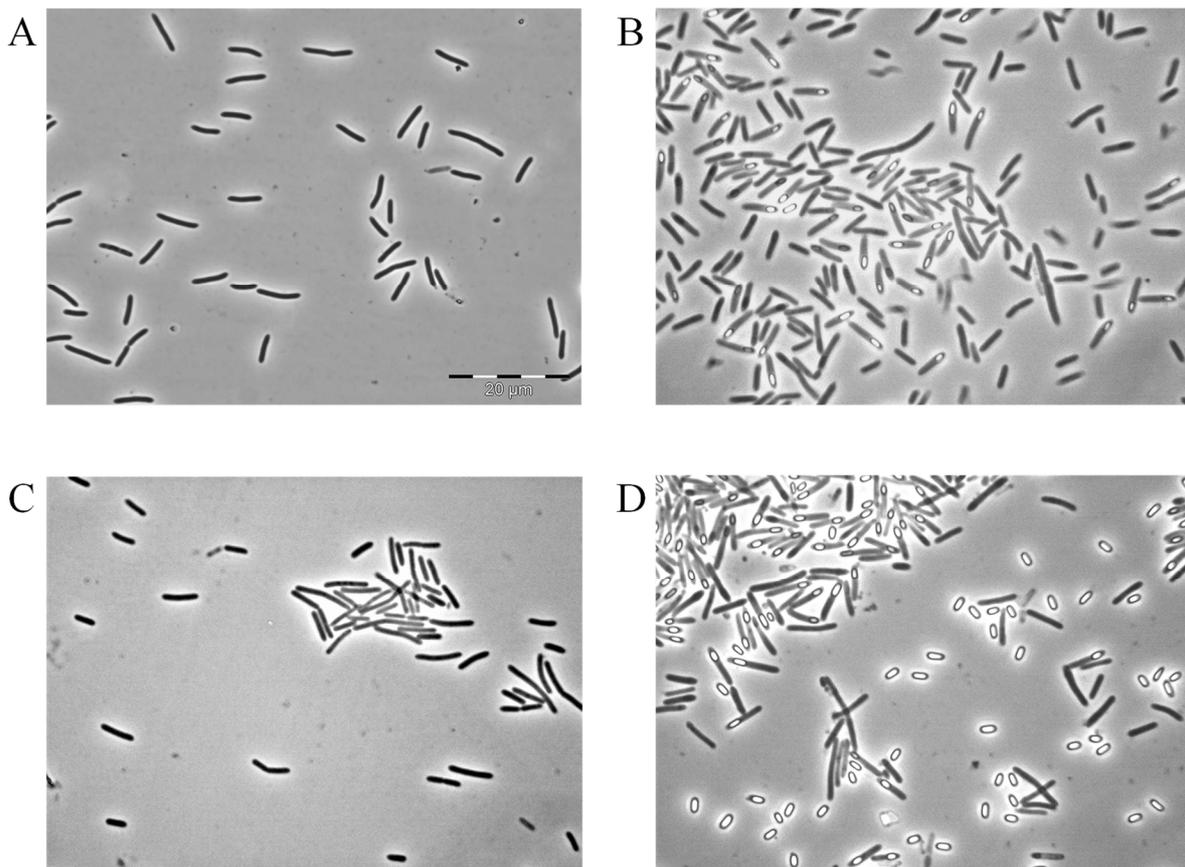


Abbildung 24 Zellmorphologie von *Paenibacillus* sp. nov. WS5169^T im Lichtmikroskop bei 100-facher Vergrößerung. **A** Vegetative Zellen erreichen eine Größe von $0,9 \times 5,8 \mu\text{m}$ (TSB, 18 h, 30 °C, 250 rpm). **B** Ellipsoide Sporen finden sich subterminal in nicht geschwollenen Sporangien (SM, 48 h, 30°C). **C+D** Bistabiler Phänotyp auf CASO-Agar (3 d, 30 °C) mit transparenter, gelblich-weißer Morphologie ohne Sporenbildung (**C**) und opaque-weißen, stark sporulierenden Kolonien (**D**).

Leicht glänzende Kolonien, die auf CASO-Agar innerhalb von 3 d bei 30 °C einen Durchmesser von 1-3 mm erreichten, erschienen flach, rund und wiesen einen leicht unregelmäßigen Rand auf. Dabei trat ein bistabiler Phänotyp auf. Während Kolonien einer stark sporulierenden Subpopulation opaque und weiß erschienen, so war die geringfügig größer wachsende Hauptmorphologie transparent, gelblich-weiß und assoziiert mit einem niedrigen Sporulationsgrad. Der Nachweis, dass es sich bei beiden Phänotypen um den identischen Stamm handelt, erfolgte mittels RAPD-Typisierung.

In TSB wuchsen die *Paenibacillus* sp. nov. Stämme bei Temperaturen zwischen 5 und 37 °C, pH 6 – 9 und NaCl-Konzentrationen von maximal 3%. Die Optima lagen bei 29 – 33 °C, pH 7,0 und 0,5 % NaCl (geringste getestete Konzentration). Dabei wiesen die Stämme WS5171 und WS5172 im Vergleich zum Typstamm WS5169^T einen minimal erweiterten Temperaturbereich von 4 – 37 und 4 – 38°C auf. *Paenibacillus* sp. nov. war ein fakultativ anaerobes Bakterium, Katalase- und Oxidase-positiv. Es hydrolysierte Stärke und Aesculin, spaltete jedoch weder Gelatine noch Harnstoff oder Casein. Nitrat wurde reduziert und auch die Voges-Proskauer Reaktion war positiv. Negativ fielen dagegen die Tests auf Citratverwertung, Bildung von Indol und H₂S, sowie die Bildung der Enzyme Arginindihydrolase, Lysindecaboxylase, Ornithindecaboxylase und Tryptophandesaminase aus. Säurebildung fand bei der Metabolisierung von 28 Zuckern, einem Großteil der 46 getesteten Substrate, statt: Glycerin, D-Arabinose, L-Arabinose, D-Xylose, Methyl-βD-xylopyranosid, D-Galactose, D-Glucose, D-Fructose, D-Mannose, L-Rhamnose, D-Mannitol, Methyl-αD-glucopyranosid, N-Acetylglucosamin, Amygdalin, Arbutin, Salicin, D-Cellobiose, D-Maltose, D-Lactose, D-Melibiose, D-Saccharose, D-Trehalose, D-Melezitose, D-Raffinose, Glycogen, Gentiobiose, D-Turanose und Kaliumgluconat. Jeweils zwei der drei *Paenibacillus* sp. nov. Stämme bildeten außerdem Säure aus Inulin, Xylit und Inositol. Keine Säure entstand lediglich aus Erythritol, L-Xylose, D-Adonitol, L-Sorbose, Dulcitol, Harnstoff, D-Lyxose, D-Tagatose, D-Fucose, D-Arabitol und L-Arabitol. Uneindeutig waren die Tests auf Säurebildung bei D-Ribose, D-Sorbitol, Methyl-αD-mannopyranosid und L-Fucose. Dabei unterschied sich der Stamm WS5169^T in 5 – 10 Reaktionen von allen Referenzstämmen und war als einziger Stamm zur Säurebildung aus Inositol fähig. Alle diskriminativen phänotypischen, aber auch genetischen Merkmale des Stamms WS5169^T und aller Referenzstämmen sind in Tabelle 13 zusammengefasst.

Tabelle 13 Diskriminative physiologische, biochemische und genetische Merkmale des Stamms *Paenibacillus* sp. nov. WS5169^T und Typstämmen ausgewählter *Paenibacillus* Spezies. Stämme: 1 *Paenibacillus* sp. nov. WS5169^T; 2 *Paenibacillus borealis* DSM 13188^T; 3 *Paenibacillus jilunlii* DSM 23019^T; 4 *Paenibacillus graminis* DSM 15220^T; 5 *Paenibacillus riograndensis* DSM 28159^T; 6 *Paenibacillus sonchi* LMG 24727^T; 7 *Paenibacillus polymyxa* DSM 36^T; + positiv; - negativ; v variabel; t terminal; st subterminal; c zentral; > größer; < kleiner.

Merkmal	1	2	3	4	5	6	7
morphologisch							
Gram-Färbung	+	-*	+*	+*	v*	+*	-*
Position Sporen	st	st-t*	t*	st*	t*	c-st*	st*
physiologisch							
Oxidase	+	+	-	-	+	+	-
Wachstumstemperatur [°C]							
Optimum	31-33	29-31	31-33	29-33	33-35	31-33	>35
Minimum - Maximum	5-37	<4-37	5-38	5-38	5-41	5-40	8-42
Wachstum bei pH							
Minimum - Maximum	6,5-9,0	6,5-8,0	7,0	7,0	6,5-9,0	6,5-9,0	5,5-8,5
Wachstum bei NaCl [%]							
Maximum	3,0	3,0	4,0	3,0	4,0	3,0	5,0
biochemisch							
Nitratreduktion	+	-	+	+	+	+	+
Indolbildung	-	-	-	-	v	v	-
Caseinhydrolyse	-	-	+	-	+	-	+
Gelatinehydrolyse	-	-	-	-	-	-	+
Säurebildung							
D-Arabinose	+	+	+	+	+	v	-
D-Ribose	+ [†]	+	-	v	+	+	+
D-Adonitol	-	+	-	-	-	-	-
L-Rhamnose	+	+	+	+	v	v	-
Inositol	+ [†]	-	-	-	-	-	-
D-Sorbitol	+ [†]	+	-	-	+	-	-
Methyl- α D-mannopyranosid	+ [†]	+	-	-	-	-	-
N-Acetylglucosamin	+	+	+	+	+	+	-
Inulin	+ [†]	+	-	+	+	+	+
D-Melezitose	+	+	+	+	+	+	-
Xylit	+ [†]	-	-	-	+	-	-
D-Fucose	-	-	+	-	-	-	-
L-Fucose	+ [†]	+	-	-	v	-	-
D-Arabitol	-	+	-	-	-	-	-
Kaliumgluconat	+	+	+	+	-	-	+

* Daten aus den Neubeschreibungen der Stämme 2 Elo *et al.* (2001), 3 Berge *et al.* (2002), 4 Jin *et al.* (2011), 5 Hong *et al.* (2009), 6 Beneduzi *et al.* (2010), 7 Ash *et al.* (1993)

[†] Ergebnis positiv bei WS5169^T und zwei weiteren *Paenibacillus* sp. nov. Stämmen

^{††} Ergebnis positiv bei WS5169^T und einem weiteren *Paenibacillus* sp. nov. Stamm

5.1.3 Chemotaxonomische Charakterisierung

Für die chemotaxonomischen Charakterisierung wurde die Zellwandstruktur des Stamms WS5169^T mit diagnostischer Diaminosäure und Peptidoglycantyp analysiert, die respiratorischen Chinone und polaren Lipide bestimmt. Außerdem wurde das Profil zellulärer Fettsäuren des Stamms WS5169^T und aller Referenzen untersucht. Alle Versuche wurden vom Identifizierungsdienst der DSMZ durchgeführt.

Nach der Totalhydrolyse des Zellmaterials von *Paenibacillus* sp. nov. WS5169^T wurden die Hydrolysate durch Dünnschichtchromatographie (DC) auf Anwesenheit von Dpm-Isomeren geprüft. Dabei wurde *meso*-Dpm als diagnostische Diaminosäure des Peptidoglycans identifiziert. Das Auftreten von *meso*-Dpm wurde bisher lediglich für den Peptidoglycantyp A1 γ und drei Variationen des Typs A4 γ beschrieben. Diese Variationen wurden jedoch nur bei Stämmen der Gattungen *Brachybacterium*, *Devriesae* und *Dermabacter* nachgewiesen, die zur Familie der *Dermabacteraceae* gehören. Aufgrund der phylogenetischen Zuordnung des Stamms WS5169^T konnte der Peptidoglycantyp A4 γ somit ausgeschlossen werden. *Paenibacillus* sp. nov. besitzt daher mit großer Wahrscheinlichkeit den Peptidoglycantyp A1 γ , mit direkt quervernetzter *meso*-Dpm (Schumann, 2011).

Bei der Analyse der respiratorischen Chinone wurde MK-7 mit 100 % als einziger Vertreter ausgemacht. Die Analyse der polaren Lipide von Stamm WS5169^T zeigte das Vorkommen sieben verschiedener Komponenten (Abbildung 25): Diphosphatidylglycerol als Hauptbestandteil, Phosphatidylglycerol, Phosphatidylethanolamin, drei verschiedener Aminolipide, sowie eines weiteren Lipids.

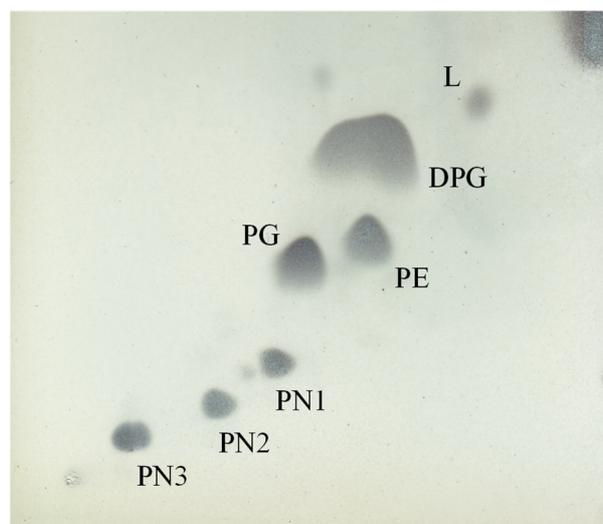


Abbildung 25 Polare Lipide des Stammes *Paenibacillus* sp. nov. WS5169^T, aufgetrennt in 2-dimensionaler Dünnschichtchromatographie. DPG: Diphosphatidylglycerol; PG: Phosphatidylglycerol, PE: Phosphatidylethanolamin; PN: Aminolipid; L: Lipid.

Die zellulären Fettsäuren wurden parallel zu Stamm WS5169^T auch für alle Referenzen bestimmt (Tabelle 14). Die drei wichtigsten zellulären Fettsäuren des Stamms WS5169^T waren dabei anteiso-C_{15:0} (39,0%), aber auch iso-C_{14:0} (22%) und iso-C_{16:0} (11,5%). Weitere 14 Fettsäuren wurden detektiert, von denen jedoch nur die gesättigten, unverzweigten Vertreter C_{14:00}, C_{15:00} und C_{16:00}, sowie iso-C_{15:0} und C_{16:1} ω11c Anteile von über 2 % erreichten.

Tabelle 14 Profil zellulärer Fettsäuren des Stammes WS5169^T im Vergleich zu den Typstämmen ausgewählter *Paenibacillus* Spezies. Stämme: 1 *Paenibacillus* sp. nov. WS5169^T; 2 *Paenibacillus borealis* DSM 13188^T; 3 *Paenibacillus jilunlii* DSM 23019^T, 4 *Paenibacillus graminis* DSM 15220^T, 5 *Paenibacillus riograndensis* DSM 28159^T, 6 *Paenibacillus sonchi* LMG 24727^T; 7 *Paenibacillus polymyxa* DSM 36^T. andere: iso-C_{15:0} 2-OH und/oder C_{16:1} ω7C; fett: die drei häufigsten zellulären Fettsäuren; N.D. nicht detektiert.

Fettsäure	1	2	3	4	5	6	7
gesättigt, unverzweigt							
C _{10:00}	0,2	0,3	N.D.	N.D.	0,2	N.D.	N.D.
C _{12:00}	0,3	0,3	0,3	0,4	0,5	0,6	0,2
C _{13:00}	0,3	N.D.	0,3	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
C _{14:00}	4,4	11,1	4,9	5,1	8,4	7,4	2,4
C _{15:00}	4,8	0,5	4,9	2,9	0,5	1,1	0,7
C _{16:00}	6,3	17,1	9,9	11,4	14,9	18,1	10,6
C _{17:00}	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0,3
C _{18:00}	N.D.	N.D.	0,2	0,3	N.D.	N.D.	N.D.
gesättigt, verzweigt (iso)							
iso-C _{12:0}	N.D.	N.D.	0,2	0,3	N.D.	N.D.	N.D.
iso-C _{13:0}	0,3	N.D.	0,3	0,2	N.D.	N.D.	N.D.
iso-C _{14:0}	22,2	4,4	19,9	22,5	5,0	4,6	2,4
iso-C _{15:0}	2,4	8,1	3,8	2,5	7,9	8,2	8,4
iso-C _{16:0}	11,5	8,8	10,4	14,2	10,0	8,7	9,3
iso-C _{17:0}	N.D.	1,4	0,2	N.D.	1,5	1,9	4,1
gesättigt, verzweigt (anteiso)							
anteiso-C _{13:0}	0,6	N.D.	1,0	0,9	0,3	N.D.	N.D.
anteiso-C _{15:0}	39,0	44,7	42,0	37,1	48,1	47,1	49,5
anteiso-C _{17:0}	0,9	2,3	0,6	0,6	2,8	2,4	9,5
ungesättigt							
C _{16:1} ω7c Alkohol	1,7	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0,4
C _{16:1} ω11c	4,4	1,1	0,3	0,5	N.D.	N.D.	2,7
C _{18:1} ω9c	0,4	N.D.	0,4	0,5	N.D.	N.D.	N.D.
andere	0,5	N.D.	0,6	0,7	N.D.	N.D.	N.D.

Die übrigen Fettsäuren waren lediglich in Spuren vorhanden. Die größten Übereinstimmungen der Fettsäureprofile traten mit *P. jilunlii* und *P. graminis* auf. Wesentliche Unterschiede dagegen fanden sich im Vergleich mit den anderen Referenzen vor allem bei den Fettsäuren C_{16:00} und anteiso-C_{15:0}, die im Stamm WS5169^T nur in geringeren Mengen vorkamen, sowie der Fettsäure iso-C_{14:0}, deren Anteil in *Paenibacillus* sp. nov. gegenüber *P. borealis* DSM 13188^T; *P. riograndensis* DSM 28159^T, *P. sonchi* LMG 24727^T und *P. polymyxa* DSM 36^T bis zu sechs Mal höher lag.

Nach Fertigstellung aller Versuche zur Neubeschreibung, wurde die Charakterisierung einer weiteren, neuen Art, *Paenibacillus silagei*, publiziert (Tohno *et al.*, 2016). Ihre 16S rRNA Sequenz zeigt eine Übereinstimmung von 99,7 % mit dem Typstamm der hier beschriebenen Spezies *Paenibacillus* sp. nov. WS5169^T. Dies deutet darauf hin, dass es sich bei beiden Stämmen um Vertreter der identischen Art handelt. Ein Genom zur Speziesabgrenzung mittels genetischer Merkmale ist nicht verfügbar (Stand Juli 2017). Auch eine Gegenüberstellung aller phänotypischen und chemotaxonomischen Merkmale, die für eine abschließende Beurteilung nötig ist und eine Wiederholung der Versuche in Einbeziehung von *P. silagei* LOOC 204^T als Referenz erfordert, war im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht mehr möglich.

5.2 Beschreibung einer potentiell neuen Gattung

Bei der Biodiversitätsanalyse psychrotoleranter Sporenbildner in Rohmilch wurden aus 4 Proben von 3 Herstellern insgesamt sieben Isolate gewonnen, die zwar der identischen Spezies angehörten, deren 16S rRNA jedoch weniger als 95 % Sequenzübereinstimmung mit allen bereits beschriebenen Taxa zeigte. Damit handelte es sich bei den Isolaten um Vertreter einer potentiell neuen Gattung, die im Rahmen dieser Arbeit in einem polyphasischen Ansatz genetisch, morphologisch, physiologisch, biochemisch und chemotaxonomisch charakterisiert wurde. Je Rohmilchprobe wurde ein Stamm für die Versuche ausgewählt, sodass alle Merkmale für vier Vertreter des Taxons erfasst wurden.

5.2.1 Genetische und phylogenetische Charakterisierung

Um vier Stämme der neuen Gattung (WS5173^T, WS5174, WS1574, WS51759) phylogenetisch einzuordnen, wurden zunächst ihre annähernd vollständigen 16S rRNA Sequenzen bestimmt (1346 nt). Untereinander lag die Übereinstimmung der vier Stämme dabei mit maximal 4 Nukleotiden Unterschied zwischen 99,6 und 99,9 %. Mittels RAPD-Typisierung wurde sichergestellt, dass es sich um vier verschiedene Stämme handelt. Ein

Abgleich der WS5173^T Sequenz mit der Datenbank EzTaxon, ergab die höchsten Hitwerte für *P. aestuarii* CJ25^T (95,2%), *Paenibacillus marchantiophytorum* R55^T (94,9 %), *Paenibacillus gansuensis* B518^T (94,7 %), *Paenibacillus ehimensis* KCTC 3748^T (94,5 %) und *Paenibacillus tianmuensis* B27_rnA^T (94,3 %). Obwohl sich unter den ersten 30 Treffern ausschließlich *Paenibacillus* spp. fanden, betrug die Sequenzübereinstimmung mit deren Typspezies *P. polymyxa* lediglich 92,2 % und war vergleichbar mit den Hitwerten gegenüber Typstämmen anderer Gattungen der *Paenibacillaceae*, wie *Fontibacillus aquaticus* GPTSA19^T (93,4 %), *Cohnella thermotolerans* CCUG 47242^T (91,9%) oder *Saccharibacillus sacchari* DSM19268^T (91,8 %). Die Ähnlichkeit der 16S rDNA zwischen WS5173^T und den übrigen Genera dieser Familie lagen zwischen 85,7 % und 90,3 %.

