



TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Lehrstuhl für Mikrobielle Ökologie

**Biodiversität und enzymatisches Verderbspotential von
Rohmilch-Mikrobiota**

Mario George Freiherr von Neubeck

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 29.04.2019 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät „Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt“ am 19.09.2019 angenommen.

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS.....	I
LISTE DER VORVERÖFFENTLICHUNGEN.....	IV
ZUSAMMENFASSUNG	V
SUMMARY.....	VII
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	VIII
TABELLENVERZEICHNIS	XI
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	XIV
1 EINLEITUNG.....	- 1 -
1.1 Mikrobielle Flora in Rohmilch und Milchhalbfabrikaten und ihre Enzyme.....	- 1 -
1.2 Aufbau und Regulation des <i>apr</i> -Operons der Gattung <i>Pseudomonas</i>	- 4 -
1.2.1 Aufbau des <i>apr</i> -Operons.....	- 4 -
1.2.2 Regulation des <i>apr</i> -Operons	- 6 -
1.3 Taxonomische Einordnung neuer Bakterienarten	- 8 -
Die Gattung <i>Pseudomonas</i>	- 10 -
1.4 Zielsetzung der Arbeit	- 12 -
2 MATERIAL UND METHODEN	- 13 -
2.1 Nährmedien und Lösungen.....	- 13 -
2.2 Rohmilchproben, Milchhalbfabrikate, isolierte Mikroorganismen und Referenzstämmen	- 17 -
2.2.1 Isolierung von Mikroorganismen aus Rohmilchen und Milchhalbfabrikaten	- 19 -
2.2.2 Zur Beschreibung neuer <i>Pseudomonas</i> -Arten verwendete Referenzstämmen.....	- 19 -
2.2.3 Zur Genomsequenzierung und Analyse des <i>apr</i> -Operons verwendete <i>Pseudomonas</i> -Stämme	- 20 -
2.3 Identifizierung von Mikroorganismen durch FTIR-Spektroskopie.....	- 21 -
2.4 Charakterisierung von Mikroorganismen zur Auswahl geeigneter FTIR-Referenzdatenbanken	- 23 -
2.5 Identifizierung repräsentativer Mikroorganismen mittels Gensequenzanalyse	- 25 -
2.6 Molekulargenetische Methoden	- 26 -
2.6.1 Isolierung RNA-freier, genomischer DNA.....	- 26 -
2.6.2 Isolierung von Nukleinsäuren durch mechanische Zell-Lyse	- 26 -
2.6.3 <i>In-vitro</i> -Amplifikation von DNA durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	- 27 -
2.6.4 Agarose-Gelelektrophorese	- 29 -

INHALTSVERZEICHNIS

2.6.5	Aufreinigung der PCR-Produkte	- 29 -
2.6.6	DNA-Sequenzierung von PCR-Produkten	- 30 -
2.6.7	Genomsequenzierung	- 30 -
2.7	Bioinformatische Methoden	- 34 -
2.7.1	Einzelgen-Sequenzanalyse	- 34 -
2.7.2	Phylogenetische Sequenzanalyse und Identifizierung potentiell unbekannter Gattungen und Arten.....	- 35 -
2.7.3	Bestimmung der durchschnittlichen Nukleotid-Übereinstimmung von Genomen untereinander (average nucleotide identity =ANI)	- 36 -
2.7.4	Vorhersage und Identifizierung von Genen in Genomen	- 37 -
2.8	Charakterisierung neuer <i>Pseudomonas</i> -Arten	- 39 -
2.8.1	Phänotypische Charakterisierungen	- 39 -
2.8.2	Chemotaxonomische Charakterisierung.....	- 41 -
2.8.3	Hinterlegung in öffentlichen Stammsammlungen	- 42 -
2.9	Konservierung der isolierten Mikroorganismen.....	- 42 -
2.10	Agardiffusions-Tests zur Visualisierung lipolytischer und proteolytischer Enzyme. -	43
	-	
2.11	Statistik.....	- 44 -
3	ERGEBNISSE.....	- 45 -
3.1	Mikrobielle Biodiversität in Rohmilchen und Milchhalbfabrikaten	- 45 -
3.1.1	Gesamtkeimzahlen der Rohmilchen und Milchhalbfabrikate	- 45 -
3.1.2	Biodiversitäts-Analyse der Rohmilchen und Milchhalbfabrikate	- 49 -
3.2	Lipolytische und proteolytische Aktivität der repräsentativen Mikrobiota.....	- 69 -
3.3	Genetische Variabilität und Phylogenie des <i>apr</i> -Operons der Gattung <i>Pseudomonas</i> ... -	78 -
3.3.1	Untersuchung der genetischen Variabilität des <i>apr</i> -Operons	- 81 -
3.3.2	Untersuchung der Phylogenie des <i>apr</i> -Operons	- 85 -
3.4	Beschreibung neuer <i>Pseudomonas</i> -Arten.....	- 89 -
3.4.1	Genetische und phylogenetische Analysen	- 90 -
3.4.2	Morphologische und physiologische Charakterisierung	- 101 -
3.4.3	Chemotaxonomische Charakterisierung.....	- 106 -
4	DISKUSSION	- 111 -
4.1	Biodiversität der Rohmilch- und Milchhalbfabrikat-Mikrobiota.....	- 111 -
4.2	Lipolytische und proteolytische Aktivität der repräsentativen Mikrobiota.....	- 121 -

INHALTSVERZEICHNIS

4.3	Genetische Variabilität und Phylogenie des <i>apr</i> -Operons der Gattung <i>Pseudomonas</i> ... -	
	128 -	
4.4	Beschreibung neuer <i>Pseudomonas</i> -Arten.....	- 132 -
4.4.1	Neubeschreibung der Arten <i>Pseudomonas helleri</i> sp. nov. und <i>Pseudomonas weihenstephanensis</i> sp. nov.	- 132 -
4.4.2	Neubeschreibung der Arten <i>Pseudomonas lactis</i> sp. nov. und <i>Pseudomonas paralactis</i> sp. nov.	- 136 -
5	SCHLUSSFOLGERUNG UND AUSBLICK.....	- 142 -
6	ANHANG	- 144 -
	LITERATURVERZEICHNIS	- 177 -
	DANKSAGUNG	- 202 -

LISTE DER VORVERÖFFENTLICHUNGEN

Publikationen

Teile der vorliegenden Dissertation wurden bereits vorab veröffentlicht:

Schlussbericht zum AiF Projekt 16588 N – „Hitze stabile mikrobielle Enzyme in Rohstoffen zur Milchverarbeitung – Qualitätssicherung, Entwicklung eines Testsystems und technologische Optionen“ vom 15.10.2014.

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., Gluck, 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.

von Neubeck, M., Huptas, C., Gluck, C., Krewinkel, M., Stoeckel, M., Stressler, T., Fischer, L., Hinrichs, J., Scherer, S. und Wenning, M. (2017). *Pseudomonas lactis* sp. nov. and *Pseudomonas paralactis* sp. nov., isolated from bovine raw milk. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 67, 1656-1664.

Präsentationen

„*Lipolytic and proteolytic activity of raw milk microbiota*“, Milchkonferenz 2013, Stuttgart, Deutschland, September 2013

Poster

„Lipolytische und proteolytische Aktivität von Rohmilch-Mikrobiota“, 13. Fachsymposium Lebensmittel mikrobiologie, Stuttgart, Deutschland, März 2012

„*Biodiversity of raw milk microbiota*“, 14. Fachsymposium Lebensmittel mikrobiologie, Tutzing, Deutschland, April 2013

ZUSAMMENFASSUNG

Die Milchindustrie ringt seit Jahrzehnten mit mikrobiellen Verderbsorganismen und deren Einfluss auf die Lagerstabilität von Endprodukten. Während der Eintrag von Mikroorganismen in die Endprodukte durch laufende Kontrollen eingedämmt wird, ist noch immer unklar, welche mikrobielle Biodiversität in Rohmilch und industriellen Zwischenprodukten vorliegt. Ergänzend dazu ist nur teilweise bekannt, wie und in welchem Umfang einzelne taxonomischen Großgruppen, Gattungen und Arten die Qualität der Endprodukte negativ beeinflussen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, die mikrobielle Biodiversität von kaltgelagerten Rohmilchen und Milchhalbfabrikaten zu analysieren sowie deren lipolytisches und proteolytisches Potential zu ermitteln.

Insgesamt wurden aus 40 Proben 4812 Mikroorganismen isoliert. Diese konnten 204 Arten aus 75 Gattungen zugeordnet werden. Die Mikrobiota der Rohmilchen wurde dabei von 15 Gattungen dominiert, die 93 % der Isolate stellten. Dabei konnten allein 63 % der Rohmilchisolate den Gattungen *Pseudomonas*, *Lactococcus* und *Acinetobacter* zugeordnet werden. In den Milchhalbfabrikaten stellten 16 Gattungen etwa 90 % aller Isolate. Die vier häufigsten Gattungen waren mit insgesamt 57 % der Isolate *Pseudomonas*, *Microbacterium*, *Enterobacter* und *Acinetobacter*. Die Gattung *Pseudomonas* war insgesamt betrachtet die mit Abstand häufigste Gattung, der rund 28 % aller Isolate zugeordnet werden konnten.

Für die taxonomischen Großgruppen der gramnegativen, fakultativ anaeroben Bakterien, der Hefen und der Milchsäurebakterien sowie auch für die Gattungen *Microbacterium*, *Staphylococcus*, *Acinetobacter* und *Pseudomonas* konnten im Rahmen der Analyse der lipolytischen und proteolytischen Aktivität teilweise gruppen- und gattungsspezifische Aktivitätsausprägungen ermittelt werden. Insbesondere Vertreter der Gattung *Pseudomonas* zeigten unabhängig von der Anzuchtstemperatur meist sowohl lipolytische als auch proteolytische Aktivität. Diese ist vermutlich auf das *apr*-Operon zurückzuführen, dessen Variabilität und Verbreitung innerhalb der Gattung in der vorliegenden Arbeit untersucht wurde. Das *apr*-Operon konnte in 29 der 56 untersuchten *Pseudomonas*-Arten nachgewiesen werden. Dabei wurden sechs verschiedene Operonstrukturen ermittelt, wobei phylogenetisch sehr nah verwandte Arten meist dieselbe Operonstruktur besitzen. Dabei spiegelt der für 28 Arten bestätigte erweiterte konservierte Bereich des *apr*-Operons mit der Genfolge *aprA-aprI-aprD-aprE-aprF* die in der Gattung vorherrschenden Verwandtschaftsverhältnisse wider. Ergänzend dazu konnten die Gene für die zentralen regulatorischen Elemente *GacA/GacS* sowie *RsmE/RsmA* in allen diesbezüglich untersuchten Arten identifiziert werden. Gleiches gilt für die -35 und -10 Region sowie den Transkriptionsstart und die vermutete Ribosomenbindestelle mit dem darin enthaltenen zentralen *RsmA/RsmE* Bindemotiv. Des Weiteren wurden auch Gene für die regulatorischen sRNAs *RsmX*, *RsmY* und *RsmZ* nachgewiesen.

ZUSAMMENFASSUNG

Da im Zuge der Biodiversitäts-Analyse der 40 Proben viele Isolate innerhalb der Gattung *Pseudomonas* keiner der offiziell anerkannten Arten eindeutig zugeordnet werden konnten, wurden im Rahmen dieser Arbeit vier neue Arten der Gattung *Pseudomonas* (*Pseudomonas helleri*, *Pseudomonas lactis*, *Pseudomonas paralactis* und *Pseudomonas weihenstephanensis*) mittels eines polyphasischen Ansatzes charakterisiert und beschrieben.

SUMMARY

The dairy industry is struggling against microbial spoilage and its impact on end product stability for decades. As contamination of end products is stemmed due to continuous monitoring it still remains unclear which microbial biodiversity is present in raw milk and semi-finished milk products. In addition it is only known partially how and to which extent the different higher taxonomic groups, genera and species negatively impact end products.

Aim of the current study was to analyse the biodiversity of cold stored raw milk and semi-finished milk products microbiota and to determine their lipolytic and proteolytic potential

In total 4812 microbial isolates have been achieved out of 40 samples. These isolates have been assigned to 204 species out of 75 genera. The raw milk microbiota was dominated by 15 genera providing 93 % of all raw milk isolates. In addition, 63 % of all raw milk isolates could be assigned to the three genera *Pseudomonas*, *Lactococcus* and *Acinetobacter*. The semi-finished milk products microbiota was dominated by 16 genera providing about 90 % of the isolates. The four most prevalent genera were *Pseudomonas*, *Microbacterium*, *Enterobacter* und *Acinetobacter* providing 57 % of all isolates together. The genus *Pseudomonas* was the most prevalent in total providing about 28 % of all isolates.

During analysis of the lipolytic and proteolytic activity group and genera related tendencies in the shape of activity could be partially detected for the higher taxonomic groups gram negative, facultative anaerobic bacteria, yeasts and lactic acid bacteria as well as for the genera *Microbacterium*, *Staphylococcus*, *Acinetobacter* and *Pseudomonas*. Especially isolates of the genus *Pseudomonas* tend to show lipolytic and proteolytic activity independent of the growth conditions. This activity is most probably based on the *apr*-operon, which was analysed for its variability and distribution among the genus in the current study. The *apr*-operon could be detected in 29 of the 56 analysed *Pseudomonas* species. Six different operon structures have been detected, while phylogenetic closely related species showed to have the same operon structure in almost all cases. The proven extended conserved part of the *apr*-operon of 28 species with the gene order *aprA-aprI-aprD-aprE-aprF* reflects the phylogenetic relation of the genus. Furthermore, the genes for the central regulatory elements GacA/GacS as well as RsmE/RsmA could be detected in all analysed species. The same is true for the –35 and –10 region, as well as the transcriptional start and the assumed ribosomal binding site containing the RsmA/RsmE binding site. In addition, genes for regulatory sRNAs RsmX, RsmY and RsmZ have also been detected.

While analysing the microbial biodiversity of the 40 samples many isolates assigned to the genus *Pseudomonas* could not be assigned correctly to any of the officially accepted species. In the current study four species of the genus *Pseudomonas* (*Pseudomonas helleri*, *Pseudomonas lactis*, *Pseudomonas paralactis* and *Pseudomonas weihenstephanensis*) have been characterised and described based on a polyphasic approach.

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 2-1: Schematischer Ablauf der Probenanalyse..... 17

Abbildung 2-2: Hydrolysehof auf einer Proteolyse-Agarplatte und Tributyrin-Agarplatte..... 43

Abbildung 3-1: Gewichtetes arithmetisches Mittel der Gesamtkeimzahlen der Rohmilchen von Höfen (H) und Molkereitanks (M)..... 45

Abbildung 3-2: Gewichtetes arithmetisches Mittel der Gesamtkeimzahlen der Milchhalbfabrikate... 47

Abbildung 3-3: Boxplot der Gesamtkeimzahlen der Hofmilchen, Molkereitankmilchen und Milchhalbfabrikate..... 48

Abbildung 3-4: Zusammensetzung der mikrobiellen Biodiversität einzelner Hof- und Molkereitankmilchen in taxonomischen Großgruppen..... 49

Abbildung 3-5: Biodiversitätsvergleich der zusammengefassten Hof- und Molkereitankmilchen auf Ebene der Isolate, Gattungen und Arten in taxonomischen Großgruppen..... 51

Abbildung 3-6: Vergleich der mikrobiellen Biodiversität der Hof- und Molkereitankmilchen in Hinblick auf gemeinsame Gattungen und Arten..... 53

Abbildung 3-7: Prozentualer Anteil der 15 häufigsten Gattungen an der Gesamt-Rohmilch-Mikrobiota..... 54

Abbildung 3-8: Prozentualer Anteil der 25 häufigsten Arten an der Gesamt-Rohmilch-Mikrobiota.. 55

Abbildung 3-9: Prozentualer Anteil von 19 Arten, die aus mindestens 5 Proben isoliert werden konnten..... 58

Abbildung 3-10: Zusammensetzung der mikrobiellen Biodiversität einzelner Milchhalbfabrikate in taxonomischen Großgruppen..... 59

Abbildung 3-11: Biodiversitätsvergleich der zusammengefassten Milchhalbfabrikatgruppen, Hofmilchen und Molkereitankmilchen sowie der Milchhalbfabrikate und Rohmilchen insgesamt auf Ebene der Isolate in taxonomischen Großgruppen..... 60

Abbildung 3-12: Prozentualer Anteil der 16 häufigsten Gattungen an der Gesamt-Milchhalbfabrikat-Mikrobiota..... 62

Abbildung 3-13: Phylogenetischer Neighbor-Joining-Baum, basierend auf partiellen *rpoD*-Gensequenzen, der die phylogenetische Position der 27 potentiell neuen *Pseudomonas*-Arten zeigt..... 66

Abbildung 3-14: Der als Teilbaum 1 bezeichnete Ast des Baumes aus Abbildung 3-13..... 67

Abbildung 3-15: Der als Teilbaum 2 bezeichnete Ast des Baumes aus Abbildung 3-13..... 68

Abbildung 3-16: Proteolytische und lipolytische Aktivität der repräsentativen Isolate der 15 häufigsten Gattungen aus Rohmilchen..... 70

Abbildung 3-17: Proteolytische und lipolytische Aktivität der repräsentativen Isolate der 16 häufigsten Gattungen aus Milchhalbfabrikaten..... 71

Abbildung 3-18: Proteolytische und lipolytische Aktivität der häufigsten *Pseudomonas*-Arten aus Rohmilchen und Milchhalbfabrikaten..... 74

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 3-19: Proteolytische und lipolytische Aktivität der <i>Acinetobacter</i> -Arten aus Rohmilchen.	75
Abbildung 3-20: Proteolytische und lipolytische Aktivität der Milchsäurebakterien-Arten aus Rohmilchen.	76
Abbildung 3-21: Proteolytische und lipolytische Aktivität der <i>Microbacterium</i> - und <i>Staphylococcus</i> -Arten aus Rohmilchen.	77
Abbildung 3-22: Artauswahl zur Untersuchung der Variabilität und Verbreitung des <i>apr</i> -Operons innerhalb der Gattung <i>Pseudomonas</i> anhand eines phylogenetischen Neighbor-Joining-Baums, basierend auf 145 partiellen <i>rpoD</i> -Gensequenzen von <i>Pseudomonas</i> -Typstämmen.	79
Abbildung 3-23: Teilbaum der in Abbildung 3-22 zusammengefassten 83 <i>Pseudomonas</i> -Arten.	80
Abbildung 3-24: Gegenüberstellung phylogenetischer Neighbor-Joining-Bäume 73 verschiedener <i>Pseudomonas</i> -Stämme.	86 -
Abbildung 3-25: Verbreitung des <i>apr</i> -Operons innerhalb der Gattung <i>Pseudomonas</i> anhand eines phylogenetischen Neighbor-Joining-Baums, basierend auf 145 partiellen <i>rpoD</i> -Gensequenzen von <i>Pseudomonas</i> -Typstämmen.	87 -
Abbildung 3-26: Teilbaum der in Abbildung 3-25 zusammengefassten 83 <i>Pseudomonas</i> -Arten.	88 -
Abbildung 3-27: Phylogenetischer Maximum-Likelihood-Baum, basierend auf 48 partiellen <i>rpoD</i> -Gensequenzen.	91 -
Abbildung 3-28: Phylogenetischer Maximum-Likelihood-Baum, basierend auf 48 fast vollständigen 16S-rRNA- Gensequenzen.	92 -
Abbildung 3-29: Phylogenetischer Neighbor-Joining-Baum, basierend auf partiellen, konkatenierten Nukleotidsequenzen der 16S-rRNA-, <i>gyrB</i> -, <i>rpoD</i> - und <i>rpoB</i> -Gene.	93 -
Abbildung 3-30: Phylogenetischer Maximum-Likelihood-Baum, basierend auf 35 partiellen <i>rpoD</i> -Gensequenzen.	96 -
Abbildung 3-31: Phylogenetischer Maximum-Likelihood-Baum, basierend auf 35 fast vollständigen 16S-rRNA-Gensequenzen.	97 -
Abbildung 3-32: Phylogenetischer Neighbor-Joining-Baum, basierend auf 32 partiellen, konkatenierten Nukleotidsequenzen der 16S-rRNA-, <i>gyrB</i> -, <i>rpoD</i> - und <i>rpoB</i> -Gene.	99 -
Abbildung 3-33: Phasenkontrastaufnahme von <i>Pseudomonas helleri</i> sp. nov. WS4917 ^T	102 -
Abbildung 3-34: Phasenkontrastaufnahme von <i>Pseudomonas weihenstephanensis</i> sp. nov. WS4993 ^T	102 -
Abbildung 3-35: Phasenkontrastaufnahme von <i>Pseudomonas lactis</i> sp. nov. WS4992 ^T	104 -
Abbildung 3-36: Phasenkontrastaufnahme von <i>Pseudomonas paralactis</i> sp. nov. WS672 ^T	105 -
Abbildung 3-37: Mittels zweidimensionaler Dünnschichtchromatographie aufgetrennte polare Lipide der Stämme WS4917 ^T (links) und WS4993 ^T (rechts).	108 -
Abbildung 3-38: Mittels zweidimensionaler Dünnschichtchromatographie aufgetrennte polare Lipide der Stämme WS4992 ^T (links) und WS4672 ^T (rechts).	110 -

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 4-1: Bildausschnitte von Cetrimid-Agarplatten nach Wachstum von <i>Pseudomonas libanensis</i> DSM 17149 ^T für mehr als 10 Tage.	137 -
Abbildung 6-1: Phylogenetischer Neighbor-Joining-Baum, basierend auf partiellen 16S-rRNA-Sequenzen, der die phylogenetische Position der zwei potentiell neuen <i>Acinetobacter</i> -Arten zeigt. .	171 -
Abbildung 6-2: Phylogenetischer Neighbor-Joining-Baum, basierend auf partiellen 16S-rRNA-Sequenzen, der die phylogenetische Position der beiden potentiell neuen <i>Arthrobacter</i> -Arten zeigt. -	172 -
Abbildung 6-3: Phylogenetischer Neighbor-Joining-Baum, basierend auf partiellen 16S-rRNA-Sequenzen, der die phylogenetische Position der potentiell neuen <i>Lactococcus</i> -Art zeigt.....	173 -
Abbildung 6-4: Phylogenetischer Neighbor-Joining-Baum, basierend auf partiellen 16S-rRNA-Sequenzen, der die phylogenetische Position der potentiell neuen <i>Diaphorobacter</i> -Art zeigt. .	174 -
Abbildung 6-5: Phylogenetischer Neighbor-Joining-Baum, basierend auf partiellen 16S-rRNA-Sequenzen, der die phylogenetische Position der potentiell neuen Gattung neben den nah verwandten Gattungen <i>Empedobacter</i> und <i>Chishuiella</i> zeigt.	175 -
Abbildung 6-6: Proteolytische und lipolytische Aktivität der <i>Pseudomonas</i> -Arten aus Rohmilchen und Milchhalbfabrikaten.	176 -