Der Maximum-Likelihood-Baum in Abbildung 26 zeigt die phylogenetische Zuordnung der neuen Gattung unter Einbeziehung der 25 Spezies mit der höchsten 16S rRNA Übereinstimmung (nach EzTaxon), sowie der Typstämme aller Gattungen der Familie *Paenibacillaceae* und *Bacillus subtilis* DSM 10^T als Outgroup. Dabei bildeten die vier Stämme WS6173^T, WS5174, WS5175 und WS5176 eine eigenständige, klar abgegrenzte phyletische Linie, die durch sehr hohe Bootstrapwerte unterstützt wurde. Auffällig in Bezug auf die Topologie des Baumes ist die Lage der Typstämme einiger Gattungen, wie *Cohnella*, *Fontibacillus* oder *Marinicrocinis*, die ähnlich dem neuen Genus zwischen *Paenibacillus* Spezies verteilt auftraten. *F. aquaticus* GPTSA 19^T lag dabei sogar innerhalb eines Clusters mit *P. polymyxa* ATCC 842^T. Auf Basis der phylogenetischen Zuordnung und der 16S rRNA Sequenzübereinstimmung wurden *P. aestuarii* DSM 23861^T (Bae *et al.*, 2010) als nächst verwandte Spezies, sowie die Typstämme der drei am nächsten verwandten Gattungen, *P. polymyxa* DSM 36^T (Claus und Berkeley, 1986; Ash *et al.*, 1993) *C. thermotolerans* DSM 17683^T (Kämpfer *et al.*, 2006) und *F. aquaticus* DSM 17643^T (Saha *et al.*, 2010) als Referenzen ausgewählt.

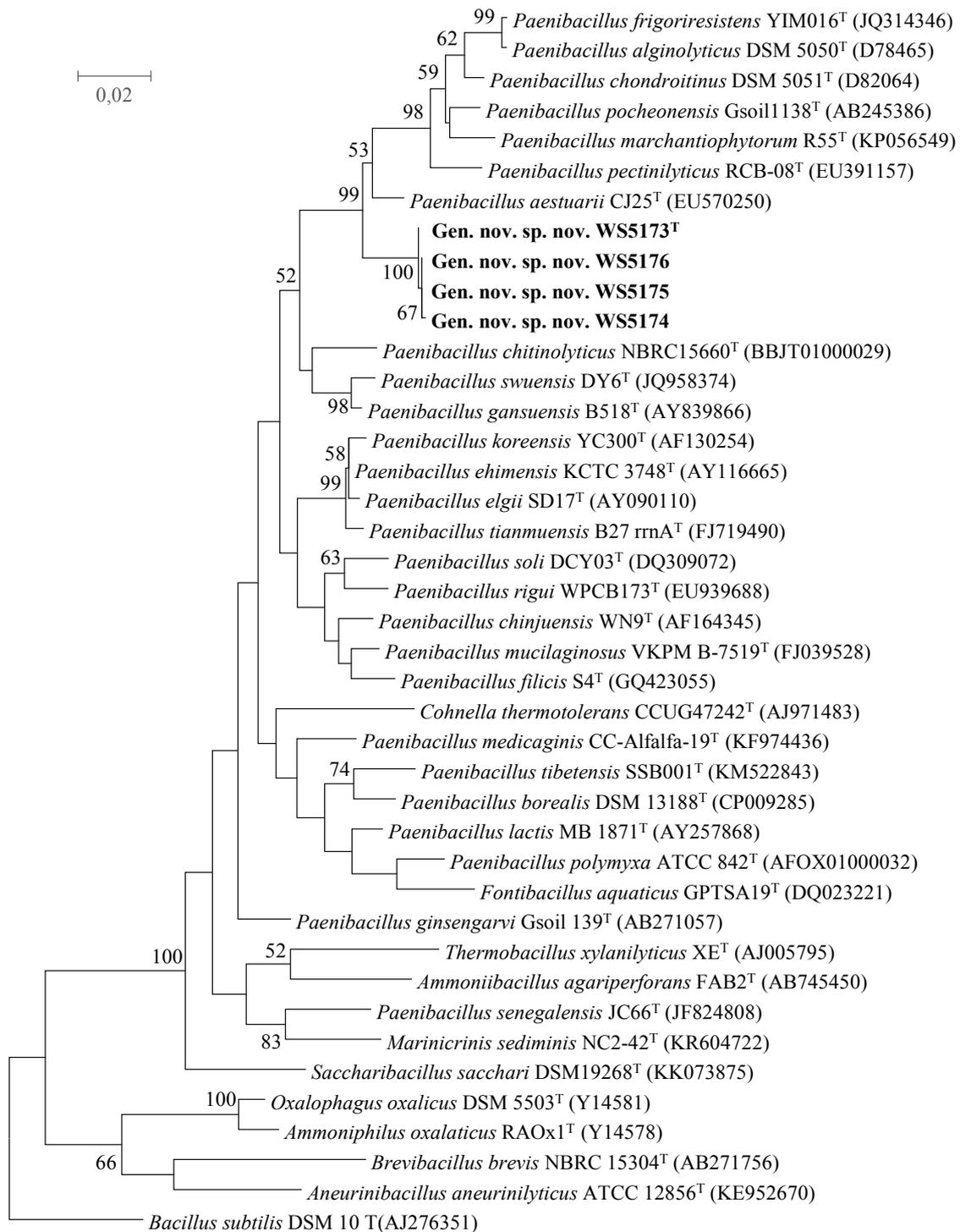


Abbildung 26 Maximum-Likelihood-Baum, basierend auf der fast vollständigen 16S rRNA Sequenz (1346 Nukleotidpositionen) zur phylogenetischen Einordnung der vier Gen. nov. sp. nov. Stämme WS5173^T, WS5174, WS5175, WS5176 und der Typstämme der 25 am nächsten verwandten Spezies, aller Gattungen der Familie *Paenibacillaceae* und *Bacillus subtilis* DSM 10^T als Outgroup. Bootstrapwerte >50 % bei 1000 Replikationen werden in Prozent an den entsprechenden, internen Knoten angegeben. Accession Nummern der Sequenzen sind in Klammern angeführt. Balken: 0,02 Substitutionen je Nukleotidposition.

5.2.2 Phänotypische und chemotaxonomische Charakterisierung

Um die potentiell neue Gattung genauer zu charakterisieren, wurde die mikroskopische und makroskopische Morphologie sowie die Chemotaxonomie des Typstamms WS5173^T untersucht. Für die Erfassung intraspezifischer Unterschiede wurden außerdem physiologische und biochemische Merkmale, sowie die zellulären Fettsäuren der vier Stämme WS5173^T, WS5174, WS5175 und WS5176 bestimmt und verglichen. Um die Gattung von nahe verwandten Taxa abzugrenzen, wurden außerdem die Fettsäureprofile der Typstämme *P. aestuarii* DSM 23861^T, *P. polymyxa* DSM 36^T, *C. thermotolerans* DSM 17683^T und *F. aquaticus* DSM 17643^T analysiert und Daten aus deren Neubeschreibungen herangezogen.

Bei der potentiell neuen Gattung Gen. nov. sp. nov. WS5173^T handelte es sich um ein Gram-positives, bewegliches und sporenbildendes Bakterium. Die stäbchenförmigen, vegetativen Zellen maßen 3,8 µm (2,7 – 5,7 µm) in der Länge, 1,2 µm (1,0 – 1,5 µm) in der Breite und enthielten neben den subterminal lokalisierten, ellipsoiden Sporen keine weiteren zellulären Einschlüsse (Abbildung 27). Der Stamm WS5173^T bildete auf CASO-Agar innerhalb 3 d bei 30 °C runde, konvex und mukös wachsende, weiße, glänzende Kolonien mit glattem Rand und 1-2 mm Durchmesser.

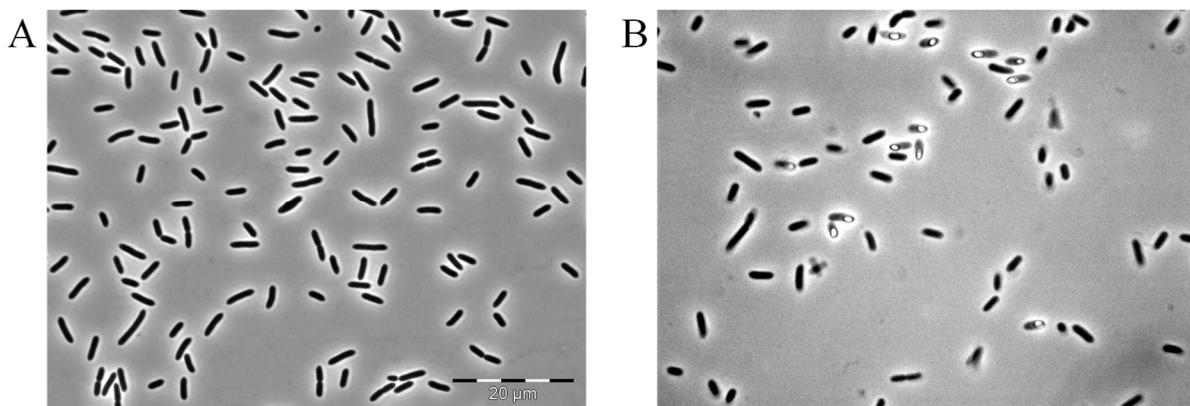


Abbildung 27 Zellmorphologie von Gen. nov. sp. nov. WS5173^T im Lichtmikroskop bei 100-facher Vergrößerung. **A** Vegetative Zellen erreichen eine Größe von 0,9 x 5,8 µm (TSB, 18 h, 30 °C, 250 rpm). **B** Ellipsoide Sporen finden sich subterminal in nicht geschwollenen Sporangien (SM, 48 h, 30 °C).

In TSB proliferierte Gen. nov. sp. nov. bei Temperaturen von 4 – 35 °C, pH 6,0 – 9,0 und bis zu 3,0 % NaCl, wobei der Stamm WS5176 mit <4 - 36°C ein minimal erweitertes Temperaturspektrum tolerierte. Die Wachstumsoptima aller vier Stämme lagen bei 29 – 31 °C, pH 7,0 und einer NaCl-Konzentration von 0,5 % (geringste getestete Konzentration). Die neue Gattung war obligat aerob, Katalase- und Oxidase-positiv. Aesculin wurde hydrolysiert, Stärke, Casein, Gelatine und Harnstoff dagegen wurden nicht gespalten. Die

Voges-Proskauer Reaktion fiel für drei der vier Stämme positiv aus und auch β -Galactosidase wurde gebildet. Negativ dagegen waren die Tests auf Nitratreduktion, Citratmetabolisierung, Bildung von Indol und H_2S , sowie die Enzyme Arginindihydrolase, Lysindecaboxylase, Ornithindecaboxylase und Tryptophandesaminase. Von 46 Substraten wurden 20 zu Säuren metabolisiert: Glycerin, D-Ribose, Methyl-D-xylopyranosid, D-Glucose, L-Rhamnose, Methyl- α D-mannopyranosid, Methyl- α D-glucopyranosid, Amygdalin, Arbutyrin, Salicin, D-Cellobiose, D-Maltose, D-Melibiose, D-Saccharose, D-Trehalose, D-Raffinose, Gentiobiose, D-Turanose, D-Tagatose, L-Fructose. Ebenfalls positiv für Säurebildung wurden jeweils drei der vier Stämme bei N-Acetylglucosamin und D-Arabinose getestet. Keine Säure wurde gebildet aus Erythritol, L-Xylose, D-Adonitol, L-Sorbose, Dulcitol, Inositol, D-Mannitol, D-Sorbitol, D-Lactose, Inulin, D-Melezitose, Harnstoff, Glycogen, Xylit, D-Lyxose, D-Arabit, L-Arabit. Drei von vier Stämmen bildeten ebenfalls keine Säure aus L-Arabinose und Kaliumgluconat. Nicht eindeutig war die Reaktion bei den Substraten D-Fructose, D-Fucose, D-Galactose, D-Mannose und D-Xylose.

Diskriminative morphologische und physiologische Merkmale des Stammes WS5173^T im Vergleich zu den Referenzstämmen sind in Tabelle 15 zusammengefasst.

Tabelle 15 Diskriminative morphologische, physiologische, chemotaxonomische und genetische Merkmale des Stammes *Gen. nov. sp. nov.* WS5173^T und Typstämmen ausgewählter Referenztaxa. Stämme: 1 *Gen. nov. sp. nov.* WS5173^T; 2 *Paenibacillus aestuarii* DSM 23861^T; 3 *Paenibacillus polymyxa* DSM 36^T; 4 *Cohnella thermotolerans* DSM 17683^T; 5 *Fontibacillus aquaticus* DSM 17643^T; MK Menachinon; + positiv; - negativ; N.D. nicht bestimmt.

Merkmal	1	2	3	4	5
morphologisch					
Gram-Reaktion	+	+	-*	+	-*
Beweglichkeit	+	+	+	-*	N.D.
physiologisch					
anaerobes Wachstum	-	-	+	-	+
Katalase	+	-	+	+	-
Oxidase	+	+	-	+	+
chemotaxonomisch					
Chinone	MK-7 (98%) MK-6 (2%)	MK-7* _‡	MK-7* _‡	MK-7 (98%)* MK-6 (1%) MK-8 (1%)	MK-7* _‡

* Daten aus den Neubeschreibungen der Stämme 2 Bae *et al.* (2010), 3 Ash *et al.* (1993), 4 Kämpfer *et al.* (2006), 5 Saha *et al.* (2010)

‡ als Hauptchinon, keine genaueren Angaben

5.2.3 Chemotaxonomische Charakterisierung

Für die chemotaxonomische Charakterisierung des potentiell neuen Taxons wurden die Zellwandstruktur, die respiratorischen Chinone und die polaren Lipide des Stammes WS5273^T bestimmt. Außerdem bestimmt und verglichen wurde das Fettsäureprofil des Typstamms WS5173^T und aller Referenzen.

Nach der Totalhydrolyse des Zellmaterials von Gen. nov. sp. nov. WS5173^T wurde mittels DC *meso*-DPM als diagnostische Diaminosäure des Peptidoglycans ausgemacht. Diese Diaminosäure wurde bisher lediglich in den zwei Peptidoglycantypen A1 γ und A4 γ detektiert. Da A4 γ -Varianten mit *meso*-DPM als diagnostischer Diaminosäure bislang nur in der Familie der *Dermabacteraceae* beschrieben wurde, ermöglichte die phylogenetische Zuordnung der neuen Gattungen zu den *Paenibacillaceae* einen Ausschluss dieser Mureinstruktur. Gen. nov. sp. nov. besitzt daher mit hoher Wahrscheinlichkeit den Peptidoglycantyp A1 γ mit direkt vernetzter *meso*-DPM (Schumann, 2011).

Bei der Analyse der respiratorischen Chinone wurde im Stamm WS5173^T neben MK-7 (98 %) auch ein geringer Anteil von MK-6 (2 %) detektiert. Die Untersuchung der polaren Lipide zeigte die Präsenz neun verschiedener Komponenten (Abbildung 28). Neben dem quantitativ bedeutendsten Diphosphatidylglycerol wurden Phosphatidylglycerol, Phosphatidylethanol-amin, drei verschiedene Aminolipide sowie drei weitere Lipide detektiert.

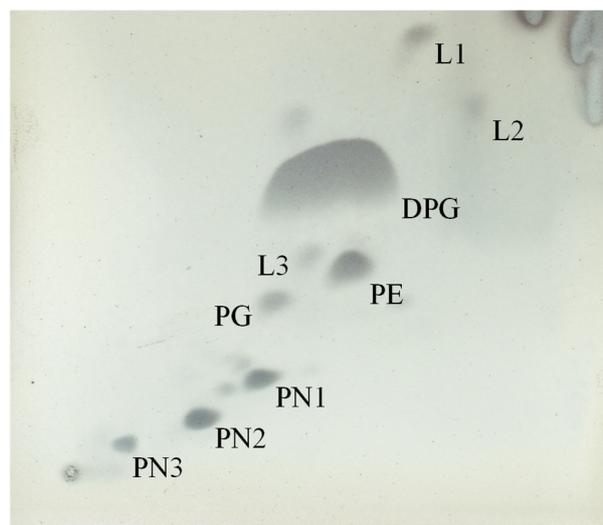


Abbildung 28 Polare Lipide des Stammes Gen. nov. sp. nov. WS573^T, aufgetrennt in 2-dimensionaler Dünnschichtchromatographie. DPG: Diphosphatidylglycerol; PG: Phosphatidylglycerol, PE: Phosphatidylethanolamin; PN: Aminolipid; L: Lipid.

Das zelluläre Fettsäureprofil von WS5173^T setzte sich aus insgesamt 15 Bestandteilen zusammen (Tabelle 16). Die zwei bedeutendsten Fettsäuren waren dabei anteiso-C_{15:0} (44,7 %) und iso-C_{15:0} (18,2 %). Mit relativ hohen Anteilen von 9,4 und 8,0 % wurden außerdem C_{16:0} und C_{15:0} detektiert, während alle anderen Fettsäuren jeweils weniger als 3 % ausmachten und so quantitativ eine untergeordnete Rolle spielten.

Tabelle 16 Profil zellulärer Fettsäuren des Stammes WS5173^T im Vergleich zu den Typstämmen ausgewählter Referenztaxa. Stämme: 1 *Paenibacillus* sp. nov. WS5173^T; 2 *Paenibacillus aestuarii* DSM 23861^T; 3 *Paenibacillus polymyxa* DSM 36^T, 4 *Cohnella thermotolerans* DSM 17683^T, 5 *Fontibacillus aquaticus* DSM 17643^T. andere: iso-C_{15:0} 2-OH und/oder C_{16:1}ω7C; fett: die drei häufigsten zellulären Fettsäuren; N.D. nicht detektiert.

Fettsäure	1	2	3	4	5
gesättigt, unverzweigt					
C _{10:00}	1,5	N.D.	N.D.	N.D.	0,2
C _{12:00}	0,9	N.D.	0,2	N.D.	1,8
C _{14:00}	1,8	3,0	2,4	1,1	8,0
C _{15:00}	8,0	0,8	0,7	0,9	0,5
C _{16:00}	9,4	9,3	10,6	5,1	18,9
C _{17:00}	0,9	N.D.	0,3	N.D.	N.D.
gesättigt, verzweigt (iso)					
iso-C _{13:0}	0,2	0,1	N.D.	N.D.	N.D.
iso-C _{14:0}	2,1	8,0	2,4	2,7	1,1
iso-C _{15:0}	18,2	10,7	8,4	1,1	5,8
iso-C _{16:0}	6,1	13,1	9,3	35,0	8,5
iso-C _{17:0}	2,9	1,6	4,1	N.D.	7,8
gesättigt, verzweigt (anteiso)					
anteiso-C _{13:0}	0,3	N.D.	N.D.	0,3	0,3
anteiso-C _{15:0}	44,7	50,8	49,5	39,6	36,3
anteiso-C _{17:0}	1,8	2,5	9,5	7,3	10,5
ungesättigt					
C _{16:1} ω7c Alkohol	N.D.	N.D.	0,4	1,1	N.D.
C _{16:1} ω11c	1,3	0,2	2,7	0,9	N.D.
C _{17:1} ω6c	N.D.	N.D.	N.D.	1,2	N.D.
C _{18:1} ω7c	N.D.	N.D.	N.D.	3,3	N.D.
andere*	N.D.	N.D.	N.D.	0,4	0,4

Große Unterschiede im Vergleich zu Referenzstämmen wies WS5173^T bei den Fettsäuren C_{15:00} und iso-C_{15:0} auf, die hier bis zu zehnfach höhere Anteile erreichten, während anteiso-C_{17:0} mit 1,8 % sehr selten auftrat. Auch die Referenzstämmen besaßen in ihrem

Fettsäureprofil mindestens ein Alleinstellungsmerkmal. So traten bei *P. aestuarii* DSM 23861^T und *C. thermotolerans* DSM 17683^T die iso-Fettsäuren iso-C_{14:0} und iso-C_{16:0}, bei *F. aquaticus* die geradkettigen C_{14:0} und C_{16:0} in auffällig hohen Konzentrationen auf.

Nach Abschluss der Versuche wurde die Neubeschreibung der Spezies *Paenibacillus eucommiae* publiziert (Fang *et al.*, 2017), deren fast vollständige 16S rRNA zu 99,9 % mit der des Stamms WS5173^T übereinstimmt, sich lediglich um ein Nukleotid unterscheidet. Ein komplettes Genom von *P. eucommiae* für einen detaillierteren Vergleich ist nicht hinterlegt (Stand Juli 2017) und auch die direkte Gegenüberstellung physiologischer Merkmalen unter identischen Versuchsbedingungen fehlt für die endgültige Bewertung. Aufgrund der extrem hohen Sequenzähnlichkeit ist jedoch davon auszugehen, dass es sich bei den Stämmen WS5173^T, S5174, WS5175, WS5176 und *P. eucommiae* CCCC 100226^T um Vertreter der identischen Spezies handelt. Eine Zuordnung zur Gattung *Paenibacillus* wird durch die Daten dieser Studie nicht unterstützt.

DISKUSSION

1 Hitzeresistente Mikrobiota von Rohmilch

Rohmilch stellt eine potentielle Quelle von hitzeresistenten Bakterien, den High G+C Gram-positiven Keimen und psychrotoleranten Sporenbildnern in ESL-Milch dar. Obwohl es unzählige Studien zur Rohmilchmikrobiota gibt, beschäftigen sich nur wenige davon mit diesen Bakteriengruppen. Um die Rolle der Rohmilchspezies für die Kontamination des Endprodukts zu erfassen wurden im Rahmen dieser Arbeit daher sowohl ihre Prävalenz als auch Biodiversität umfassend untersucht.