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1-1: Bekannte Strukturen des <i>apr</i> -Operons verschiedener <i>Pseudomonas</i> -Stämme nach Ma <i>et al.</i> (2003).....	6
Tabelle 2-1: Verwendete Medien und Lösungen.	14
Tabelle 2-2: Zusammensetzung des generell verwendeten PCR-Ansatzes.....	27
Tabelle 2-3: Verwendete Primer.	28
Tabelle 2-4: Verwendete Primerpaare und theoretische Länge der PCR-Fragmente.....	29
Tabelle 2-5: Einstellungen Covaris S220 AFA Ultrasonicator zur DNA-Fragmentierung.....	31
Tabelle 2-6: Als Referenz zur Analyse des <i>apr</i> -Operons verwendete Aminosäure- und Nukleotidsequenzen.	38
Tabelle 3-1: Anteil einzelner taxonomischer Großgruppen an der Gesamtmikrobiota der Rohmilchen.	50
Tabelle 3-2: Auflistung der in Abbildung 3-8 zusammengefassten anderen Gattungen (47).	55
Tabelle 3-3: Auflistung der in Abbildung 3-9 zusammengefassten anderen Arten (1–72).....	56
Tabelle 3-4: Auflistung der in Abbildung 3-9 zusammengefassten anderen Arten (73–144).....	57
Tabelle 3-5: Anzahl der Gattungen und Arten aus den einzelnen taxonomischen Großgruppen.....	57
Tabelle 3-6: Auflistung der in Abbildung 3-13 zusammengefassten anderen Gattungen (37).	62
Tabelle 3-7: Dominierende Gattungen in einzelnen Milchhalbfabrikaten.	63
Tabelle 3-8: Potentiell neue Gattungen und Arten aus Rohmilchen und Milchhalbfabrikaten.....	64
Tabelle 3-9: Zusammengefasste enzymatische Aktivität der Gesamtmikrobiota der Rohmilchen und Milchhalbfabrikate bei 30 °C und 6 °C.....	69
Tabelle 3-10: Zusammengefasste proteolytische und lipolytische Aktivität der Hefen und der gramnegativen, fakultativ anaeroben Bakterien bei 30 °C und 6 °C.....	72
Tabelle 3-11: Ermittelte <i>apr</i> -Operonstrukturen und regulationsassoziierte Gene von 29 <i>Pseudomonas</i> -Arten.....	82
Tabelle 3-12: DNA-Sequenz des vermuteten Promotorbereichs des <i>apr</i> -Operons (5'-UTR vor <i>aprA</i>) 28 verschiedener <i>Pseudomonas</i> -Arten.	83
Tabelle 3-13: ANIb-Ähnlichkeit (%) zwischen allen sequenzierten Stämmen der beiden neuen Arten <i>Pseudomonas helleri</i> und <i>Pseudomonas weihenstephanensis</i> und den Referenzstämmen.	- 94 -
Tabelle 3-14: ANIb-Ähnlichkeit (%) zwischen den Typstämmen der beiden neuen Arten <i>Pseudomonas lactis</i> sp. nov. und <i>Pseudomonas paralactis</i> sp. nov. und den gewählten Referenzstämmen.	- 100 -
Tabelle 3-15: Zusammensetzung der zellulären Fettsäuren (%) der Stämme <i>Pseudomonas helleri</i> sp. nov. WS4917 ^T und <i>Pseudomonas weihenstephanensis</i> sp. nov. WS4993 ^T , der Referenzstämme und der Typspezies <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	- 107 -

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 3-16: Zusammensetzung der zellulären Fettsäuren (%) der Stämme <i>Pseudomonas lactis</i> sp. nov. WS4992 ^T und <i>Pseudomonas paralactis</i> sp. nov. WS4672 ^T , der Referenzstämmen und der Typspezies <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	- 109 -
Tabelle 4-1: Gemeinsame Gattungen der Rohmilchen und Milchhalbfabrikate.....	- 119 -
Tabelle 4-2: Differenzierende Merkmale für die Arten <i>Pseudomonas helleri</i> sp. nov. und <i>Pseudomonas weihenstephanensis</i> sp. nov., die Typstämme der am nächsten verwandten Arten und die Typspezies <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	- 134 -
Tabelle 4-3: Differenzierende Merkmale für die Arten <i>Pseudomonas lactis</i> sp. nov. und <i>Pseudomonas paralactis</i> sp. nov., die Typstämme der am nächsten verwandten Arten und die Typspezies <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	- 139 -
Tabelle 6-1: Verwendete Chemikalien und Medien.....	- 144 -
Tabelle 6-2: Auflistung der 107 <i>Pseudomonas</i> -Stämme, deren Genom hinsichtlich des <i>apr</i> -Operons untersucht wurde.	- 148 -
Tabelle 6-3: Accession-Nummern der Gene 16S rRNA, <i>gyrB</i> , <i>rpoD</i> und <i>rpoB</i> der zur MLSA-Analyse verwendeten <i>Pseudomonas</i> -Typstämme.	- 152 -
Tabelle 6-4: Gewichtetes arithmetisches Mittel der Gesamtkeimzahlen der Rohmilchen und Milchhalbfabrikate.	- 154 -
Tabelle 6-5: Test der (logarithmierten) Gesamtkeimzahlen der Hof- und Molkereitankmilchen auf Abweichung von einer Normalverteilung.	- 156 -
Tabelle 6-6: T-Test zur Feststellung eines Unterschieds zwischen der logarithmierten GKZ der Hof- und Molkereitankmilchen bei 15 °C.	- 157 -
Tabelle 6-7: Mann-Whitney-U-Test zur Feststellung eines Unterschieds zwischen der GKZ der Hof- und Molkereitankmilchen bei 30 °C und 6 °C.	- 157 -
Tabelle 6-8: Test der (logarithmierten) Gesamtkeimzahlen der Rohmilchen und Milchhalbfabrikate auf Abweichung von einer Normalverteilung.	- 158 -
Tabelle 6-9: T-Test zur Feststellung eines Unterschieds zwischen der logarithmierten GKZ der Rohmilchen und Milchhalbfabrikate bei 30 °C.....	- 158 -
Tabelle 6-10: Mann-Whitney-U-Test zur Feststellung eines Unterschieds zwischen der GKZ der Rohmilchen und Milchhalbfabrikate.....	- 159 -
Tabelle 6-11: Test auf Korrelation nach Spearman zwischen den GKZ der Rohmilchen und der Anzahl an Isolaten höherer taxonomischer Gruppen.....	- 159 -
Tabelle 6-12: Test der Anzahl der Isolate verschiedener taxonomischer Großgruppen in den Hof- und Molkereitankmilchen auf Abweichung von einer Normalverteilung.....	- 160 -
Tabelle 6-13: T-Test zur Feststellung eines Unterschieds in der mittleren Anzahl an gramnegativen, obligat aeroben Bakterien in den Hof- und Molkereitankmilchen.....	- 161 -
Tabelle 6-14: Mann-Whitney-U-Test zur Feststellung eines Unterschieds in der mittleren Anzahl verschiedener taxonomischer Großgruppen in den Hof- und Molkereitankmilchen.	- 162 -

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 6-15: T-Test zur Feststellung eines Unterschieds in der mittleren Anzahl der Gattungen und Arten pro Probe der Hof- und Molkereitankmilchen.	- 163 -
Tabelle 6-16: Test der Anzahl der Gattungen und Arten pro Probe der Hof- und Molkereitankmilchen auf Abweichung von einer Normalverteilung.	- 164 -
Tabelle 6-17: Test der Anzahl der Isolate verschiedener taxonomischer Großgruppen der Rohmilchen und Milchhalbfabrikate auf Abweichung von einer Normalverteilung.	- 165 -
Tabelle 6-18: Mann-Whitney-U-Test zur Feststellung eines Unterschieds in der mittleren Anzahl verschiedener taxonomischer Großgruppen in den Rohmilchen und Milchhalbfabrikaten.	- 166 -
Tabelle 6-19: Auflistung der 12 Stämme der vier neuen Arten und der korrespondierenden GenBank/EMBL/DDBJ- Accession-Nummern	- 167 -
Tabelle 6-20: Ermittelte <i>apr</i> -Operonstrukturen von 107 <i>Pseudomonas</i> -Stämmen.	- 168 -

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

~	etwa
®	<i>Registered Trade Mark</i>
°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
AiF	Arbeitsgemeinschaft industrieller Forschungsvereinigungen „Otto von Guericke“ e.V.
ANI	<i>average nucleotide identity</i>
apr	<i>alkaline protease</i>
BCCM™/LMG	Belgian Co-ordinated Collection of Micro-organismes/ Laboratorium voor Microbiologie, Universiteit Gent
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
cm ⁻¹	Wellenzahl (Angabe pro Zentimeter)
DDBJ	<i>DNA Data Bank of Japan</i>
DDH	DNA-DNA- Hybridisierung
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DSMZ	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen
EC-Nummer	<i>Enzyme Commission</i> Nummer
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMBL	<i>European Molecular Biology Laboratory</i>
EwagMk	Eiweißangereichertes Molkenkonzentrat
EwK	Milcheiweiß-Konzentrat
FTIR	Fourier-Transform-Infrarot
g	Gramm
Gen. nov.	<i>genus novum</i>
GKZ	Gesamtkeimzahl
h	Stunde
H	Hof
HCA	hierarchische Clusteranalyse
High G+C	Actinobacteria, mit hohem Guanin- und Cytosin-Gehalt in der DNA
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
IPTG	Isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranosid
IR	Infrarot
KbE	Koloniebildende Einheit
L	Liter
log	Logarithmus
m	Meter
M	Molkereitank bzw. Molarität bei chemischem Zusammenhang
Mb	Megabasen

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

MF	Mikrofiltration
min	Minute
ml	Milliliter
MLSA	Multi-Locus-Sequenz-Analyse
MLST	Multi-Locus-Sequenz-Typisierung
mM	Mikromol
MmK	Magermilchkonzentrat
N	Normalität
NaCl	Natriumchlorid
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NCBI-Datenbank	Harmonisierte DNA-Datenbank (GenBank/EMBL/DDBJ)
NGS	Next-Generation Sequencing
nM	Nanomol
nm	Nanometer
nt	Nukleotid
OD	optische Dichte
OFG	Oxidativ- fermentativ- Medium mit D-(+)-Glucose
OFL	Oxidativ- fermentativ- Medium mit D-(+)-Lactose
<i>p</i>	<i>p</i> -Wert als Ergebnis des Mann-Whitney-U-Tests oder des <i>t</i> -Tests
PCM	<i>Plate Count Milk Agar</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pmol	Pikomol
RBS	Ribosomenbindestelle
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SIM	Medium zur Detektion der Sulfidbildung, Indolbildung und Beweglichkeit (" <i>Motility</i> ")
sp.	Spezies
sp. nov.	<i>species nova</i>
spp.	<i>species pluralis</i>
sRNA	Kurze (<i>small</i>) Ribonukleinsäure
subsp.	Subspezies
T	Kennzeichnung für einen Typstamm
TBE	TRIS-Borat-EDTA
™	<i>Trade Mark</i>
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TSA	Trypton-Soja-Agar
TSB	Trypton-Soja-Bouillon
U	U-Wert als Ergebnis des Mann-Whitney-U-Tests

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

U/ μ l	Unit/Mikroliter
UF	Ultrafiltration
UpM	Umdrehungen pro Minute (1/min)
UTR	<i>untranslated region</i>
UV	Ultraviolet
w/v	Massenkonzentration in Masse pro Volumen
YGC	Hefeextrakt(<i>yeast extract</i>)-Glucose-Chloramphenicol-Agar
YGCB	YGC-Agar + Bromphenolblau

1 EINLEITUNG

1.1 Mikrobielle Flora in Rohmilch und Milchhalbfabrikaten und ihre Enzyme

Im Euter von Kühen ohne Euterinfektionen ist die Milch eine keimfreie, nährstoffreiche Flüssigkeit (enthält Proteine, Fette, Kohlenhydrate, Vitamine und Mineralien) mit neutralem pH-Wert und einer Temperatur von etwa 35–38 °C. Dadurch bietet Milch nach dem Melken ideale Bedingungen für die Vermehrung von einer Vielzahl von Mikroorganismen. Während des Melkvorgangs wird die Milch durch Mikroorganismen besiedelt, die von den unterschiedlichsten Quellen stammen können. Einige haben ihren Ursprung in der Stallluft, dem Futter, dem Einstreu und dem Dung oder gelangen über die Euteroberfläche, den Strichkanal der einzelnen Zitzen, das Melkgeschirr oder die Milchleitungen in die Milch (Cousin, 1982, Vacheyrou *et al.*, 2011, Verdier-Metz *et al.*, 2012, Verdier-Metz *et al.*, 2009). Die gesamte Rohmilch-Mikrobiota besteht demzufolge aus Kontaminationskeimen und ihre Zusammensetzung ist äußerst komplex. Eine große Vielfalt verschiedener bakterieller Gattungen und Arten, aber auch Hefen und Schimmel wurden in den letzten Jahrzehnten aus Rohmilch isoliert oder mittels kulturunabhängiger Methoden nachgewiesen (Delbes *et al.*, 2007, Quigley *et al.*, 2011, 2012). Eine recht umfassende Zusammenfassung über den generellen Wissensstand über die vorkommenden und bisher detektierten Gattungen und Arten in roher Kuhmilch wurde von Quigley *et al.* (2013b) veröffentlicht. Darin wird auch auf die Mikrobiota von Milch anderer Säugetiere einschließlich des Menschen eingegangen. Im Allgemeinen kann aus roher Kuhmilch eine Vielzahl von Milchsäurebakterien-Gattungen (z.B. *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus* und *Weissella*) sowie Vertreter anderer grampositiver Gattungen wie beispielsweise *Bacillus*, *Microbacterium* und *Staphylococcus* isoliert werden. Außerdem werden auch die gramnegativen Gattungen *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Chryseobacterium*, *Moraxella*, *Pseudomonas* und *Stenotrophomonas* neben zahlreichen anderen, inklusive der Enterobakterien (z.B. *Enterobacter*, *Escherichia*, *Hafnia*, *Klebsiella* und *Salmonella*) regelmäßig nachgewiesen. Dabei kommt der Gattung *Pseudomonas* eine besondere Bedeutung zu, da diese als die am häufigsten isolierte Gattung aus Rohmilch gilt (Sørhaug & Stepaniak, 1997). Neben der bakteriellen Flora finden sich aber auch verschiedene Hefen- und Schimmeligattungen wie beispielsweise *Candida* und *Kluyveromyces* bzw. *Aspergillus* und *Penicillium* (Delavenne *et al.*, 2011, Fleet, 1990) in Rohmilch. Während der überwiegende Teil der mikrobiellen Milchflora gesundheitlich unbedenklich ist, stellen einige Arten ein hohes Risiko dar. Insbesondere die Arten *Bacillus cereus*, *Campylobacter jejuni*, *Cronobacter sakazakii*, *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* und *Staphylococcus aureus* sowie verschiedene *Salmonella*-Arten stellen in Form von Primär- und Sekundärkontaminationen von Zwischen- und Endprodukten in der Milchindustrie ein erhebliches Gesundheitsrisiko für die Verbraucher dar (Claeys *et al.*, 2013, Michael *et al.*, 2014, Rowe & Donaghy, 2011, Verraes *et al.*, 2015).

Rohmilch für die Milchindustrie wird nach dem Melken gekühlt gelagert (~ 4–6 °C), um das Wachstum von Mikroorganismen zu verlangsamen. Die Dauer der Lagerung ist dabei abhängig von der Abholfrequenz am Hof, dem Transportweg, der Lagerdauer in den Stapeltanks und eventuellem Handel zwischen verschiedenen Verarbeitungsbetrieben. Während dieser Zeit findet einigen Studien zufolge eine Selektion zugunsten psychrotoleranter Keime statt, die sich auch bei kühlen Temperaturen stark vermehren können, wodurch sich die mikrobielle Flora in ihrer Zusammensetzung verändert (Fricker *et al.*, 2011, Lafarge *et al.*, 2004, Rasolofo *et al.*, 2010). Vertreter psychrotoleranter Mikroorganismen finden sich unter anderem in den gramnegativen Gattungen *Aeromonas*, *Acinetobacter*, *Chryseobacterium*, *Moraxella*, *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas* und *Serratia*, aber auch in grampositiven Gattungen wie beispielsweise *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Microbacterium* und *Streptococcus* (Hantsis-Zacharov & Halpern, 2007, Lafarge *et al.*, 2004, Munsch-Alatossava & Alatossava, 2006, Sørhaug & Stepaniak, 1997). Die größte Bedeutung kommt aber vermutlich der Gattung *Pseudomonas* zu, da Vertreter dieser Gattung ein stark ausgeprägtes psychrotolerantes Wachstum zeigten (Eneroth *et al.*, 1998, Hantsis-Zacharov & Halpern, 2007, Martins *et al.*, 2006, Rasolofo *et al.*, 2010, Ternström *et al.*, 1993), was sie zu der wohl wichtigsten bakteriellen Gattung im milchverarbeitenden Umfeld macht. Die Bedeutung der Gattung ist deshalb so hoch, da *Pseudomonas*-Arten häufig auch als Rekontaminationskeime nach der Pasteurisierung nachgewiesen werden konnten (Dogan & Boor, 2003, Quigley *et al.*, 2013a, Sørhaug & Stepaniak, 1997, Tamime, 2009). Über die mikrobielle Flora von meist innerbetrieblich zwischengelagerten Milchhalbfabrikaten wie Magermilchkonzentrat, Milcheiweißkonzentrat, eiweißangereichertem Molkenkonzentrat und Rahm (Sahne) kann keine direkte Aussage getroffen werden, da keine offiziellen Vergleichsdaten vorliegen. Da es sich dabei aber um bereits prozessierte Zwischenprodukte handelt, wird eine von der Rohmilch-Mikrobiota abweichende Flora angenommen. Diese besteht vermutlich entweder überwiegend aus rohmilchassoziierten Keimen, die als Rekontamination eingebracht wurden, oder ist geprägt von Mikroorganismen, die die technologischen Verarbeitungsschritte unbeschadet überstehen können, wie es für verschiedene Endprodukte der Molkereiindustrie bekannt ist (Champagne *et al.*, 1994, Ledenbach & Marshall, 2010, Rowe & Donaghy, 2011, Stepaniak, 2011).

Dass die Qualität von Rohmilch und Milchhalbfabrikaten durch das Wachstum vieler Mikroorganismen negativ beeinflusst wird, ist seit langem bekannt und meist auf die Bildung von Lipasen und Peptidasen zurückzuführen (Cousin, 1982, Sørhaug & Stepaniak, 1997). Wie von Baur *et al.* (2015) beschrieben, ist gemäß dem „Nomenclature Committee of The International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB)“ der Begriff „Peptidase“ dem Begriff „Protease“ vorzuziehen und wird für alle Enzyme, die Peptidbindungen spalten, verwendet. Peptidasen werden generell in an Polypeptidketten endständig spaltenden Exopeptidasen (EC 3.4.11-19) und innerhalb der Polypeptidketten spaltenden Endopeptidasen (EC 3.4.21-24) unterschieden, während lipolytische Enzyme in Esterasen (EC 3.1.1.1, spalten die Esterbindung wasserlöslicher, kurzkettiger Triglyzeride mit

weniger als 10 C-Atomen) und Lipasen (EC 3.1.1.3, spalten die Esterbindung langkettiger Triglyzeride mit mehr als 10 C-Atomen) unterteilt sind (Baur *et al.*, 2015, Chen *et al.*, 2003). In der vorliegenden Arbeit findet die exakte Unterteilung jedoch keine Anwendung, da mit Ausnahme weniger Arten die Enzyme nicht näher untersucht wurden. Daher werden ausschließlich die Begriffe „Lipase“ (für lipolytische Enzyme, Esterase oder Lipase) und „Peptidase“ (für proteolytische Enzyme) verwendet.

Dabei ist die Fähigkeit zur Bildung solcher Enzyme in einer Vielzahl von Gattungen wie beispielsweise *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Chryseobacterium*, *Lactobacillus*, *Microbacterium*, *Pseudomonas*, *Propionibacterium*, *Serratia* und *Streptococcus* vorhanden (Hantsis-Zacharov & Halpern, 2007, Stepaniak, 2011). Eine Beteiligung von Lipasen und Peptidasen von Starterkulturen in der Käsereifung ist dabei durchaus gewünscht (Collins *et al.*, 2003, Wilkinson & Kilcawley, 2005), werden diese aber bereits während der Lagerung von Rohmilch oder sekundärkontaminierten Zwischenprodukten gebildet, kann die textuelle und sensorische Qualität von mikrobiologisch einwandfreien Endprodukten negativ beeinträchtigt sein (Champagne *et al.*, 1994). Dies ist darauf zurückzuführen, dass einige der durch Mikroorganismen gebildeten Lipasen und Peptidasen die Pasteurisierung oder sogar die Ultrahocherhitzung relativ unbeschadet überstehen können und in den Endprodukten in aktiver Form vorliegen oder zumindest eine ausreichende Restaktivität aufweisen (Celestino *et al.*, 1997, Chen *et al.*, 2003, Machado *et al.*, 2017, Marchand *et al.*, 2009b, Sørhaug & Stepaniak, 1997, Stepaniak, 2011). Demzufolge werden diese Enzyme als hitzestabil bezeichnet, wobei sie sich in ihrer Hitzestabilität (D_9 -Wert = Zeit, um die Ausgangsaktivität des Enzyms bei Temperatur ϑ um 90 % zu reduzieren) teilweise deutlich unterscheiden. Dieser D_9 -Wert reicht beispielsweise für Lipasen von 48 °C für etwa 10 Minuten bei *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* (Oterholm *et al.*, 1970) bis zu 120 °C für 4 Minuten bei *Pseudomonas fluorescens* (Makhzoum *et al.*, 1996) und für Peptidasen von 55 °C für 15 Minuten bei *Lactobacillus helveticus* (Miyakawa *et al.*, 1992) bis zu 149 °C für etwa 22 Sekunden (in Milch) bei *Pseudomonas fluorescens* (Barach *et al.*, 1976). Aber auch milcheigene Enzyme wie beispielsweise Plasmin weisen eine relativ hohe Hitzestabilität auf und werden nicht vollständig durch die Pasteurisierung oder Ultrahocherhitzung inaktiviert (Chavan *et al.*, 2011, Metwalli *et al.*, 1998, Nielsen, 2002, Saint Denis *et al.*, 2001). Da sich die produktschädigenden Einflüsse von Lipasen und Peptidasen meist erst nach einiger Zeit zeigen, können insbesondere Produkte mit einer langen Haltbarkeit wie Butter, Hartkäse sowie auch alle ultrahocherhitzten Produkte davon betroffen sein. Das Vorhandensein proteolytischer Enzyme (Peptidasen) kann zu einem bitteren Geschmack, einer erhöhten Viskosität oder auch zur Gelbildung führen (Datta & Deeth, 2003), wohingegen lipolytische Enzyme (Lipasen) einen ranzigen Geschmack hervorrufen (Deeth & Fitz-Gerald, 2006).

1.2 Aufbau und Regulation des *apr*-Operons der Gattung *Pseudomonas*

1.2.1 Aufbau des *apr*-Operons

Vertreter der Gattung *Pseudomonas* sind wegen ihrer proteolytischen und lipolytischen Aktivität in der Milchindustrie seit Jahrzehnten vorwiegend als Verderbskeime bekannt. Vor allem, da ihre extrazellulär vorliegenden, sekretierten Lipasen und Peptidasen eine deutliche Hitzeresistenz aufweisen können (Andersson *et al.*, 1979, Baglinière *et al.*, 2013, Barach & Adams, 1977, Christen & Marshall, 1984, Marchand *et al.*, 2009a, Marchand *et al.*, 2009b, Matéos *et al.*, 2015, Mayerhofer *et al.*, 1973, Noreau & Drapeau, 1979, Sørhaug & Stepaniak, 1997). Zahlreiche Untersuchungen basierten dabei auf der Charakterisierung der Enzyme und möglichen, die Enzyymbildung beeinflussenden Umweltfaktoren wie beispielsweise die Wachstumstemperatur oder auch der Eisen- oder Calciumgehalt des Wachstumsmediums (Gügi *et al.*, 1991, Hellio *et al.*, 1993, Kordel *et al.*, 1991, Margesin & Schinner, 1992, Matéos *et al.*, 2015, Maunsell *et al.*, 2006, McKellar, 1982, McKellar & Cholette, 1984, 1986, McKellar *et al.*, 1987, Nicolaisen *et al.*, 2012, Patel *et al.*, 1983, Shamsuzzaman & McKellar, 1987). Andere Studien hingegen beschäftigten sich mit den genetischen Hintergründen dieser enzymatischen Aktivitäten (Aoyama *et al.*, 1988, Guzzo *et al.*, 1991a, Guzzo *et al.*, 1990, Guzzo *et al.*, 1991b). Dabei war insbesondere die mit der Typspezies *Pseudomonas aeruginosa* (Stamm PAO1) durchgeführte Studie von Guzzo *et al.* (1990) wegweisend, in der ein eigener Sekretionsmechanismus für das Peptidasegen (*aprA*; *apr* = *alkaline protease*) postuliert wurde. Dieser konnte in den darauffolgenden Jahren nachgewiesen werden (Guzzo *et al.*, 1991a, Guzzo *et al.*, 1991b). Die Sekretionsgene *aprD*, *aprE* und *aprF*, die für ein Signalpeptid unabhängiges Typ-I-Sekretionssystem kodieren ((AprD = inneres Membranprotein/ABC-Protein (*ATP-binding cassette*), AprE = Membran-Fusionsprotein (*membrane fusion protein*), AprF = äußeres Membranprotein (*outer membrane protein*)), sowie auch das Gen *aprI*, das für einen Peptidaseinhibitor (AprI) kodiert, wurden in Anlehnung an das Peptidase-Gen *aprA* benannt, da diese als in einem gemeinsamen Operon vorliegend vermutet wurden (Duong *et al.*, 1992). Im selben Jahr wurde außerdem das Lipasegen *lipA* auf dem Chromosom von *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 nachgewiesen, dessen Produkt (LipA) eine ähnliche Aminosäuresequenz wie die Lipasen anderer *Pseudomonas*-Arten aufweist (Wohlfarth *et al.*, 1992). Dabei wird LipA von *Pseudomonas aeruginosa* über ein komplexes Sekretionssystem exportiert (Bleves *et al.*, 2010, Filloux *et al.*, 1987, Jaeger *et al.*, 1994, Tommassen *et al.*, 1992, Wretling & Pavlovskis, 1984), worauf im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht weiter eingegangen wird. Duong *et al.* (1994) hatten aber gezeigt, dass die Lipase LipA von *Pseudomonas fluorescens* durch das Typ-I-Sekretionssystem, bestehend aus AprD, AprE und AprF, sekretiert wird, welches von *Pseudomonas aeruginosa* für die Sekretion der Peptidase AprA genutzt wird. Ergänzend dazu konnte bereits zuvor nachgewiesen werden, dass es sich sowohl bei den Sekretionsproteinen AprD, AprE und AprF als auch bei den Peptidasen AprA bzw. AprX aus *Pseudomonas aeruginosa* bzw. *Pseudomonas fluorescens* um homologe Proteine handelt (Liao & McCallus, 1998). Dass die Gene des Typ-I-Sekretionssystems (hier als *tliD*, *tliE* und *tliF* bezeichnet) und

die Gene *prtA* (Peptidasegen) und *tliA* (Lipasegen) in *Pseudomonas fluorescens* in Form eines Operons vorliegen, wurde auch von Ahn *et al.* (1999) bestätigt. *Pseudomonas aeruginosa* nutzt die Sekretionsproteine des *apr*-Sekretionssystems außerdem zum Export eines weiteren extrazellulären Proteins (ebenfalls als AprX bezeichnet), dessen Gen (*aprX*) wie auch das Peptidasegen (*aprA*) im *apr*-Gencluster von *Pseudomonas aeruginosa* vorliegt. Die genaue Funktion von AprX aus *Pseudomonas aeruginosa* ist bisher jedoch nicht bekannt (Duong *et al.*, 2001) und war vor dem Hintergrund der lipolytischen und proteolytischen Aktivität von *Pseudomonas*-Arten auch nicht Gegenstand der Untersuchung des *apr*-Operons der vorliegenden Arbeit. Ma *et al.* (2003) wiesen darauf hin, dass es sich bei den Proteinen AprX aus *Pseudomonas aeruginosa* (Duong *et al.*, 2001) und AprX aus *Pseudomonas fluorescens* (Woods *et al.*, 2001) um zwei unterschiedliche Proteine handelt. AprX aus *Pseudomonas fluorescens* ist dabei homolog zur Peptidase AprA aus *Pseudomonas aeruginosa*. Weitere mit dem *apr*-Gencluster assoziierte Gene wurden auch in *Pseudomonas fluorescens* nachgewiesen (Kawai *et al.*, 1999). Dabei handelte es sich um die Gene *pspA* und *pspB*, die eine deutliche Homologie zu Serin-Peptidasen aus *Serratia marcescens* aufweisen. Chabeaud *et al.* (2001) und Woods *et al.* (2001) hatten gezeigt, dass in *Pseudomonas brassicacearum* bzw. *Pseudomonas fluorescens* die Proteine PspA und PspB (auch als PrtA und PrtB bezeichnet) nicht an der proteolytischen Aktivität der beiden *Pseudomonas*-Arten beteiligt sind, obwohl die jeweiligen Gene im *apr*-Gencluster in Form eines Operons vorliegen und den Ergebnissen zufolge gemeinsam transkribiert werden. Der Promotor wurde „upstream“ (in 5'-Richtung) des Peptidasegens lokalisiert. AprA ist nach Chabeaud *et al.* (2001) und Woods *et al.* (2001) in einigen *Pseudomonas*-Arten die einzige extrazelluläre Peptidase, was auch aus anderen Studien hervorgeht (Hellio *et al.*, 1993, Loper *et al.*, 2012, Marchand *et al.*, 2009b, Maunsell *et al.*, 2006).

Die zahlreichen Studien an unterschiedlichen *Pseudomonas*-Isolaten/-Arten hatten zu einer sehr uneinheitlichen und teilweise irreführenden Benennung der verschiedenen Gene des *apr*-Operons geführt. Ma *et al.* (2003) postulierten aufgrund dieser Unstimmigkeiten nach Vergleich der vorliegenden Literatur und der genetischen Organisation der mit dem Operon assoziierten Gene verschiedener *Pseudomonas*-Arten eine einheitliche Gen-Nomenklatur. Diese ist nachfolgend aufgeführt und wurde auch in der vorliegenden Arbeit angewandt. Das gesamte Operon wurde nach Ma *et al.* (2003) als *apr*-Operon bezeichnet, unabhängig davon, welche der Gene in den einzelnen untersuchten Arten vorlagen. Nach Ma *et al.* (2003) wurde das Peptidasegen als *aprA* bezeichnet, das Gen für den Peptidaseinhibitor als *aprI*, die Gene des Typ-I-Sekretionssystems als *aprD*, *aprE* und *aprF* und das Lipasegen als *lipA*. Falls mehrere Lipasegene in diesem Operon vorlagen, wurden diese als *lipA1* und *lipA2* bezeichnet. Die bei einigen *Pseudomonas*-Arten ebenfalls in diesem Operon vorliegenden Gene mit Homologie zu Serin-Peptidasen wurden als *pspA* und *pspB* bezeichnet. Eine Übersicht der bisher aus den verschiedenen Arten oder Stämmen bekannten genetischen Organisationen des *apr*-Operons ist in Tabelle 1-1 aufgeführt. Dabei ist zu beachten, dass in *Pseudomonas aeruginosa* nicht nur das Lipasegen *lipA* nicht Teil des Operons ist, sondern auch die

Operonstruktur (Anordnung der Gene) deutlich von der Struktur aller anderen Arten abweicht.

Tabelle 1-1: Bekannte Strukturen des *apr*-Operons verschiedener *Pseudomonas*-Stämme nach Ma *et al.* (2003).

Operonstruktur (5'-3')	Operonstruktur Kurzform	(5'-3')	Art(en)/Isolat(e)	Referenz
(<i>aprX</i>)- <i>aprD</i> - <i>aprE</i> - <i>aprF</i> - <i>aprA</i> - <i>aprI</i>	(X) D E F A I		<i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i> PAO1	Duong <i>et al.</i> 1992
<i>aprA</i> - <i>aprI</i> - <i>aprD</i> - <i>aprE</i> - <i>aprF</i> - <i>lipA</i>	A I D E F L		<i>Pseudomonas</i> <i>fluorescens</i> SIK W1	Ahn <i>et al.</i> 1999
<i>aprA</i> - <i>aprI</i> - <i>aprD</i> - <i>aprE</i> - <i>aprF</i> - <i>pspA</i> - <i>pspB</i> - <i>lipA</i>	A I D E F pA pB L		<i>Pseudomonas</i> <i>fluorescens</i> no. 33 B52	Kawai <i>et al.</i> 1999
<i>aprA</i> - <i>aprI</i> - <i>aprD</i> - <i>aprE</i> - <i>aprF</i> - <i>pspA</i> - <i>pspB</i> - <i>lipA2</i> - <i>lipA1</i>	A I D E F pA pB L2 L1		<i>Pseudomonas</i> <i>fluorescens</i> Pf0-1	Woods <i>et al.</i> 2001
<i>aprA</i> - <i>aprI</i> - <i>aprD</i> - <i>aprE</i> - <i>aprF</i> - <i>pspB</i> - <i>lipA</i>	A I D E F pB L		<i>Pseudomonas</i> <i>brassicacearum</i> NFM421	Ma <i>et al.</i> 2003
				Chabeaud <i>et al.</i> 2001

Trotz der unterschiedlichen genetischen Organisation der Gene des *apr*-Operons von *Pseudomonas aeruginosa* und den anderen *Pseudomonas*-Arten lässt sich das *apr*-Operon in einen konservierten und einen variablen Bereich unterteilen. Konserviert wäre nach Ma *et al.* (2003) die Reihenfolge der Gene des Typ-I-Sekretionssystems (*aprD*, *aprE* und *aprF*). Lässt man *Pseudomonas aeruginosa* außen vor, könnten aber auch die Gene *aprA* und *aprI* zum konservierten Bereich gehören, da derartige Operonstrukturen ähnlicher Peptidasen auch aus anderen Gattungen bekannt sind (Linhartova *et al.*, 2010).

1.2.2 Regulation des *apr*-Operons

Aussagekräftige systematische und direkte Untersuchungen zur Regulation des *apr*-Operons liegen derzeit nicht vor, jedoch wurde die Peptidase AprA in zahlreichen Studien als phänotypischer Marker verwendet. Aufgrund der aus *Pseudomonas fluorescens* B52 bekannten polycistronischen Operonstruktur mit *aprA* am Anfang und *lipA* am Ende (mit Ausnahme von *Pseudomonas aeruginosa*), ist eine parallele Expression von *aprA* und *lipA* naheliegend (Chabeaud *et al.*, 2001, McCarthy *et al.*, 2004) – vor allem, da die Expression des Operons vermutlich über einen einzigen Promotor gesteuert wird (Woods *et al.*, 2001). Da extrazelluläre Enzyme in *Pseudomonas* spp. aber oftmals Teil des Sekundärmetabolismus sind oder als Virulenzfaktoren fungieren, ist deren Transkription und Translation in der Regel streng reguliert (Blumer *et al.*, 1999, Heeb & Haas, 2001, Reimann *et al.*, 1997). Die

Bildung von AprA steht dabei unter der Kontrolle der RNA-Bindeproteine RsmA und/oder RsmE sowie des zentralen regulatorischen Zweikomponentensystems GacS (Sensor kinase)/GacA (Antwortregulator), welches die Expression der kurzen regulatorischen RNAs (*small RNAs* = sRNAs) RsmX, RsmY und RsmZ steuert (Blumer *et al.*, 1999, Heeb *et al.*, 2002, Humair *et al.*, 2010, Siddiqui *et al.*, 2005, Valverde *et al.*, 2003, Zuber *et al.*, 2003). Diese sRNAs binden spezifisch an RsmA und RsmE und lösen deren Bindung an die Shine-Dalgarno-Sequenz der Ribosomenbindestelle (RBS). Dadurch wird die translationale Hemmung durch RsmA und/oder RsmE aufgehoben und die Translation der mRNA so regulierter Genprodukte wird ermöglicht (Duss *et al.*, 2014, Kay *et al.*, 2005, Lapouge *et al.*, 2013, Lapouge *et al.*, 2008, Lapouge *et al.*, 2007, Reimann *et al.*, 2005, Schubert *et al.*, 2007). Die Gac/Rsm-Regulations-Kaskade unterliegt jedoch selbst zahlreichen regulatorischen Einflüssen. In *Pseudomonas protegens* (Stamm CHA0) und *Pseudomonas aeruginosa* wurde nachgewiesen, dass die Sensor kinase LadS aktivierend und die Sensor kinase RetS hemmend auf GacS wirkt, wobei die Umgebungstemperatur zusätzlichen Einfluss auf die Aktivität von RetS selbst zu haben scheint (Goodman *et al.*, 2009, Humair *et al.*, 2009). Die Peptidase Lon hat in *Pseudomonas protegens* (Stamm CHA0) ebenfalls eine hemmende Wirkung auf das Gac/Rsm-System, indem es GacA in Abhängigkeit vom Wachstumszustand der Zelle abbaut (Takeuchi *et al.*, 2014). Aber auch Intermediate und Enzyme des Primärstoffwechsels beeinflussen das Gac/Rsm-System. Neben den Enzymen Pyruvat-Carboxylase (codiert durch *pycAB*) und Fumarase (Fumarase Isoenzym, codiert durch *fumA*) kommt auch dem Alarmon Guanosintetraphosphat (ppGpp) eine entscheidende Rolle zu (Takeuchi *et al.*, 2009, Takeuchi *et al.*, 2012). Es wird vermutet, dass ppGpp bei der Aktivierung des Gac/Rsm-Systems beteiligt ist, wenn bei hohen Zelldichten oder Nährstoffmangel ein Übergang von exponentiellem Wachstum in stationäres Wachstum oder ein Umschalten auf den Sekundärmetabolismus erfolgt (Takeuchi *et al.*, 2012). Die Aktivierung bei hohen Zelldichten war bereits zuvor beobachtet worden und wurde auf ein bisher unbekanntes Quorum-Sensing-Signal zurückgeführt (Dubuis & Haas, 2007, Kay *et al.*, 2005). Quorum-Sensing-Signale spielen insbesondere bei der komplexen Regulation von *Pseudomonas aeruginosa* eine zentrale Rolle, während sie teilweise aber selbst unter dem direkten oder indirekten Einfluss des Gac/Rsm-Systems stehen (Balasubramanian *et al.*, 2013, Brencic & Lory, 2009, Brencic *et al.*, 2009, Coggan & Wolfgang, 2012, Jimenez *et al.*, 2012, Juhas *et al.*, 2005, Mikkelsen *et al.*, 2011). Es ist außerdem bekannt, dass Spontanmutationen in den Genen *gacA* und *gacS* von *Pseudomonas* sp. an der Entstehung unterschiedlicher Phänotypen in Bezug auf Sekundärmetabolite beteiligt sind (van den Broek *et al.*, 2003, van den Broek *et al.*, 2005). Dieser als *phase variation* bezeichnete Mechanismus lässt sich möglicherweise auch auf das *apr*-Operon übertragen, zumindest deutet die Studie von Chabeaud *et al.* (2001) darauf hin.

Obwohl bereits seit über einem Jahrzehnt am Zusammenspiel der Gac/Rsm-Regulations-Kaskade und an möglichen daran beteiligten Faktoren geforscht wird, wurden die meisten Untersuchungen dazu an den Stämmen *Pseudomonas protegens* CHA0 (Typstamm der Art,

zuvor als *Pseudomonas fluorescens* CHA0 bezeichnet) (Blumer *et al.*, 1999, Dubuis & Haas, 2007, Humair *et al.*, 2009, Lapouge *et al.*, 2013, Lapouge *et al.*, 2007, Moll *et al.*, 2010, Reimann *et al.*, 2005, Takeuchi *et al.*, 2009, Takeuchi *et al.*, 2014, Takeuchi *et al.*, 2012, Valverde *et al.*, 2003, Zuber *et al.*, 2003) und *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (Brencic & Lory, 2009, Brensic *et al.*, 2009, Frangipani *et al.*, 2013, Guzzo *et al.*, 1990, Mikkelsen *et al.*, 2011, Morris *et al.*, 2013, Reimann *et al.*, 1997) durchgeführt. Untersuchungen zum Gac/Rsm-System an anderen *Pseudomonas*-Arten wie z.B. *Pseudomonas brassicacearum*, *Pseudomonas chlororaphis* und *Pseudomonas syringae* oder deren Subspezies liegen hingegen nur vereinzelt vor (Cha *et al.*, 2012, Lalaouna *et al.*, 2012, Moll *et al.*, 2010, Selin *et al.*, 2012, Wang *et al.*, 2013). Insgesamt betrachtet ist momentan jedoch noch unklar, ob sich die Regulations-Kaskade des Gac/Rsm-Systems und dessen Verknüpfung mit dem *apr*-Operon auch auf andere, diesbezüglich bisher nicht untersuchte *Pseudomonas*-Arten übertragen lässt.

1.3 Taxonomische Einordnung neuer Bakterienarten

Klassifizierung, Charakterisierung und Nomenklatur bilden die Grundbausteine der Taxonomie. Bakterien werden aufgrund von Ähnlichkeiten oder Gemeinsamkeiten in verschiedenen hierarchischen Gruppen (Taxa) zusammengefasst. Der Grad der Ähnlichkeit entscheidet über die Zugehörigkeit zu einer Domäne, einem Phylum, einer Klasse, einer Ordnung, einer Familie, einer Gattung oder einer Art (Stackebrandt, 2006, Woese *et al.*, 1990). Die beiden Kategorien „Gattung“ und „Art“ bilden dabei die wichtigsten taxonomischen Ebenen (Brenner *et al.*, 2005) und sind in der Nomenklatur untrennbar miteinander verbunden. Dabei gehen die Ursprünge der Systematik und Taxonomie der Bakterien auf das Ende des 19. Jahrhunderts zurück (Migula, 1897, 1900). Aufgrund des damals vorliegenden Wissensstands und der verfügbaren Techniken wurden zahlreiche, teilweise gleiche Gattungen und Arten aufgrund unterschiedlicher Beobachtungen als verschiedene Gattungen oder Arten beschrieben. Um dieser Lage Herr zu werden, veröffentlichten Skerman *et al.* (1980) die sogenannte „Approved Lists of Bacterial Names“. Alle darin genannten Gattungen und Arten galten ab dem Moment der Veröffentlichung als valide beschrieben und alle nicht darin genannten Gattungs- und Artnamen wurden als ungültig erklärt. Dies war gleichzeitig der Startpunkt der bis heute gültigen Nomenklatur von Bakterien, die als „Bakteriologischer Code“ bekannt wurde (Lapage *et al.*, 1992). Diese Nomenklatur in Form von Gattungs- und Artnamen (Binomial System) hat ihren Ursprung im Werk „*Species Plantarum*“ von Carl von Linné aus dem Jahr 1753 zur Benennung von Pflanzen. Darauf geht außerdem der bis heute gültige Zusammenhang zurück, dass die Beschreibung einer Art nicht möglich ist, ohne eine Gattung zu beschreiben, und eine Gattung nicht ohne eine Art beschrieben werden kann (Stackebrandt, 2006). Zwar existieren bis heute keine eindeutig festgelegten und allgemein gültigen Definitionen zur Abgrenzung von Gattungen oder Arten, jedoch wurde für einige Gattungen ein minimaler methodischer Standard zur Beschreibung neuer Arten veröffentlicht (Freney *et al.*, 1999, Graham *et al.*, 1991, Logan *et al.*, 2009, Schumann *et al.*, 2009, Stackebrandt *et al.*, 2002). Ganz allgemein

werden sowohl Gattungen als auch Arten als Gruppe von Stämmen angesehen, die sich in einer Vielzahl von Merkmalen ähnlich sind, sich aber gleichzeitig durch weitere Eigenschaften von anderen Stammgruppen unterscheiden (Stackebrandt, 2006). Die Charakterisierung einer isolierten Stammgruppe (oder eines einzelnen Isolats) beginnt mit dem Sammeln von Daten. Diese können genetischer, phylogenetischer, chemotaxonomischer, physiologischer oder auch biochemischer Natur sein, aus deren Zusammenfassung sich die charakteristischen Eigenschaften der Gruppe ergeben. Stimmen diese Charakteristika mit denen bereits beschriebener Gattungen oder Arten überein, führt dies zur Identifizierung und Klassifizierung der Gruppe. Ist dies nicht der Fall, kann eine Klassifizierung erst nach vorhergehender Neubeschreibung und Benennung der Gruppe gemäß den taxonomischen Richtlinien erfolgen (Trüper & Schleifer, 2006). Heutzutage geben in der Regel die genetischen und phylogenetischen Informationen die ersten Hinweise darauf, dass es sich bei einem Isolat um einen Vertreter einer potentiell neuen Art oder Gattung handeln könnte. Im Allgemeinen erfolgt die Identifizierung eines unbekanntes Isolats über den Vergleich seiner 16S rRNA Gensequenz mit in öffentlichen Datenbanken hinterlegten korrespondierenden Gensequenzen valide beschriebener Arten (Benson *et al.*, 2013, Chun *et al.*, 2007, Kim *et al.*, 2012, Rossello-Mora & Amann, 2001, Tindall *et al.*, 2010). Eine 16S rRNA Gensequenzähnlichkeit von 98,65 % wird dabei als gängige Artgrenze verwendet (Kim *et al.*, 2014), unterhalb derer Stämme als nicht der gleichen Spezies angehörig betrachtet werden. Als Gattungsgrenze findet sich in der gängigen Praxis eine 16S rRNA Gensequenzähnlichkeit von 95 %, wobei generell auch die phylogenetische Verwandtschaft von Gattungen und Arten zu beachten ist (Tindall *et al.*, 2010). Außerdem sollte berücksichtigt werden, dass die Ähnlichkeit 16S rRNA Gensequenz nicht für alle Gattungen ausreichend differenzierend ist und eventuell auch andere oder weitere Gene als phylogenetischer Marker verwendet werden sollten (Becker *et al.*, 2004, Lechner *et al.*, 1998, Mellmann *et al.*, 2006, Moore *et al.*, 1996, Mulet *et al.*, 2009, Mulet *et al.*, 2010, Sproer *et al.*, 1999, Yamamoto *et al.*, 2000). Liegt basierend auf diesen Methoden die Vermutung nahe, dass es sich um ein potentiell neues Taxa handeln könnte, ist das Mittel der Wahl dieses zu charakterisieren und zu klassifizieren ein sogenannter polyphasischer Ansatz (Vandamme *et al.*, 1996). Bei dessen methodischer Durchführung sind auch die Typstämme aller relevanten nah verwandten Gattungen oder Arten mitzuführen (Ludwig *et al.*, 1998, Rossello-Mora & Amann, 2001, Stackebrandt, 2006, Tindall *et al.*, 2010, Vandamme *et al.*, 1996). Ein polyphasischer Ansatz beinhaltet beispielsweise chemotaxonomische Merkmale, wie die Zusammensetzung der Zellmembran in Hinblick auf die respiratorischen Chinone, die zellulären Fettsäuren oder die polaren Lipide (Altenburger *et al.*, 1996, Kämpfer & Kroppenstedt, 1996, Tindall, 1990a, b), morphologische Eigenschaften wie Zellgröße, Kolonieforn, Begeißelung oder auch Sporenbildung, und physiologische Merkmale wie zum Beispiel die Fähigkeit, bestimmte Kohlenhydrate zu verstoffwechseln oder bei definierten Temperaturen, pH-Werten und Salzkonzentrationen zu wachsen (Trüper & Schleifer, 2006). Da es für die zu testenden physiologischen Merkmale keine definierten Richtlinien gibt, sollte dabei die Auswahl anhand der Eigenschaften der Vergleichs-Typstämme erfolgen. Ergänzt werden diese Informationen in der Regel durch