1.1 Prävalenz hitzeresistenter Bakterien in Rohmilch

Die Keimzahlen High G+C Gram-positiver Keime wurden nach kurzzeitiger Erhitzung der Rohmilch auf 75 °C bestimmt. Da hohe Konzentrationen thermodurer Keime häufig mit einer mangelhaften Melksystemhygiene assoziiert werden, dienen ihre Zahlen unter anderem als Qualitätsmarker (Reinemann *et al.*, 2003; Gleeson *et al.*, 2013). Sie lagen bei durchschnittlich 3,9 log KbE/mL und damit knapp unterhalb des amerikanischen Grenzwerts von 4,0 log KbE/mL (Vithanage *et al.*, 2016). In vielen Studien wurde der Gehalt thermodurer Keime nach 30-minütiger Erhitzung auf 63 °C ermittelt und schwankte danach zwischen 2,0 und

3,0 log KbE/mL (Bava *et al.*, 2009; Gleeson *et al.*, 2013; Buehner *et al.*, 2014; O'Connell *et al.*, 2016). Neben den Zahlen High G+C Gram-positiver Keime wurde in der vorliegenden Arbeit auch der Gehalt an Sporenbildnern bestimmt. Vor allem die Konzentrationen psychrotoleranter Sporen waren dabei extrem gering und lagen bei durchschnittlich 0,57 MPN/mL (<0,02 - 16,00 MPN/mL). Diese Werte stimmen mit früheren Berichten überein, in denen ebenfalls große Schwankungen auftraten und, abhängig von der Messmethode, zwischen 0,0011 und 6,300 Sporen/mL detektiert wurden (McKinnon und Pettipher, 1983; Meer *et al.*, 1991; Mayr *et al.*, 1999; McGuiggan *et al.*, 2002; Masiello *et al.*, 2014). Auch die durchschnittliche Konzentration mesophiler Sporenbildner, die mit 90 KbE/mL um ein 150-faches höher lag als die der psychrotoleranten Spezies, entspricht bereits veröffentlichten Zahlen (Slaghuis *et al.*, 1997; Jackson *et al.*, 2012; Miller *et al.*, 2015a).

Während für die High G+C Gram-positiven Keime und mesophilen Sporenbildner kein saisonaler Einfluss auf die Prävalenz in Rohmilch festgestellt wurde, so war der Gehalt psychrotoleranter Sporenbildner durchaus jahreszeitlichen Schwankungen ausgesetzt. Vor allem im Sommer und frühen Herbst (Juli-September) kam es zu einer Abnahme, nicht nur der Sporenzahlen, sondern auch der Schwankungen zwischen den einzelnen Proben. Im August und September war die Abnahme im Vergleich zum Frühling (März) und den Wintermonaten Dezember und Januar signifikant ($p < 0,05$) und auch wenn in anderen Monaten aufgrund der großen Schwankungen zwischen einzelnen Proben keine Signifikanz vorlag, so wurde der Trend dennoch in zwei aufeinanderfolgenden Analysejahren bestätigt. Auch die fehlende Saisonalität mesophiler Sporenbildner stützt das Ergebnis, da ihre Zahlen aus den gleichen Rohmilchproben bestimmt wurden und somit die generelle Milchqualität als Ursache für die Schwankungen auszuschließen ist. Bisher konzentrierten sich Analysen jahreszeitlicher Schwankungen meist auf mesophile Sporenbildner (McKinnon und Pettipher, 1983; McGuiggan *et al.*, 2002; Buehner *et al.*, 2014) oder mesophile Vertreter der *B. cereus* Gruppe (Vissers *et al.*, 2007; Bartoszewicz *et al.*, 2008) und lediglich drei Studien befassten sich mit der Saisonalität psychrotoleranter Sporenbildner (McKinnon und Pettipher, 1983; Sutherland und Murdoch, 1994; McGuiggan *et al.*, 2002). Die Ergebnisse dabei waren nicht einheitlich. Während McGuiggan *et al.* (2002) zwar von Mai bis Juni geringere Sporenzahlen feststellten, waren diese jedoch nicht mit der meteorologischen Temperatur oder relativen Feuchtigkeit assoziiert. In der Studie von McKinnon und Pettipher (1983) wurden Sporenzahlen von 14 Höfen in Sommer und Winter ohne signifikante Unterschiede verglichen. Sutherland und Murdoch (1994) dagegen postulierten hohe Konzentrationen

psychrotoleranter Sporen im Sommer und frühen Herbst, während die Zahlen im Winter unter das Detektionslimit absanken. Die gegensätzlichen Daten sind auf die Vielzahl möglicher Kontaminationsquellen im Hof- und Molkereiumfeld zurückzuführen, die abhängig von geographischer Lage, wechselndem Hofmanagement und Melkpraxis großen Schwankungen unterliegen. Eine Hauptquelle psychrotoleranter Sporen im Stall ist die Einstreu (Magnusson *et al.*, 2007a; Magnusson *et al.*, 2007b), mit der das Vieh in den Wintermonaten vermehrt in Kontakt kommt. Doch auch das Futter ist eine typische Quelle (Te Giffel *et al.*, 2002; Vissers *et al.*, 2007). Liegen hohe Sporenzahlen z.B. in der Silage vor, so werden sie im Fäzes ausgeschieden, kontaminieren die Euteroberfläche und gelangen darüber in die Milch (Magnusson *et al.*, 2007a). Erhöhte Sporenzahlen in Winter und Frühling können auf den geringeren Temperaturen basieren, die die Proliferation der Begleitmikrobiota hemmen und damit das Wachstum psychrotoleranter Sporenbildner im Hofumfeld und in der Rohmilch fördern. Dafür spricht auch die Beobachtung von Vithanage *et al.* (2016), dass die Zahlen psychrotoleranter Keime in den australischen Wintermonaten Mai bis August um etwa 1 log KbE/mL anstiegen. Die Tatsache, dass identische Spezies psychrotoleranter Sporenbildner unabhängig von der Jahreszeit in allen Milchproben detektiert wurden, deutet zusätzlich auf einen ganzjährig gleichbleibenden Ursprung hin, an dem sie lediglich im Winter höhere Zahlen erreichen.

1.2 Biodiversität hitzeresistenter Bakterien in Rohmilch

In umfassenden Analysen wurde die Diversität High G+C Gram-positiver Keime und psychrotoleranter Sporenbildner bestimmt. Für die Biodiversitätsstudien High G+C Gram-positiver Bakterien wurden insgesamt 318 Isolate aus elf kurzzeiterhitzten Rohmilchproben identifiziert. Mit 12 Gattungen wiesen diese eine beachtliche Diversität auf. Quantitativ bedeutend war dabei das Genus *Microbacterium*, das alleine fast 90 % aller Isolate ausmachte und damit eine außerordentliche Dominanz aufwies. Als Umweltkeim findet es meist über Heu, Staub oder das Melksystem Eintrag in die Rohmilch (Vacheyrou *et al.*, 2011) und wird als wichtiger Teil der Rohmilchmikrobiota beschrieben (Champagne *et al.*, 1994; Vithanage *et al.*, 2016; 2017). Andere Vertreter der *Actinobacteria* wie *Kocuria*, *Arthrobacter*, *Corynebacterium* oder *Micrococcus*, die in der Regel ebenfalls einen signifikanten Teil der Rohmilchmikrobiota stellen (Hantsis-Zacharov und Halpern, 2007; Raats *et al.*, 2011; Braem *et al.*, 2012; Weber *et al.*, 2014; Miller *et al.*, 2015b) und nach Rodrigues *et al.* (2017) sogar zum Core-Mikrobiom zählen, wurden hier nur vereinzelt isoliert. Sie machten lediglich 0,6 – 1,6 % der Stichprobe aus. Zurückzuführen ist dies zum Teil auf natürliche Unterschiede in der

mikrobiellen Zusammensetzung, die abhängig von Saison, Hof-, Melksystems- und Tankmikrobiota stark fluktuiert (Raats *et al.*, 2011; Vacheyrou *et al.*, 2011; Mallet *et al.*, 2012; Vithanage *et al.*, 2016; Doyle *et al.*, 2017). Entscheidend jedoch ist, dass die Milchproben in anderen Studien nicht oder lediglich auf 63 °C erhitzt wurden und damit auch hitzesensitivere Spezies erfasst wurden, die höchstwahrscheinlich bei der Kurzzeiterhitzung auf 75 °C in dieser Studie und auch bei der Pasteurisierung im Unternehmen größtenteils inaktiviert werden. *Microbacterium* und vor allem *Microbacterium lacticum* sind bekannt für ihre hohe Hitzeresistenz (Bramley und McKinnon, 1990; Meer *et al.*, 1991; Fromm und Boor, 2004). Tatsächlich wurden ganze 115 Isolate dieser Spezies zugeordnet, die damit als potentielle Kontaminante von BF+PAST und MF+PAST Milch von besonderer Bedeutung ist.

Die Identifizierung von 2791 Isolaten psychrotoleranter Sporenbildner aus 28 Rohmilchproben zeigte ebenfalls eine breite Biodiversität. Insgesamt 56 Spezies aus neun Gattungen wurden detektiert. Das bedeutendste Genus dabei war *Paenibacillus*, das 84 % der Stichprobe ausmachte und mit 31 verschiedenen Spezies vertreten war und auch *Bacillus* wurde häufig isoliert. Bereits in früheren Studien wurden beide Gattungen als wichtige Vertreter psychrotoleranter Sporenbildner im Molkereiumfeld postuliert und auch andere Genera dieser Studie, wie *Viridibacillus* und *Lysinibacillus*, gehören zur bekannten Rohmilchmikrobiota (Coorevits *et al.*, 2008; Ivy *et al.*, 2012; Masiello *et al.*, 2014; Miller *et al.*, 2015b) Auch auf Speziesebene kam es zur klaren Dominanz einer einzigen Gruppe. Fast die Hälfte aller Isolate gehörte dem Spezieskomplex *P. amylolyticus/xylanexedens* an, während ein Großteil der übrigen Arten jeweils weniger als 1 % der Stichprobe ausmachte. Unebene Häufigkeitsverteilungen wie diese sind typisch für die Rohmilchmikrobiota (Rasolofo *et al.*, 2010; Delavenne *et al.*, 2011; Quigley *et al.*, 2013a; Von Neubeck *et al.*, 2015). Auch im Zusammenhang mit psychrotoleranten Sporenbildnern beschreiben Ivy *et al.* (2012), dass sechs verschiedene Spezies (*B. cereus sensu lato*, *Bacillus licheniformis*, *B. pumilus*, *P. odorifer*, *P. amylolyticus/xylanexedens*, *Paenibacillus graminis*) bereits mehr als 80 % aller Isolate ausmachten. Die klare Dominanz einer einzigen Art wie in dieser Studie ist dennoch auffällig und belegt deren hervorragende Anpassung an das Rohmilchumfeld. Mit 13,5 % gehörte ein großer Anteil der Isolate bisher nicht beschriebenen Taxa an. 20 potentiell neue Spezies und sogar drei potentiell neue Gattungen wurden detektiert. Dies entspricht auch den Ergebnissen anderer Biodiversitätsstudien (Hantsis-Zacharov und Halpern, 2007; Coorevits *et al.*, 2008; Vithanage *et al.*, 2016). Die Autoren hier schlossen daraus, dass die Rohmilchmikrobiota immer noch zu wenig erforscht ist und tatsächlich gibt es bisher keine

Studie, welche die sporenbildende Mikrobiota in vergleichbarer Tiefe und Stichprobengröße untersucht. Vielmehr wurden sie bisher lediglich als Teil der Gesamtmikrobiota bestimmt, wo sie quantitativ eine untergeordnete Rolle spielen. So wurden auch zwei der häufigsten Spezies *Paenibacillus* sp. nov. 1 und *Paenibacillus* sp. nov. 2 bisher noch nicht beschrieben, obwohl sie aufgrund ihrer Prävalenz durchaus technologische Relevanz besitzen. *B. mycoides/weihenstephanensis*, die als psychrotolerante Vertreter der *B. cereus* Gruppe als wichtige sporenbildende Spezies in Rohmilch gelten (Meer *et al.*, 1991; Lechner *et al.*, 1998; Lin *et al.*, 1998; Páčová *et al.*, 2003; Coorevits *et al.*, 2008; Vithanage *et al.*, 2016), wurden in dieser Studie dagegen lediglich 17 Mal isoliert. Ein bedeutender Eintrag von Sporen aus der Rohmilch in das Endprodukt erschien damit unwahrscheinlich.

2 Mikrobiota und Verderb baktofugierter und mikrofiltrierter ESL-Milch

2.1 Potential der Herstellungsverfahren zur Abtrennung von Mikroorganismen

Das technologische Potential von Herstellungsverfahren definiert sich über die Abtrennleistung produktspezifischer Problemkeime. Bei BF+PAST und MF+PAST Milch sind dies vor allem hitzeresistente und psychrotolerante Mikroorganismen, die einerseits das Potential haben die Pasteurisierung zu überdauern und andererseits während der Kühlung hohe Keimzahlen erreichen und somit zum Produktverderb führen.

Da zur Reduktion vegetativer Zellen im MF+PAST Prozess bereits eine Vielzahl von Studien existiert, wurde das technologische Potential gezielt im Hinblick auf die Abscheidung psychrotoleranter Sporenbildner untersucht. In sechs Stufenkontrollen wurde dabei die Abtrennleistung jedes einzelnen Verarbeitungsschritts analysiert. Der gesamte Prozess, zusammengesetzt aus Separation, Mikrofiltration, Hoherhitzung des Rahms bzw. der Rahm-Retentat-Suspension und Pasteurisierung erreichte dabei eine Reduktion der Sporenlast um mindestens 3,9 log-Stufen. Damit liegt die Sporenabtrennung zwar unterhalb der Werte für vegetative Zellen, die sich zwischen 4,6 und 5,6 log-Stufen bewegt (Elwell und Barbano, 2006; Schmidt *et al.*, 2012; Caplan und Barbano, 2013; Fernández García und Riera Rodríguez, 2014), ist jedoch trotzdem als sehr effizient einzustufen. Ausgehend von der durchschnittlichen Sporenzahl von 570 MPN/L Rohmilch wird ihr Gehalt auf 0,05 Sporen/L reduziert, sodass rein rechnerisch lediglich jede zwanzigste Packung eine einzige Spore enthalten sollte.

Den größten Beitrag zur Sporenabtrennung leistete mit durchschnittlich 2,2 log-Stufen die Mikrofiltration. Vor allem im Hinblick auf die geringe Sporenlast ist dies durchaus beachtlich, bleibt jedoch ebenfalls hinter den Werten für vegetative Zellen zurück, für die eine Reduktion von 3,7 - 6,0 log-Stufen postuliert wurde (Pafylas *et al.*, 1996; Barbano *et al.*, 2006; Elwell und Barbano, 2006; Schmidt *et al.*, 2012; Caplan und Barbano, 2013; Ribeiro *et al.*, 2017). Zurückzuführen ist dies, zumindest zum Teil, auf die Partikelgröße. Während vegetative Zellen, vor allem Gram-negative und Gram-positive Stäbchen, teilweise mehrere μm groß sind und durch die keramischen Filter mit $1,4 \mu\text{m}$ weiten Poren zurückgehalten werden, messen Sporen außerhalb der Mutterzelle lediglich $1,0 - 1,7 \times 0,5 - 0,9 \mu\text{m}$ (Carrera *et al.*, 2008; Orsburn *et al.*, 2008), sodass eine Permeation möglich ist. Ein größenspezifischer Effekt wurde bereits für verschiedene andere Zellpopulationen postuliert (Trouvé *et al.*, 1991; Schmidt *et al.*, 2012). Die Verringerung der Porengröße auf z.B. $0,8 \mu\text{m}$, die in Spiking-Versuchen mit Sporen von *Bacillus anthracis* im Vergleich zur $1,4 \mu\text{m}$ Membran einen Effizienzgewinn von 2 log-Stufen brachte, ist jedoch im Industriemaßstab unvorteilhaft, da eine verstärkte Retention von Produktpartikeln wie z.B. Casein und Fett zu verringertem Durchfluss und zu unwirtschaftlich verkürzten Prozesslaufzeiten führt (Pafylas *et al.*, 1996; Guerra *et al.*, 1997; Tomasula *et al.*, 2011). Daten zur Abtrennung von Sporen, die natürlicherweise in Milch vorliegen, gibt es bisher nicht. In Spiking-Versuchen, bei denen Milch mit *Clostridium tyrobutyricum* oder *B. anthracis* in Konzentrationen von 3 - 6 log Sporen/mL beimpft wurde, lagen die Werte jedoch ebenfalls höher als in dieser Studie und schwankten zwischen 3,0 und 4,5 log-Stufen (Trouvé *et al.*, 1991; Tomasula *et al.*, 2011). Bei den hier eingesetzten Sporenzahlen kann es zum Aneinanderhaften einzelner Partikel kommen und der Retentionsanteil im Vergleich zu vorliegender Studie verbessert werden (Maubois, 2002). Aufgrund experimenteller Einschränkungen ist jedoch auch eine Unterschätzung der tatsächlichen Abtrennleistung möglich. Einerseits wurden zwei Permeatproben bereits nach kurzer Prozesslaufzeit gezogen, sodass sich zum Zeitpunkt der Probenahme evtl. noch keine Deckschicht gebildet hatte, die die Retention unterstützen kann (Madec *et al.*, 1992). Andererseits lagen die Sporenkonzentrationen im Permeat zweier Stufenkontrollen unter der Detektionsgrenze von 0,08 bzw. 0,06 Sporen/L, sodass die tatsächliche Abtrennung nicht vollständig quantifiziert werden konnte. Die 2,2 log-Stufen bilden somit einen Mindestwert der Abtrennleistung. In den beiden Prozessen, die eine uneingeschränkte Erfassung der Mikrofiltrationseffizienz ermöglichten, lagen die Werte bei 2,7 und sogar 3,1 log-Stufen.

Im MF+PAST Prozess trugen Separation und Pasteurisierung jeweils 0,9 und 1,2 log-Stufen zur Sporenabtrennung bei. Auch wenn die Separation nicht zur Keimabscheidung, sondern ausschließlich zur Trennung von Rahm und Magermilch eingesetzt wird, so ist doch bekannt, dass auch bei der natürlichen Aufräumung von Milch mehr als 80 % aller Keime, also in etwa 0,9 log-Stufen, in der Rahmphase verbleiben (Dellaglio *et al.*, 1969; Caplan und Barbano, 2013). Die anschließende Hoherhitzung des Rahms bzw. der Rahm-Retentat-Suspension inaktiviert die abgetrennten psychrotoleranten Sporen dann quantitativ (Meer *et al.*, 1991), sodass sie auch nach der Fetteinstellung keine Rolle mehr für den Produktverderb spielen. Die Pasteurisierung sollte auf Sporen keinen Effekt haben (Novak *et al.*, 2005; Tomasula *et al.*, 2011), eliminierte in dieser Studie jedoch weitere 1,2 log-Stufen. Zurückzuführen ist dies auf die oben erwähnte Unterschätzung der Mikrofiltrationsleistung in zwei Stufenkontrollen. Da die Beprobung pasteurisierter Milch zu einem späteren Zeitpunkt nach Bildung der Deckschicht und voll funktionaler Mikrofiltration erfolgte, wurde die Pasteurisierungseffizienz in diesen Chargen mit 1,4 und 2,2 log-Stufen wahrscheinlich überschätzt. In allen anderen Produktionen leistete sie keinen Beitrag zur Sporenreduktion. Vegetative Zellen werden bei der Pasteurisierung im MF-Prozess in der Regel um 0,5 - 1,8 log-Stufen verringert (Elwell und Barbano, 2006; Caplan und Barbano, 2013).

Da für den Baktofugationsprozess kaum Daten publiziert sind, wurde die Abtrennleistung in dieser Studie im Hinblick auf die Gesamtmikrobiota analysiert. In sechs Stufenkontrollen bei zwei Herstellern wurden jeweils Rohmilch, doppelt baktofugierte und standardisierte sowie pasteurisierte Milch beprobt. Die Baktofugen selbst waren nur bei einem Hersteller zugänglich. Hier wurden zusätzlich Proben nach Baktofuge 1 und Baktofuge 2 gezogen. Insgesamt ermöglichte der BF+PAST Prozess mit allen Verarbeitungsstufen eine Keimreduktion um 2,9 log-Stufen. Das technologische Potential war damit der MF+PAST unterlegen, deren Leistung etwa 2 log-Stufen höher liegt, gewann jedoch gegenüber der konventionellen Pasteurisierung, deren Abtrennraten abhängig von der eingesetzten Temperatur zwischen 1,6 und 1,8 log-Stufen schwanken (Elwell und Barbano, 2006; Fernández García und Riera Rodríguez, 2014). Ausgehend von einer Keimzahl von 5,0 log KbE/mL Rohmilch verbleiben in frisch produzierter BF+PAST Milch rein rechnerisch etwa 2,1 log KbE/mL.