genotypische und phylogenetische Charakterisierungen (Stackebrandt *et al.*, 2002, Tindall *et al.*, 2010), die zu den wohl wichtigsten Parametern zur Abgrenzung von Gattungen und Arten im Rahmen eines polyphasischen Ansatzes dienen. Neben dem zuvor schon erwähnten Vergleich der Gensequenzähnlichkeit der 16S rRNA kommen unter anderem auch Techniken wie Multi-Lokus-Sequenz-Typisierungen (MLST) (Baldwin *et al.*, 2005, Maiden *et al.*, 1998) und Multi-Lokus-Sequenz-Analysen (MLSA) (Gevers *et al.*, 2005, Mulet *et al.*, 2010, Serrano *et al.*, 2010) verschiedener *Housekeeping*-Gene zum Einsatz, aber auch die DNA-DNA-Hybridisierung (DDH), die noch immer als „Goldstandard“ gilt, um Bakterienstämme miteinander zu vergleichen (Colwell, 1970, Johnson & Ordal, 1968, Stackebrandt *et al.*, 2002, Tindall *et al.*, 2010, Wayne *et al.*, 1987). Da jedoch auch die DDH gewisse Schwächen aufweist, die Artgrenze von 70 % DDH-Ähnlichkeit nicht allgemein gültig ist und die Anwendung als relativ aufwändig gilt (Fournier & Raoult, 2009, Konstantinidis *et al.*, 2006, Rosselló-Mora, 2006), geht der Trend in der Bakterientaxonomie hin zu neuen Methoden des Gesamtgenomvergleichs (Borriss *et al.*, 2011, Chun & Rainey, 2014, Kämpfer & Glaeser, 2012, Thompson *et al.*, 2013). Durch die Entwicklung des „Next-Generation Sequencing“ (NGS) ist es heutzutage möglich, bakterielle Genome innerhalb kürzester Zeit kostengünstig zu sequenzieren und mittels verschiedener bioinformatischer Methoden miteinander zu vergleichen (Buermans & den Dunnen, 2014, Deloger *et al.*, 2009, Henz *et al.*, 2005, Kämpfer & Glaeser, 2012, Konstantinidis & Tiedje, 2005a, b, van Dijk *et al.*, 2014, Varghese *et al.*, 2015). Insbesondere der Methode zur Bestimmung der durchschnittlichen Nukleotid-Übereinstimmung von Genomen untereinander (*average nucleotide identity* = ANI) kommt dabei eine besondere Bedeutung zu, da gezeigt werden konnte, dass ein ANI-Wert von 94–96 % mit einer DDH-Ähnlichkeit von 70 % korreliert (Chun & Rainey, 2014, Goris *et al.*, 2007, Konstantinidis & Tiedje, 2005a, Richter & Rossello-Mora, 2009).

Die Gattung *Pseudomonas*

Arten der Gattung *Pseudomonas* wurden erstmals 1894 von W. Migula vorgestellt. Dieser präsentierte eine ausführliche Beschreibung der Gattung (Migula, 1900) anhand 75 verschiedener Arten, inklusiver einer Beschreibung der Art *Pseudomonas aeruginosa*, deren erste Erwähnung als „*Bacterium aeruginosum*“ auf Schroeter (1872) zurückgeht. Die Gattung *Pseudomonas* wurde 1952 von der „*Judicial Commission of the International Committee on Bacteriological Nomenclature*“ anerkannt und *Pseudomonas aeruginosa* als Typspezies der Gattung definiert (Hugh & Leifson, 1964). Da jedoch kein Isolat des von J. Schroeter ursprünglich beschriebenen Stamms vorhanden war, wurde der Stamm ATCC 10145 (Lysenko, 1961) als neuer Typstamm der Typspezies vorgeschlagen (Hugh & Leifson, 1964) und im Nachfolgenden auch als solcher definiert (Parker *et al.*, 2015, Skerman *et al.*, 1980). Die Gattung *Pseudomonas*, nach der auch die Familie der *Pseudomonadaceae* benannt wurde (Winslow *et al.*, 1917), umfasst derzeit über 150 anerkannte Arten (Euzeby, 1997, Parte, 2014) und ist schon seit langem für ihre extreme metabolische Vielfältigkeit bekannt (Stanier *et al.*, 1966). Dabei sind die Vertreter der Gattung bezogen auf ihren Nähr- und Mineralstoffbedarf als relativ anspruchslos zu betrachten. Sie wachsen in der Regel gut in

einem Temperaturbereich von 4–42 °C und einem pH-Wert zwischen 4 und 8 (Moore *et al.*, 2006). Einzelne Arten wachsen jedoch auch bei höheren Temperaturen (Bennasar *et al.*, 1996, Manaia & Moore, 2002). Arten der Gattung *Pseudomonas* gelten als ubiquitär vorkommend und konnten rund um den Globus aus den unterschiedlichsten Lebensräumen wie Böden (Arnau *et al.*, 2015, Carrion *et al.*, 2011, Sanchez *et al.*, 2014b, Toro *et al.*, 2013, Xie *et al.*, 2014, Zhang *et al.*, 2015), Gewässern (Dabboussi *et al.*, 1999a, b, Ivanova *et al.*, 2002, Manaia & Moore, 2002, Pascual *et al.*, 2012, Verhille *et al.*, 1999a, Verhille *et al.*, 1999b), Pflanzen (Achouak *et al.*, 2000, Amoozegar *et al.*, 2014, Gardan *et al.*, 2002, Hwang *et al.*, 2009, Munsch *et al.*, 2002, Ramirez-Bahena *et al.*, 2015, Ramos *et al.*, 2013) und Tieren (Hameed *et al.*, 2014, Lopez *et al.*, 2012, Menendez *et al.*, 2015, Nishimori *et al.*, 2000) isoliert werden. Einige Arten wurden außerdem als Tier-, Pflanzen- oder Humanpathogene eingestuft (Moore *et al.*, 2006, Peix *et al.*, 2009) oder als Verderbskeime in der Lebensmittelindustrie identifiziert (Arslan *et al.*, 2011, Ercolini *et al.*, 2007, Franzetti & Scarpellini, 2007, Tryfinopoulou *et al.*, 2002, Van Tassell *et al.*, 2012). Insbesondere in der Milchindustrie zählen *Pseudomonas*-Arten aufgrund der in der gesamten Gattung stark verbreiteten Psychrotoleranz und der proteolytischen und lipolytischen Aktivität vieler Arten zu den wichtigsten Verderbskeimen (Caldera *et al.*, 2016, Hantsis-Zacharov & Halpern, 2007, Marchand *et al.*, 2009a, Marchand *et al.*, 2009b, Martins *et al.*, 2006).

Da die erste Beschreibung der Gattung *Pseudomonas* aus der Anfangszeit der Bakterientaxonomie stammt, wurde sie im Laufe der Zeit mehrfach taxonomisch umgestaltet und zahlreiche Arten anderen oder neuen Gattungen zugeordnet. Zu den ursprünglich beschriebenen Eigenschaften (stäbchenförmig, beweglich, gramnegativ, aerober Stoffwechsel, keine Sporenbildung) kamen zahlreiche genetische, phylogenetische, chemotaxonomische, physiologische und biochemische Eigenschaften hinzu, um die Zugehörigkeit einer Art zu dieser Gattung zu bestätigen. Eine umfangreiche Zusammenfassung dieser zeitlichen und methodischen Entwicklung wurde von Peix *et al.* (2009) veröffentlicht. Ein Jahr später publizierten Mulet *et al.* (2010) einen MLSA-Ansatz zur Differenzierung von *Pseudomonas*-Arten, der seitdem als gängige Methode bei der Beschreibung neuer *Pseudomonas*-Arten gilt (Arnau *et al.*, 2015, Pascual *et al.*, 2015, Pascual *et al.*, 2012, Ramirez-Bahena *et al.*, 2015, Tao *et al.*, 2014, Toro *et al.*, 2013). Außerdem belegten Gomila *et al.* (2015) in ihrer phylogenetischen Studie eine Korrelation zwischen der MLSA-Ähnlichkeit und den Ergebnissen von Gesamtgenomvergleichen mittels ANIb (Goris *et al.*, 2007) innerhalb der Gattung *Pseudomonas*. Dabei wiesen die Autoren außerdem auf die Notwendigkeit hin, dass Genome von allen anerkannten Typstämmen verfügbar sein sollten, wodurch eine detailliertere Darstellung der Phylogenie dieser artenreichen Gattung ermöglicht werden würde.

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es zunächst die vorherrschende Mikrobiota aus 20 Rohmilchen und 20 Milchhalbfabrikaten anhand einer randomisierten Stichprobe zu ermitteln. Hierfür sollten die Isolate in einem ersten Schritt identifiziert und nachfolgend das lipolytische und proteolytische Potential repräsentativer Vertreter ermittelt werden. Diese groß angelegte systematische Studie soll dazu beitragen, das Verderbspotential einzelner Arten, Gattungen oder taxonomischer Großgruppen in der Milchindustrie besser beurteilen zu können.

Die Gattung *Pseudomonas* weist, den Ergebnissen des ersten Teils dieser Arbeit zufolge, ein hohes lipolytisches und proteolytisches Potential auf. Dieses ist vermutlich auf das *apr*-Operon zurückzuführen, das mit unterschiedlicher Operonstruktur nur für wenige Arten beschrieben ist. Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit sollte daher die Verbreitung des *apr*-Operons innerhalb der Gattung *Pseudomonas* anhand von 56 ausgewählten Arten ermittelt werden. Die hierfür notwendigen genomischen Daten sollten dabei für 86 der 107 verwendeten *Pseudomonas*-Stämme erstellt werden. Auf Basis der genomischen Daten galt es im nächsten Schritt, die genetische Variabilität des *apr*-Operons zu untersuchen und mögliche regulationsassoziierte Gene zu ermitteln. Ziel war es außerdem, in einem weiteren Schritt die phylogenetische Verwandtschaft des *apr*-Operons anhand konservierter Gene zu ermitteln. Insgesamt sollen diese Daten dazu beitragen, einen tieferen Einblick in die genetischen, phylogenetischen und regulatorischen Hintergründe der lipolytischen und proteolytischen Aktivität von *Pseudomonas*-Arten zu gewinnen, damit diese in nachfolgenden Studien genauer analysiert werden können.

Im Zuge der Ermittlung der vorherrschenden Mikrobiota aus 20 Rohmilchen und 20 Milchhalbfabrikaten konnten jedoch viele Isolate auf Basis der zur Identifizierung verwendeten phylogenetischen Markergene keiner offiziell anerkannten Art oder Gattung eindeutig zugeordnet werden. Vier potentiell neue Arten der Gattung *Pseudomonas* sollten im dritten Teil dieser Arbeit durch einen polyphasischen Ansatz im Vergleich zu nah verwandten Typstämmen charakterisiert und anschließend beschrieben werden.

2 MATERIAL UND METHODEN

Alle im Zuge dieser Arbeit verwendeten Chemikalien (siehe Tabelle 6-1) und Materialien wurden, sofern nicht anders angegeben, von den folgenden Firmen bezogen: Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland), Greiner Bio-One (Frickenhausen, Deutschland), Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland), Thermo Scientific Inc. (Waltham, Massachusetts, USA), Sigma-Aldrich (München, Deutschland) und VWR (Darmstadt, Deutschland). Das zur Herstellung von Medien und Lösungen verwendete Reinstwasser (MilliQ) wurde über eine MilliQ-Anlage (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) hergestellt. Um sterile Lösungen und Medien zu erhalten, wurden diese entweder autoklaviert oder mit einem Membranfilter mit einer Porengröße von 0,2 µm sterilfiltriert. Alle verwendeten Fertignährmedien wurden entsprechend der Herstellerangaben hergestellt.

2.1 Nährmedien und Lösungen

In der vorliegenden Arbeit wurden die im Folgenden aufgelisteten Nährmedien und Lösungen verwendet (siehe Tabelle 2-1). Alle Medien wurden entsprechend der angegebenen Zusammensetzung erstellt und, sofern nicht anders angegeben, für 20 Minuten bei 121 °C autoklaviert. Hitzelabile Medien und Medienkomponenten, wie z.B. das Suspensionsmedium oder die Spurenelement- und Kohlenstoffquellen-Lösungen, wurden mit Hilfe eines Sterilfilters (Porengröße 0,2 µm) sterilfiltriert. Die Medien SIM, OFG, OFL, Glycerin-Lösung zur Stammlagerung, Tributyrin-Agar und die Komponente 1 des Proteolyse-Agars wurden alle vor dem Autoklavieren für 10 Minuten bei 100 °C gelöst. Halbfeste Medien wie SIM, OFG, OFL, Nutrient-Gelatine und die Glycerin-Lösung zur Stammlagerung wurden in 5–10 Milliliter-Portionen in Reagenzgläser abgefüllt. Alle Agarmedien wurden nach dem Autoklavieren und Abkühlen auf ca. 50 °C in sterile Petrischalen zu Medien mit einer Schichtdicke von etwa 5 mm gegossen. Abweichend davon wurden der Tributyrin- und der Proteolyse-Agar bei einer Medientemperatur von ca. 60 °C gegossen und die Agarplatten zur schnellen Abkühlung einzeln ausgelegt, damit die Medienlösungen ihren homogenen Charakter auch beim Erkalten beibehalten. Dies war vor allem beim Tributyrin-Agar von besonderer Bedeutung, da sich das fein emulgierte Tributyrin bei langsamem Abkühlen wieder aus der Emulsion löst und dem Medium nicht die gewünschte Trübung verleiht. Bei den zur FTIR-Messung verwendeten Medien handelte es sich jeweils um spezielle Chargen der Fertignährmedien APT, TSA und YGC. Für diese wurde vor ihrer Verwendung überprüft, ob sie im Vergleich zu den vorhergehend verwendeten Chargen vergleichbare FTIR-Spektren lieferten. Das API[®] 50 CHB/E Flüssigmedium wurde als Fertignährmedium in Ampullen direkt verwendet und die API[®] 20E Teststreifen wurden entsprechend der Herstellerangaben angewendet.

MATERIAL UND METHODEN

Tabelle 2-1: Verwendete Medien und Lösungen.

Medium/Lösung	Mengenangabe	Komponenten/Spezifikationen
All-purpose-Agar mit Tween (APT)	59,9 g/L	Fertignährmedium (Merck KGaA) eingestellt auf pH 6,7
Trypton-Soja-Agar (TSA) + Glucose	40,0 g/L 1,0 g/L	Fertignährmedium (Oxoid) D-(+)-Glucose eingestellt auf pH 7,3
Hefeextrakt-Glucose-Chloramphenicol-Agar (YGC)	40,0 g/L	Fertignährmedium (Merck KGaA) eingestellt auf pH 6,6
YGC + Bromphenolblau (YGCB)	40,0 g/L 0,01 g/L	Fertignährmedium (Merck KGaA) Bromphenolblau eingestellt auf pH 6,6
Cetrimid-Agar	45,3 g/L 10,0 ml/L	Fertignährmedium (Merck KGaA) Glycerin eingestellt auf pH 7,2
R2A-Agar	18,2 g/L	Fertignährmedium (Merck KGaA) eingestellt auf pH 7,2
Lysogeny broth(LB)-Agar (Bertani, 1951)	10,0 g/L 5,0 g/L 5,0 g/L 15,0 g/L	Pepton aus Casein Hefeextrakt NaCl Agar eingestellt auf pH 7,0
Stärke-Agar	10,0 g/L 3,0 g/L 12,0 g/L	Stärke (löslich) Fleischextrakt Agar eingestellt auf pH 7,5
Plate-Count-Magermilch-Agar (PCM)	5,0 g/L 2,5 g/L 1,0 g/L 1,0 g/L 15,0 g/L	Pepton aus Casein Hefeextrakt D-(+)-Glucose Magermilchpulver Agar eingestellt auf pH 7,5
King-A-Agar (King <i>et al.</i> , 1954)	20,0 g/L 1,4 g/L 10,0 g/L 10,0 g/L 10,0 ml/L	Pepton aus Gelatine MgCl K ₂ SO ₄ Agar Glycerin eingestellt auf pH 7,2
King-B-Agar (King <i>et al.</i> , 1954)	10,0 g/L 10,0 g/L 1,5 g/L 1,5 g/L 10,0 g/L 10,0 ml/L	Pepton aus Gelatine Pepton aus Casein MgSO ₄ K ₂ HPO ₄ Agar Glycerin eingestellt auf pH 7,2

MATERIAL UND METHODEN

Medium/Lösung	Mengenangabe	Komponenten/Spezifikationen
Columbia-Blut-Agar	39,0 g/L 5 % (v/v)	Fertignährmedium Columbia Blood steriles, defibriniertes Schafsblut eingestellt auf pH 7,3
Tributylin-Agar	2,5 g/L	Pepton aus Fleisch
Protokoll nach KGaA (2005)	2,5 g/L	Pepton aus Casein
	3,0 g/L	Hefeextrakt
	12,0 g/L	Agar
	4,0 ml/L	TWEEN 80
	10,0 ml/L	Tributylin eingestellt auf pH 7,5
Proteolyse-Agar		
Komponente 1 (2 x Nutrient-Agar)	6,0 g/L	Fleischextrakt
	10,0 g/L	Pepton aus Casein
	30,0 g/L	Agar eingestellt auf pH 6,8
Komponente 2 (Magermilchpulver)	100,0 g/L	Magermilchpulver eingestellt auf pH 6,8
SIM-Medium	30,0 g/L	Fertignährmedium (Merck KGaA) eingestellt auf pH 7,3
OF-Medium	2,0 g/L	Pepton aus Casein
(OF = Oxidativ-fermentativ-Medium	1,0 g/L	Hefeextrakt
in Anlehnung an	5,0 g/L	NaCl
Hugh and Leifson (1953))	0,2 g/L	K ₂ HPO ₄
	0,08 g/L	Bromthymolblau
	2,5 g/L	Agar
(OFG) bzw.	10,0 g/L	D-(+)-Glucose bzw.
(OFL)		D-(+)-Lactose eingestellt auf pH 6,8
Trypton-Soja-Bouillon (TSB)	17,0 g/L	Pepton aus Casein
	3,0 g/L	Pepton aus Soya
	5,0 g/L	NaCl
	2,5 g/L	K ₂ HPO ₄
	2,5 g/L	D-(+)-Glucose eingestellt auf pH 7,3
Nutrient-Gelatine	3,0 g/L	Fleischextrakt
	5,0 g/L	Pepton aus Fleisch
	120,0 g/L	Gelatine eingestellt auf pH 6,8
Glycerin-Lösung zur Stammlagerung	19,0 g/L	L-Glutaminsäure-Natriumsalz
	16,0 g/L	D-(+)-Lactose
	1,0 g/L	Agar
	0,1 g/L	L-(+)-Ascorbinsäure
	120,0 g/L	Glycerin
Ringer-Lösung (1/4 stark)	1 Tablette/500 ml	Ringer-Tablette eingestellt auf pH 6,9

MATERIAL UND METHODEN

Medium/Lösung	Mengenangabe	Komponenten/Spezifikationen
TBE-Puffer (0,5 x)	5,4 g/L	TRIS
	2,75 g/L	Borsäure
	0,185 g/L	EDTA-Dinatriumsalz eingestellt auf pH 8,0
API® 50 CHB/E Medium Suspensionsmedium	Ampullen zu 10	Fertignährlösung
	200 ml/L	M9-Salz (10 x)
	4,0 ml/L	MgSO ₄ -Lösung (1M)
	0,2 ml/L	CaCl-Lösung (1M)
M9-Salze (10 x)	10,0 ml/L	Spurenelement-Lösung eingestellt auf pH 6,8
	128,0 g/L	Na ₂ HPO ₄
	30,0 g/L	KH ₂ PO ₄
	5,0 g/L	NaCl
	10,0 g/L	NH ₄ Cl
Spurenelement-Lösung	232 mg/L	H ₃ Bo ₄
	174 mg/L	ZnSO ₄ * 7 H ₂ O
	116 mg/L	FeSO ₄ (NH ₄) ₂ SO ₄ * 6 H ₂ O
	81 mg/L	CoCl ₂ * 6 H ₂ O
	22 mg/L	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ * 4 H ₂ O
	8 mg/L	CuSO ₄ * 5 H ₂ O
	6 mg/L	MnSO ₄ * 1 H ₂ O
Kohlenstoffquellen-Lösungen (jeweils einzeln gelöst in H ₂ O)	25,6 mg/ml	1-o-Methyl- α -D-Glucopyranoside
	13,2 mg/ml	α -D-(+)-Melibiose
	13,2 mg/ml	α -D-Melezitose
	21,6 mg/ml	Arbutin
	27,2 mg/ml	D-Adonitol
	28 mg/ml	D-(-)-Arabinose
	28 mg/ml	D-(-)-Fructose
	27,2 mg/ml	D-(-)-Mannit
	28 mg/ml	D-(-)-Ribose
	20,8 mg/ml	D-(-)-Salicin
	14 mg/ml	D-(-)-Tagatose
	14 mg/ml	D-(+)-Arabitol
	13,2 mg/ml	D-(+)-Cellobiose
	12,8 mg/ml	D-(+)-Fucose
	28 mg/ml	D-(+)-Galactose
	31,2 mg/ml	D-(+)-Glucose
	14 mg/ml	D-(+)-Lactose
	28 mg/ml	D-(+)-Mannose
	15,6 mg/ml	D-(+)-Raffinose
	13,2 mg/ml	D-(+)-Sucrose
13,2 mg/ml	D-(+)-Trehalose	
28 mg/ml	D-(+)-Xylose	
21,6 mg/ml	D-Amygdalin	
18,4 mg/ml	D-Gluconsäure-Kaliumsalz	
14 mg/ml	D-Lyxose	
27,2 mg/ml	D-Sorbitol	
13,2 mg/ml	D-Turanose	

Medium/Lösung	Mengenangabe	Komponenten/Spezifikationen
Kohlenstoffquellen-Lösungen (jeweils einzeln gelöst in H ₂ O)	27,2 mg/ml	Dulcitol
	32,8 mg/ml	Glycerin
	12,8 mg/ml	Glycogen
	28,8 mg/ml	I-Erythritol
	14 mg/ml	L-(-)-Arabitol
	12,8 mg/ml	L-(-)-Fucose
	28 mg/ml	L-(-)-Sorbose
	28 mg/ml	L-(-)-Xylose
	28 mg/ml	L-(+)-Arabinose
	27,2 mg/ml	L-(+)-Rhamnose
	14 mg/ml	Maltose
	25,6 mg/ml	Methyl- α -D-Mannopyranoside
	25,6 mg/ml	Methyl- β -D-Xylopyranoside
	28 mg/ml	Myo-Inositol
25,6 mg/ml	N-Acetyl-D-Glucosamine	
5 mg/ml	β -D-Gentiobiose	
14 mg/ml	Xylit	

2.2 Rohmilchproben, Milchhalbfabrikate, isolierte Mikroorganismen und Referenzstämme

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden 20 Rohmilchen und 20 Milchhalbfabrikate hinsichtlich ihrer Gesamtkeimzahl und aerob kultivierbaren Mikrobiota untersucht. Von 10 weiteren Milchhalbfabrikaten wurde lediglich die Gesamtkeimzahl bestimmt. Die gesamte Probenbearbeitung erfolgte nach dem in Abbildung 2-1 gezeigten Schema.

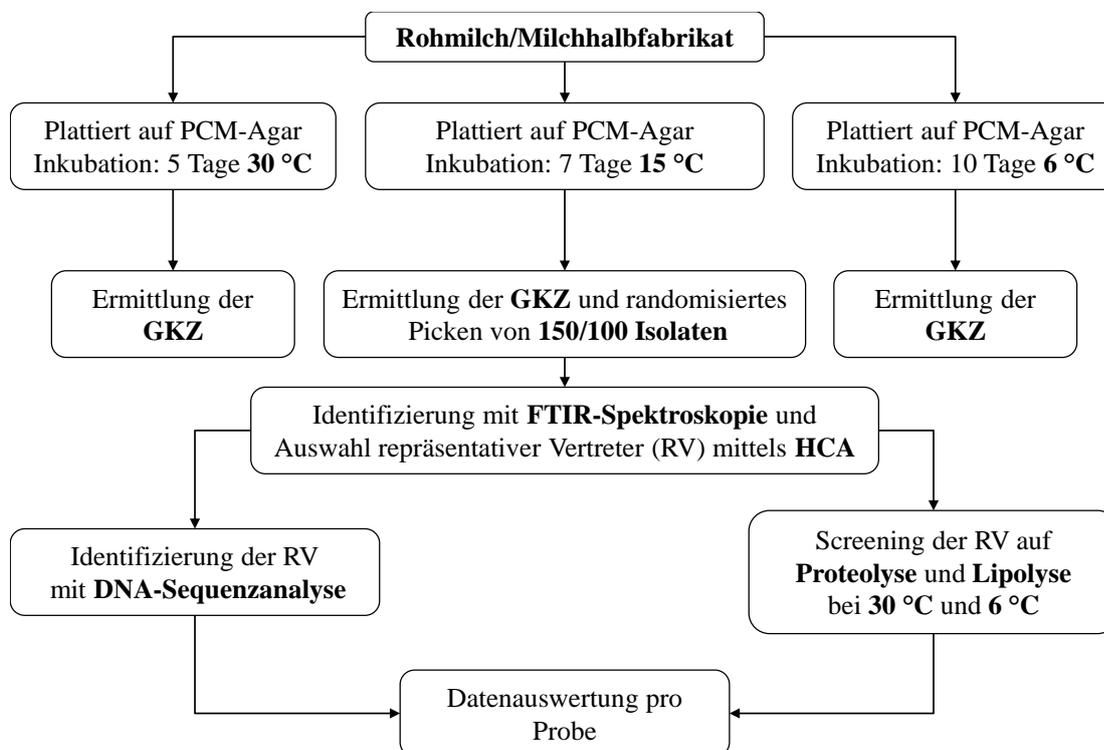


Abbildung 2-1: Schematischer Ablauf der Probenanalyse.

Die Rohmilchen stammten von 10 Einzelhöfen (vier bis sechs Gemelke) und 10 Molkereistapeltanks (Mischung von Einzelhofmilchen unbekannter Anzahl). Die Einzelhofmilchen (H) und die Milchen aus den Molkereistapeltanks (M) wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten untersucht. Nur eine der 10 Stapeltankproben stammte von einer Molkerei, an die auch Höfe lieferten, die Rohmilchproben bereitstellten. Die anderen Rohmilch bereitstellenden Molkereien hatten keine Verbindung zu den Höfen. Die untersuchten Höfe sind alle in Baden-Württemberg angesiedelt und hatten während des Untersuchungszeitraums zwischen 10 und 110 Kühe (ca. 60 Kühe im Durchschnitt) in Laufstallhaltung. Die tägliche Milchmenge betrug zwischen 70 und 2800 Litern (ca. 1313 Liter im Durchschnitt). Neun der untersuchten Molkereien haben ihren Standort in Deutschland und eine in der Slowakei. Die sterile Probenentnahme der Hofproben erfolgte automatisiert beim Umpumpen der Milch vom Lagertank auf dem Hof in den Sammelwagen; die Proben aus den Sammel tanks der Molkereien wurden durch deren Laborpersonal steril entnommen. Die Abholfrequenz auf den Höfen lag zwischen zwei bis drei Tagen, die Lagertemperatur lag bei etwa 4–5 °C. Alle 20 Proben wurden zwischen Oktober 2011 und Juli 2012 entnommen.

Die 30 Milchhalbfabrikate stammten aus unterschiedlichen Produktgruppen. Es wurden sechs Milcheiweißkonzentrate (EwK), sieben eiweißangereicherte Molkenkonzentrate (EwagMk), acht Magermilchkonzentrate (MmK) und neun Rahmproben (Sahne) untersucht. Die vom Laborpersonal der Molkereien steril entnommenen Produkte stammten von acht verschiedenen Herstellern und wurden zwischen Februar 2012 und August 2013 untersucht. Anzumerken ist jedoch, dass die meisten Milchhalbfabrikate produktionsbedingt bereits keimreduzierenden Maßnahmen unterzogen worden waren. Für die einzelnen zuvor genannten Produktkategorien kamen dabei jeweils verschiedene Methoden zum Einsatz, die sich von Hersteller zu Hersteller unterschieden. Die Magermilchkonzentrate wurden meist durch Ultrafiltration (UF), Eindampfen oder Eindampfen nach der Pasteurisierung hergestellt. Bei der Herstellung der eiweißangereicherten Molkenkonzentrate wurde die UF alleine oder nach der Pasteurisierung eingesetzt. Ultrafiltration nach der Pasteurisierung wurde auch bei der Produktion der Milcheiweißkonzentrate verwendet, wobei bei einigen Proben auch Mikrofiltration (MF) oder eine Bactofuge nach der Pasteurisierung zum Einsatz kam. Die Sahne wurde generell durch Separierung bei ~55 °C mit nachgeschalteter Thermisierung auf ~100 °C hergestellt. Die Dauer der Hitzebehandlung der Sahne variierte zwischen zwei und 40 Sekunden. Dabei bildeten die untersuchten Sahneprobe n Sahne 3 und Sahne 5 eine Ausnahme, diese wurden zwischen Separierung und Erhitzung entnommen.

Alle 50 Proben wurden gekühlt über Nacht an das Labor verschickt und sofort nach ihrer Ankunft bearbeitet. Die Hofmilchen waren somit zum Zeitpunkt der Analyse zwischen drei und vier Tagen alt. Über das genaue Alter der Rohmilchgemische aus den Molkereistapeltanks kann keine Aussage getroffen werden, da die Tanks produktionsbedingt permanent gefüllt und entleert werden und einige der Halbfabrikate aus dem Zukaufmarkt stammten. Die Milchhalbfabrikate waren zum Zeitpunkt der Analyse in der Regel zwei bis

drei Tage alt (ausgehend vom Produktionsdatum), jedoch waren auch Proben dabei, die nach der Produktion länger gelagert worden waren sowie Proben, über deren Alter keinerlei Informationen vorlagen (MmK 4, EwagMk 3, EwK 4, EwK 5 und Sahne 5). Älter als zwei bis drei Tage waren die Proben Sahne 8 und Sahne 9 (vier Tage), die Probe EwK 3 (fünf Tage), die Proben Sahne 4 und EwagMk 7 (sechs Tage), die Proben EwK 1 und EwagMk 5 (9 Tage) und die Probe MmK 1 (zehn Tage).

2.2.1 Isolierung von Mikroorganismen aus Rohmilchen und Milchhalbfabrikaten

Nach Ankunft der Proben wurden von diesen, ausgehend von einem 1 ml Aliquot, dezimale Verdünnungsreihen mit steriler Ringer-Lösung (¼ stark) erstellt. Je 100 µl wurden im Dreifachansatz für die drei Temperaturen 30 °C, 15 °C und 6 °C auf Plate-Count-Magermilch-Agar (PCM-Agar) mit einem Drigalski-Spatel ausplattiert. Nach fünf, sieben bzw. zehn Tagen Inkubationszeit bei den zuvor genannten Temperaturen wurde die Gesamtkeimzahl in koloniebildenden Einheiten pro Milliliter (KbE/ml) als gewichtetes arithmetisches Mittel aus den Einzelergebnissen je dreier Agarplatten zweier Verdünnungsstufen berechnet. Im Falle von unbewachsenen Agarplatten der niedrigsten gewählten Verdünnungsstufe wurde die Gesamtkeimzahl als kleiner als der Minimalwert dieser Verdünnungsstufe angegeben.

Von den bei 15 °C inkubierten Probenansätzen der Rohmilchen bzw. Milchhalbfabrikate (MmK, EwK, Sahne und EwagMk, jeweils Probennummern 1-5) wurden jeweils 150 bzw. 100 Einzelkolonien randomisiert abgenommen, auf PCM-Agar ausgestrichen und für drei Tage bei 30 °C inkubiert. Es folgten, wenn nötig, weitere Reinigungsausstriche, um sicherzustellen, dass Reinkulturen vorlagen, wobei im Falle des Auftretens unterschiedlicher Koloniemorphologien mit diesen getrennt weitergearbeitet wurde. Andererseits konnten auch einige Isolate nicht weiter kultiviert werden.

2.2.2 Zur Beschreibung neuer *Pseudomonas*-Arten verwendete Referenzstämme

Die für die Erstbeschreibung der Arten *Pseudomonas helleri* sp. nov. und *Pseudomonas weihenstephanensis* sp. nov. verwendeten Referenzstämme wurden anhand der Ähnlichkeit ihrer 16S rRNA und partiellen *rpoD*-Gensequenzen sowie auf Basis ihrer phylogenetischen Verwandtschaft zu den sieben Stämmen (siehe 3.4) der beiden neuen Arten ausgewählt. Aufgrund der phylogenetischen Verwandtschaft zu den am nächsten verwandten Arten wurden die Arten *Pseudomonas helleri* sp. nov. und *Pseudomonas weihenstephanensis* sp. nov. gemeinsam untersucht. Die verwendeten Referenzstämme waren *Pseudomonas deceptionensis* DSM 26521^T (Carrion *et al.*, 2011), *Pseudomonas endophytica* BSTT44^T (Ramirez-Bahena *et al.*, 2015), *Pseudomonas fragi* DSM 3456^T (Skerman *et al.*, 1980), *Pseudomonas lini* DSM 16768^T (Delorme *et al.*, 2002), *Pseudomonas lundensis* DSM 6252^T (Molin *et al.*, 1986), *Pseudomonas psychrophila* DSM 17535^T (Yumoto *et al.*, 2001) und *Pseudomonas taetrolens* DSM 21104^T (Skerman *et al.*, 1980).

Die Referenzstämme für die Erstbeschreibung der Arten *Pseudomonas lactis* sp. nov. und *Pseudomonas paralactis* sp. nov. wurden anhand der Gensequenz-Ähnlichkeit und phylogenetischen Verwandtschaft zu den fünf Stämmen (siehe 3.4) der beiden neuen Arten basierend auf den Ergebnissen der 16S-rRNA-Analyse und des MLSA-Ansatzes ausgewählt. Aufgrund der phylogenetischen Verwandtschaft zu den am nächsten verwandten Arten wurden die Arten *Pseudomonas lactis* sp. nov. und *Pseudomonas paralactis* sp. nov. gemeinsam untersucht. Die hierbei verwendeten Referenzstämme waren *Pseudomonas azotoformans* DSM 18862^T (Skerman *et al.*, 1980), *Pseudomonas gessardii* DSM 17152^T (Verhille *et al.*, 1999a), *Pseudomonas cedrina* subsp. *cedrina* DSM 17516^T (Behrendt *et al.*, 2009, Dabboussi *et al.*, 1999b), *Pseudomonas libanensis* DSM 17149^T (Dabboussi *et al.*, 1999a), *Pseudomonas orientalis* DSM 14489^T (Dabboussi *et al.*, 1999b), *Pseudomonas poae* DSM 14936^T (Behrendt *et al.*, 2003), *Pseudomonas synxantha* DSM 18928^T (Skerman *et al.*, 1980), *Pseudomonas trivialis* DSM 14937^T (Behrendt *et al.*, 2003) und *Pseudomonas veronii* DSM 11331^T (Elomari *et al.*, 1996).

Neben den für die vier Arten gewählten Referenzstämmen wurde auch die Typspezies der Gattung *Pseudomonas*, *Pseudomonas aeruginosa* DSM 50071^T (Skerman *et al.*, 1980) mituntersucht. Die zur Charakterisierung der neuen *Pseudomonas*-Arten verwendeten Referenzstämme wurden fast alle von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) bezogen. Nur der Stamm *Pseudomonas endophytica* BSTT44^T wurde direkt vom Autor der Erstbeschreibung bezogen, da dieser zum Zeitpunkt der Untersuchung noch nicht öffentlich zugänglich war.

2.2.3 Zur Genomsequenzierung und Analyse des *apr*-Operons verwendete *Pseudomonas*-Stämme

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde zur Analyse des *apr*-Operons das Genom von 86 *Pseudomonas*-Stämmen sequenziert und daraus jeweils ein *draft*-Genom erstellt (siehe 2.6.7 und Tabelle 6-2). Dieses Stammset setzte sich aus 31 anerkannten Typstämmen, 43 Milchisolaten und 12 Isolaten aus der WS-Sammlung (Weihenstephaner Mikroorganismen-Sammlung, Lehrstuhl für Mikrobielle Ökologie, Zentralinstitut für Ernährungs- und Lebensmittelforschung, Technische Universität München) zusammen. Alle *Pseudomonas*-Typstämme, mit Ausnahme von *Pseudomonas endophytica* BSTT44^T (siehe 2.2.2) wurden von der DSMZ bezogen. Ergänzend dazu sind 21 weitere *Pseudomonas*-Typstämme in Tabelle 6-2 aufgelistet, deren Genomdaten von der NCBI-Genbank[®]-Datenbank (Benson *et al.*, 2013, Sayers *et al.*, 2009) bezogen wurden. Insgesamt wurde bei der Analyse des *apr*-Operons mit den Genomdaten von 107 *Pseudomonas*-Stämmen gearbeitet, die 56 *Pseudomonas*-Arten zuzuordnen sind. Sofern vorhanden, wurde neben dem Genom des jeweiligen Typstamms auch das Genom von mindestens einem Milchisolat oder einem Isolat aus der WS-Sammlung der gleichen Art sequenziert.

Des Weiteren wurden im Zuge der Erstbeschreibung der Arten *Pseudomonas lactis* sp. nov. und *Pseudomonas paralactis* sp. nov. die Genome der Typstämme *Pseudomonas*

azotoformans DSM 18862^T und *Pseudomonas cedrina* subsp. *cedrina* DSM 17516^T sequenziert. Da die Genome zu einem späteren Zeitpunkt erstellt wurden, waren diese nicht in die Analyse des *apr*-Operons eingeschlossen. Die *draft*-Genome dieser beiden Arten wurden unter den GenBank/EMBL/DDBJ Accession-Nummern MNPV00000000 (*Pseudomonas azotoformans* DSM 18862^T) bzw. MNPW00000000 (*Pseudomonas cedrina* subsp. *cedrina* DSM 17516^T) veröffentlicht. Die GenBank/EMBL/DDBJ Accession-Nummern aller anderen bereits veröffentlichten *draft*-Genome sind in Tabelle 6-2 aufgeführt.

2.3 Identifizierung von Mikroorganismen durch FTIR-Spektroskopie

Die Methode der FTIR-Spektroskopie ermöglicht eine schnelle und einfache Identifizierung von Mikroorganismen anhand ihrer gesamten chemischen Zellzusammensetzung in Kombination mit Referenzspektren-Datenbanken (Helm *et al.*, 1991a, Helm *et al.*, 1991b, Naumann *et al.*, 1991, Wenning & Scherer, 2013, Wenning *et al.*, 2008). Die Zellbestandteile, neben Wasser hauptsächlich Proteine, Lipide und Phospholipide, aber auch niedermolekulare Substanzen absorbieren das zur Molekülanregung verwendete Infrarotlicht (mittlerer IR-Bereich, Wellenzahlen: 4000–500 cm⁻¹) unterschiedlich stark. Dadurch lassen sich den einzelnen Bestandteilen bestimmte Wellenzahlenbereiche zuordnen (Helm *et al.*, 1991a, Naumann *et al.*, 1991). Fettsäuren absorbieren Infrarotlicht im Bereich von 3000–2800 cm⁻¹ und 1500–1400 cm⁻¹, Phospholipide zwischen 1750–1730 cm⁻¹, Proteine im Bereich von 1700–1500 cm⁻¹ und Kohlenhydrate zwischen 1200 und 900 cm⁻¹. Das nach einer FTIR-spektroskopischen Messung ausgegebene Absorptionsspektrum wird mittels Fourier-Transformation aus dem detektierten Interferogramm berechnet. Dabei ist es unabdingbar, dass das Absorptionsspektrum mit einer standardisierten Methode und vorhergehender standardisierter Mikroorganismenanzucht auf definierten Nährmedien erstellt wurde. Sind diese Voraussetzungen erfüllt, ist das Absorptionsspektrum für jeden Mikroorganismus einzigartig, ähnlich einem Fingerabdruck. Über den Vergleich des Absorptionsspektrums eines unbekanntes mikrobiellen Isolats mit den FTIR-Spektren bekannter Mikroorganismen in speziellen Datenbanken (Coutinho *et al.*, 2009, Oberreuter *et al.*, 2002, Rebuffo *et al.*, 2006, Wenning & Scherer, 2013) kann das Isolat anhand der Spektrenähnlichkeit identifiziert werden. Das Anwendungsgebiet reicht von der Lebensmittelmikrobiologie (Buchl *et al.*, 2008, Kuhm *et al.*, 2009, Kümmerle *et al.*, 1998) über die Identifizierung von Mikroorganismen aus Umweltproben (Bounphanmy *et al.*, 2010, Naumann, 2009, Tindall *et al.*, 2000, Winder *et al.*, 2004) bis hin zur klinischen Diagnostik (Amiali *et al.*, 2011, Bosch *et al.*, 2008, Coutinho *et al.*, 2009).

Probenvorbereitung

Bei der gesamten Probenvorbereitung wurde nach dem von Oberreuter *et al.* (2002) beschriebenen Schema vorgegangen. Vor der eigentlichen Messung erfolgte eine Grobdifferenzierung der Mikroorganismen (siehe 2.4), da eine zuverlässige Identifizierung anhand der Referenzdatenbanken der FTIR-Spektren auf standardisierten Anzuchtbedingungen beruht. Um diese zu gewährleisten, wurden alle Mikroorganismen, ausgehend von Einzelkolonien, mit einem Drigalski-Spatel auf einem Drittel einer Agarplatte

ausplattiert. Unabhängig von den äußerlichen Anzuchtbedingungen, betrug die standardisierte Inkubationszeit vor der eigentlichen Messung $24 \pm 0,5$ Stunden. Nur die Agarplatten, auf denen die Bakterien oder Hefen zu einem geschlossenen mikrobiellen Rasen gewachsen waren, dienten als Ausgangskultur für die nachfolgende Messung. Dadurch wurde sichergestellt, dass sich die Mehrheit der Zellen in einem vergleichbaren Wachstumsstadium befand und somit die gesamte Population eine möglichst ähnliche zelluläre Zusammensetzung besaß. Milchsäurebakterien wurden hierfür auf APT-Agarplatten bei 34 °C in einem Anaerobiertopf unter Zugabe von Anaerocult® A (MERCK KGaA, Darmstadt) kultiviert. Hefen wurden bei 27 °C auf YGC-Agarplatten bebrütet und bei allen anderen Bakterienisolaten erfolgte die Anzucht auf TSG-Agarplatten bei 30 °C bzw. 25 °C , wenn es sich um aerobe Sporenbildner handelte. Von jeder der angewachsenen Kulturen wurde etwa eine Impföse voll Zellmaterial abgenommen und in $100\text{ }\mu\text{l}$ autoklaviertem Wasser suspendiert. Von diesen Suspensionen wurden für die Messung $25\mu\text{l}$ auf einen für die Infrarotstrahlung durchlässigen 96-well-Probenräger aus ZnSe (Bruker Optics, Deutschland) aufgetragen und für 45 Minuten bei 40 °C getrocknet. Im Anschluss daran erfolgte die Messung im Tensor 27 FTIR-Spektrometer, welches an ein HTS-XT-Mikrotitermodul gekoppelt ist (beide Geräte von Bruker Optics, Deutschland).

Identifizierung von Mikroorganismen mittels Referenz-FTIR-Spektren

Die Identifizierung von Mikroorganismen anhand ihrer FTIR-Spektren erfolgte unter Verwendung der OPUS/LAB-6.5®-Software (Bruker Optics, Deutschland) in Kombination mit Datenbanken spezifischer Referenzspektren für unterschiedliche Mikroorganismengruppen (Wenning *et al.*, 2008). Im Anschluss an jede Messung wurde die Spektrenqualität in Bezug auf das Verhältnis zwischen Absorption und Hintergrundrauschen sowie auf die absolute Absorption hin überprüft (Helm *et al.*, 1991a). Daraufhin erfolgte die Berechnung von Ableitungen sowie das Glätten der Originalspektren (Savitzky & Golay, 1964) mittels der zuvor genannten Software. Zusätzlich wurden die FTIR-Spektren normalisiert, um Absorptionsvarianzen, die beispielsweise auf leicht abweichende Probenvolumen oder eine unterschiedliche Dichte der Anzuchtkultur zurückzuführen sind, zu minimieren. Mit diesem Vorgehen lassen sich die einzelnen Scheitelpunkte der FTIR-Spektren in den einzelnen spektralen Bereichen besser voneinander abgrenzen, wodurch etwaige Unterschiede zweier oder mehrerer Spektren stärker in Erscheinung treten. Für die Identifizierung wurde von allen FTIR-Spektren sporenbildender Bakterien die zweite Ableitung berechnet, bei den FTIR-Spektren aller anderen Mikroorganismen wurde die erste Ableitung berechnet, da diese jeweils die besser zu unterscheidenden Absorptionsspektren lieferten. Es ist jedoch zu beachten, dass speziell für gramnegative Bakterien weiterführende Charakterisierungen notwendig sind, um die richtige Referenzdatenbank auswählen zu können (siehe 2.4). Die grampositiven Isolate wurden entsprechend der Referenzdatenbanken in die Gruppen aerobe Sporenbildner, Milchsäurebakterien (Katalase negativ) und andere nicht sporenbildende grampositive (Katalase positiv) eingeteilt. Das Identifizierungsergebnis wird in Form einer Liste in ansteigender Hitqualität ausgegeben. Diese ist ein Maß für die

Ähnlichkeit bzw. spektrale Distanz des FTIR-Spektrums des zu identifizierenden Isolates zu einem Referenzspektrum aus den Datenbanken. Die Hitqualität selbst wird durch einen in der OPUS/LAB-6.5[®]-Software eingebundenen Algorithmus (Helm *et al.*, 1991a) berechnet. Das Ergebnis der Artidentifizierung wurde als Identifizierungsergebnis gewertet, wenn die ersten beiden Hits das FTIR-Spektrum der gleichen Art zuordneten und die spektrale Distanz unter einem Wert von 1,5 lag (Oberreuter *et al.*, 2002). Wiesen die ersten beiden Hits unterschiedliche Artzuordnungen auf, wurden für das Isolat beide Ergebnisse notiert. Zum Zeitpunkt der Messungen enthielten die Referenzdatenbanken insgesamt etwa 8000 FTIR-Spektren von Isolaten aus 240 Gattungen und 1000 Arten.