Ein Großteil der Keimabtrennung im BF+PAST Prozess fand während der kombinierten Baktofugation und Standardisierung statt. Die Keimlast wurde hier um ganze 2,3 log-Stufen reduziert, wovon 73 % allein auf die erste Baktofuge zurückzuführen waren. Schon Torres-Anjel und Hedrick (1971) verzeichneten bei Versuchen mit dreifacher Baktofugation eine

graduelle Effizienzabnahme für nacheinander geschaltete Zentrifugen. Während die erste Baktofuge eine Keimreduktion um 99,8 % erreichte, erzielte die Zweite maximal 43,2 % und die letzte Zentrifugation keine weitere Abtrennung. Generell stammen Werte zur Baktofugationsleistung vor allem aus Spiking-Versuchen mit verschiedenen Keimgruppen und weisen extreme Schwankungen auf. So wurden die Zahlen vegetativer Zellen mit einfacher Baktofugation abhängig von Volumenstrom, Drehzahl, Prozesstemperatur und eingesetzter Spezies um 7 bis hin zu 93 % reduziert (Kosikowski und Fox, 1968; Te Giffel und Van Der Horst, 2004; Grant *et al.*, 2005; McCarthy, 2011; Faccia *et al.*, 2013). Für Sporen sind die Werte aufgrund ihrer Zelldichte höher und bewegen sich zwischen 90,3 und 99,8 % (Bergere *et al.*, 1969; Torres-Anjel und Hedrick, 1971; Te Giffel und Van Der Horst, 2004). Die mit 2,2 log-Stufen verhältnismäßig hohe Effizienz in vorliegender Studie ist einerseits auf die doppelte Baktofugation und andererseits, vor allem im Vergleich zu den Studien aus den 60er und 70er Jahren, auch auf leistungsstärkere Baktofugen zurückzuführen. Die Pasteurisierung im BF+PAST Prozess inaktivierte weitere 0,6 log-Stufen hitzesensitiver Keime. Dieser Wert scheint im Vergleich zur konventionellen Pasteurisierung recht gering, erklärt sich jedoch bei genauerer Betrachtung der mikrobiellen Zusammensetzung entlang des Herstellungsprozesses.

Insgesamt fand im Verlauf des BF+PAST Prozesses ein Shift der Mikrobiota von der typischen Lagertankmilch mit Dominanz von Gram-negativen *Pseudomonadales* (Rasolofo *et al.*, 2010; Fricker *et al.*, 2011; Raats *et al.*, 2011; Vithanage *et al.*, 2017) hin zu einer ausschließlich Gram-positiven Endproduktpopulation statt. Bereits nach der kombinierten, doppelten Baktofugation und Standardisierung lag nur noch ein geringer Anteil an Gram-negativen Keimen vor und die Gram-positiv dominierte Mikrobiota setzte sich vor allem aus Milchsäurebakterien und kleinen Anteilen von High G+C Gram-positiven Keimen zusammen. Die Selektivität gegenüber Gram-negativen Keimen ist dabei teilweise auf den Wirkungsgrad der Zentrifugation zurückzuführen, der basierend auf speziesspezifischen Unterschieden in Zelldichte oder auch Agglomeratsbildung durchaus schwanken kann (Te Giffel und Van Der Horst, 2004; Grant *et al.*, 2005; McCarthy, 2011). Vielmehr spielt jedoch die Prozesstemperatur eine wichtige Rolle. Aufgrund ihrer Zellwandstruktur sind Gram-negative Bakterien sehr hitzesensitiv und werden so bei der Baktofugation, die bei etwa 55°C durchgeführt wird, bereits zu großen Teilen inaktiviert (Torres-Anjel und Hedrick, 1971; Sørhaug und Stepaniak, 1997; Samelis *et al.*, 2009). Dies erklärt auch die im Vergleich zum konventionellen Pasteurisierungsprozess geringere Effizienz der anschließenden Pasteurisierung. Dabei wurde die übrige hitzesensitive Mikrobiota, die sich aus Resten Gram-

negativer Keime und vor allem aus Milchsäurebakterien zusammensetzte, abgetötet. Auch Schmidt *et al.* (2012) postulieren diese selektive Wirkung. In ihrer Studie wurden bei der Pasteurisierung die gleichen Keimgruppen quantitativ inaktiviert. Die Mikrobiota von MF+PAST Milch setzte sich neben High G+C Gram-positiven Keimen der Gattung *Microbacterium* auch zu geringeren Anteilen aus sporenbildenden Spezies zusammen.

Bewertet man zusammenfassend das technologische Potential von BF+PAST und MF+PAST Milch, so sind beide Herstellungsverfahren der traditionellen Pasteurisierung von Trinkmilch überlegen und vor allem die Mikrofiltration weist eine hohe Effizienz auf. Entscheidend für die Unternehmen ist nun die Ausschöpfung des Potentials beider Prozesse und die daraus resultierende Produkthaltbarkeit.

2.2 Haltbarkeit von ESL-Milch

Das Haltbarkeitsdatum von ESL-Milch ist in Deutschland auf ein Maximum von 24 d reguliert. Während die Hersteller von MF+PAST Milch diese Dauer in der Regel voll ausschöpfen, variieren die Angaben auf BF+PAST Milch erheblich und die drei Hersteller dieser Studie legten jeweils 21 d (Hersteller A), 18 d (Hersteller B) und 17 d (Hersteller C) als MHD fest. Während der gesamten Haltbarkeit soll die Qualität unverändert, die Milch genießbar und gesundheitlich unbedenklich bleiben.

Enzymatischer Verderb und damit die sensorische Haltbarkeit spielten in dieser Studie tatsächlich keine Rolle, mikrobielles Wachstum dagegen war durchaus für frühzeitige Qualitätseinbußen verantwortlich und stellt so ein Problem für die Hersteller dar. Von 287 Packungen MF+PAST Milch, die nach Lagerung bei 8 °C (empfohlene Lagertemperatur in Deutschland) untersucht wurden, waren bei Ablauf der Haltbarkeit bereits 15 % mit Keimzahlen von 6,0 bis hin zu 7,8 log KbE/mL verdorben. Damit war der Anteil höher als in einer früheren Qualitätsanalyse deutscher MF+PAST Milch, in der 8 % frühzeitiger Produktverderb festgestellt wurden (Schmidt *et al.*, 2012). Eine Verkürzung des MHD erscheint somit zumindest für einen Teil der Proben sinnvoll. Eine weitere Möglichkeit die 24-tägigen Haltbarkeit zuverlässig zu erfüllen, stellt die Absenkung der Lagertemperatur dar. So wurde für MF+PAST Milch bei 6 °C eine Lagerstabilität von 26 bis zu 33 d beschrieben (Elwell und Barbano, 2006; Caplan und Barbano, 2013; Fernandez Garcia *et al.*, 2013). Aufgrund von Unterbrechungen der Kühlkette und verhältnismäßig hohen Kühlschrankschranktemperaturen in Europa ist diese Bedingung jedoch nur schwer zu erfüllen (Te Giffel *et al.*, 1997a; Sarkar, 2017). Zu Keimzahlen in BF+PAST Milch gibt es bisher kaum

Daten. Der Anteil frühzeitig verdorbener Packungen in der Analyse von 190 Milchproben dreier Hersteller (A-C) lag jedoch bei 43 % und damit trotz der kürzeren Lagerdauer wesentlich höher als für MF+PAST Milch. Auffällig waren dabei große Unterschiede zwischen den Molkereien. Während bei Hersteller A mit 21 Tagen Haltbarkeit 80 % der Packungen verdorben waren, wiesen die Packungen von Hersteller C nach 17-tägigem MHD eine hervorragende Qualität auf und der Verderbsanteil lag bei lediglich 3 %. Eine Anpassung des Haltbarkeitsdatums scheint damit von großer Bedeutung.

Lagerversuche von BF+PAST Milch sollten Hinweise auf ein sinnvolles Haltbarkeitsdatum geben und klären, welche Einflussfaktoren eine Rolle für frühzeitigen Verderb spielen. Sechs Produktionschargen von drei Herstellern (A-C) wurden dafür bei 8 °C gelagert und über den Verlauf von 21 d auf ihre Keimzahlen und mikrobielle Zusammensetzung hin untersucht. Als wichtigster Faktor für die Lagerstabilität zeigten sich dabei die Ausgangskeimzahlen im Endprodukt. Diese waren in drei Produktionen mit $\leq 2,0$ KbE/mL besonders gering. Tatsächlich waren in diesen Chargen erste Packungen, mit einer Ausnahme, erst nach 21 d verdorben, während der Produktverderb in anderen Chargen nach 17 oder bereits 14 d einsetzte. Aufgrund des limitierten technologischen Potentials des BF+PAST Prozesses ist es daher besonders wichtig, dieses durch geeignete Prozessparameter und eine engmaschige Qualitätskontrolle der Rohware voll auszuschöpfen, um möglichst niedrige Keimzahlen zu erreichen. Die Bedeutung einer sorgfältigen Betriebshygiene, die sowohl der Entstehung von Biofilmen und mikrobieller Besiedlung von Foulingschichten als auch Postpasteurierungs-Rekontaminanten vorbeugt (Ralyea *et al.*, 1998; Gruetzmacher und Bradley Jr, 1999; Bansal und Chen, 2006; Gopal *et al.*, 2015), wurde durch Qualitätsunterschiede der beiden Produktionen von Hersteller A deutlich. Vor Entnahme der zweiten Charge wurde ein zusätzlicher Reinigungsschritt direkt vor Prozessbeginn eingeführt und tatsächlich fielen hier die Keimzahlen während der gesamten Lagerdauer um 0,5 - 2,0 log-Stufen geringer aus. Einen weiteren Einflussfaktor für die Lagerstabilität stellte die Produktmikrobiota dar. High G+C Gram-positive Bakterien wurden aus einem Großteil der Packungen isoliert, schränkten die Haltbarkeit jedoch kaum ein. Erst nach 17 d kam es zu den ersten verdorbenen Proben. Wesentlich problematischer war die Kontamination mit psychrotoleranten Sporenbildnern, vor allem mit *B. cereus sensu lato*, der für die kurze Lagerstabilität und den hohen Verderbsanteil bei Hersteller B verantwortlich war. Entsprechend früherer Studien, die für die Auskeimung und beginnende Proliferation von *B. cereus* Sporen bei 7 °C eine lag-Phase von 5 -7 d postulierten (Larsen und Jørgensen, 1997; Saleh-Lakha *et al.*, 2017), wurden erste Packungen auch hier nach 7 d positiv getestet. Danach kam es zu einem exponentiellen

Wachstum und bereits nach 14 d erreichten bis auf zwei Ausnahmen alle Packungen mit *B. cereus sensu lato* Keimzahlen von 6,7 - 7,6 log KbE/mL. Die Konzentrationen anderer Sporenbildner überschritten die Verderbsgrenze erst nach 21 d. Auch in konventionell pasteurisierter Milch stellt *Bacillus* vor allem bis zu 14 d die dominante Gattung psychrotoleranter Sporenbildner dar. Nach 17 d bei 6 °C wurde in einigen Studien ein Shift hin zu *Paenibacillus* festgestellt (Huck *et al.*, 2008; Ranieri und Boor, 2009; Ranieri *et al.*, 2009). Generell gelten Sporenbildner vor allem bei Haltbarkeiten ab 14 d als verderbsrelevante Problemkeime (Collins, 1981; Meer *et al.*, 1991; Champagne *et al.*, 1994). Insgesamt schwankte die Lagerstabilität in dieser Studie also zwischen 14 und 17 d ist somit minimal länger als die Dauer von 13 -15 d, die Te Giffel *et al.* (2006) in der einzigen Literaturstelle zur Haltbarkeit von BF+PAST Milch angeben.

Zusammenfassend wird die Haltbarkeit von ESL-Milch neben der Lagertemperatur vor allem durch die Ausgangskeimzahl und die mikrobielle Zusammensetzung im Endprodukt beeinflusst. Stellschrauben hierfür sind die Qualität eingehender Rohmilch, das technologische Potential des Herstellungsprozesses und die Betriebshygiene. Unter Einbeziehung dieser Faktoren ist die Wahl eines MHDs für jeden Hersteller individuell anzupassen, wobei 24 d für MF+PAST Milch und 14 – 17 d für BF+PAST Milch bei Lagertemperaturen von 8 °C geeignet scheinen.

2.3 Verderbsmikrobiota von ESL-Milch

In Endproduktanalysen von 287 Packungen MF+PAST Milch und 190 Packungen BF+PAST Milch waren zu Ablauf der aufgedruckten Haltbarkeit bereits sehr hohe Anteile von 15 und 43 % der Proben verdorben. Um Eintragsrouten der Verderbsorganismen aufzudecken und diese schlussendlich zu eliminieren, ist zunächst eine detaillierte Erfassung und Identifizierung der relevanten Arten nötig.

Insgesamt fünf verschiedene Gruppen verderbsinduzierender Mikroorganismen wurden aus ESL-Milch isoliert: High G+C Gram-positive Bakterien, psychrotolerante Sporenbildner und hitzesensitive Rekontaminanten, die durch Gram-negative Keime, Milchsäurebakterien und andere Gram-positive Keime vertreten waren. Die Zusammensetzung der Verderbsmikrobiota beider Milchsorten war dabei ähnlich, lediglich eine größere Biodiversität wurde in BF+PAST Milch festgestellt.

Die mit Abstand häufigste der fünf Gruppen stellten die High G+C Gram-positiven Bakterien dar (v.a. *Microbacterium*), die aus 90 % aller MF+PAST und 43 % aller BF+PAST

Packungen isoliert wurden. Ihr Verderbspotential war jedoch gering. Lediglich 5 % bzw. 9 % der positiv getesteten Packungen erreichten zu Ende des MHD Keimzahlen von $\geq 6,0 \log \text{KbE/mL}$. Aufgrund ihrer hohen Generationszeiten bei 8 °C, die in den Lagerversuchen von BF+PAST Milch deutlich wurden, sind High G+C Gram-positive Keime in Trinkmilch nur selten mit Produktverderb assoziiert (Muir, 1990; Fromm und Boor, 2004). Auch Schmidt *et al.* (2012) detektiertem *Microbacterium* zwar als häufigste Gattung in 65 % aller MF+PAST Packungen, keine dieser Proben war jedoch zu Ablauf des MHD verdorben.

Etwa ein Drittel des Verderbs war sowohl bei MF+PAST als auch bei BF+PAST Milch auf Postpasteurierungs-Rekontaminanten zurückzuführen. Dabei traten Gram-negative Bakterien zwar insgesamt nur selten auf (jeweils 5 % der Packungen), zeigten jedoch ein hohes Verderbspotential. Sie waren, alleine oder in Mischkultur, für 10 bzw. sogar 24 % des Produktverderbs von BF+PAST und MF+PAST Milch verantwortlich. Auch in Studien zu konventionell pasteurisierter Milch wurden sie vor allem bei mangelhafter Betriebshygiene als verderbsrelevante Mikroorganismen beschrieben (Ralyea *et al.*, 1998; He *et al.*, 2009; Ranieri und Boor, 2009; Martin *et al.*, 2011). Zusätzlich zu Gram-negativen wurden in BF+PAST Milch zwei weitere Gruppen hitzesensitiver Bakterien detektiert. Gram-positive Bakterien, v.a. der Gattung *Staphylococcus*, und Milchsäurebakterien des Genus *Weissella* trugen jeweils weitere 10 % zum Produktverderb bei. Die breitere Biodiversität von Rekontaminationskeimen in BF+PAST Milch deutet dabei auf ein größeres Spektrum an Kontaminationsquellen und Problemstellen in der hygienischen Praxis hin. Während Gram-negative Keime als Umweltkeime meist aus Wasser stammen, gelten sowohl *Staphylococcus* als auch *Weissella* als humanassoziierte Haut- oder Fäkalkeime und ihr Eintrag könnte, sofern er nicht mit der Anlage assoziiert ist, auf mangelnde Personalhygiene zurückzuführen sein (Schleifer und Kloos, 1975; Shittu *et al.*, 2004; Fusco *et al.*, 2015). Insgesamt zeigen die Ergebnisse, dass die Postpasteurierungs-Rekontamination sowohl in BF+PAST als auch in MF+PAST Milch noch nicht ausreichend kontrolliert ist und für die Unternehmen weiterhin eine Herausforderung darstellt.

Psychrotolerante Sporenbildner, stellten sowohl in MF+PAST als auch in BF+PAST Milch die relevanteste, verderbsinduzierende Keimgruppe dar. Trotz ihrer geringen Prävalenz in MF+PAST Milch (8 %) wurden *Bacillus* spp. und *Paenibacillus* spp. aus 55 % aller verdorbenen Packungen isoliert. In BF+PAST Milch traten Sporen insgesamt noch häufiger auf. Sie wurden in 43 % aller Packungen detektiert und waren verantwortlich für 57 % des Produktverderbs. Neben *Bacillus* und *Paenibacillus* wurde dabei zu einem geringeren Anteil auch *Lysinibacillus* isoliert. Das Verderbsrisiko, das mit dem Eintrag psychrotoleranter

Sporenbildner verbunden ist, war für beide Milchsorten sehr hoch. Jeweils 90 % und 62 % aller positiv getesteten MF+PAST und BF+PAST-Packungen wiesen bei Ablauf der Haltbarkeit Keimzahlen von 6,0 - 7,9 KbE/mL. Besonders *B. cereus sensu lato* war dabei von Bedeutung. Er wurde sowohl in BF+PAST als auch in MF+PAST aus mehr als der Hälfte aller positiv getesteten Gebinde isoliert und erreichte in Lagerversuchen von BF+PAST Milch binnen 14 d Keimzahlen von $\geq 6,0 \log$ KbE/mL. Schmidt *et al.* (2012) beschrieben *B. cereus sensu lato* und zwei *Paenibacillus* spp. als wichtigste Verderbserreger in MF+PAST Milch. In ihrer Studie waren zwei Drittel des Verderbs auf diese beiden Gattungen zurückzuführen. Auch in konventionell pasteurisierter Milch gelten *Bacillus* und *Paenibacillus*, sobald die Rekontamination mit Gram-negativen Bakterien ausreichend kontrolliert ist, als Gattungen mit dem höchsten Verderbspotential (Meer *et al.*, 1991; Lin *et al.*, 1998; Fromm und Boor, 2004; Barbano *et al.*, 2006; Huck *et al.*, 2006; Huck *et al.*, 2007; Huck *et al.*, 2008; Ivy *et al.*, 2012). Vor allem das Genus *Paenibacillus* wurde bei Temperaturen unter 10 °C als hochkompetitiv beschrieben (Meer *et al.*, 1991; Fromm und Boor, 2004; Huck *et al.*, 2007; Ranieri und Boor, 2009). Ranieri *et al.* (2012), die Milch gezielt auf das Vorkommen von *Paenibacillus* untersuchten, stellten fest, dass bereits geringe Konzentrationen von ≤ 1 Spore/mL ausreichen, um pasteurisierte Milch während der Lagerung bei 6 °C innerhalb von 21 d zu verderben.

Zusammenfassend zeigte die Analyse der verderbsrelevanten Mikroorganismen, dass neben der Kontrolle von Postpasteurierungs-Rekontaminationen vor allem die Eliminierung psychrotoleranter Sporenbildner von Bedeutung für eine Qualitätsverbesserung der ESL-Milch ist. Um dies zu ermöglichen, bedarf es jedoch zunächst einer Aufklärung der potentiellen Eintragsrouten.

2.4 Eintragsrouten verderbsinduzierender Mikroorganismen in die ESL-Milch

Während hitzesensitive Keimgruppen im Endprodukt immer aus Rekontaminationsereignissen nach der Pasteurisierung stammen, können hitzeresistente Spezies ihren Eintrag in das Endprodukt sowohl aus der Rohmilch als auch als Rekontaminationen an jeder Stelle des Herstellungsprozesses finden. Gezielt untersucht wurde in MF+PAST Milch die Transmission und Rekontamination mit psychrotoleranten Sporenbildnern als wichtigste verderbsinduzierende Keimgruppe. Da BF+PAST Milch ein geringeres technologisches Potential aufwies und von einer Transmission gewisser Teile der hitzeresistenten Rohmilchmikrobiota in das Endprodukt auszugehen ist, wurden die

Endprodukte hier spezifisch auf mögliche Rekontaminationen mit Stämmen psychrotoleranter Sporenbildner und *Microbacterium*, die in der Anlage persistieren, untersucht.

Kommt es bei der Produktion von Trinkmilch zu einer horizontalen Transmission von bakteriellen Sporen, so sollten identische Stämme übereinstimmender Spezies an allen Punkten entlang des Herstellungsprozesses auftreten. Tatsächlich war die Prävalenz von *Paenibacillus* sp. nov. 1 und *B. pumilus* in Rohmilch und daraus hergestellten Endprodukten bereits auf den ersten Blick erkennbar sehr ähnlich, und auch die Häufigkeiten von *P. odorifer* und *P. taichungensis/tundrae* waren in Roh- und ESL-Milch statistisch abhängig, das Vorkommen aller vier Spezies in beiden Milchsorten miteinander assoziiert. Dies zeigt, dass psychrotolerante Sporenbildner durchaus zu einem bestimmten Anteil aus der Rohmilch in das Endprodukt eingetragen werden. Insgesamt zehn Produktionen MF+PAST Milch wurden mittels Stammtypisierung auf Transmissionsereignisse hin untersucht und interessanterweise wurden dabei für eben diese vier Spezies identische Stämme entlang des gesamten Herstellungsprozesses dreier Chargen nachgewiesen. Auffällig war dabei, dass in zwei der drei Produktionen besonders hohe Sporenzahlen in der Rohmilch vorlagen und jeweils die häufigsten Spezies über die Mikrofiltration hinweg in das Endprodukt gelangten. Damit scheint die Rohmilchqualität eine wichtige Stellschraube zur Vermeidung eines Eintrags psychrotoleranter Sporenbildner darzustellen. Schon in früheren Studien wurde die Bedeutung der Rohmilch für die Haltbarkeit und den Sporengehalt im Endprodukt beschrieben (Olesen und Jensen, 1989; Fernandez Garcia *et al.*, 2013; Fernández García und Riera Rodríguez, 2014).