Auswahl repräsentativer Mikroorganismen über hierarchische Clusteranalyse

Ausgehend von den Spektren aller Isolate einer Milch(-halbfabrikat)-Probe wurde eine hierarchische Clusteranalyse (HCA) durchgeführt. Durch die Auswahl repräsentativer Isolate für die einzelnen Cluster konnte die Anzahl der Isolate für die weiteren Untersuchungen verringert werden. Dieser Schritt ist möglich, da die FTIR-Spektroskopie eine Unterscheidung von Isolaten bis auf die Stamm-Ebene zulässt (Wenning *et al.*, 2014). Die FTIR-Spektren sehr ähnlicher oder klonaler Isolate bilden in der HCA Cluster mit geringer spektraler Distanz innerhalb dieser Gruppierung und trennen sich graphisch in den daraus resultierenden Ähnlichkeitsbäumen von Isolaten oder Clustern ab, deren FTIR-Spektren eine höhere spektrale Distanz aufweisen. Die HCA wurde ausgehend von den vektornormalisierten ersten Ableitungen der FTIR-Spektren mittels des clusterbildenden Average-Linkage-Verfahrens des OPUS/LAB-6.5[®]-Software-Pakets berechnet. Ein Cluster wurde definiert als eine Gruppe von Spektren, die eine spektrale Distanz von etwa 0,3 oder weniger zueinander aufwiesen. Je nach Größe des Clusters wurden ein oder mehrere repräsentative Isolate ausgewählt und diese daraufhin näher charakterisiert, um eine Identifizierung mit spezifischen Referenzdatenbanken durchführen zu können.

2.4 Charakterisierung von Mikroorganismen zur Auswahl geeigneter FTIR-Referenzdatenbanken

Die nachfolgenden Tests dienen gemeinsam der Auswahl der geeigneten FTIR-Referenzdatenbank für die Identifizierung. Eine erste Grobdifferenzierung der Mikroorganismen erfolgte aufgrund von Kolonie- und Zellmorphologie (Phasenkontrastmikroskop Laborlux S, Leitz) sowie des Katalase-Tests. Dabei wurde zwischen Hefen, Milchsäurebakterien (katalasenegativ), aeroben Sporenbildnern (sichtbare Sporen unter dem Mikroskop) und allen anderen Bakterien unterschieden. Ausgehend davon wurde das entsprechende Anzuchtmedium für die nachfolgende Messung gewählt (siehe 2.3). Die Bakterienisolate wurden außerdem über den KOH-Test in die beiden Gruppen gramnegative Bakterien und grampositive Bakterien unterteilt. Die gramnegativen Isolate wurden anschließend über den Cytochrom-c-Oxidase-Test den Gruppen Pseudomonaden und Aeromonaden (Oxidase positiv) sowie Enterobakterien und anderen gramnegativen Bakterien (Oxidase negativ) zugeordnet. Alle gramnegativen Isolate wurden nachfolgend auf ihre

Fähigkeit zur Oxidation/Fermentation von Glucose getestet. Glucose fermentierende, Oxidase negative Isolate wurden zusätzlich auf ihre Fähigkeit zur Oxidation/Fermentation von Lactose sowie auf ihre Beweglichkeit und die Fähigkeit zur Bildung von Indol und Schwefelwasserstoff hin untersucht.

Katalase-Test

Der Katalase-Test wird angewendet, um zwischen grampositiven, katalasepositiven Kokken wie *Staphylococcus* und anderen grampositiven, katalasenegativen Kokken wie *Streptococcus* unterscheiden zu können. Dabei wird eine Impföse voll Zellmaterial auf einen Objektträger gegeben und einige Tropfen einer 3-prozentigen Wasserstoffperoxid(H_2O_2)-Lösung eingerührt und beobachtet, ob sich Bläschen bilden. Die Bläschenbildung (O_2 -Freisetzung) gilt als Nachweis für das Enzym Katalase (EC 1.11.1.6), welches das für Bakterienzellen toxische H_2O_2 zu Sauerstoff (O_2) und Wasser (H_2O) umsetzt.

KOH-Test

Der KOH-Test ist eine nicht-färbende Methode zur Bestimmung des Gram-Typs (Powers, 1995, Ryu, 1940). Hierbei wird eine Impföse mit Bakterienzellen in ein paar Tropfen 3%ige Kaliumhydroxid(KOH)-Lösung eingerührt. Die Zellmembran gramnegativer Bakterien wird durch die basische Lösung lysiert, wodurch die DNA freigesetzt wird. Diese verleiht der Lösung aufgrund der die DNA umgebenden Hydrathüllen einen zähflüssigen, fadenziehenden Charakter (sichtbar beim Durchstreichen der Lösung mit einer Impföse). Im Gegensatz dazu ist die 3%ige KOH-Lösung zu schwach, um die Zellmembran grampositiver Bakterien mit ihrer dickeren Peptidoglycan-Schicht zu lysieren. Die Zellen bleiben intakt, es tritt keine DNA aus und die Lösung behält ihren wässrigen Charakter, ist nicht zähflüssig und zieht keine Fäden.

Oxidase-Tests

Der Oxidase-Test beruht auf dem Nachweis des Enzyms Cytochrom-c-Oxidase (EC 1.9.3.1), das als Endoxidase der Elektronentransportkette Elektronen auf Sauerstoff überträgt. Da fast allen Gattungen der fakultativ anaeroben, gramnegativen Bakterien dieses Enzym fehlt, wird der Oxidase-Test zur Differenzierung zwischen Enterobakterien und anderen gramnegativen Bakterien eingesetzt. Jedoch reicht dies als einziges Merkmal für die Differenzierung nicht aus, da beispielsweise auch Isolate der Gattungen *Acinetobacter* ein negatives Testergebnis liefern können. Der Test wurde mit Bactident[®]-Oxidase-Teststreifen (MERCK KGaA) entsprechend der Herstellerangaben durchgeführt. Beim Vorhandensein der Cytochrom-c-Oxidase wird das Testreagenz der Teststäbchen von seiner farblosen Ausgangsform zu einem violetten-Farbstoff umgesetzt.

Test auf Oxidation/Fermentation von Glucose und Lactose

Für den Test auf Oxidation oder Fermentation wurden dem sogenannten OF-Medium die Einfachzucker Glucose (OFG) bzw. Lactose (OFL) als Kohlenstoffquelle zugegeben (Hugh & Leifson, 1953). Das im Medium als pH-Wert-Indikator enthaltene Bromthymolblau verleiht

dem Medium bei pH 6,8 eine grüne Färbung. Sinkt der pH-Wert durch die Umsetzung der Kohlenstoffquelle zu Säure(n), erfolgt ein Farbwechsel von Grün nach Gelb, bei basischen Abbauprodukten wechselt die Medienfärbung von Grün nach Blau. Eine Impföse voll Zellmaterial wird in das halb feste Medium (10 ml in einem Reagenzglas) eingerührt und für 24 h bei Raumtemperatur inkubiert. Wenn Glucose von strikt aeroben gramnegativen Bakterien zu Säure umgesetzt wird, dann erfolgt nur im oberen Bereich des Mediums (aerobe/mikroaerobe Zone) ein Farbumschlag von Grün nach Gelb (oxidativ sauer). Wenn sich die Medienfärbung im oberen Bereich nicht ändert oder durch einen Anstieg des pH-Werts von Grün nach Blau wechselt, wird das Ergebnis als oxidativ alkalisch gewertet. Zu einem Anstieg des pH-Werts kommt es meist dann, wenn das im Medium enthaltene Pepton von dem Bakterienisolat zu Aminen umgesetzt wird. Bei gramnegativen, fakultativen anaeroben Enterobakterien liegt ein fermentativer Glucose-Stoffwechsel vor, durch den Glucose zu Säure(n) umgesetzt wird. Dies führt dazu, dass sich das gesamte OFG-Medium gelb färbt (aerobe und anaerobe Zone). Die Ergebnisse der Oxidation/Fermentation von Lactose werden jedoch nur bei einem fermentativen OFG-Ergebnis hinzugezogen, um die Enterobakterien über ihre Fähigkeit, Lactose zu vergären, weiter unterteilen zu können.

Test Beweglichkeit, Indol- und Schwefelwasserstoffbildung

Die Beweglichkeit sowie die Indol- und Schwefelwasserstoff(H₂S)-Bildung wurden mittels SIM-Medium (Merck KGaA) überprüft. Dazu wird eine Impföse voll Zellmaterial mittig in das halb feste Medium bis zum Boden des Röhrchens (5 ml) eingestochen (Stichkultur) und für 24 h bei Raumtemperatur bebrütet. Bei unbeweglichen Bakterien erfolgt das Wachstum nur innerhalb des Stichkanals, sind die Bakterien beweglich, ist das Medium über den Stichkanal hinaus getrübt. Eine Schwarzfärbung des Mediums belegt die Produktion von Schwefelwasserstoff durch das Isolat. Die Schwarzfärbung beruht auf der Umsetzung von Natriumthiosulfat zu H₂S durch die Enzyme Cystein-Desulfurase (EC 2.8.1.7) oder Thiosulfat-Reduktase (EC 2.8.1.5) und der anschließenden Reaktion von H₂S mit Ammoniumeisen(II)-citrat zu Eisensulfid, welches als schwarzer Niederschlag ausfällt. Die Indol-Produktion wird über die Zugabe von einigen Tropfen farblosen Kovac's-Reagenz auf die Medienoberfläche überprüft. Eine Rotfärbung zeigt an, dass Indol gebildet wurde und ist gleichzeitig der Nachweis für das Enzym Tryptophanase (EC 4.1.99.1), welches die Aminosäure Tryptophan in Indol, Ammoniak und Pyruvat spaltet.

2.5 Identifizierung repräsentativer Mikroorganismen mittels Gensequenzanalyse

Zur abschließenden Identifizierung der repräsentativen Isolate (siehe 2.3) wurden alle Isolate aus den Rohmilchen und ausgewählte Isolate aus den Milchhalbfabrikaten zusätzlich mittels Polymerase-Kettenreaktion (engl., *polymerase chain reaction*, PCR) auf ausgewählte Markergene, DNA-Sequenzierung und anschließender DNA-Sequenzanalyse identifiziert (siehe 2.6.6 und 2.7.1). Alle Hefen-Isolate wurden anhand ihrer Nukleotidsequenz des 26S-rRNA-Gens identifiziert und die meisten bakteriellen Isolate wurden anhand der DNA-

Sequenz ihres 16S-rRNA-Gens identifiziert. Diese universellen Markergene sind jedoch für sehr nahe verwandte Arten oftmals nicht ausreichend differenzierend, um eine eindeutige Artidentifizierung zu gewährleisten. Dies trifft unter anderem auf Arten der Gattung *Pseudomonas* (Moore *et al.*, 1996, Yamamoto *et al.*, 2000) und *Staphylococcus* (Becker *et al.*, 2004) zu. Aus diesem Grund wurden alle Isolate der Gattung *Pseudomonas* über eine partielle DNA-Sequenz des *rpoD*-Gens identifiziert, welches für die σ -Untereinheit (Sigma-Faktor, σ^{70}) der DNA-abhängigen RNA-Polymerase codiert. Die Methode basierte auf den Ergebnissen von Mulet *et al.* (2010), die in ihrer Studie zeigen konnten, dass das *rpoD*-Gen innerhalb der Gattung *Pseudomonas*, zumindest nach heutigem Wissensstand, das phylogenetisch am stärksten differenzierende Gen darstellt. Bei Isolaten der Gattung *Staphylococcus* wurde eine partielle Nukleotidsequenz des *rpoB*-Gens (codiert für die β -Untereinheit der RNA-Polymerase) zur Artidentifizierung verwendet. Diese Teilsequenz wurde ausgewählt, da die Studien von Drancourt and Raoult (2002) und Mellmann *et al.* (2006) gezeigt hatten, dass dieses Gen eine genauere Differenzierung innerhalb der Gattung *Staphylococcus* ermöglicht.

2.6 Molekulargenetische Methoden

2.6.1 Isolierung RNA-freier, genomischer DNA

Zur Isolierung genomischer DNA für die Genomsequenzierung wurde das QIAamp®-DNA-Mini-Kit (Qiagen GmbH, Deutschland) verwendet. Dabei wurde nach dem Herstellerprotokoll für die Isolierung RNA-freier, genomischer DNA aus gramnegativen Bakterien von Agarplatten-Kulturen vorgegangen. Als einzige Abweichung vom Extraktionsprotokoll wurde die Bakteriensuspension vor Zugabe der Proteinase K (EC 3.4.21.14) für fünf Minuten auf 95 °C erhitzt und für weitere fünf Minuten auf Eis gekühlt. Die Anzucht der *Pseudomonas*-Stämme erfolgte auf TSG-Agarplatten über 24 Stunden bei 22 °C. Die extrahierte DNA wurde anschließend bei -20 °C gelagert.

2.6.2 Isolierung von Nukleinsäuren durch mechanische Zell-Lyse

Ausgehend von einer Agarplatten-Übernachtskultur wird eine Impföse voll Zellmaterial in 200 μ l autoklaviertem MilliQ-Wasser in einem 1,5-ml-Reaktionsgefäß mit Schraubverschluss resuspendiert. Dieser Suspension wird eine Spatelspitze Zirkoniasilikatperlen (BioSpec Products Inc.) zugegeben. Für den Zellaufschluss von Hefen bzw. Bakterien werden Zirkoniasilikatperlen mit einem Durchmesser von 0,5 mm bzw. 0,1 mm zugegeben. Der eigentliche Zellaufschluss, bei dem die DNA freigesetzt wird, erfolgt durch ein zweimaliges Schüttelintervall von 45 Sekunden mit einer Geschwindigkeit von 6,5 m/s im FastPrep®-24 (MP Biomedicals, LLC, Deutschland). Im Anschluss daran erfolgt eine Erhitzung der Probe auf 95 °C für 10 Minuten. Dieser Schritt ist notwendig, um die beim Zellaufschluss ebenfalls freiwerdenden Desoxyribonukleasen (EC 3.1.21.1) zu inaktivieren. Nach fünfminütiger Kühlung auf Eis und einem Zentrifugationsschritt (5 min, 13 000 UpM) werden von dem DNA-haltigen Überstand 80 μ l in ein neues 0,5-ml-Reaktionsgefäß überführt. Die Lagerung der DNA-Lösung (Zell-Lysate) bis zu ihrer Verwendung erfolgte bei -20 °C.

2.6.3 *In-vitro*-Amplifikation von DNA durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Das Verfahren der PCR dient der gezielten Vervielfältigung spezifischer DNA-Abschnitte. Zwei sequenzspezifische, komplementäre DNA-Oligonukleotide (Primer) begrenzen den zu amplifizierenden Bereich am 5'- und am 3'-Ende der Zielsequenz auf je einem der beiden DNA-Doppelstränge. Zu Beginn eines PCR-Reaktionszyklus werden die Doppelstränge der Template-DNA durch Hitze voneinander getrennt (Denaturierung). Danach wird die Temperatur unter die Schmelztemperatur der Primer abgesenkt, wodurch diese an ihren komplementären Bereich auf der DNA binden (Annealing) und kurze doppelsträngige Segmente ausbilden können. Diese dienen der thermostabilen DNA-Polymerase als Startpunkt für die Synthese des Komplementärstrangs in 5'-3'-Richtung (Elongation). Durch die mehrfache Wiederholung dieser drei Schritte wird die Zielsequenz spezifisch vervielfältigt. Tabelle 2-2 zeigt die Zusammensetzung des für alle PCR-Reaktionen verwendeten Reagenzien-Ansatzes.

Tabelle 2-2: Zusammensetzung des generell verwendeten PCR-Ansatzes.

Konzentration	Reagenz	Eingesetztes Volumen [µl]
10 x	<i>High Performance Buffer</i> (Thermo Scientific)	2,5
2 mM	dNTP Mix (Thermo Scientific)	2,5
25 mM	MgCl ₂ (Thermo Scientific)	1,5
50 pmol/µl	Primer <i>forward</i> (Eurofins MWG)	0,25
50 pmol/µl	Primer <i>reverse</i> (Eurofins MWG)	0,25
-	Template-DNA	1,0
-	MilliQ-Wasser	16,85
5 U/µl	Thermo-Start DNA-Polymerase (Thermo)	0,15

Als Template-DNA für die PCR-Reaktionen wurden die Zell-Lysate (siehe 2.6.2) verwendet. Alle in der vorliegenden Arbeit verwendeten Primer (siehe

Tabelle 2-3) wurden von der Firma Eurofins MWG (Ebersberg, Deutschland) in lyophilisierter Form bezogen. Alle Primer wurden mit sterilem MilliQ-Wasser resuspendiert und auf eine Konzentration von 50 pmol/µl eingestellt.

Tabelle 2-3: Verwendete Primer.

Primer	Zielgen	Primersequenz	Referenz	Tm [°C]
16S_27f (fD1)	16S rRNA	5'-agagtttgatcctggctca-3'	Weisburg <i>et al.</i> (1991)	54,5
16S_1492r (rP2)	16S rRNA	5'-cggctacctgttacgac-3'		56,0
16S_926R	16S rRNA	5'-ccgtcaattcctttgagttt-3'	LGC Genomics	53,2
16S_519F	16S rRNA	5'-cagcagccgcggaataac-3'		58,2
NL-1_(F)	26S rRNA	5'-gcatatcaataagcggaggaaaag-3'	O'Donnell (1993)	59,3
NL-4_(R)	26S rRNA	5'-gggccgtgtttcaagacgg-3'		58,8
PsEG30F	<i>rpoD</i> -Gen <i>Pseudomonas</i> sp.	5'-atygaaatcgccaarcg-3'	Mulet <i>et al.</i> (2009)	50,4
PsEG790R	<i>rpoD</i> -Gen <i>Pseudomonas</i> sp.	5'-cggttgatktccttga-3'		47,9
1418_for	<i>rpoB</i> -Gen <i>Staphylococcus</i>	5'-caattcatggaccaagc-3'	Mellmann <i>et al.</i> (2006)	50,4
3554_rev	<i>rpoB</i> -Gen <i>Staphylococcus</i>	5'-ccgtccaagtcatgaaac-3'		56,7

Die PCR-Reaktionen wurden alle in einem Biometra® T 3000 *thermocycler* unter den folgenden Bedingungen durchgeführt: initiale Denaturierung bei 95 °C für 15 Minuten, gefolgt von 35 Zyklen Denaturierung bei 95 °C für 20 Sekunden, Primer Annealing bei angepasster Temperatur (52 °C bei den 16S-rRNA-Primern, 45 bis 51 °C bei den *rpoD*-Gen-Primern, 48 °C bei den *rpoB*-Gen-Primern und 55 °C bei den 26S-rRNA-Primern) und Elongation bei 72 °C für 100 Sekunden bei den 16S-Primern, 45 Sekunden bei den 26S-Primern und 70 Sekunden bei den *rpoD*-Primern und *rpoB*-Primern. Auf diesen letzten Zyklus folgte ein finaler Elongationsschritt bei 72 °C für 5 Minuten. In Tabelle 2-4 ist eine Übersicht der verwendeten Primerpaare und der zu erwartenden Fragmentlänge des PCR-Produkts dargestellt. Die Primer 16S_27f und 16S_1492r dienen der Amplifikation des fast

vollständigen 16S-rRNA-Gens der bakteriellen repräsentativen Isolate, die nach Analyse des FTIR-Spektrums nicht den Gattungen *Pseudomonas* oder *Staphylococcus* zugeordnet werden konnten. Für die Gattung *Pseudomonas* wurden die Primer PsEG30F und PsEG790R zur Amplifikation eines Teiles des *rpoD*-Gens verwendet, das Amplifikations-Zielsegment der Primer 1418_for und 3554_rev liegt auf dem *rpoB*-Gen der Gattung *Staphylococcus*. Das Primerpaar NL-1_(F) und NL-4_(R) diente der Amplifikation eines Teiles des 26S-rRNA-Gens der repräsentativen Hefen-Isolate.

Tabelle 2-4: Verwendete Primerpaare und theoretische Länge der PCR-Fragmente.

Primerpaar	Erwartete Fragmentlänge in Basenpaaren (Bp)
16S_27f/16S_1492r	~ 1400 Bp
NL-1_(F)/NL-4_(R)	~ 500 Bp
PsEG30F/PsEG790R	~ 750 Bp
1418_for/3554_rev	~ 900 Bp

2.6.4 Agarose-Gelelektrophorese

In der vorliegenden Arbeit wurden mit der Methode der nichtdenaturierenden Agarose-Gelelektrophorese die DNA-Fragmentlängen der PCR-Produkte überprüft. Die Phosphatreste verleihen der DNA in wässrigen Lösungen eine negative Ladung, wodurch sie sich im elektrischen Feld zur Anode (Pluspol) hin bewegt. Die Agarose-Gelmatrix dient dabei als Widerstand und verlangsamt die Bewegung größerer DNA-Fragmente stärker als die kleineren DNA-Fragmente. Dadurch wird eine Trennung von unterschiedlich langen DNA-Fragmenten entsprechend ihrer Fragmentlänge ermöglicht. Die verwendeten Agarosegele bestanden aus 1 % (w/v) Agarose, gelöst in 0,5 x TBE-Puffer. Pro 60 ml Agarose-Lösung wurden 3 µl des 1:20 verdünnten, mit der DNA interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffs RedSafe™ Nucleic Acid Staining Solution (20 000 x) (iNtRON Biotechnology, Inc., Republik Korea) zugegeben. Die zu trennenden DNA-Proben wurden im Verhältnis 5:1 mit 6 x DNA Gel Loading Dye (Thermo Scientific) versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Parallel dazu wurde ein DNA-Größenstandard (Gene Ruler™ 100 Bp Plus DNA Ladder) aufgetragen, um die DNA-Fragmentlänge der PCR-Produkte bestimmen zu können. Nach der elektrophoretischen Trennung für 30 Minuten bei 120 Volt wurden die DNA-Fragmente durch UV-Transillumination (ImageMaster® VDS, Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) bei 320 nm sichtbar gemacht und dokumentiert.

2.6.5 Aufreinigung der PCR-Produkte

Die Aufreinigung der PCR-Produkte erfolgte mit dem GenElute™ PCR Clean-up Kit von Sigma-Aldrich nach Angaben des Herstellers. Die DNA wurde mit 50 µl MilliQ-Wasser eluiert. Im Falle von unsauberem PCR-Produkt oder dem Auftreten von mehreren DNA-Fragmenten unterschiedlicher Größe im Agarosegel wurde das komplette verbleibende

Volumen des PCR-Ansatzes über ein Agarosegel aufgetrennt. Im Anschluss daran wurden die DNA-Fragmente von Interesse aus dem Agarosegel unter UV-Licht (UVsolo TS, Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland) bei 302 nm ausgeschnitten. Die DNA wurde mit dem QIAquick® Gel Extraction Kit (Qiagen GmbH, Deutschland) nach Angaben des Herstellers aus dem Agarosegel-Stück herausgelöst und gereinigt. Die Elution der DNA erfolgte mit 50 µl MilliQ-Wasser.