Insgesamt spielte die Transmission von Sporen aus der Rohmilch für MF+PAST Milch jedoch nur eine untergeordnete Rolle und trat in lediglich der Hälfte von zehn untersuchten Produktionen auf. Darüber hinaus war *P. amylolyticus/xylanexedens* der mit Abstand häufigste Vertreter psychrotoleranter Sporenbildner in Rohmilch, wurde aber aus den dazugehörigen Endprodukten kein einziges Mal isoliert. Es findet also trotz der hohen Prävalenz keine Transmission statt, was einen klaren Beleg für die hohe Effizienz des Sporenrückhalts im MF+PAST Prozess darstellt, der fast 4,0 log-Stufen betrug. Dies deutet darauf hin, dass zumindest ein Teil der Sporenbildner in MF+PAST Milch aus der Prozessanlage stammt. Betrachtet man die Prävalenzen von *B. cereus sensu lato*, *B. circulans* und *P. algorifonticola* in Rohmilch und im Endprodukt, so fällt auf, dass es hier keinen Zusammenhang gibt. Die Häufigkeiten in Roh- und ESL-Milch waren nicht miteinander assoziiert. *B. circulans* und *P. algorifonticola* wurden ausschließlich aus Endprodukten isoliert und auch *B. cereus sensu lato*, der mit Abstand bedeutendste Sporenbildner im

Endprodukt machte in der Rohmilch nur einen minimalen Anteil von 0,6 % der Isolate aus. Dieser Häufigkeitsanstieg während der Herstellung auf ein 190-Faches ist wahrscheinlich auf ein Rekontaminationsereignis im Prozess zurückzuführen, auch wenn keine Persistenz einzelner Stämme nachgewiesen wurde.

Auch in BF+PAST Milch wurde *B. cereus sensu lato* bei zwei Herstellern (B+C) als Rekontaminationskeim identifiziert. Hier wurde durch Stammvergleiche von Isolaten aus verschiedenen Chargen gezielt auf eine Persistenz in den Anlagen geprüft. Bei Hersteller C wurden dabei zwei Stämme aus jeweils zwei Chargen isoliert. Es kam nur zu einer kurzen Verweildauer in der Prozessanlage, wie sie oft bei mikrobieller Besiedlung von Foulingschichten beobachtet wird (De Jong, 1997; Bansal und Chen, 2006; Gopal *et al.*, 2015). Bei Hersteller B dagegen wurde ein Stamm aus sieben Chargen über einen Zeitraum von mehreren Wochen hinweg detektiert und war in dieser Periode für einen Großteil des Produktverderbs verantwortlich. Die dauerhafte Persistenz und die hohe Anzahl an betroffenen Packungen (mindestens 13) deuten auf die Bildung eines Biofilms innerhalb der Anlage hin.

Tatsächlich wurden Rekontaminationen mit *B. cereus sensu lato* bereits im Silotank (Svensson *et al.*, 1999; Svensson *et al.*, 2004), dem Pasteur (Te Giffel *et al.*, 1997b; Svensson *et al.*, 2000) und der Füllmaschine (Eneroth *et al.*, 2001; Mugadza und Buys, 2017) nachgewiesen und Salustiano *et al.* (2009) detektierten identische *B. cereus sensu lato* Stämme auf verschiedenen Oberflächen nach dem Pasteur und im Endprodukt. Es kam teilweise zur Ausbildung einer Hausflora, die über Monate und Jahre in den Endprodukten des entsprechenden Herstellers auftauchte (Schraft *et al.*, 1996; Svensson *et al.*, 2004). Vor allem die hydrophoben Sporen von *B. cereus sensu lato* sind in der Lage sich auf Edelstahlflächen anzuhafte (Faille *et al.*, 2001; Peng *et al.*, 2002; Peña *et al.*, 2014) und anschließend Biofilme auszubilden, die extrem resistent gegenüber verschiedenen Reinigungsansätzen und Desinfektionsmitteln sind (Wirtanen *et al.*, 1996; Faille *et al.*, 2001; Faille *et al.*, 2002; Peng *et al.*, 2002; Sharma und Anand, 2002; Wijman *et al.*, 2007; Malek *et al.*, 2012). Auch wenn in dieser Studie der Prozess nicht auf spezifische Eintragspunkte der Rekontaminationen analysiert und für MF+PAST Milch keine Persistenz nachgewiesen wurde, so zeigen sowohl die Literatur als auch die aktuellen Daten, dass Rekontamination mit psychrotoleranten Sporenbildnern, vor allem *B. cereus sensu lato*, ein weiterverbreitetes Phänomen und den wahrscheinlichsten Grund für die hohe Prävalenz dieser Spezies in MF+PAST und BF+PAST Milch darstellt.

Vor allem bei BF+PAST Milch spielte Rekontamination eine große Rolle und tatsächlich wurde neben *B. cereus sensu lato* auch für *Microbacterium* bei allen drei Herstellern eine Persistenz in der Anlage nachgewiesen. Eine Vielzahl von Stämmen wurde dabei aus jeweils zwei Chargen isoliert, zwei Stämme wurden jedoch über einen Zeitraum von mehreren Wochen detektiert und traten in jeweils vier Produktionen von Hersteller B auf. Auch wenn *Microbacterium* nicht dafür bekannt ist, sich auf Edelstahloberflächen anzusiedeln, so besteht aufgrund der ausgeprägten Hitzeresistenz doch die Möglichkeit, dass es zur Ansiedlung auf Foulingschichten im Pasteur kommt. Eine andere Erklärung für die Persistenz stellt eine Proliferation in bereits bestehenden *B. cereus sensu lato* Biofilmen dar. Auch wenn in früheren Studien der Ursprung von *Microbacterium* in Trinkmilch nicht im Detail untersucht wurde, so stellten doch Mayr *et al.* (2004) einen Eintrag nach der Pasteurisierung fest. Auch Schmidt *et al.* (2012) führten Rekontaminationen als mögliche Quelle für hitzetolerante *Microbacterium* spp. in MF+PAST Milch auf.

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass neben einer engmaschigen Kontrolle der Rohmilchqualität zur Vermeidung einer Transmission von hitzeresistenten Spezies in das Endprodukt auch die verstärkte Kontrolle der Betriebshygiene eine wichtige Rolle spielen. Vor allem durch Hygieneschulungen des Personals und Cleaning In Place (CIP) Maßnahmen, können Rekontaminationen mit verderbsinduzierenden Mikroorganismen vor und nach der Pasteurisierung vermieden (Wirtanen *et al.*, 1996; Gopal *et al.*, 2015) und damit die Qualität von BF+PAST und MF+PAST Milch bis zum Ablauf des MHD aufrechterhalten werden.

3 Beschreibung neuer sporenbildender Taxa

Im Mittelpunkt jeder Beschreibung eines neuen, bakteriellen Taxons steht die Erfassung typischer Merkmale, die eine Abgrenzung gegenüber bereits valide beschriebenen, nahe verwandten Arten oder Gattungen ermöglicht und damit die Einteilung als neues Taxon rechtfertigt. Im Rahmen dieser Studie wurde jeweils eine Spezies und ein Genus psychrotoleranter Sporenbildner neu beschrieben, wofür phylogenetische Studien durchgeführt, eine Vielzahl phänotypischer Merkmale charakterisiert und mit den am nächsten verwandten Taxa verglichen wurden.

3.1 Abgrenzung einer neuen *Paenibacillus* Spezies aus Milchproben

Bei den Biodiversitätsanalysen von Roh- und ESL-Milch wurden 90 Isolate einer potentiell neuen Art psychrotoleranter Sporenbildner gewonnen, die im Rahmen dieser Studie

charakterisiert wurde. Für die Neubeschreibung dieser Spezies wurden vier verschiedene, nicht klonale Stämme des Taxons ausgewählt (WS5169^T, WS5170, WS5171, WS5172), anhand derer die phylogenetischen, phänotypischen und biochemischen Merkmale erfasst wurden.

Die 16S rRNA Sequenz gilt mit ihrem Informationsgehalt, der Tiefe der taxonomischen Auflösung und dem Umfang verfügbarer Daten als Grundgerüst der mikrobiellen Klassifizierung und ist ein essentieller Bestandteil jeder Neubeschreibung (Logan *et al.*, 2009; Tindall *et al.*, 2010). Für eine phylogenetische Einordnung wurde daher zunächst die fast vollständige 16S rRNA Sequenz des Typstamms WS5169^T mit der Datenbank EzTaxon abgeglichen. Alle 30 Treffer befanden sich innerhalb des Genus *Paenibacillus*, was eine Zuordnung des neuen Taxons zu dieser Gattung erlaubte. Eine Allokation auf Speziesebene war dagegen nicht möglich. Die Typstammsequenz von *P. borealis*, der am nächsten verwandten Art, wies lediglich eine Übereinstimmung von 97,6 % auf und lag damit mindestens 1 % unterhalb aller Grenzwerte zur Speziesabgrenzung. Während einige Autoren ein Limit von 98,7 - 99,0 % vorschlagen (Stackebrandt, 2006; Mende *et al.*, 2013), liegt der aktuell am weitesten akzeptierte Wert, der auf einer Studie mit 6500 qualitätskontrollierten Genomen basiert, bei 98,65 % (Kim *et al.*, 2014). Auch wenn die Sequenzübereinstimmung als Marker zur Diskriminierung auf Speziesebene teilweise als unzuverlässig beschrieben wird (Stackebrandt und Goebel, 1994; Rosselló-Mora und Amann, 2001; Ludwig und Klenk, 2005), so dienen Werte, die wie in dieser Studie weit unterhalb genannter Grenzen liegen dennoch als aussagekräftiger, erster Anhaltspunkt. Die phylogenetische Rekonstruktion im Maximum-Likelihood-Baum, die neben den vier *Paenibacillus* sp. nov. Stämmen die 25 am nächsten verwandten Spezies, die *Paenibacillus* Typspezies *P. polymyxa* und die Outgroup *B. subtilis* darstellt, bestätigt die Speziesdemarkation zusätzlich. Sie zeigt die vier *Paenibacillus* sp. nov. Stämme am Ende einer robusten und klar abgegrenzten Abstammungslinie, deren Position ähnlich isoliert ist wie die anderer, valide beschriebener Arten. Als Referenzspezies für die folgenden Versuche wurden die phylogenetisch nächsten Verwandten *P. borealis* (Elo *et al.*, 2001), *P. graminis* (Berge *et al.*, 2002), *P. jilunlii* (Jin *et al.*, 2011), *P. riograndensis* (Beneduzi *et al.*, 2010), *P. sonchi* (Hong *et al.*, 2009) ausgewählt. Auch *P. polymyxa* (Ash *et al.*, 1993) wurde als Typspezies in die Experimente einbezogen.

Morphologisch und auch physiologisch war eine Abgrenzung der potentiell neuen Spezies anhand verschiedener Merkmale möglich, die innerhalb der Gattung *Paenibacillus* als variabel beschrieben werden (Ash *et al.*, 1993; Vos *et al.*, 2009). So erlaubte sowohl die Gram-positive Zellfärbung als auch die subterminale Lokalisierung der Sporen und der

positive Oxidase-Test eine Unterscheidung von WS5169^T und allen Referenzen in mindestens einem Punkt. Während die potentiell neue Art ein für *Paenibacillus* typisches Wachstumsoptimum bei etwa 30 °C aufwies (Vos *et al.*, 2009), ermöglichten die Wachstumsgrenzen durchaus eine Abgrenzung gegenüber nahe verwandten Spezies. So tolerierte WS5169^T maximale Umgebungstemperaturen von 37 °C, während *P. riograndensis* DSM 28159^T, *P. sonchi* LMG 24727^T und *P. polymyxa* DSM 36^T auch bei 40 °C proliferierten. Eine Unterscheidung von den übrigen Referenzen war durch die hohe Alkalitoleranz der Stämme WS5159^T - WS5172 mit Wachstum bei pH 9,0 im Vergleich zu pH 8,0 bei *P. borealis* DSM 13188^T und pH 7,0 bei *P. graminis* DSM 15220^T und *P. jilunlii* DSM 23019^T möglich.

Auch 5 bis 10 der biochemischen Reaktionen fielen bei WS5169 T anders aus als bei den Referenzstämmen und unterstützten damit die Speziesdemarkation. Die Umsetzung von Inositol unter Säurebildung war dabei ein Alleinstellungsmerkmal der neuen Spezies, das bei drei der vier Stämme auftrat. Generell fielen die Reaktionen bei den vier Neubeschreibungsstämmen nicht immer einheitlich aus und neben Inositol wurden zwei weitere Substrate von nur drei Stämmen und vier Kohlenhydrate sogar nur von 2 Stämmen zu Säure umgesetzt. Dies spiegelt die innerartliche Heterogenität wider und stellt einen der Gründe dar, warum Neubeschreibungen nicht auf einem einzigen Stamm basieren sollten (Felis und Dellaglio, 2007; Logan *et al.*, 2009). Auch im Vergleich mit Angaben aus den Originalpublikationen wurden für einige Referenzen widersprüchliche Ergebnisse festgestellt (Elo *et al.*, 2001; Berge *et al.*, 2002; Hong *et al.*, 2009; Beneduzi *et al.*, 2010). Zurückzuführen ist dies auf Unterschiede in der Versuchsdurchführung und Ergebnisinterpretation, die vor allem bei API Testsystemen sehr unterschiedlich gehandhabt werden (Vos *et al.*, 2009; Von Neubeck *et al.*, 2016). Eine parallele Charakterisierung und Datenauswertung aller Stämme im direkten Vergleich wie in dieser Studie ist daher von großer Bedeutung.

Chemotaxonomische Merkmale werden in den Mindeststandards von Logan *et al.* (2009) für Speziesbeschreibungen nur teilweise gefordert und Vergleichsdaten aus den Neubeschreibungen der Referenzstämmen sind daher limitiert. Das Vorkommen der diagnostischen Diaminosäure *meso*-Dpm, MK-7 als Hauptvertreter respiratorischer Chinone und den polaren Lipiden Diphosphatidylglycerol, Phosphatidylglycerol und Phosphatidylethanolamin gilt jedoch innerhalb der Klasse der *Bacilli* als weit verbreitet (Kämpfer *et al.*, 2006; Vos *et al.*, 2009) und bestätigt somit die taxonomische Zuordnung der Art. Auch das Fettsäureprofil von Stamm WS5169^T entsprach größtenteils der für

Paenibacillus üblichen Zusammensetzung (Shida *et al.*, 1997b) und ermöglichte keine Abgrenzung gegenüber *P. graminis* DSM 15220^T und *P. jilunlii* DSM 23019^T. Die Hauptfettsäure der neuen Art wurde als anteiso-C_{15:0} identifiziert. Sie wies bei allen Referenzstämmen die höchste Prävalenz auf und gilt generell mit Werten zwischen 36 und 80 % als wichtigste Fettsäure der Gattung *Paenibacillus* (Kämpfer *et al.*, 2006; Vos *et al.*, 2009). Ein ungewöhnlich hoher Anteil an iso-C_{14:0} und geringe Werte von C_{16:0} ermöglichten jedoch die Differenzierung gegenüber *P. borealis* DSM 13188^T, *P. riograndensis* DSM 28159^T, *P. sonchi* LMG 24727^T und *P. polymyxa* DSM 36^T. Auffällig waren auch hier die Unterschiede zu zuvor publizierten Daten, die vor allem bei der Quantifizierung von iso-Fettsäuren auftraten (Hong *et al.*, 2009; Jin *et al.*, 2011). Der große Einfluss von Kultivierungs- und Versuchsbedingungen auf die Fettsäurezusammensetzung und -messung, könnte für diesen Effekt verantwortlich sein (Kämpfer, 1994).

Zusammenfassend ist eine Abgrenzung der vier Stämme WS5169^T, WS5170, WS5171 und WS5172 im Vergleich zu bereits beschriebenen Arten sowohl anhand ihrer 16S rRNA Sequenz, als auch durch eine Vielzahl morphologischer und physiologischer Reaktionen und ihres Fettsäureprofils möglich. Damit handelt es sich um Vertreter einer neuen Spezies, die der Gattung *Paenibacillus* angehört.

3.2 Abgrenzung einer neuen Gattung der *Paenibacillaceae* aus Rohmilch

Im Verlauf der Biodiversitätsanalysen psychrotoleranter Sporenbildner in Rohmilch wurden sieben Isolate einer Spezies gewonnen, die keiner beschriebenen Art oder Gattung zugeordnet werden konnten. Vier nicht-klonale Stämme, WS5173^T, WS5174, WS5175 und WS5176 wurden für die Neubeschreibung im Rahmen dieser Arbeit als Vertreter des neuen Taxons ausgewählt.

Für eine detaillierte, phylogenetische Einordnung der potentiell neuen Gattung wurde zunächst die fast vollständige 16S Sequenz des Typstamms WS5173^T mit der Datenbank EzTaxon abgeglichen. Das Ergebnis deutete zunächst auf eine Zuordnung des neuen Taxons zur Gattung *Paenibacillus* hin, da sich alle 30 Datenbanktreffer innerhalb dieses Genus befanden. Die Sequenzübereinstimmung zur am nächsten verwandten Spezies, *P. aestuarii*, war mit 95,2 % allerdings gering, so dass eine Klassifizierung als *Paenibacillus* unwahrscheinlich war. Die Anwendung von Grenzwerten wird zur Abgrenzung von Taxa oberhalb der Speziesebene als sehr verlässlich eingestuft (Rosselló-Mora und Amann, 2001; Yarza *et al.*, 2008; Yarza *et al.*, 2010) und das Limit für die Gattungsdemarkation liegt bei

95 % (Ludwig *et al.*, 1998; Tindall *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2014). Im Rahmen des „All Species Living“ Projekts, einer umfassenden Analyse von fast 7000 qualitätsgeprüften 16S rRNA Sequenzen, stellten auch Yarza *et al.* (2008) fest, dass eine Übereinstimmung von $94,9\% \pm 0,4$ im Vergleich zur Typspezies die Gattungsabgrenzung garantiert. Tatsächlich betrug die Sequenzähnlichkeit von WS5173^T und *P. polymyxa* ATCC 842^T lediglich 92,2 % und lag damit weit unterhalb dieses Wertes. Auch die Übereinstimmung zu den Typspezies anderer Genera der *Paenibacillaceae*, die sich zwischen 85,8 und 93,4 % bewegte, bestätigte die Klassifizierung des Stamms WS5173^T als Vertreter einer neuen Gattung. Der Grenzwert zur Demarkation als eigenständige Familie liegt bei $87,5\% \pm 1,3$ (Yarza *et al.*, 2015). Unterschritten wurde dieser Wert nur beim Sequenzvergleich von WS5173^T mit Vertretern der *Aneurinibacillus* Gruppe (85,8 – 86,4 %) und eine Zuordnung der neuen Gattung zu den *Paenibacillaceae* ist damit gesichert. Gestützt wurden die Ergebnisse des Datenbankabgleichs auch durch eine phylogenetische Rekonstruktion, die vor allem für Taxa oberhalb der Speziesebene einen essentiellen Schritt in der objektiven Klassifikation darstellt (Rosselló-Mora und Amann, 2001). Der Maximum-Likelihood-Baum, der auf Basis der Datenbankrecherche aus den Sequenzen der vier Gen. nov. sp. nov. Stämme, der 25 am nächsten verwandten Spezies, sowie den Typspezies aller Genera der *Paenibacillaceae* berechnet wurde, zeigt das neue Taxon am Ende einer robusten und eigenständigen Abstammungslinie, die klar separat von allen *Paenibacillus* spp. und allen anderen Gattungen der *Paenibacillaceae* auftritt. Die Topologie bestätigte damit die Klassifikation als unabhängiges, neues Genus innerhalb dieser Familie mit den nächsten Verwandten *Paenibacillus*, *Cohnella* und *Fontibacillus*.

Betrachtet man den phylogenetischen Baum genauer, so fällt auf, dass die Typstämme einiger anderer Gattungen der *Paenibacillaceae*, z.B. *Cohnella*, *Fontibacillus* oder *Marinicrinis*, ähnlich dem neuen Genus zwischen den paraphyletischen *Paenibacillus* spp. auftauchten. *F. aquaticus* befand sich dabei sogar innerhalb eines engen Clusters mit *P. polymyxa*. Dies zeigt deutlich, dass die Taxonomie der Gattung *Paenibacillus* einer umfassenden Revision bedarf. Auch in anderen Studien wurde basierend auf der großen Heterogenität von 16S rRNA Sequenzen, Unterschieden im G+C-Gehalt von über 20 % und Differenzen in der Zusammensetzung polarer Lipide eine gewissenhafte Subdivision dieses Genus gefordert (Kämpfer *et al.*, 2006; Vos *et al.*, 2009; Grady *et al.*, 2016). Da solche Maßnahmen sehr umfassend und arbeitsintensiv sind, betonen Kämpfer *et al.* (2006) in ihrer Neubeschreibung der Gattung *Cohnella*, dass die ausstehende Revision des Taxons nicht die Beschreibung neuer Gattungen aufhalten soll, die eng mit *Paenibacillus* assoziiert sind. Sofern

Charakterisierungen basierend auf Unterschieden zur Typspezies *P. polymyxa* durchgeführt würden, sei eine Beschreibung neuer Genera durchaus valide. Viele Autoren verweigern sich dieser Idee und beschreiben, auch bei 16S rRNA Sequenzübereinstimmungen von weniger als 94 % weitere *Paenibacillus* Spezies (Bae *et al.*, 2010; Fang *et al.*, 2017) um diese Problematik zu umgehen und verstärken damit lediglich den Handlungsbedarf. Eine Überarbeitung der Gattung *Paenibacillus* war im Rahmen dieser Studie nicht möglich, eine Zuordnung des Taxons als unabhängige Gattung erscheint vor diesem Hintergrund jedoch sehr sinnvoll.