2.6.6 DNA-Sequenzierung von PCR-Produkten

Für die Sequenzierung des 16S-rRNA-Gen-PCR-Fragments wurde im Allgemeinen der Primer 16S_926R verwendet, welcher als Ergebnis die ersten zwei Drittel des 16S-rRNA-Gens lieferte. Bei ausgewählten Isolaten, insbesondere bei Isolaten potentiell neuer Gattungen und Arten, wurde das 16S-rRNA-Gen-PCR-Fragment zusätzlich mit dem Primer 16S_519F sequenziert. Die PCR-Fragmente der Gene 26S rRNA (für Hefen-Isolate), *rpoB* (für *Staphylococcus*-Isolate) und *rpoD* (für *Pseudomonas*-Isolate) wurden mit den Primern NI-1_(F), 1418_for und PsEG30F sequenziert und resultierten meist im Erhalt des gesamten PCR-Fragments. Alle Sequenzierungsreaktionen der PCR-Produkte wurden vom Sanger-Sequenzierungs-Service der LGC Genomics GmbH (Berlin, Deutschland) durchgeführt.

2.6.7 Genomsequenzierung

Zur Sequenzierung bakterieller Genome wurde die illumina® Plattform MiSeq™ (illumina Inc., San Diego, Kalifornien, USA) in Verbindung mit MiSeq Reagent Kits v3 (600-cycle) verwendet. Die Genome wurden mit einer *read length* von 2 x 250 Nukleotiden (*paired end*) sequenziert. Zum Zeitpunkt der Sequenzierung wurde die Software MiSeq Reporter (Version 2.4.60.8) und die Software MiSeq Control (Version 2.4.1.3) verwendet, wobei nur die FASTQ *files* als Ausgabedatei erstellt wurden. Nach erfolgter Qualitätskontrolle und dem Filtern der Daten wurden die Genome mit dem *SPAdes Genome Assembler* (Version 2.5.1) assembliert. Die Genome lagen zu diesem Zeitpunkt jeweils in Form von mehreren *contigs* vor. Es handelt sich also nicht um „geschlossene“ Genome, die nur aus einem *contig* bestehen würden, sondern um sogenannte *draft*-Genome (engl. *draft* = Entwurf). Ein Teil dieser *draft*-Genome wurde im Zuge ihrer Veröffentlichung in der Genbank®-Datenbank (Benson *et al.*, 2013) durch den Annotierungsservice, die *Prokaryotic Genome Annotation Pipeline* (Tatusova *et al.*, 2014), annotiert. Dabei wurden auch die Genomgröße, der Guanin und Cytosin Gehalt (GC-Gehalt) der DNA sowie die Anzahl der Gene und die Anzahl der proteincodierenden Gene ermittelt und im sogenannten *annotation and assembly report* zusammengefasst.

Probenvorbereitung

Zur Probenvorbereitung wurde das illumina TruSeq® DNA PCR-Free Sample Preparation Kit verwendet. Die Präparation des DNA-Templates erfolgte nach einer von Huptas *et al.* (2016) modifizierten und optimierten Version des Herstellerprotokolls. Darauf basierend wurden aus der fragmentierten Template-DNA Fragmente mit einer Länge von ca. 875 Nukleotiden selektiv zur anschließenden Sequenzierung isoliert. Zur Probenvorbereitung wurde die RNA-

freie, genomische DNA (gDNA) auf eine DNA-Konzentration von ~ 75 ng/µl eingestellt. Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte mit dem Qubit® 2.0 Fluorometer unter Verwendung des Qubit® dsDNA HS (High Sensitivity) Assay Kit (Life Technologies™, Carlsbad, Kalifornien, USA) nach Angaben des Herstellers. Im Nachfolgenden ist das für alle sequenzierten *Pseudomonas*-Stämme verwendete Protokoll zur Probenvorbereitung aufgeführt. Sofern nicht anders angegeben, wurden alle Schritte der Probenvorbereitung bei Raumtemperatur durchgeführt.

DNA-Fragmentierung

Von der auf ~ 75 ng/µl eingestellten gDNA wurden 52,5 µl in ein Covaris microTUBE pipettiert und gDNA mit dem Covaris S220 AFA (Adaptive Focused Acoustics™) Ultrasonicator (Covaris, Woburn, Massachusetts, USA) fragmentiert. Die Fragmentierung erfolgte unter den in Tabelle 2-5 genannten Einstellungen. Im Anschluss daran wurden 50 µl der gescherten gDNA in ein steriles 1,5-ml-Reaktionsgefäß überführt.

Tabelle 2-5: Einstellungen Covaris S220 AFA Ultrasonicator zur DNA-Fragmentierung.

1. Peak Incident Power (PIP):	175 Watt
2. Duty Factor:	10 %
3. Cycles/Burst:	200
4. Duration:	15 Sekunden
5. Temperature:	6 °C

Erste Selektion der Größe der DNA-Fragmente

Zu den 50 µl der gescherten gDNA wurden 50 µl *Resuspension Buffer* und 50 µl 1X Agencourt AMPure XP *magnetic beads* (Beckman Coulter, Brea, Kalifornien, USA) pipettiert, wodurch in der Lösung ein Verhältnis von 2:1 zwischen DNA-Fragmenten und *magnetic beads* (nachfolgend als *1x-beads* bezeichnet) vorlag. Bei diesem Verhältnis werden größere DNA-Fragmente (> ~1100 Nukleotide) an die *1x-beads* gebunden und können dadurch aus der Lösung entfernt werden.

Nach mehrmaligem Auf- und Abpipettieren der Lösung und fünfminütiger Inkubation wurde die Probe in einen Magnetständer (6-Tube Magnetic Separation Rack, New England BioLabs Inc.) überführt. In den darauffolgenden 2–3 Minuten konzentrierten sich die in der Lösung fein verteilten vorliegenden *1x-beads* punktuell an der dem Magneten zugewandten Seite des Reaktionsgefäßbodens. Von der *1x-bead*-freien Reaktionslösung wurden daraufhin 147 µl in ein neues 1,5-ml-Reaktionsgefäß überführt und 88,2 µl *Resuspension Buffer* zugegeben. Zu dieser Lösung wurden 49 µl 2X AMPure XP *magnetic beads* (Beckman Coulter, Brea, Kalifornien, USA) zugegeben und das gesamte Volumen durch Auf- und Abpipettieren gemischt. In der Lösung lag dabei ein Verhältnis von 1,9:1 zwischen DNA und *magnetic*

beads (nachfolgend als *2x-beads* bezeichnet) vor, wodurch kleinere DNA-Fragmente ($< \sim 650$ Nukleotide) nicht an die *2x-beads* binden konnten und in Lösung verblieben. Nach fünfminütiger Inkubation und weiteren 2–3 Minuten auf dem Magnetständer wurde der gesamte *2x-beads*-freie Überstand abgenommen und verworfen. Daraufhin wurden 200 μl 80%iger Ethanol (EtOH) zugegeben, ohne dabei das *2x-bead*-Pellet zu lösen. Der gesamte Überstand wurde nach 30 Sekunden abgenommen, woraufhin dieser Schritt ein zweites Mal durchgeführt wurde. Im Anschluss daran wurde das Reaktionsgefäß fünf Minuten mit geöffnetem Deckel inkubiert, damit das restliche EtOH aus dem *2x-bead*-Pellet verdampfen kann. Anschließend wurde das Reaktionsgefäß aus dem Magnetständer genommen und das *2x-bead*-Pellet in 52 μl *Resuspension Buffer* resuspendiert. Nach vorsichtigem Mischen der Lösung durch Auf- und Abpipettieren und einer Inkubationszeit von zwei Minuten wurde das Reaktionsgefäß in den Magnetständer überführt und nach weiteren 2–3 Minuten 50 μl der *2x-bead*-freien Lösung in ein neues 1,5-ml-Reaktionsgefäß pipettiert.

Reparieren der DNA-Fragmentenden

Auf die erste Selektion der DNA-Fragmentgrößen folgte das Reparieren der Fragmentenden. Bei der Fragmentierung entstehen sowohl Fragmente mit glatten Enden (*blunt ends*) als auch mit kohäsiven Enden (*sticky ends*). Letztere müssen für die spätere Ligation der Sequenzierungsadapter zu *blunt ends* umgewandelt werden. Dafür wurden zu 50 μl der fragmentierten DNA-Lösung 20 μl TruSeq End Repair Mix 2 und 5 μl TruSeq End Repair Control zugegeben und für 30 Minuten bei 30 °C inkubiert.

Zweite Selektion der Größe der DNA-Fragmente

Direkt im Anschluss an das Reparieren der DNA-Fragmentenden erfolgte die zweite Selektion der Fragmentgrößen. Hierfür wurden 70 μl dieser Lösung in ein neues 1,5-ml-Reaktionsgefäß überführt und 30 μl *Resuspension Buffer* sowie 50 μl *1x-beads* zugegeben. Alle weiteren Schritte wurden analog zur ersten Selektion der Größe der DNA-Fragmente durchgeführt. Abweichend davon wurde das getrocknete *2x-bead*-Pellet im vorletzten Schritt in 19 μl *Resuspension Buffer* resuspendiert und davon im letzten Schritt 18 μl des *2x-bead*-freien Überstandes in ein neues 1,5-ml-Reaktionsgefäß überführt.

Validierung der DNA-Bibliothek Teil 1

Ausgehend von 1 μl wurde die DNA-Konzentration der Lösung nach der zweiten Selektion der Größe der DNA-Fragmente mit dem Qubit[®] 2.0 Fluorometer unter Verwendung des Qubit[®] dsDNA HS Assay Kit bestimmt. Des Weiteren wurden 1 μl der DNA-Lösung auf eine DNA-Konzentration von $\sim 0,3$ ng/ μl verdünnt. Damit wurde in drei technischen Wiederholungen die Verteilung der DNA-Fragmentgrößen mit dem 2100 Bioanalyzer Instrument (Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornien, USA) ermittelt. Dazu wurden Agilent High Sensitivity DNA Chips nach Angaben des Herstellers verwendet. Der Durchschnitt der Ergebnisse der drei Wiederholungen wurde als durchschnittliche Länge (in Nukleotiden) der DNA-Fragmente (= Bioanalyzer-*inferred average insert size* = AIS_{Bio}) angenommen.

Daraufhin wurde die tatsächliche Länge der in der Probe enthaltenen DNA-Fragmente (= *actual fragment size* = AFS) mit der Formel $AFS = 0,564 * AIS_{\text{BIO}} + 258$ bestimmt.

Adenylierung der DNA-Fragmentenden am 3'-Ende und Ligation der Sequenzierungs-Adapter

Zu 15 µl der DNA-Lösung nach der zweiten Selektion der Größe der DNA-Fragmente wurden 1,25 µl A-tailing Controle und 6,25 µl A-tailing Mix pipettiert. Diese Lösung wurde daraufhin für 35 Minuten bei 37 °C inkubiert und im direkten Anschluss daran für fünf Minuten bei 70 °C. Nach fünfminütiger Inkubation auf Eis wurden zu dieser Lösung (22,50 µl) jeweils 1,25 µl der Ligation Control, des Ligation Mix 2 und des zuvor ausgewählten DNA-Adapters hinzugegeben. Nach mehrmaligem Mischen der Lösung durch Auf- und Abpipettieren wurde diese für 12 Minuten bei 30 °C inkubiert, woraufhin 2,5 µl *Stop Ligation Buffer* zugegeben wurden, um die Ligationsreaktion zu stoppen.

Finale Aufreinigung der DNA-Lösung

Von der adapterligierten DNA-Fragmentlösung wurden 25 µl in ein neues 1,5-ml-Reaktionsgefäß überführt und 25 µl *1x-beads* zugegeben. Nach mehrmaligem Auf- und Abpipettieren der Lösung wurde diese für fünf Minuten inkubiert und in einen Magnetständer überführt. Nach Klärung der Lösung in den darauffolgenden 2–3 Minuten wurde der *1x-bead*-freie Überstand abgenommen und das *1x-bead*-Pellet mit 200 µl 80%igem EtOH zweimal gewaschen. Im Anschluss daran wurde das *1x-bead*-Pellet für fünf Minuten mit geöffnetem Reaktionsgefäß getrocknet. Nach Entnahme des Reaktionsgefäßes aus dem Magnetständer wurde das *1x-bead*-Pellet in 27 µl *Resuspension Buffer* aufgenommen, für zwei Minuten inkubiert und für weitere 2–3 Minuten in den Magnetständer zurückgegeben. Vom *1x-bead*-freien Überstand dieser Lösung wurden 25 µl in ein neues 1,5-ml-Reaktionsgefäß pipettiert. Es folgte eine Wiederholung der soeben beschriebenen Schritte, wobei das getrocknete *1x-bead*-Pellet zuletzt in 15 µl *Resuspension Buffer* aufgenommen wurde und davon nach Inkubation auf dem Magnetständer 13 µl in ein neues 1,5-ml-Reaktionsgefäß überführt worden waren.

Validierung der DNA-Bibliothek Teil 2

Nach der finalen Aufreinigung erfolgte die Bestimmung der DNA-Konzentration (*conc*) in ng/µl mit dem Qubit[®] 2.0 Fluorometer unter Verwendung des Qubit[®] dsDNA HS Assay Kit in drei unabhängigen Messungen. Der Durchschnitt der gemessenen DNA-Konzentrationen wurde als DNA-Konzentration der DNA-Bibliothek definiert. Unter Verwendung der unter dem Punkt „Validierung der DNA-Bibliothek Teil 1“ berechneten DNA-Fragmentlänge (AFS) wurde die Nanomolarität (nM) der DNA-Bibliothek mit der Formel
$$= \frac{\text{conc} * 10^6}{(\text{AFS} + 120)} * 650$$
 berechnet.

Normalisierung und Zusammenfassen mehrerer Proben

Jede einzelne Probe wurde auf eine Molariät von 1 nM eingestellt. Nach Bestimmung der Anzahl der zu vereinigenden Proben (meist 6 bis 12) wurden von jeder Probe 10 µl der 1 nM

DNA-Bibliothek-Lösung in ein gemeinsames 1,5-ml-Reaktionsgefäß gegeben. Bei weniger als 6 Proben ist es wichtig, ein höheres Volumen einzusetzen, um ein Endvolumen von mindestens 60 µl zu erreichen. Des Weiteren ist zu beachten, dass alle Proben einen unterschiedlichen Sequenzierungsadapter besitzen.

Vorbereiten der vereinten DNA-Bibliothek-Lösung für die Genomsequenzierung

Direkt vor der eigentlichen Genomsequenzierung wurden in einem neuen 1,5-ml-Reaktionsgefäß 60 µl der DNA-Bibliothek-Lösung mit 60 µl NaOH (0,1 N) gemischt, für fünf Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen und im Anschluss daran für weitere fünf Minuten bei 95 °C inkubiert. Dabei denaturieren die doppelsträngigen DNA-Fragmente und liegen einzelsträngig vor. Dieser Schritt ist essentiell, da nur einzelsträngige DNA-Fragmente auf der *illumina flow cell* zur Cluster-Bildung hybridisieren können. Nach der Erhitzung auf 95 °C wurde die Probe für 10 Minuten auf Eis gekühlt, woraufhin 60 µl HCL (0,1 N) zugegeben wurden, um die NaOH zu neutralisieren. Nach Durchmischen der Probe durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren wurde die Probe weiter auf Eis gelagert, um eine Renaturierung der DNA-Fragment-Doppelstränge zu verhindern. Anschließend wurden 570 µl gekühlter *Hybridisation Buffer* zugegeben und die Lösung durch mehrmaliges Schwenken des Reaktionsgefäßes gemischt. In dieser Lösung lag daraufhin eine DNA-Menge von 80 pM vor. Davon wurden 600 µl in die zuvor vorbereitete *illumina sequencing cartridge* gegeben, welche anschließend bei 4 °C gelagert wurde, bis die Vorbereitungen (gemäß Hersteller) für die Sequenzierung an der illumina Plattform MiSeq abgeschlossen waren und die Sequenzierung gestartet werden konnte.

2.7 Bioinformatische Methoden

2.7.1 Einzelgen-Sequenzanalyse

Die Qualität von jeder von LGC Genomics erhaltenen Nukleotidsequenz wurde anhand des Sequenzierungs-Chromatogramms mit dem Programm Finch TV (Geospiza Inc., Version 1.4.0) überprüft. Bei unzureichender Sequenzqualität am Anfang und am Ende der Nukleotidsequenzen wurden diese Bereiche aus den Sequenzen entfernt. Einzelne, laut Chromatogramm fehlerhaft detektierte Basenpositionen in den Nukleotidsequenzen wurden manuell korrigiert. Die beiden Fragmente des 16S-rRNA-Gens, die über die DNA-Sequenzierung mit den Primern 16S_519F und 16S_926R für ausgewählte Isolate potentiell neuer Arten und Gattungen erstellt wurden, wurden mit Hilfe des Online-Tools EMBOSS 6.3.1: merger (Rice *et al.*, 2000) auf der Internetseite <http://mobyli.pasteur.fr/cgi-bin/portal.py#welcome> (Stand 08.04.2015) in ihrem überlappenden Bereich miteinander verbunden. Die Ähnlichkeit der partiellen *rpoB*-, *rpoD*- und 26S-rRNA-Gensequenzen zur Gensequenz von Typstämmen wurde unter Verwendung des Basic Local Alignment Search Tools (BLAST) (Altschul *et al.*, 1990) und der damit verbundenen Genbank[®] Datenbank überprüft (Benson *et al.*, 2013). Die Überprüfung der Ähnlichkeit der partiellen 16S-rRNA-Gensequenzen zu Typstammgensequenzen erfolgte mittels der Online-Plattform EzTaxon-e (Kim *et al.*, 2012) (<http://www.ezbiocloud.net/eztaxon>; Stand 08.04.2015). Als

Identifizierungsergebnis wurde immer die Art angenommen, zu deren Typstamm-Nukleotidsequenz die erhaltene Nukleotidsequenz die größte Ähnlichkeit zeigte. Bei Isolaten, deren Nukleotidsequenz eine niedrigere Übereinstimmung als 98 % des (partiellen) 16S-rRNA-Gens (angelehnt an Kim *et al.* (2014)), 97 % des partiellen *rpoD*-Gens (angelehnt an Mulet *et al.* (2011) und Sanchez *et al.* (2014a)) und 94 % des partiellen *rpoB*-Gens (Mellmann *et al.*, 2006) zu Typstamm-Gensequenzen gezeigt hatte, wurde die taxonomische Zuordnung zu einer bestimmten Art als nicht eindeutig angesehen. Bei Isolaten, deren Nukleotidsequenz eine niedrigere Übereinstimmung als 95–96 % des (partiellen) 16S-rRNA-Gens (angelehnt an Yarza *et al.* (2008)) zu Typstamm-Gensequenzen gezeigt hatte, wurde die taxonomische Zuordnung zu einer bestimmten Gattung als nicht eindeutig angesehen. Für alle nicht eindeutig identifizierten Isolate wurde angenommen, dass es sich dabei um potentielle, bisher unbekannte Arten oder Gattungen handeln könnte.

2.7.2 Phylogenetische Sequenzanalyse und Identifizierung potentiell unbekannter Gattungen und Arten

Um Isolate potentiellen, bisher unbekannten Gattungen oder Arten zuzuordnen, wurden mit den jeweiligen Gensequenzen der Isolate und den entsprechenden Gensequenzen von Typstämmen (Euzéby, 1997, Parte, 2014) der am nächsten verwandten Gattungen oder Arten aus der öffentlich zugänglichen Genbank[®]-Datenbank (Benson *et al.*, 2013) Alignments mit dem Muscle Alignment tool (Edgar, 2004) unter Verwendung der Standardeinstellungen erstellt. Ausgehend davon wurden phylogenetische Bäume mit den Methoden „Maximum-Likelihood“ und „Neighbor-Joining“ basierend auf dem Tamura-Nei Model berechnet. Alle verwendeten Methoden und Algorithmen sind in der MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) 5.2.2 Software (Hall, 2013, Tamura *et al.*, 2011) enthalten. Aus der Kombination von phylogenetischem Abstand und der Gensequenzähnlichkeit zu den am nächsten verwandten Typstämmen lassen sich Aussagen darüber treffen, ob ein Isolat einer bestimmten Art zugehörig ist oder der Verdacht naheliegt, dass es sich um eine bisher unbeschriebene Art handeln könnte. Wenn die Gensequenzen von einem oder mehreren Isolate in einem phylogenetischen Baum eine eigene Gruppe bildeten und zudem der Abstand zu einer Typstammsequenz vergleichbar oder größer war als zwischen den am nächsten verwandten Typstämmen, wurde dieses Isolat oder diese Gruppe als einer potentiell neuen Art zugehörig angesehen. Wurden innerhalb einer Gattung mehrere potentiell neue Arten identifiziert, wurden diese entsprechend der Anzahl der identifizierten Isolate, beginnend mit der am häufigsten isolierten Art, fortlaufend nummeriert (z.B. *Pseudomonas* sp. nov. (1)). Des Weiteren wurden phylogenetische Vergleiche konkatenierter partieller Gensequenzen (MLSA) zur Beschreibung neuer *Pseudomonas*-Arten verwendet, um diese von nah verwandten Arten abzugrenzen. Dabei wurde die Methode von Mulet *et al.* (2010) verwendet. Hierbei werden die partiellen Nukleotidsequenzen der Gene 16S rRNA, *gyrB* (codiert für die β -Untereinheit der DNA-Gyrase), *rpoD* und *rpoB* zuerst zugeschnitten und dann in der soeben genannten Reihenfolge konkateniert. Für die Beschreibung der beiden Arten *Pseudomonas helleri* sp. nov. und *Pseudomonas weihenstephanensis* sp. nov. wurden die

Sequenzen der vier Gene 16S rRNA, *gyrB*, *rpoD* und *rpoB* für die ausgewählten Stämme und alle *Pseudomonas*-Referenzstämme aus den annotierten *draft*-Genomen entnommen. Einzig die 16S-rRNA-Gensequenzen der Arten *Pseudomonas fragi* (Stamm IFO 3458^T, Gene Accession Nummer AB021413) und *Pseudomonas lini* (Stamm CFBP 5737^T, Gene Accession Nummer AY035996) wurden aus öffentlichen Datenbanken bezogen. Da die vollständige 16S-rRNA-Gensequenz eines Typstamms der Art *Pseudomonas orientalis* weder aus den *draft*-Genomsequenzen noch aus öffentlichen Datenbanken bezogen werden konnte, wurde diese manuell zusammengesetzt. Die ersten 12 Nukleotide stammten von der partiellen 16S-rRNA-Gensequenz aus dem *draft*-Genom des Stamms *Pseudomonas orientalis* DSM 17489^T (siehe Tabelle 6-2) und die Nukleotide 13 bis 1288 stammten aus der 16S-rRNA-Gensequenz des Stamms *Pseudomonas orientalis* CFML 96-170^T (AF064457). Dabei ist zu beachten, dass laut Alignment die Nukleotidposition 13 in der vollständigen 16S-rRNA-Gensequenz der Nukleotidposition 6 der 16S-rRNA-Gensequenz AF064457 (*Pseudomonas orientalis* CFML 96-170^T) entspricht.