Während phänotypische Merkmale für die Speziesabgrenzung essentiell sind, besitzen sie in höheren taxonomischen Ebenen eine geringe Auflösung und spielen daher für die Demarkation neuer Gattungen eine untergeordnete Rolle (Rosselló-Mora und Amann, 2001). Bei der Beschreibung physiologischer und biochemischer Charakteristika der Stämme WS5173^T, WS5174, WS5175 und WS5174 fiel jedoch auf, dass eine ungewöhnlich große Anzahl an Reaktionen negativ ausfiel. Wie für die phylogenetisch entfernt verwandten Gattungen *Aneurinibacillus* und *Brevibacillus* beschrieben, ist dies zwar ein Problem hinsichtlich Speziesbeschreibungen innerhalb dieses Genus, ermöglicht jedoch durchaus eine Differenzierung gegenüber reaktiveren, nahe verwandten Gattungen (Vos *et al.*, 2009). Auch das fakultativ anaerobe Wachstum, der positive Katalase- und Oxidasetest, sowie die positive Gramfärbung und vorhandene Beweglichkeit stellen phänotypische Charakteristika dar, die innerhalb der Familie der *Paenibacillaceae* variabel ausfallen (Vos *et al.*, 2009). Mindestens eines dieser Merkmale ermöglichte eine Unterscheidung der neuen Gattung von allen Referenzen.

Neben der Phylogenie beruhen Neubeschreibungen und Demarkationen von Gattungen vor allem auf chemotaxonomischen Daten (Wayne *et al.*, 1987; Kämpfer *et al.*, 2006). Von Bedeutung sind hier vor allem die polaren Lipide, die bei den *Paenibacillaceae* eine hohe Variabilität aufweisen und vor allem bei *Cohnella* und *Fontibacillus* essentiell zur Abgrenzung beitragen (Kämpfer *et al.*, 2006; Rivas *et al.*, 2008; Saha *et al.*, 2010; Mayilraj und Stackebrandt, 2014). Ihre Bedeutung ist dabei im taxonomischen und evolutionären Kontext zu sehen, in dem die Fähigkeit zur Synthese bestimmter Lipide steht (Vos *et al.*, 2009). Die polaren Lipide des Typstamms WS5173^T setzten sich, wie für alle Vertreter der *Bacilli* vor allem aus Diphosphatidylglycerol, Phosphatidylglycerol und Phosphatidylethanolamin zusammen. Zusätzlich wurden allerdings drei Aminolipide und drei weitere, nicht genauer identifizierbare Lipide detektiert, die weder von *C. thermotolerans* CCUG 47242^T noch von *P. polymyxa* DSM 36^T oder *F. aquaticus* GPTSA 19^T synthetisiert

werden (Kämpfer *et al.*, 2006; Saha *et al.*, 2010). Sehr ähnlich war das Lipidprofil lediglich zu *P. aestuarii*, doch auch hier enthielt WS5173^T zusätzlich mindestens ein Aminolipid und drei Lipide (Fang *et al.*, 2017) und konnte somit klar von allen Referenzen unterschieden werden.

Andere chemotaxonomische Merkmale zeigen oft eine geringere Auflösung (Vos *et al.*, 2009; Tindall *et al.*, 2010), was auch in dieser Studie auffiel. So war das Hauptchinon des Stamms WS5173^T und aller Referenzen MK - 7. Eine Abgrenzung des neuen Taxons gegenüber anderen Gattungen könnte lediglich über den zusätzlich detektierten, geringen Anteil an MK-6 erfolgen. Auch der Peptidoglycantyp ist für keine der Referenzen publiziert und konnte somit nicht zur Demarkation herangezogen werden. Das Fettsäureprofil besaß ein größeres Potential. Auch wenn es keine Unterscheidung zwischen WS5173^T und der am nächsten verwandten Spezies *P. aestuarii* ermöglichte und anteiso-C_{15:0}, wie für die *Paenibacillaceae* üblich, die Hauptfettsäure aller Stämme darstellte (Vos *et al.*, 2009), so erlaubte die Fettsäurezusammensetzung doch eine Unterscheidung des neuen Taxons von allen anderen Referenzen. Auffällig war zunächst die Konzentration von iso-C_{15:0}, deren Anteil mit 18,2 % der über den für andere Gattungen der *Paenibacillaceae* publizierten Werten von 1-12 % lag (Kämpfer, 2002). Auch der hohe Gehalt an C_{15:0} war ein Alleinstellungsmerkmal der neuen Gattung. Abgesehen von vereinzelt *Saccharibacillus* Stämmen, besitzen *Paenibacillaceae* in der Regel nur geringe Anteile unverzweigter, gesättigter Fettsäuren (Rivas *et al.*, 2008; Vos *et al.*, 2009; Saha *et al.*, 2010; Sakai *et al.*, 2015; Guo *et al.*, 2016).

Zusammenfassend ist eine Abgrenzung der vier Stämme WS5173^T, WS5174, WS5175 und WS5176 im Vergleich zu bereits beschriebenen Arten und Gattungen sowohl anhand ihrer phylogenetischen Position als auch durch ihre chemotaxonomischen Charakteristika, vor allem die polaren Lipide aber auch das Fettsäureprofil möglich. Es handelt sich also um Vertreter einer neuen Gattung, die der Familie der *Paenibacillaceae* angehört.

SCHLUSSFOLGERUNG UND AUSBLICK

Die Daten dieser Arbeit zeigen, dass Verderb von ESL-Milch zum größten Teil durch psychrotolerante Sporenbildner wie *B. cereus sensu lato* und *Paenibacillus* verursacht wird. Während der Herstellungsprozess baktofugierter ESL-Milch eine Transmission hitzeresistenter Spezies aus der Rohmilch in das Endprodukt zwar im Vergleich zur

traditionell pasteurisierten Milch reduziert, jedoch nicht vollständig verhindert, spielte sie bei mikrofiltrierter ESL-Milch nur in Abhängigkeit von geringer Milchqualität und hohen Sporenzahlen eine Rolle. Für beide Milchsorten erhöhen jedoch vor allem Rekontaminationen aus der Anlage oder der Abfüllung das Risiko für einen frühzeitigen Produktverderb. Neben engmaschigen Kontrollen der Rohmilchqualität bezüglich hitzeresistenter Mikroorganismen stellt daher besonders die sorgfältige Reinigung und Kontrolle aller hygienischen Parameter eine wichtige Stellschraube zur Verbesserung der ESL-Milchqualität dar. Dabei wird zukünftig vor allem die Lokalisation von persistierenden Stämmen in der Anlage und Entwicklung von wirkungsvollen Desinfektions- und Reinigungsansätzen eine Rolle spielen.

Die taxonomischen Untersuchungen im Rahmen von Neubeschreibungen zeigten, dass eine intensive Revision und Subdivision der Familie der *Paenibacillaceae*, vor allem aber des Genus *Paenibacillus* aussteht. Dafür bedarf es einer intensiven Studie mit polyphasischen Ansatz, in dem neben chemotaxonomischen Merkmalen vor allem Sequenzen, die über die 16S rRNA hinausgehen und ganze Genome umfassen, verglichen werden. Dafür sind neben spezialisierten Laboren und Fachkräften für die Durchführung und vor allem die Auswertung chemotaxonomischer Daten, auch leistungsstarke Rechner und bioinformatische Expertise für die Handhabung der Genomsequenzen nötig.

LITERATURVERZEICHNIS

- Adékambi, T., Shinnick, T.M., Raoult, D. und Drancourt, M. (2008). Complete rpoB gene sequencing as a suitable supplement to DNA–DNA hybridization for bacterial species and genus delineation. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 58, 1807-1814.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. und Lipman, D.J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of molecular biology* 215, 403-410.
- Andersson, A., Rönner, U. und Granum, P.E. (1995). What problems does the food industry have with the spore-forming pathogens *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens*? *International journal of food microbiology* 28, 145-155.
- Ash, C., Farrow, J., Wallbanks, S. und Collins, M. (1991). Phylogenetic heterogeneity of the genus *Bacillus* revealed by comparative analysis of small-subunit-ribosomal RNA sequences. *Letters in Applied Microbiology* 13, 202-206.
- Ash, C., Priest, F.G. und Collins, M.D. (1993). Molecular identification of rRNA group 3 bacilli (Ash, Farrow, Wallbanks and Collins) using a PCR probe test. *Antonie van Leeuwenhoek* 64, 253-260.

- Bae, J.-Y., Kim, K.-Y., Kim, J.-H., Lee, K., Cho, J.-C. und Cha, C.-J. (2010). *Paenibacillus aestuarii* sp. nov., isolated from an estuarine wetland. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 60, 644-647.
- Bansal, B. und Chen, X.D. (2006). A critical review of milk fouling in heat exchangers. *Comprehensive reviews in food science and food safety* 5, 27-33.
- Barbano, D., Ma, Y. und Santos, M. (2006). Influence of Raw Milk Quality on Fluid Milk Shelf Life. *Journal of dairy science* 89, E15-E19.
- Bartoszewicz, M., Hansen, B.M. und Swiecicka, I. (2008). The members of the *Bacillus cereus* group are commonly present contaminants of fresh and heat-treated milk. *Food Microbiology* 25, 588-596.
- Bava, L., Zucali, M., Brasca, M., Zanini, L. und Sandrucci, A. (2009). Efficiency of cleaning procedure of milking equipment and bacterial quality of milk. *Italian Journal of Animal Science* 8, 387-389.
- Beaman, T., Greenamyre, J., Corner, T., Pankratz, H. und Gerhardt, P. (1982). Bacterial spore heat resistance correlated with water content, wet density, and protoplast/sporoplast volume ratio. *Journal of bacteriology* 150, 870-877.
- Beeby, R. (1980). The use of fluorescamine at pH 6.0 to follow the action of chymosin on kappa-casein and to estimate this protein in milk. *New Zealand Journal of Dairy Science and Technology* 15, 99-108.
- Beneduzi, A., Costa, P.B., Parma, M., Melo, I.S., Bodanese-Zanettini, M.H. und Passaglia, L.M. (2010). *Paenibacillus riograndensis* sp. nov., a nitrogen-fixing species isolated from the rhizosphere of *Triticum aestivum*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 60, 128-133.
- Berge, O., Guinebretiere, M.-H., Achouak, W., Normand, P. und Heulin, T. (2002). *Paenibacillus graminis* sp. nov. and *Paenibacillus odorifer* sp. nov., isolated from plant roots, soil and food. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52, 607-616.
- Bergere, J., Le Bars, D. und Commissaire, J. (1969). La bactofugation du lait et l'élimination des spores de *Clostridium tyrobutyricum*. *Le Lait* 49, 507-519.
- Bligh, E.G. und Dyer, W.J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian journal of biochemistry and physiology* 37, 911-917.
- Braem, G., De Vliegher, S., Verbist, B., Heyndrickx, M., Leroy, F. und De Vuyst, L. (2012). Culture-independent exploration of the teat apex microbiota of dairy cows reveals a wide bacterial species diversity. *Vet Microbiol* 157, 383-390.
- Bramley, A. und McKinnon, C. (1990). The microbiology of raw milk. *Dairy microbiology* 1, 163-208.
- Buehner, K.P., Anand, S. und Garcia, A. (2014). Prevalence of thermophilic bacteria and spores on 10 Midwest dairy farms. *Journal of Dairy Science* 97, 6777-6784.

- Caplan, Z. und Barbano, D.M. (2013). Shelf life of pasteurized microfiltered milk containing 2% fat. *Journal of Dairy Science* 96, 8035-8046.
- Carrera, M., Zandomeni, R.O. und Sagripanti, J.L. (2008). Wet and dry density of *Bacillus anthracis* and other *Bacillus* species. *Journal of applied microbiology* 105, 68-77.
- Champagne, C.P., Laing, R.R., Roy, D., Mafu, A.A., Griffiths, M.W. und White, C. (1994). Psychrotrophs in dairy products: their effects and their control. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition* 34, 1-30.
- Chawla, R., Patil, G.R. und Singh, A.K. (2011). High hydrostatic pressure technology in dairy processing: a review. *Journal of food science and technology* 48, 260-268.
- Christiansson, A., Bertilsson, J. und Svensson, B. (1999). *Bacillus cereus* Spores in Raw Milk: Factors Affecting the Contamination of Milk During the Grazing Period. *Journal of dairy science* 82, 305-314.
- Claus, D. und Berkeley, R. (1986). "Genus *Bacillus* Cohn 1872," in *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, ed. P.H.A. Sneath. Baltimore: Williams & Wilkins, 1105-1139.
- Collins, E. (1981). Heat resistant psychrotrophic microorganisms. *Journal of dairy science* 64, 157-160.
- Collins, M., Lawson, P., Willems, A., Cordoba, J., Fernandez-Garayzabal, J., Garcia, P., Cai, J., Hippe, H. und Farrow, J. (1994). The phylogeny of the genus *Clostridium*: proposal of five new genera and eleven new species combinations. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 44, 812-826.
- Coorevits, A., De Jonghe, V., Vandroemme, J., Reekmans, R., Heyrman, J., Messens, W., De Vos, P. und Heyndrickx, M. (2008). Comparative analysis of the diversity of aerobic spore-forming bacteria in raw milk from organic and conventional dairy farms. *Systematic and Applied Microbiology* 31, 126-140.
- Datta, N. und Deeth, H.C. (1999). High pressure processing of milk and dairy products. *Australian Journal of Dairy Technology* 54, 41.
- De Jong, P. (1997). Impact and control of fouling in milk processing. *Trends in Food Science & Technology* 8, 401-405.
- De Jonghe, V., Coorevits, A., De Block, J., Van Coillie, E., Grijspeerdt, K., Herman, L., De Vos, P. und Heyndrickx, M. (2010). Toxinogenic and spoilage potential of aerobic spore-formers isolated from raw milk. *Int J Food Microbiol* 136, 318-325.
- Delavenne, E., Mounier, J., Asmani, K., Jany, J.L., Barbier, G. und Le Blay, G. (2011). Fungal diversity in cow, goat and ewe milk. *Int J Food Microbiol* 151, 247-251.
- Delbes, C., Ali-Mandjee, L. und Montel, M.C. (2007). Monitoring bacterial communities in raw milk and cheese by culture-dependent and -independent 16S rRNA gene-based analyses. *Appl Environ Microbiol* 73, 1882-1891.

- Dellaglio, F., Stadhouders, J. und Hup, G. (1969). Distribution of Bacteria between Bottom, Middle and Cream Layers of Creamed Milk. *Netherlands Milk and Dairy Journal* 23, 140-145.
- Den Hertog, A., Klatser, P. und Anthony, R. (2009). Buoyant density of *Mycobacterium tuberculosis*: implications for sputum processing. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease* 13, 466-471.
- Doll, E.V., Scherer, S. und Wenning, M. (2017). Spoilage of Microfiltered and Pasteurized Extended Shelf Life Milk Is Mainly Induced by Psychrotolerant Spore-Forming Bacteria that often Originate from Recontamination. *Frontiers in Microbiology* 8.
- Doyle, C.J., Gleeson, D., O'Toole, P.W. und Cotter, P.D. (2017). Impacts of Seasonal Housing and Teat Preparation on Raw Milk Microbiota: a High-Throughput Sequencing Study. *Applied and Environmental Microbiology* 83, e02694-02616.
- Drancourt, M., Roux, V., Fournier, P.-E. und Raoult, D. (2004). *rpoB* gene sequence-based identification of aerobic Gram-positive cocci of the genera *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Gemella*, *Abiotrophia*, and *Granulicatella*. *Journal of clinical microbiology* 42, 497-504.
- Elo, S., Suominen, I., Kämpfer, P., Juhanoja, J., Salkinoja-Salonen, M. und Haahtela, K. (2001). *Paenibacillus borealis* sp. nov., a nitrogen-fixing species isolated from spruce forest humus in Finland. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 51, 535-545.
- Elwell, M. und Barbano, D. (2006). Use of Microfiltration to Improve Fluid Milk Quality. *Journal of dairy science* 89, E20-E30.
- Eneroth, Å., Christiansson, A., Brendehaug, J. und Molin, G. (1998). Critical contamination sites in the production line of pasteurised milk, with reference to the psychrotrophic spoilage flora. *International Dairy Journal* 8, 829-834.
- Eneroth, Å., Svensson, B., Molin, G. und Christiansson, A. (2001). Contamination of pasteurized milk by *Bacillus cereus* in the filling machine. *Journal of dairy research* 68, 189-196.
- Euzéby, J.P. (1997). List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature: a folder available on the Internet. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 47, 590-592.
- Evans, J.B. und Niven Jr, C. (1951). Nutrition of the heterofermentative lactobacilli that cause greening of cured meat products. *Journal of bacteriology* 62, 599.
- Faccia, M., Mastromatteo, M., Conte, A. und Del Nobile, M.A. (2013). Influence of the milk bacto-fugation and natural whey culture on the microbiological and physico-chemical characteristics of Mozzarella cheese. *Journal of Food Processing and Technology* 4.
- Faille, C., Fontaine, F. und Bénézech, T. (2001). Potential occurrence of adhering living *Bacillus* spores in milk product processing lines. *Journal of Applied Microbiology* 90, 892-900.

- Faille, C., Jullien, C., Fontaine, F., Bellon-Fontaine, M.-N., Slomianny, C. und Benezech, T. (2002). Adhesion of *Bacillus* spores and *Escherichia coli* cells to inert surfaces: role of surface hydrophobicity. *Canadian Journal of Microbiology* 48, 728-738.
- Fang, X.-M., Su, J., Wang, H., Zhang, T., Zhao, L.-L., Liu, H.-Y., Ma, B.-P., Zhang, Y.-Q. und Yu, L.-Y. (2017). *Paenibacillus eucommiae* sp. nov., isolated from a traditional Chinese medicinal herbal plant, *Eucommia ulmoides* Oliver. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 67, 993-997.
- Felis, G.E. und Dellaglio, F. (2007). On species descriptions based on a single strain: proposal to introduce the status species proponenda (sp. pr.). *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 57, 2185-2187.
- Fernandez Garcia, L., Alvarez Blanco, S. und Riera Rodriguez, F.A. (2013). Microfiltration applied to dairy streams: removal of bacteria. *J Sci Food Agric* 93, 187-196.
- Fernández García, L. und Riera Rodríguez, F.A. (2014). Combination of microfiltration and heat treatment for ESL milk production: Impact on shelf life. *Journal of Food Engineering* 128, 1-9.
- Fricke, M., Skånseng, B., Rudi, K., Stessl, B. und Ehling-Schulz, M. (2011). Shift from farm to dairy tank milk microbiota revealed by a polyphasic approach is independent from geographical origin. *International journal of food microbiology* 145, S24-S30.
- Fromm, H.I. und Boor, K. (2004). Characterization of pasteurized fluid milk shelf-life attributes. *Journal of food science* 69, M207-M214.
- Fusco, V., Quero, G.M., Cho, G.-S., Kabisch, J., Meske, D., Neve, H., Bockelmann, W. und Franz, C.M. (2015). The genus *Weissella*: taxonomy, ecology and biotechnological potential. *Frontiers in microbiology* 6.
- Genersch, E., Ashiralieva, A. und Fries, I. (2005). Strain-and genotype-specific differences in virulence of *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*, a bacterial pathogen causing American foulbrood disease in honeybees. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 7551-7555.
- Gésan-Guiziou, G. (2010). Removal of bacteria, spores and somatic cells from milk by centrifugation and microfiltration techniques. *Improving the safety and quality of milk. Volume 1: Milk production and processing*, 349-372.
- Gevers, D., Dawyndt, P., Vandamme, P., Willems, A., Vancanneyt, M., Swings, J. und De Vos, P. (2006). Stepping stones towards a new prokaryotic taxonomy. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 361, 1911-1916.
- Giannino, M.L., Aliprandi, M., Feligini, M., Vanoni, L., Brasca, M. und Fracchetti, F. (2009). A DNA array based assay for the characterization of microbial community in raw milk. *J Microbiol Methods* 78, 181-188.
- Gleeson, D., O'Connell, A. und Jordan, K. (2013). Review of potential sources and control of thermophilic bacteria in bulk-tank milk. *Irish Journal of Agricultural and Food Research*, 217-227.

- Goff, H.D. und Griffiths, M.W. (2006). Major advances in fresh milk and milk products: fluid milk products and frozen desserts. *Journal of Dairy Science* 89, 1163-1173.
- Gopal, N., Hill, C., Ross, P.R., Beresford, T.P., Fenelon, M.A. und Cotter, P.D. (2015). The Prevalence and Control of *Bacillus* and Related Spore-Forming Bacteria in the Dairy Industry. *Frontiers in Microbiology* 6.
- Grady, E.N., MacDonald, J., Liu, L., Richman, A. und Yuan, Z.-C. (2016). Current knowledge and perspectives of *Paenibacillus*: a review. *Microbial cell factories* 15, 203.
- Grant, I.R., Williams, A.G., Rowe, M.T. und Muir, D.D. (2005). Investigation of the impact of simulated commercial centrifugation and microfiltration conditions on levels of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in milk. *International journal of dairy technology* 58, 138-142.
- Gregersen, T. (1978). Rapid method for distinction of Gram-negative from Gram-positive bacteria. *European journal of applied microbiology and biotechnology* 5, 123-127.
- Griffiths, M. und Phillips, J. (1990). Incidence, source and some properties of psychrotrophic *Bacillus* spp. found in raw and pasteurized milk. *International Journal of Dairy Technology* 43, 62-66.
- Gruetzmacher, T.J. und Bradley Jr, R.L. (1999). Identification and control of processing variables that affect the quality and safety of fluid milk. *Journal of food protection* 62, 625-631.
- Guerra, A., Jonsson, G., Rasmussen, A., Waagner Nielsen, E. und Edelsten, D. (1997). Low cross-flow velocity microfiltration of skim milk for removal of bacterial spores. *International dairy journal* 7, 849-861.
- Guo, L.-Y., Xia, J., Ling, S.-K., Chen, G.-J. und Du, Z.-J. (2016). *Marinicrinis sediminis* gen. nov., sp. nov., isolated from marine sediment. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 66, 3725-3730.
- Hall, B.G. (2013). Building phylogenetic trees from molecular data with MEGA. *Molecular biology and evolution* 30, 1229-1235.
- Hantsis-Zacharov, E. und Halpern, M. (2007). Culturable psychrotrophic bacterial communities in raw milk and their proteolytic and lipolytic traits. *Appl Environ Microbiol* 73, 7162-7168.
- Harrigan, W.F. und McCance, M.E. (1976). *Laboratory methods in food and dairy microbiology*. London: Academic Press Inc.
- Harrison, H., Patel, R. und Yousten, A.A. (2000). *Paenibacillus* associated with milky disease in Central and South American scarabs. *Journal of invertebrate pathology* 76, 169-175.
- Harwood, C.R. und Cutting, S.M. (1990). *Molecular biological methods for Bacillus*. Wiley.

- He, H., Dong, J., Lee, C.N. und Li, Y. (2009). Molecular analysis of spoilage-related bacteria in pasteurized milk during refrigeration by PCR and denaturing gradient gel electrophoresis. *Journal of food protection* 72, 572-577.
- Holm, S., Malmberg, R. und Svensson, K. (1986). Method and plant producing milk with low bacterial content. *World Patent WO* 86, 01687.
- Hong, Y.-Y., Ma, Y.-C., Zhou, Y.-G., Gao, F., Liu, H.-C. und Chen, S.-F. (2009). *Paenibacillus sonchi* sp. nov., a nitrogen-fixing species isolated from the rhizosphere of *Sonchus oleraceus*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 59, 2656-2661.
- Huck, J.R., Hammond, B., Murphy, S. und Boor, K.J. (2006). Ecology of psychrotolerant aerobic sporeformers present in dairy production systems. *Journal of Animal Science* 84, 108-108.
- Huck, J.R., Sonnen, M. und Boor, K.J. (2008). Tracking heat-resistant, cold-thriving fluid milk spoilage bacteria from farm to packaged product. *J Dairy Sci* 91, 1218-1228.
- Huck, J.R., Woodcock, N.H., Ralyea, R.D. und Boor, K.J. (2007). Molecular subtyping and characterization of psychrotolerant endospore-forming bacteria in two New York State fluid milk processing systems. *Journal of Food Protection* 70, 2354-2364.
- Ivy, R.A., Ranieri, M.L., Martin, N.H., den Bakker, H.C., Xavier, B.M., Wiedmann, M. und Boor, K.J. (2012). Identification and characterization of psychrotolerant sporeformers associated with fluid milk production and processing. *Appl Environ Microbiol* 78, 1853-1864.
- Jackson, E.E., Erten, E.S., Maddi, N., Graham, T.E., Larkin, J.W., Blodgett, R.J., Schlessler, J.E. und Reddy, R.M. (2012). Detection and enumeration of four foodborne pathogens in raw commingled silo milk in the United States. *Journal of food protection* 75, 1382-1393.
- Jin, H.-J., Zhou, Y.-G., Liu, H.-C. und Chen, S.-F. (2011). *Paenibacillus jilunlii* sp. nov., a nitrogen-fixing species isolated from the rhizosphere of *Begonia semperflorens*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 61, 1350-1355.
- Kagkli, D.M., Vancanneyt, M., Hill, C., Vandamme, P. und Cogan, T.M. (2007). *Enterococcus* and *Lactobacillus* contamination of raw milk in a farm dairy environment. *Int J Food Microbiol* 114, 243-251.
- Kämpfer, P. (1994). Limits and possibilities of total fatty acid analysis for classification and identification of *Bacillus* species. *Systematic and Applied Microbiology* 17, 86-98.
- Kämpfer, P. (2002). Whole-Cell Fatty Acid Analysis in the Systematics of *Bacillus* and Related Genera. *Applications and Systematics of Bacillus and Relatives*, 271-299.
- Kämpfer, P. und Kroppenstedt, R.M. (1996). Numerical analysis of fatty acid patterns of coryneform bacteria and related taxa. *Canadian journal of microbiology* 42, 989-1005.
- Kämpfer, P., Rosselló-Mora, R., Falsen, E., Busse, H.-J. und Tindall, B.J. (2006). *Cohnella thermotolerans* gen. nov., sp. nov., and classification of 'Paenibacillus

- hongkongensis*' as *Cohnella hongkongensis* sp. nov. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 56, 781-786.
- Kaufmann, V., Scherer, S. und Kulozik, U. (2010). Verfahren zur Verlängerung der Haltbarkeit von Konsummilch und ihre stofflichen Veränderungen: ESL-Milch. *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit* 5, 59-64.
- Kessler, H. (1988). in *Lebensmittel- und Bioverfahrenstechnik – Molkereitechnologie*. Freising: Kessler H.G.
- Kim, M., Oh, H.-S., Park, S.-C. und Chun, J. (2014). Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 64, 346-351.
- Kim, O.-S., Cho, Y.-J., Lee, K., Yoon, S.-H., Kim, M., Na, H., Park, S.-C., Jeon, Y.S., Lee, J.-H. und Yi, H. (2012). Introducing EzTaxon-e: a prokaryotic 16S rRNA gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 62, 716-721.
- Kocak, H.R. und Zadow, J.G. (1985). Age gelation of UHT whole milk as influenced by storage-temperature. *Australian Journal of Dairy Technology* 40, 14-21.
- Kosikowski, F. und Fox, P. (1968). Low Heat, Hydrogen Peroxide, and Bactofugation Treatments of Milk to Control Coliforms in Cheddar Cheese¹. *Journal of Dairy Science* 51, 1018-1022.
- Kumari, S. und Sarkar, P.K. (2016). *Bacillus cereus* hazard and control in industrial dairy processing environment. *Food Control* 69, 20-29.
- Kuykendall, L., Roy, M., O'Neill, J. und Devine, T. (1988). Fatty acids, antibiotic resistance, and deoxyribonucleic acid homology groups of *Bradyrhizobium japonicum*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 38, 358-361.
- Larsen, H. und Jørgensen, K. (1997). The occurrence of *Bacillus cereus* in Danish pasteurized milk. *International journal of food microbiology* 34, 179-186.
- Lechner, S., Mayr, R., Francis, K.P., Prüß, B.M., Kaplan, T., Wießner-Gunkel, E., Stewart, G.S.A.B. und Scherer, S. (1998). *Bacillus weihenstephanensis* sp. nov. is a new psychrotolerant species of the *Bacillus cereus* group. *International Journal of Systematic Bacteriology* 48, 1373-1382.
- Lewis, C.L., Craig, C.C. und Senecal, A.G. (2014). Mass and density measurements of live and dead gram-negative and gram-positive bacterial populations. *Applied and environmental microbiology* 80, 3622-3631.
- Lin, S., Schraft, H., Odumeru, J.A. und Griffiths, M.W. (1998). Identification of contamination sources of *Bacillus cereus* in pasteurized milk. *International Journal of Food Microbiology* 43, 159-171.
- Logan, N.A., Berge, O., Bishop, A.H., Busse, H.-J., De Vos, P., Fritze, D., Heyndrickx, M., Kämpfer, P., Rabinovitch, L. und Salkinoja-Salonen, M.S. (2009). Proposed minimal

- standards for describing new taxa of aerobic, endospore-forming bacteria. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 59, 2114-2121.
- Logan, N.A. und Vos, P.D. (2015). "*Bacillus*," in *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*, ed. W.B. Whitman. Baltimore: John Wiley & Sons, Ltd.
- Lopez-Benavides, M.G., Williamson, J.H., Pullinger, G.D., Lacy-Hulbert, S.J., Cursons, R.T. und Leigh, J.A. (2007). Field observations on the variation of *Streptococcus uberis* populations in a pasture-based dairy farm. *J Dairy Sci* 90, 5558-5566.
- Ludwig, W. und Klenk, H.-P. (2005). "Overview: a phylogenetic backbone and taxonomic framework for procaryotic systematics," in *Bergey's manual of systematic bacteriology*, eds. D.J. Brenner, N.R. Krieg, J.T. Staley & G.M. Garrity. New York: Springer, 49-66.
- Ludwig, W., Strunk, O., Klugbauer, S., Klugbauer, N., Weizenegger, M., Neumaier, J., Bachleitner, M. und Schleifer, K.H. (1998). Bacterial phylogeny based on comparative sequence analysis. *Electrophoresis* 19, 554-568.
- Madec, M., Mejean, S. und Maubois, J. (1992). Retention of *Listeria* and *Salmonella* cells contaminating skim milk by tangential membrane microfiltration. *Le Lait* 72, 327-332.
- Magnusson, M., Christiansson, A. und Svensson, B. (2007a). *Bacillus cereus* spores during housing of dairy cows: factors affecting contamination of raw milk. *J Dairy Sci* 90, 2745-2754.
- Magnusson, M., Svensson, B., Kolstrup, C. und Christiansson, A. (2007b). *Bacillus cereus* in free-stall bedding. *Journal of dairy science* 90, 5473-5482.
- Malek, F., Moussa-Boudjemacirc, B., Khaouani-Yousfi, F., Kalai, A. und Kihel, M. (2012). Microflora of biofilm on Algerian dairy processing lines: An approach to improve microbial quality of pasteurized milk. *African Journal of Microbiology Research* 6, 3836-3844.
- Mallet, A., Guéguen, M., Kauffmann, F., Chesneau, C., Sesboué, A. und Desmasures, N. (2012). Quantitative and qualitative microbial analysis of raw milk reveals substantial diversity influenced by herd management practices. *International Dairy Journal* 27, 13-21.
- Martin, N., Ranieri, M., Murphy, S., Ralyea, R., Wiedmann, M. und Boor, K. (2011). Results from raw milk microbiological tests do not predict the shelf-life performance of commercially pasteurized fluid milk. *Journal of dairy science* 94, 1211-1222.
- Masiello, S.N., Martin, N.H., Watters, R.D., Galton, D.M., Schukken, Y.H., Wiedmann, M. und Boor, K.J. (2014). Identification of dairy farm management practices associated with the presence of psychrotolerant sporeformers in bulk tank milk. *Journal of dairy science* 97, 4083-4096.
- Masoud, W., Vogensen, F.K., Lillevang, S., Abu Al-Soud, W., Sorensen, S.J. und Jakobsen, M. (2012). The fate of indigenous microbiota, starter cultures, *Escherichia coli*, *Listeria innocua* and *Staphylococcus aureus* in Danish raw milk and cheeses determined by pyrosequencing and quantitative real time (qRT)-PCR. *Int J Food Microbiol* 153, 192-202.

- Matta, H. und Punj, V. (1999). Isolation and identification of lipolytic, psychrotrophic, spore forming bacteria from raw milk. *International journal of dairy technology* 52, 59-62.
- Maubois, J. (2002). Membrane microfiltration: a tool for a new approach in dairy technology. *Australian Journal of Dairy Technology* 57, 92.
- Mayilraj, S. und Stackebrandt, E. (2014). "The Family *Paenibacillaceae*," in *The Prokaryotes*, ed. E. Rosenberg. Heidelberg: Springer, 267-280.
- Mayr, R., Eppert, I. und Scherer, S. (1999). Incidence and identification of psychrotrophic (7°C-tolerant) *Bacillus* spp. in german HTST pasteurized milk. *Milchwissenschaft* 54, 26-30.
- Mayr, R., Gutser, K., Busse, M. und Seiler, H. (2004). Gram positive non-sporeforming recontaminants are frequent spoilage organisms of German retail ESL (extended shelf life) milk. *Milchwissenschaft* 59, 262-266.
- McCarthy, O.J. (2011). "Plant and Equipment Centrifuges and Separators: Applications in the Dairy Industry," in *Encyclopedia of Dairy Sciences (Second Edition)*. San Diego: Academic Press, 175-183.
- McGuiggan, J., McCleery, D.R., Hannan, A. und Gilmour, A. (2002). Aerobic spore-forming bacteria in bulk raw milk: factors influencing the numbers of psychrotrophic, mesophilic and thermophilic *Bacillus* spores. *International journal of dairy technology* 55, 100-107.
- McKellar, R. (1981). Development of off-flavors in ultra-high temperature and pasteurized milk as a function of proteolysis. *Journal of Dairy Science* 64, 2138-2145.
- McKinnon, C.H. und Pettipher, G.L. (1983). A survey of sources of heat-resistant bacteria in milk with particular reference to psychrotrophic spore-forming bacteria. *Journal of dairy research* 50, 163-170.
- Meer, R., Baker, J., Bodyfelt, F. und Griffiths, M. (1991). Psychrotrophic *Bacillus* spp. in fluid milk products: a review. *Journal of Food Protection* 54, 969-979.
- Mende, D.R., Sunagawa, S., Zeller, G. und Bork, P. (2013). Accurate and universal delineation of prokaryotic species. *Nature methods* 10, 881-884.
- Miller, L.T. (1982). Single derivatization method for routine analysis of bacterial whole-cell fatty acid methyl esters, including hydroxy acids. *Journal of Clinical Microbiology* 16, 584-586.
- Miller, R.A., Kent, D.J., Boor, K.J., Martin, N.H. und Wiedmann, M. (2015a). Different management practices are associated with mesophilic and thermophilic spore levels in bulk tank raw milk. *Journal of dairy science* 98, 4338-4351.
- Miller, R.A., Kent, D.J., Watterson, M.J., Boor, K.J., Martin, N.H. und Wiedmann, M. (2015b). Spore populations among bulk tank raw milk and dairy powders are significantly different. *Journal of dairy science* 98, 8492-8504.
- Moyer, C.L. und Morita, R.Y. (2007). Psychrophiles and psychrotrophs. *eLS*.

- Mugadza, D.T. und Buys, E.M. (2017). Diversity of *Bacillus cereus* strains in extended shelf life. *International Dairy Journal*.
- Muir, D. (1990). The microbiology of heat-treated fluid milk products. *Dairy microbiology* 1, 209-243.
- Naumann, D. (2000). Infrared spectroscopy in microbiology. *Encyclopedia of analytical chemistry*.
- Nilsson, J., Svensson, B., Ekelund, K. und Christiansson, A. (1998). A RAPD-PCR method for large-scale typing of *Bacillus cereus*. *Letters in applied microbiology* 27, 168-172.
- Novak, J.S., Call, J., Tomasula, P. und Luchansky, J.B. (2005). An assessment of pasteurization treatment of water, media, and milk with respect to *Bacillus* spores. *Journal of Food Protection* 68, 751-757.
- O'Connell, A., Ruegg, P., Jordan, K., O'Brien, B. und Gleeson, D. (2016). The effect of storage temperature and duration on the microbial quality of bulk tank milk. *Journal of dairy science* 99, 3367-3374.
- Oberreuter, H., Seiler, H. und Scherer, S. (2002). Identification of coryneform bacteria and related taxa by Fourier-transform infrared (FT-IR) spectroscopy. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 52, 91-100.
- Olesen, N. und Jensen, F. (1989). Microfiltration. The influence of operation parameters on the process. *Milchwissenschaft* 44, 476-479.
- Orsburn, B., Melville, S.B. und Popham, D.L. (2008). Factors contributing to heat resistance of *Clostridium perfringens* endospores. *Applied and environmental microbiology* 74, 3328-3335.
- Páčová, Z., Švec, P., Stenfors, L.P., Vyleťelová, M. und Sedláček, I. (2003). Isolation of the psychrotolerant species *Bacillus weihenstephanensis* from raw cow's milk. *Czech J Anim Sci* 48, 93-96.
- Pafylas, I., Cheryan, M., Mehaia, M. und Saglam, N. (1996). Microfiltration of milk with ceramic membranes. *Food research international* 29, 141-146.
- Parte, A.C. (2014). LPSN—list of prokaryotic names with standing in nomenclature. *Nucleic acids research* 42, D613-D616.
- Peña, W.E.L., de Andrade, N.J., Soares, N.F., Alvarenga, V.O., Junior, S.R., Granato, D., Zuniga, A.D.G. und de Souza Sant'Ana, A. (2014). Modelling *Bacillus cereus* adhesion on stainless steel surface as affected by temperature, pH and time. *International Dairy Journal* 34, 153-158.
- Peng, J.-S., Tsai, W.-C. und Chou, C.-C. (2002). Inactivation and removal of *Bacillus cereus* by sanitizer and detergent. *International journal of food microbiology* 77, 11-18.
- Quigley, L., McCarthy, R., O'Sullivan, O., Beresford, T.P., Fitzgerald, G.F., Ross, R.P., Stanton, C. und Cotter, P.D. (2013a). The microbial content of raw and pasteurized cow milk as determined by molecular approaches. *J Dairy Sci* 96, 4928-4937.

- Quigley, L., O'Sullivan, O., Stanton, C., Beresford, T.P., Ross, R.P., Fitzgerald, G.F. und Cotter, P.D. (2013b). The complex microbiota of raw milk. *FEMS Microbiol Rev* 37, 664-698.
- Raats, D., Offek, M., Minz, D. und Halpern, M. (2011). Molecular analysis of bacterial communities in raw cow milk and the impact of refrigeration on its structure and dynamics. *Food Microbiol* 28, 465-471.
- Ralyea, R.D., Wiedmann, M. und Boor, K.J. (1998). Bacterial tracking in a dairy production system using phenotypic and ribotyping methods. *Journal of Food Protection* 61, 1336-1340.
- Ranieri, M.L. und Boor, K.J. (2009). Short communication: bacterial ecology of high-temperature, short-time pasteurized milk processed in the United States. *J Dairy Sci* 92, 4833-4840.
- Ranieri, M.L., Huck, J.R., Sonnen, M., Barbano, D.M. und Boor, K.J. (2009). High temperature, short time pasteurization temperatures inversely affect bacterial numbers during refrigerated storage of pasteurized fluid milk. *J Dairy Sci* 92, 4823-4832.
- Ranieri, M.L., Ivy, R.A., Mitchell, W.R., Call, E., Masiello, S.N., Wiedmann, M. und Boor, K.J. (2012). Real-time PCR detection of *Paenibacillus* spp. in raw milk to predict shelf life performance of pasteurized fluid milk products. *Appl Environ Microbiol* 78, 5855-5863.
- Rasolofo, E.A., St-Gelais, D., LaPointe, G. und Roy, D. (2010). Molecular analysis of bacterial population structure and dynamics during cold storage of untreated and treated milk. *Int J Food Microbiol* 138, 108-118.
- Reasoner, D.J. und Geldreich, E. (1985). A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water. *Applied and environmental microbiology* 49, 1-7.
- Reddy, C., Beveridge, T.J., Breznak, J.A. und Marzluf, G. (2007). *Methods for general and molecular microbiology*. American Society for Microbiology Press.
- Reinemann, D.J., Wolters, G., Billon, P., Lind, O. und Rasmussen, M.D. (2003). Review of practices for cleaning and sanitation of milking machines. *Bulletin-International Dairy Federation*, 3-18.
- Rhuland, L.E., Work, E., Denman, R.F. und Hoare, D.S. (1955). The Behavior of the Isomers of α,ϵ -Diaminopimelic Acid on Paper Chromatograms. *Journal of the American Chemical Society* 77, 4844-4846.
- Ribeiro, M.C., da Silva Fernandes, M., Kuaye, A.Y., Jimenez-Flores, R. und Gigante, M. (2017). Preconditioning of the stainless steel surface affects the adhesion of *Bacillus cereus* spores. *International Dairy Journal* 66, 108-114.
- Rivas, R., García-Fraile, P., Zurdo-Pineiro, J.L., Mateos, P.F., Martínez-Molina, E., Bedmar, E.J., Sanchez-Raya, J. und Velazquez, E. (2008). *Saccharibacillus sacchari* gen. nov., sp. nov., isolated from sugar cane. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 58, 1850-1854.

- Rodrigues, M., Lima, S., Canniatti-Brazaca, S. und Bicalho, R. (2017). The microbiome of bulk tank milk: Characterization and associations with somatic cell count and bacterial count. *Journal of Dairy Science*.
- Rosselló-Mora, R. und Amann, R. (2001). The species concept for prokaryotes. *FEMS microbiology reviews* 25, 39-67.
- Saha, P., Krishnamurthi, S., Bhattacharya, A., Sharma, R. und Chakrabarti, T. (2010). *Fontibacillus aquaticus* gen. nov., sp. nov., isolated from a warm spring. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 60, 422-428.
- Sakai, M., Deguchi, D., Hosoda, A., Kawauchi, T. und Ikenaga, M. (2015). *Ammoniibacillus agariperforans* gen. nov., sp. nov., a thermophilic, agar-degrading bacterium isolated from compost. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 65, 570-577.
- Saleh-Lakha, S., Leon-Velarde, C.G., Chen, S., Lee, S., Shannon, K., Fabri, M., Downing, G. und Keown, B. (2017). A Study To Assess the Numbers and Prevalence of *Bacillus cereus* and Its Toxins in Pasteurized Fluid Milk. *Journal of Food Protection* 80, 1085-1089.
- Salustiano, V.C., Andrade, N.J., Soares, N.F.F., Lima, J.C., Bernardes, P.C., Luiz, L.M.P. und Fernandes, P.E. (2009). Contamination of milk with *Bacillus cereus* by post-pasteurization surface exposure as evaluated by automated ribotyping. *Food Control* 20, 439-442.
- Samelis, J., Lianou, A., Kakouri, A., Delbes, C., Rogelj, I., Bogovic-Matijasic, B. und Montel, M.-C. (2009). Changes in the microbial composition of raw milk induced by thermization treatments applied prior to traditional Greek hard cheese processing. *Journal of food protection* 72, 783-790.
- Santos, M., Ma, Y., Caplan, Z. und Barbano, D. (2003). Sensory threshold of off-flavors caused by proteolysis and lipolysis in milk. *Journal of Dairy Science* 86, 1601-1607.
- Sarkar, S.K.P.K. (2017). Quantitative risk assessment of human exposure to *Bacillus cereus* group associated with household refrigerated storage of pasteurised milk in India. *Indian J Dairy Sci* 70, 2.
- Schleifer, K.H. und Kloos, W.E. (1975). Isolation and characterization of Staphylococci from human skin I. Amended descriptions of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus saprophyticus* and descriptions of three new species: *Staphylococcus cohnii*, *Staphylococcus haemolyticus*, and *Staphylococcus xylosus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 25, 50-61.
- Schmidt, V.S., Kaufmann, V., Kulozik, U., Scherer, S. und Wenning, M. (2012). Microbial biodiversity, quality and shelf life of microfiltered and pasteurized extended shelf life (ESL) milk from Germany, Austria and Switzerland. *Int J Food Microbiol* 154, 1-9.
- Schraft, H., Steele, M., McNab, B., Odumeru, J. und Griffiths, M.W. (1996). Epidemiological typing of *Bacillus* spp. isolated from food. *Applied and environmental microbiology* 62, 4229-4232.

- Schröder, M.J. (1984). Origins and levels of post pasteurization contamination of milk in the dairy and their effects on keeping quality. *Journal of Dairy Research* 51, 59-67.
- Schumann, P. (2011). "Peptidoglycan Structure," in *Methods in Microbiology, Vol 38: Taxonomy of Prokaryotes*, eds. F. Rainey & A. Oren. 101-129.
- Sharma, M. und Anand, S. (2002). Characterization of constitutive microflora of biofilms in dairy processing lines. *Food Microbiology* 19, 627-636.
- Shida, O., Takagi, H., Kadowaki, K. und Komagata, K. (1996). Proposal for Two New Genera, *Brevibacillus* gen. nov. and *Aneurinibacillus* gen. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 46, 939-946.
- Shida, O., Takagi, H., Kadowaki, K., Nakamura, L.K. und Komagata, K. (1997a). Emended Description of *Paenibacillus amylolyticus* and Description of *Paenibacillus illinoisensis* sp. nov. and *Paenibacillus chibensis* sp. nov. *International journal of systematic bacteriology* 47, 299-306.
- Shida, O., Takagi, H., Kadowaki, K., Nakamura, L.K. und Komagata, K. (1997b). Transfer of *Bacillus alginolyticus*, *Bacillus chondroitinus*, *Bacillus curdlanolyticus*, *Bacillus glucanolyticus*, *Bacillus kobensis*, and *Bacillus thiaminolyticus* to the genus *Paenibacillus* and emended description of the genus *Paenibacillus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 47, 289-298.
- Shittu, A., Lin, J., Morrison, D. und Kolawole, D. (2004). Isolation and molecular characterization of multiresistant *Staphylococcus sciuri* and *Staphylococcus haemolyticus* associated with skin and soft-tissue infections. *Journal of medical microbiology* 53, 51-55.
- Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T.J., Karplus, K., Li, W., Lopez, R., McWilliam, H., Remmert, M. und Söding, J. (2011). Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Molecular systems biology* 7, 539.
- Simonart, P. (1959). The removal of bacteria from milk by supercentrifugation. *The Netherlands Milk and Dairy Journal* 13, 100-112.
- Slaghuis, B.A., Te Giffel, M.C., Beumer, R.R. und André, G. (1997). Effect of pasturing on the incidence of *Bacillus cereus* spores in raw milk. *International dairy journal* 7, 201-205.
- Sørhaug, T. und Stepaniak, L. (1997). Psychrotrophs and their enzymes in milk and dairy products: quality aspects. *Trends in Food Science & Technology* 8, 35-41.
- Stackebrandt, E. (2006). Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards. *Microbiol. Today Nov* 6, 152-155.
- Stackebrandt, E., Frederiksen, W., Garrity, G.M., Grimont, P.A., Kämpfer, P., Maiden, M.C., Nesme, X., Rosselló-Mora, R., Swings, J. und Trüper, H.G. (2002). Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 52, 1043-1047.

- Stackebrandt, E. und Goebel, B. (1994). Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 44, 846-849.
- Stoeckel, M., Lidolt, M., Achberger, V., Glück, C., Krewinkel, M., Stressler, T., von Neubeck, M., Wenning, M., Scherer, S. und Fischer, L. (2016). Growth of *Pseudomonas weihenstephanensis*, *Pseudomonas proteolytica* and *Pseudomonas* sp. in raw milk: Impact of residual heat-stable enzyme activity on stability of UHT milk during shelf-life. *International Dairy Journal* 59, 20-28.
- Sutherland, A. und Murdoch, R. (1994). Seasonal occurrence of psychrotrophic *Bacillus* species in raw milk, and studies on the interactions with mesophilic *Bacillus* sp. *International journal of food microbiology* 21, 279-292.
- Svensson, B., Ekelund, K., Ogura, H. und Christiansson, A. (2004). Characterisation of *Bacillus cereus* isolated from milk silo tanks at eight different dairy plants. *International Dairy Journal* 14, 17-27.
- Svensson, B., Eneroth, Å., Brendehaug, J. und Christiansson, A. (1999). Investigation of *Bacillus cereus* contamination sites in a dairy plant with RAPD-PCR. *International dairy journal* 9, 903-912.
- Svensson, B., Eneroth, Å., Brendehaug, J., Molin, G. und Christiansson, A. (2000). Involvement of a pasteurizer in the contamination of milk by *Bacillus cereus* in a commercial dairy plant. *Journal of dairy research* 67, 455-460.
- Switt, A.I.M., Andrus, A.D., Ranieri, M.L., Orsi, R.H., Ivy, R., den Bakker, H.C., Martin, N.H., Wiedmann, M. und Boor, K.J. (2014). Genomic comparison of sporeforming bacilli isolated from milk. *BMC genomics* 15, 26.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipowski, A. und Kumar, S. (2013). MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular biology and evolution*, mst197.
- Te Giffel, M., Beumer, R., Granum, P. und Rombouts, F. (1997a). Isolation and characterisation of *Bacillus cereus* from pasteurised milk in household refrigerators in the Netherlands. *International journal of food microbiology* 34, 307-318.
- Te Giffel, M., Van Asselt, A. und de Jong, P. (2006). Shelf extension. *Dairy industries international* 71.
- Te Giffel, M. und Van Der Horst, H. (2004). Comparison between bactofugation and microfiltration regarding efficiency of somatic cell and bacteria removal. *Bulletin-International Dairy Federation*, 49-53.
- Te Giffel, M.C., Beumer, R.R., Langeveld, L.P.M. und Rombouts, F.M. (1997b). The role of heat exchangers in the contamination of milk with *Bacillus cereus* in dairy processing plants. *International Journal of Dairy Technology* 50, 43-47.
- Te Giffel, M.t., Wagendorp, A., Herrewegh, A. und Driehuis, F. (2002). Bacterial spores in silage and raw milk. *Antonie van Leeuwenhoek* 81, 625-630.

- Tindall, B. (1990a). A comparative study of the lipid composition of *Halobacterium saccharovorum* from various sources. *Systematic and Applied Microbiology* 13, 128-130.
- Tindall, B. (1990b). Lipid composition of *Halobacterium lacusprofundi*. *FEMS microbiology letters* 66, 199-202.
- Tindall, B.J., Rosselló-Móra, R., Busse, H.-J., Ludwig, W. und Kämpfer, P. (2010). Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 60, 249-266.
- Tindall, B.J., Sikorski, J., Smibert, R.A. und Krieg, N.R. (2007). "Phenotypic characterization and the principles of comparative systematics," in *Methods for General and Molecular Microbiology, Third Edition*. American Society of Microbiology, 330-393.
- Tohno, M., Sakamoto, M., Ohkuma, M. und Tajima, K. (2016). *Paenibacillus silagei* sp. nov. isolated from corn silage. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 66, 3873-3877.
- Tolle, A. (1980). The microflora of the udder. *Factors Influencing the Bacteriological Quality of Raw Milk. Document* 120, p4.
- Tomasula, P.M., Mukhopadhyay, S., Datta, N., Porto-Fett, A., Call, J.E., Luchansky, J.B., Renye, J. und Tunick, M. (2011). Pilot-scale crossflow-microfiltration and pasteurization to remove spores of *Bacillus anthracis* (Sterne) from milk. *J Dairy Sci* 94, 4277-4291.
- Torres-Anjel, M.J. und Hedrick, T. (1971). Spore removal by centrifugation and its effect on ultra-high temperature commercial sterilization of milk. *Journal of dairy science* 54, 326-330.
- Touzel, J.P., O'Donohue, M., Debeire, P., Samain, E. und Breton, C. (2000). *Thermobacillus xylanilyticus* gen. nov., sp. nov., a new aerobic thermophilic xylan-degrading bacterium isolated from farm soil. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 50, 315-320.
- Trmčić, A., Martin, N.H., Boor, K.J. und Wiedmann, M. (2015). A standard bacterial isolate set for research on contemporary dairy spoilage. *Journal of Dairy Science* 98, 5806-5817.
- Trouvé, E., Maubois, J., Piot, M., Madec, M., Fauquant, J., Rouault, A., Tabard, J. und Brinkman, G. (1991). Rétention de différentes espèces microbiennes lors de l'épuration du lait par microfiltration en flux tangentiel. *Le Lait* 71, 1-13.
- Vacheyrou, M., Normand, A.C., Guyot, P., Cassagne, C., Piarroux, R. und Bouton, Y. (2011). Cultivable microbial communities in raw cow milk and potential transfers from stables of sixteen French farms. *Int J Food Microbiol* 146, 253-262.
- Vandamme, P., Pot, B., Gillis, M., De Vos, P., Kersters, K. und Swings, J. (1996). Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiological reviews* 60, 407-438.

- Vissers, M.M., Te Giffel, M.C., Driehuis, F., De Jong, P. und Lankveld, J.M. (2007). Minimizing the level of *Bacillus cereus* spores in farm tank milk. *J Dairy Sci* 90, 3286-3293.
- Vithanage, N.R., Dissanayake, M., Bolge, G., Palombo, E.A., Yeager, T.R. und Datta, N. (2016). Biodiversity of culturable psychrotrophic microbiota in raw milk attributable to refrigeration conditions, seasonality and their spoilage potential. *International Dairy Journal* 57, 80-90.
- Vithanage, N.R., Dissanayake, M., Bolge, G., Palombo, E.A., Yeager, T.R. und Datta, N. (2017). Microbiological quality of raw milk attributable to prolonged refrigeration conditions. *Journal of Dairy Research* 84, 92-101.
- Von Neubeck, M., Baur, C., Krewinkel, M., Stoeckel, M., Kranz, B., Stressler, T., Fischer, L., Hinrichs, J., Scherer, S. und Wenning, M. (2015). Biodiversity of refrigerated raw milk microbiota and their enzymatic spoilage potential. *International journal of food microbiology* 211, 57-65.
- Von Neubeck, M., Huptas, C., Glück, C., Krewinkel, M., Stoeckel, M., Stressler, T., Fischer, L., Hinrichs, J., Scherer, S. und Wenning, M. (2016). *Pseudomonas helleri* sp. nov. and *Pseudomonas weihenstephanensis* sp. nov., isolated from raw cow's milk. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 66, 1163-1173.
- Vos, P.D., Ludwig, W., Schleifer, K.H. und Whitman, W.B. (2009). “*Paenibacillaceae*” fam. nov. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*.
- Walkling-Ribeiro, M., Rodríguez-González, O., Jayaram, S. und Griffiths, M.W. (2011). Microbial inactivation and shelf life comparison of ‘cold’ hurdle processing with pulsed electric fields and microfiltration, and conventional thermal pasteurisation in skim milk. *International Journal of Food Microbiology* 144, 379-386.
- Wayne, L., Brenner, D., Colwell, R., Grimont, P., Kandler, O., Krichevsky, M., Moore, L., Moore, W., Murray, R. und Stackebrandt, E. (1987). Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 37, 463-464.
- Weber, M., Geißert, J., Kruse, M. und Lipski, A. (2014). Comparative analysis of bacterial community composition in bulk tank raw milk by culture-dependent and culture-independent methods using the viability dye propidium monoazide. *Journal of dairy science* 97, 6761-6776.
- Wenning, M., Breitenwieser, F., Konrad, R., Huber, I., Busch, U. und Scherer, S. (2014). Identification and differentiation of food-related bacteria: A comparison of FTIR spectroscopy and MALDI-TOF mass spectrometry. *Journal of Microbiological Methods* 103, 44-52.
- Wenning, M. und Scherer, S. (2013). Identification of microorganisms by FTIR spectroscopy: perspectives and limitations of the method. *Applied microbiology and biotechnology* 97, 7111-7120.
- Wijman, J.G., de Leeuw, P.P., Moezelaar, R., Zwietering, M.H. und Abee, T. (2007). Air-liquid interface biofilms of *Bacillus cereus*: formation, sporulation, and dispersion. *Applied and environmental microbiology* 73, 1481-1488.

- Williams, J.G., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A. und Tingey, S.V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic acids research* 18, 6531-6535.
- Willis, A. (1960). The lipolytic activity of some clostridia. *The Journal of Pathology* 80, 379-390.
- Wirtanen, G., Husmark, U. und Mattila-Sandholm, T. (1996). Microbial evaluation of the biotransfer potential from surfaces with *Bacillus* biofilms after rinsing and cleaning procedures in closed food-processing systems. *Journal of Food Protection* 59, 727-733.
- Xie, J.-B., Du, Z., Bai, L., Tian, C., Zhang, Y., Xie, J.-Y., Wang, T., Liu, X., Chen, X. und Cheng, Q. (2014). Comparative genomic analysis of N₂-fixing and non-N₂-fixing *Paenibacillus* spp.: organization, evolution and expression of the nitrogen fixation genes. *PLoS genetics* 10, e1004231.
- Xie, J., Shi, H., Du, Z., Wang, T., Liu, X. und Chen, S. (2016). Comparative genomic and functional analysis reveal conservation of plant growth promoting traits in *Paenibacillus polymyxa* and its closely related species. *Scientific reports* 6, 21329.
- Xu, P., Li, W.-J., Tang, S.-K., Zhang, Y.-Q., Chen, G.-Z., Chen, H.-H., Xu, L.-H. und Jiang, C.-L. (2005). *Naxibacter alkalitolerans* gen. nov., sp. nov., a novel member of the family 'Oxalobacteraceae' isolated from China. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55, 1149-1153.
- Yarza, P., Ludwig, W., Euzéby, J., Amann, R., Schleifer, K.-H., Glöckner, F.O. und Rosselló-Móra, R. (2010). Update of the All-Species Living Tree Project based on 16S and 23S rRNA sequence analyses. *Systematic and applied microbiology* 33, 291-299.
- Yarza, P., Munoz, R., Euzéby, J., Ludwig, W., Schleifer, K.-H., Amann, R., Glöckner, F.O. und Rosselló-Móra, R. (2015). "All-Species Living Tree Project," in *Encyclopedia of Metagenomics*. Springer, 25-33.
- Yarza, P., Richter, M., Peplies, J., Euzéby, J., Amann, R., Schleifer, K.-H., Ludwig, W., Glöckner, F.O. und Rosselló-Móra, R. (2008). The All-Species Living Tree project: a 16S rRNA-based phylogenetic tree of all sequenced type strains. *Systematic and applied microbiology* 31, 241-250.
- Yoon, S.-H., Ha, S.-M., Kwon, S., Lim, J., Kim, Y., Seo, H. und Chun, J. (2017). Introducing EzBioCloud: a taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 67, 1613-1617.
- Zaitsev, G.M., Tsitko, I.V., Rainey, F.A., Trotsenko, Y.A., Uotila, J.S., Stackebrandt, E. und Salkinoja-Salonen, M.S. (1998). New aerobic ammonium-dependent obligately oxalotrophic bacteria: description of *Ammoniphilus oxalaticus* gen. nov., sp. nov. and *Ammoniphilus oxalivorans* gen. nov., sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 48, 151-163.

DANKSAGUNG

Mein ausdrücklicher Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Siegfried Scherer, der es mir ermöglicht hat, diese Arbeit an seinem Lehrstuhl anzufertigen. Danke für die Zeit, die Sie in die Korrektur meiner Arbeiten investiert haben und die jederzeit offene Türe!

Für die bereitwillige Übernahme des Zweitgutachtens bedanke ich mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. Rudi Vogel.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Dr. Mareike Wenning für die hervorragende, professionelle und warmherzige Betreuung. Vielen Dank für deinen kompetenten Rat, die konstruktiven Diskussionen während der gesamten Arbeit, die vielen Möglichkeiten mich weiterzuentwickeln und nicht zuletzt die beruhigenden Worte, die ab und zu nötig waren. Ich hätte mir keine bessere Betreuerin wünschen können!

Des Weiteren möchte ich mich bei Lisa Rieder, Sonja Dandl, Charon Fuhrmann, Inge Celler und Petra Hartberger für die zuverlässige, technische Unterstützung bedanken. Mit ihrer herzlichen Art, ihrer Hilfsbereitschaft und tollen Gesprächen haben sie mir die Zeit im Labor versüßt. Auch bei meinen Studenten Eva Opferkuch, Janine König, Sophia Knox, Annika Claus, Kerstin Schild, Melanie Ismayer, Patricia Nickel und Nele Pingel möchte ich mich für den Fleiß und das Engagement bedanken, mit denen sie mir große Freude bereitet und mich auf Trab gehalten haben.

Vielen Dank auch an alle Kollegen, die für das tolle Arbeitsklima am Institut sorgen, an meine ehemaligen und heutigen Bürokollegen Mario von Neubeck, Christopher Huptas und Genia Lücking für die Unterstützung und die guten Gespräche und an Katharina Springer und Lena Staib für ihre wertvolle Freundschaft durch alle Höhen und Tiefen der Doktorandenzeit.

Zum Schluss möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die immer für mich da sind und mir so viel ermöglicht haben. Es ist nicht in Worte zu fassen, wie viel mir eure Unterstützung bedeutet!

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die bei der promotionsführenden Einrichtung dem Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der TUM zur Promotionsprüfung vorgelegte Arbeit mit dem Titel:

Mikrobiologie von Extended-Shelf-Life Milch Populationsdynamik während der Herstellung und Kühlung

am Lehrstuhl für mikrobielle Ökologie, ZIEL-Institute for Food and Health, Department für Grundlagen der Biowissenschaften unter der Anleitung und Betreuung durch Prof. Dr. Siegfried Scherer ohne sonstige Hilfe erstellt und bei der Abfassung nur die gemäß § 6 Ab. 6 und 7 Satz 2 angebotenen Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe keine Organisation eingeschaltet, die gegen Entgelt Betreuerinnen und Betreuer für die Anfertigung von Dissertationen sucht, oder die mir obliegenden Pflichten hinsichtlich der Prüfungsleistungen für mich ganz oder teilweise erledigt.

Ich habe die Dissertation in dieser oder ähnlicher Form in keinem anderen Prüfungsverfahren als Prüfungsleistung vorgelegt.

Ich habe den angestrebten Doktorgrad noch nicht erworben und bin nicht in einem früheren Promotionsverfahren für den angestrebten Doktorgrad endgültig gescheitert.

Die öffentlich zugängliche Promotionsordnung der TUM ist mir bekannt, insbesondere habe ich die Bedeutung von § 28 (Nichtigkeit der Promotion) und § 29 (Entzug des Doktorgrades) zur Kenntnis genommen. Ich bin mir der Konsequenzen einer falschen Eidesstattlichen Erklärung bewusst.

Mit der Aufnahme meiner personenbezogenen Daten in die Alumni-Datei bei der TUM bin ich einverstanden.

Freising, den _____

Etienne Doll

LISTE DER VORVERÖFFENTLICHUNGEN

Publikation

Doll, E. V., Scherer, S., & Wenning, M. (2017). Spoilage of Microfiltered and Pasteurized Extended Shelf Life Milk Is Mainly Induced by Psychrotolerant Spore-Forming Bacteria that often originate from Recontamination. *Frontiers in Microbiology*, 8.

Präsentationen

“Prävalenz und Biodiversität psychrotoleranter Sporenbildner in Rohmilch”, 15. Fachsymposium Lebensmittelmikrobiologie, Freising, Deutschland, April 2015

“Einfluss der Rohmilchmikrobiota auf die Lagerdauer mikrofiltrierter ESL-Milch”, Weihenstephaner Milchwirtschaftliche Herbsttagung, Freising, Deutschland, Oktober 2015

“Mikrobieller Verderb mikrofiltrierter ESL-Milch: Verderbspotential und Eintragsrouten relevanter Mikroorganismen”, 16. Fachsymposium Lebensmittelmikrobiologie, Stuttgart, Deutschland, März 2016

Poster

“Psychrotolerant spores in microfiltered and pasteurized ESL milk – spoilage potential and route of transmission”, 7th European Spores Conference, Egham, England April 2016

CURRICULUM VITAE

ETIENNE VALERIE DOLL

Persönliche Daten

Geburtsdatum und -ort: 11.10.1987, Fürstenfeldbruck

Staatsangehörigkeit: deutsch

Ausbildung

- 12/2013 – 08/2017 **Promotionsstudium**, TU München, ZIEL - Institute for Food & Health, Lehrstuhl für Mikrobielle Ökologie
Doktorarbeit: „Mikrobiologie von Extended-Shelf-Life Milch - Populationsdynamik während der Herstellung und Kühlung“
- 10/2011 – 10/2013 **Masterstudium** Ernährungswissenschaften, TU München
Masterarbeit: „Detailed analysis of raw milk microbiota“
- 10/2009 - 09/2011 **Bachelorstudium** Ernährungswissenschaften, TU München
Bachelorarbeit: „Einfluss der thermischen Substratvorbehandlung auf die tryptische Hydrolyse von β -Lactoglobulin“
- 10/2008 - 09/2009 Technologie und Biotechnologie der Lebensmittel TU München
- 09/1998 - 07/2007 **Abitur**, Graf-Rasso-Gymnasium Fürstenfeldbruck