Für die Beschreibung der beiden Arten *Pseudomonas lactis* sp. nov. und *Pseudomonas paralactis* sp. nov. wurden die Sequenzen der vier Gene 16S rRNA, *gyrB*, *rpoD* und *rpoB* für die ausgewählten Stämme ebenfalls aus den annotierten *draft*-Genomsequenzen entnommen, die Sequenzen der korrespondierenden Gene der *Pseudomonas*-Referenzstämme stammten aus öffentlichen Datenbanken und sind in Tabelle 6-3 aufgeführt. Die einzelnen zu verwendenden Nukleotidsequenz-Bereiche wurden, entsprechend der Methode, nach den Nukleotidpositionen der Referenzsequenzen von *Pseudomonas aeruginosa* gewählt. Die Referenzsequenzen und Positionen waren: 16S rRNA Gen (Accession-Nummer: X06684), Nukleotidpositionen 1 bis 1295; *gyrB* Gen (Accession-Nummer: AB039386), Nukleotidpositionen 43 bis 843; *rpoD* Gen (Accession-Nummer: AB039607), Nukleotidpositionen 42 bis 759; *rpoB* Gen (Accession-Nummer: AJ717442), Nukleotidpositionen 40 bis 954. Um die Gensequenzen aller zu vergleichenden Stämme zuzuschneiden, wurden zuerst die Referenzsequenzen einzeln zugeschnitten. Im Anschluss daran wurde ein Alignment mit den einzelnen Genen der zu untersuchenden Stämme und der entsprechenden, zugeschnittenen Referenzsequenz berechnet und in diesem dann die einzelnen Sequenzen entsprechend der alignierten Referenzpositionen zugeschnitten. Daraufhin wurden die einzelnen zugeschnittenen Nukleotidsequenzen konkateniert, wodurch die Sequenzvorbereitungen für das MLSA Alignment abgeschlossen waren. Zur Berechnung der phylogenetischen Neighbor-Joining-Bäume wurde das Jukes-Cantor-Modell (für Nukleotidsequenzen) verwendet. Außerdem wurden phylogenetische Methoden dazu verwendet, die genetische Ähnlichkeit des *apr*-Operons innerhalb der Gattung *Pseudomonas* zu ermitteln.

2.7.3 Bestimmung der durchschnittlichen Nukleotid-Übereinstimmung von Genomen untereinander (average nucleotide identity =ANI)

Auf der Basis von paarweisen Vergleichen von *draft*-Genomen wurde der ANIb-Wert mit dem Skript ANI.pl (von Jiapeng Chen, erreichbar unter <https://github.com/chjp/ANI>; Stand

08.04.2015) berechnet, welches auf dem von Richter and Rossello-Mora (2009) beschriebenen Algorithmus beruht. Dabei wurde als Grenzwert zur Abgrenzung zweier Arten voneinander ein Bereich von 94–96 % ANIb-Ähnlichkeit gewählt (Richter & Rossello-Mora, 2009). Bei einem Wert von unter 94 % wurden die beiden anhand ihrer Gesamtgenome verglichenen Isolate als verschiedenen Arten zugehörig angesehen; bei einem Wert über 96 % als der gleichen Art zugehörig. Bei einer ANIb-Ähnlichkeit im Bereich zwischen 94 % und 96 % sollten weitere Unterscheidungsmerkmale hinzugezogen werden, um die Artzugehörigkeit der Isolate genauer beurteilen zu können.

2.7.4 Vorhersage und Identifizierung von Genen in Genomen

Zur Vorhersage und Identifizierung von Genen in Genomen wurden bioinformatische Methoden angewendet. Die in den Genomdaten (*contigs* oder komplett assembliert) der 109 *Pseudomonas*-Stämme (siehe 2.2.3 und Tabelle 6-2) enthaltenen Gene wurden mit dem Programm Prodigal (**Pro**karyotic **D**ynamic **P**rogramming **G**enefinding **A**lgorithm), Version 2.60 (Hyatt *et al.*, 2010) vorhergesagt, wobei der Algorithmus zur Genvorhersage hauptsächlich auf der Suche nach möglichen Start- und Stopcodons in Verbindung mit möglichen Ribosomen-Bindestellen und der statistischen, durchschnittlichen Länge von Genen basiert. Von allen vorhergesagten Genen wurde sowohl die Nukleotid- als auch die Aminosäuresequenz in Form einer Multi-FASTA-Datei ausgegeben, wobei für jede Gen-/Aminosäuresequenz die genaue Position (*contig*, Gennummer, Start- und Stopposition) angegeben wurde, welche in beiden Dateien für jedes einzelne Gen und seine Aminosäuresequenz identisch ist. Dadurch war es möglich, Gene sowohl anhand ihrer Aminosäuresequenz als auch anhand ihrer Nukleotidsequenz zu identifizieren. Anhand der Nummerierung der Gene auf den *contigs* war es zudem möglich, zu ermitteln, ob die Gene auf einem *contig* in direkter Nachbarschaft liegen, also eventuell in Form eines Operons organisiert sein könnten, oder auf unterschiedlichen *contigs* liegen. Dabei war jedoch zu beachten, dass Gene, die am Anfang oder Ende eines *contigs* liegen, im Genom in direkter Nachbarschaft zu Genen liegen können, die am Anfang oder Ende eines anderen *contigs* identifiziert wurden. Die Identifizierung der vorhergesagten Gene erfolgte mittels BLAST-Vergleich (Altschul *et al.*, 1990) von Referenzgenen gegen die Aminosäure- oder Nukleotidsequenzen aller vorhergesagter Gene bzw. gegen die *contigs* eines Genoms. Die *draft*-Genome der *Pseudomonas*-Stämme wurden auf die als phylogenetische Marker verwendeten Gene 16S rRNA, *gyrB*, *rpoD* und *rpoB* hin untersucht (Mulet *et al.*, 2010). Zum anderen wurde untersucht, ob und welche Gene des *apr*-Operons: *aprA*, *aprI*, *aprD*, *aprE*, *aprF*, *lipA₁*, *lipA₂*, *pspA* und *pspB* (Ahn *et al.*, 1999, Linhartova *et al.*, 2010, Ma *et al.*, 2003, Woods *et al.*, 2001) die Stämme besitzen. Für Arten, die das *apr*-Operon besitzen, wurde außerdem überprüft, ob sich die regulationsassoziierten Gene *gacA*, *gacS*, *rsmA*, *rsmE*, *rsmX*, *rsmY* und *rsmZ* in deren *draft*-Genomen nachweisen lassen. Jeweils die, den Referenzgenen oder Referenz-Aminosäuresequenzen (siehe Tabelle 2-6) am ähnlichsten Gen- oder Aminosäuresequenzen aus den *draft*-Genomen wurden als Ergebnis angenommen und mittels BLAST-Vergleich gegen die Genbank®-Datenbank (Benson *et al.*, 2013) auf ihre Plausibilität

geprüft. Die ermittelten Nukleotidsequenzen der Gene des *apr*-Operons wurden außerdem mittels phylogenetischer Analyse (siehe 2.7.2) im Vergleich zu Nukleotidsequenzen der gleichen Gene von Isolaten derselben Art auf ihre Vollständigkeit hin überprüft. Wenn in einzelnen Gensequenzen anhand der Vergleichsequenzen fehlenden Bereiche ermittelt werden konnten, wurden im *draft*-Genom des Isolats mit unvollständiger Nukleotidsequenz nach diesen Bereichen gesucht. Nach Identifizierung des fehlenden Bereichs wurde die entsprechende Nukleotidsequenz manuell vervollständigt. Wenn der fehlende Bereich im *draft*-Genom des Isolats nicht identifiziert werden konnte, wurde das fehlende Teilstück durch die Nukleotidsequenz eines vergleichbaren Isolats ersetzt (sofern vorhanden). Betroffene Nukleotidsequenzen wurden entsprechend ausgewiesen.

Für die homologen Gene des *apr*-Operons wurde zusätzlich untersucht, ob diese in Form eines Operons organisiert sein könnten oder an einer anderen Position im Genom vorliegen. Als in Form eines potentiellen Operons vorliegend wurden Gene angenommen, die numerisch in einem *contig* aufeinander folgten. Außerdem wurde der als Promotorregion vermutete, in 5'-Richtung vor dem *aprA*-Gen gelegene, untranslatierte Bereich (5'-UTR = 5'-*untranslated region*) der *apr*-Operon tragenden *Pseudomonas*-Arten verglichen und auf mögliche bekannte Domänen hin untersucht. Aufgrund der im Vergleich zu allen anderen *Pseudomonas*-Arten deutlich abweichenden *apr*-Operonstruktur (siehe 3.3.1) wurde die Art *Pseudomonas aeruginosa* hierbei nicht berücksichtigt. Die bekannten Domänen waren im Detail die -35 und -10 Region, sowie der Transkriptionsstart nach Burger *et al.* (2000), die vermutete Ribosomenbindestelle mit dem darin enthaltenen zentralen RsmA/RsmE-Bindemotiv (5'...ACANGGANGU...3') nach Lapouge *et al.* (2008) und mögliche weitere „GGA“-Motive nach Schubert *et al.* (2007) und Lapouge *et al.* (2007).

Bei der Analyse des *apr*-Operons verwendete Referenzsequenzen

Bei den als Referenz verwendeten Sequenzen handelte es sich bei allen proteincodierenden Genen um die Aminosäuresequenzen des komplett sequenzierten Typstamms der Art *Pseudomonas protegens* (Stamm CHA0, DSM 19095); bei den nicht proteincodierenden Genen der small RNAs RsmX, RsmY und RsmZ wurde deren Nukleotidsequenz aus dem komplett sequenzierten Stamm *Pseudomonas protegens* Pf-5 als Referenzsequenz verwendet. Die Accession-Nummer aller Referenzsequenzen sind in Tabelle 2-6 aufgelistet.

Tabelle 2-6: Als Referenz zur Analyse des *apr*-Operons verwendete Aminosäure- und Nukleotidsequenzen.

Gen	Referenz-sequenz	Organismus	GenBank Accession-Nummer (Position im <i>draft</i> -Genom)
<i>rpoD</i>	RpoD	<i>Pseudomonas protegens</i> CHA0 ^T	AGL87345.1
<i>aprA</i>	AprA	<i>Pseudomonas protegens</i> CHA0 ^T	AGL85010.1
<i>aprI</i>	AprI	<i>Pseudomonas protegens</i> CHA0 ^T	AGL85009.1
<i>aprD</i>	AprD	<i>Pseudomonas protegens</i> CHA0 ^T	AGL85008.1
<i>aprE</i>	AprE	<i>Pseudomonas protegens</i> CHA0 ^T	AGL85007.1
<i>aprF</i>	AprF	<i>Pseudomonas protegens</i> CHA0 ^T	AGL85006.1
<i>lipA1</i>	LipA (LipA1)	<i>Pseudomonas protegens</i> CHA0 ^T	AGL85005.1

<i>pspA</i>	PspA	<i>Pseudomonas protegens</i> CHA0 ^T	AGL85004.1
<i>pspB</i>	PspB	<i>Pseudomonas protegens</i> CHA0 ^T	AGL85003.1
<i>lipA2</i>	LipA (LipA2)	<i>Pseudomonas protegens</i> CHA0 ^T	AGL85002.1
<i>gacA</i>	GacA	<i>Pseudomonas protegens</i> CHA0 ^T	AGL85372.1
<i>gacS</i>	GacS	<i>Pseudomonas protegens</i> CHA0 ^T	AGL86279.1
<i>rsmA</i>	RsmA	<i>Pseudomonas protegens</i> Pf-5	AAY93751.1
<i>rsmE</i>	RsmE	<i>Pseudomonas protegens</i> Pf-5	AAY91370.1
<i>rsmX</i>	rsmX	<i>Pseudomonas protegens</i> Pf-5	CP000076.1 (4773990-4774108)
<i>rsmY</i>	rsmY	<i>Pseudomonas protegens</i> Pf-5	CP000076.1 (6476723-6476840)
<i>rsmZ</i>	rsmZ	<i>Pseudomonas protegens</i> Pf-5	CP000076.1 (1382691-1382817)

Anhand eines BLAST-Vergleichs der Gensequenz des Lipasegens *lipA2* (Genom Accession Number CP000094.2 Position:3092982..3094835) aus *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1 (Ma *et al.*, 2003) mit den beiden Lipasegenen des *apr*-Operons aus *Pseudomonas protegens* CHA0^T konnte eine Ähnlichkeit von 80,7 % zu dem im Nachfolgenden als *lipA2* bezeichneten Gen ermittelt werden, zum Lipasegen *lipA1* konnte keine Ähnlichkeit ermittelt werden. Zwischen dem Lipasegen *lipA1* (Genom Accession Number CP000094.2 Position: 3091193..3092881) aus *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1 (Ma *et al.*, 2003) und den beiden Lipasegenen des *apr*-Operons aus *Pseudomonas protegens* CHA0^T konnte ebenfalls keine Ähnlichkeit ermittelt werden. Letztlich wurden alle ermittelten homologen Gene aus anderen *Pseudomonas*-Stämmen anhand ihrer Ähnlichkeit zu den verwendeten Referenzgenen benannt.

2.8 Charakterisierung neuer *Pseudomonas*-Arten

Die vier Arten *Pseudomonas helleri* sp. nov., *Pseudomonas weihenstephanensis* sp. nov., *Pseudomonas lactis* sp. nov. und *Pseudomonas paralactis* sp. nov. wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit erstbeschrieben. Zur Charakterisierung wurden ausgewählte Isolate dieser vier Arten und die Typstämme ihrer genetisch und/oder phylogenetisch am nächsten verwandten Arten phänotypisch und chemotaxonomisch untersucht und miteinander verglichen.

2.8.1 Phänotypische Charakterisierungen

Morphologische Untersuchung

Die Koloniemorphologie wurde makroskopisch nach Wachstum auf TSG bei 25 °C für 2 Tage ausgewertet. Die Zellmorphologie sowie die Beweglichkeit wurden mittels der Phasenkontrast-Funktion des Fluoreszenzmikroskops BX51 (Olympus) in Verbindung mit der Software F-View Soft Imaging System (Olympus) nach Wachstum in TSB, ohne zu schütteln, bei 25 °C für 24 h bestimmt. Die Zellgröße (Länge und Breite) wurde als Mittelwert von bis zu 100 einzeln vermessenen Bakterienzellen ermittelt.

Physiologische Untersuchungen

Die Referenzstämme und die Isolate der vier neuen *Pseudomonas*-Arten wurden hinsichtlich ihrer Toleranz und Wachstumsfähigkeit bezüglich der NaCl-Konzentration, des pH-Werts und der Inkubationstemperatur des Mediums untersucht. Des Weiteren wurde ihre Fähigkeit

untersucht, auf verschiedenen Agarmedien zu wachsen. Gleiches gilt auch für die Assimilation verschiedener Kohlenstoffquellen. Sofern nicht anders angegeben, erfolgte die Inkubation bei 25 °C über 24 Stunden. Alle Untersuchungen erfolgten in zwei komplett unabhängigen Wiederholungen. Für das Wachstum bei unterschiedlichen NaCl-Konzentrationen wurde TSB-Medium mit Konzentrationen von 0–8 % (w/v in 1-%-Intervallen) verwendet. Wachstum bei unterschiedlichen pH-Werten (pH 4–10 in Intervallen von 0,5 pH-Einheiten) wurde in TSB-Medium getestet, wobei dieses mit geeigneten Puffersystemen (pH 4–5,5 0,1 M Citronensäure/0,1 M tri-Natriumcitrat; pH 6–8 0,1 M KH₂PO₄/0,1 M NaOH; pH 8,5–10 0,1 M NaHCO₃/0,1 M Na₂CO₃) nach Xu *et al.* (2005) modifiziert wurde. Die pH-Werte der TSB-Medien wurden nach dem Autoklavieren mit 1 M NaOH oder 1 M HCl eingestellt und anschließend sterilfiltriert (Porengröße des Sterilfilters 0,22 µm). Alle Analysen wurden bei 25 °C über drei Tage unter Verwendung der „Honeycomb 2“ Mikrotiterplatten im Bioscreen C™ (Oy Growth Curves Ab Ltd, Finland) durchgeführt. Dabei wurden die Mikrotiterplatten mit mittlerer Intensität geschüttelt und alle 20 Minuten die optische Dichte bei 600 nm Wellenlänge (OD₆₀₀) gemessen. Jedes *well* enthielt 200 µl des jeweiligen Mediums (TSB NaCl 0–8 %; TSB pH 4–10) und wurde 1:1000 verdünnt mit einer Übernachtskultur (TSB, 25 °C, 24 h) des zu untersuchenden Stamms angeimpft. Das Wachstum in den Randbereichen der NaCl-Konzentration und des pH-Werts, die sich aus dem Bioscreen-C™-Ansatz als mögliche Wachstumsgrenze ergeben hatten, wurden zusätzlich in Reagenzgläsern, gefüllt mit jeweils 5 ml Medium, über eine Woche bei 25 °C untersucht. Die optimale Wachstumstemperatur der Typstämme der vier neuen Arten wurde ebenfalls unter Verwendung der „Honeycomb 2“-Mikrotiterplatten im Bioscreen C™ ermittelt. Untersucht wurde der Temperaturbereich zwischen 23 °C und 31 °C. TSB diente dabei als Kultivierungsmedium, die Messung der OD₆₀₀ erfolgte im Abstand von 30 Minuten über 48 Stunden. Jedes *well* enthielt 200 µl Medium und wurde 1:1000 verdünnt mit einer Übernachtskultur (TSB, 25 °C, 24 h) des zu untersuchenden Stamms angeimpft. Die Temperatur, bei der die Stämme zum frühesten Zeitpunkt eine optische Dichte von $\geq 0,2$ erreicht hatten, wurde als optimale Wachstumstemperatur angesehen. Zur Untersuchung der Temperatur-Wachstumsgrenzen (4 °C– 42 °C) wurden Reagenzgläser, gefüllt mit 7 ml TSB, verwendet. Diese wurden im Verhältnis 1:700 aus einer Übernachtskultur beimpft und für acht Tage bei 130 UpM schüttelnd inkubiert. Von der Übernachtskultur (TSG, 22 °C) wurde eine Impföse voll Zellmaterial abgenommen und in 1 ml TSB suspendiert. Diese Suspension diente als Inokulum. Untersucht wurden auch das Wachstum auf Cetrimid-Agarplatten und R2A-Agarplatten, die Fähigkeit zur Hämolyse mittels Columbia-Blut-Agar und das Vorhandensein des Enzyms β -Galactosidase (EC 3.2.1.23) auf LB-Agar, nachdem 40 µl (20 mg/ml) X-Gal-Lösung und 40 µl (100 mM) IPTG darauf ausplattiert worden waren. Das Wachstum unter anaeroben Bedingungen wurde auf TSG in einem Anaerobiertopf und mit Zugabe von Anaerocult® A (Merck KGaA) getestet. Die Fähigkeit, Pyocyanin und Fluorescein zu bilden, wurde mittels King A bzw. King B Agar nach King *et al.* (1954) untersucht. Zum Test auf das Vorhandensein Stärke-hydrolysierender Enzyme wurden die *Pseudomonas*-Stämme auf Stärke-Agar bei 25 °C für 48 h inkubiert. Im Anschluss daran

wurden die Agarplatten mit Lugolscher Lösung übergossen. Die darin enthaltenen Iodidionen lagern sich in die Polysaccharid-Struktur ein, demzufolge lassen sich die Agarplatten in dem Bereich, in dem die Stärke hydrolysiert wurde, nicht anfärben. Die Fähigkeit zu Lipolyse und Proteolyse wurde ebenfalls getestet (siehe 2.10). Zusätzlich zur Proteolyse von Milchproteinen wurde die Fähigkeit, Gelatine zu hydrolysieren unter Verwendung von Nutrient-Gelatine-Röhrchen, untersucht. Die ausgehend von einer Übernachtskultur (TSG, 25 °C) mittels Stichkultur beimpften Reagenzgläser wurden bei 25 °C für 14 Tage inkubiert. Die Auswertung erfolgte nach 48 Stunden und nach 14 Tagen, hierfür wurden die Reagenzgläser für 30 Minuten bei 8 °C inkubiert und im Anschluss daran geschwenkt. Bei erfolgter Gelatine-Hydrolyse kann sich das Medium nicht mehr verfestigen und bleibt flüssig. Die Indolbildung und die Fähigkeit zur Bildung von H₂S wurden, wie unter Punkt 2.3 beschrieben, mittels SIM-Medium überprüft. Zur Untersuchung auf Nitrat- und Nitrit-Reduktion wurden die Reagenzien NIT 1 und NIT 2, die Bestandteil des API[®] 20 NE *strips* (bioMérieux) Testverfahrens sind, und Zinkpulver (Zn) verwendet. Dazu wurden die *Pseudomonas*-Stämme bei 25 °C für 24 Stunden in TSB unter Zusatz von 0,1 % (w/v) KNO₃ und 0,17 % (w/v) Agar (für semi-anaerobe Bedingungen) kultiviert. Im Anschluss daran wurde 1 ml in ein 1,5-ml-Reaktionsgefäß überführt und der Test nach Anleitung des Herstellers der API[®] 20NE *strips* durchgeführt.

Die Assimilation verschiedener Kohlenstoffquellen (siehe Tabelle 2-1) als einzige Kohlenstoff- und Energiequelle wurde in Anlehnung an das Protokoll der API[®] 50CH *strips* (bioMérieux) durchgeführt. Die in den API[®] 50CH *strips* angegebenen Konzentrationen der verwendeten Kohlenstoffquellen-Lösungen in Milligramm pro Reaktionsbecher wurden mit Milligramm pro 100 µl gleichgesetzt und doppelkonzentriert hergestellt. Von den Übernachtskulturen (TSG, 25 °C) der *Pseudomonas*-Stämme wurde je eine Impföse voll Zellmaterial abgenommen, in Suspensionsmedium gelöst und dieses auf eine OD₆₀₀ von ca. 0,4 eingestellt. Jeweils 100 µl einer Kohlenstoffquellen-Lösung wurde in ein *well* einer 96-*well* Mikrotiterplatte (µCLEAR[®], Greiner Bio-One GmbH) vorgelegt und 100 µl des beimpften Suspensionsmediums zugegeben. Die Mikrotiterplatten wurden mit einer luftdurchlässigen Folie (Breathe-Easy[®], Diversified Biotech) verschlossen und für drei Tage bei 550 UpM schüttelnd bei 25 °C inkubiert. Im Anschluss daran erfolgte die optische Auswertung anhand der Medientrübung, dies wurde nach weiteren 7 Tagen (ungeschüttelte Inkubation bei 22 °C) erneut überprüft. Für die Erstbeschreibung der Arten *Pseudomonas lactis* sp. nov. und *Pseudomonas paralactis* sp. nov. wurden außerdem deren Fähigkeit zur Säurebildung bei Wachstum in den soeben genannten Kohlenstoffquellen-Lösungen untersucht. Das methodische Vorgehen war dabei identisch zur Untersuchung der Assimilation der Kohlenstoffquellen-Lösungen, wobei statt dem selbst hergestellten Suspensionsmedium das API[®] 50 CHB/E Medium verwendet wurde. Dieses beinhaltet einen pH-Wert-Indikator, der bei Säurebildung einen Farbwechsel des Mediums bewirkt. Zur Herstellung der Zellsuspension wurde sterile Ringer-Lösung (¼ stark) verwendet. Des Weiteren wurde für die Arten *Pseudomonas lactis* sp. nov. und *Pseudomonas paralactis* sp.

nov. sowie die mitgeführten Referenzstämme mittels des Tests API® 20 E untersucht, ob bei diesen die Enzym-Gruppen Arginin-Dihydrolase (EC 3.5.3.6), Lysin-Decarboxylase (EC 4.1.1.18), Ornithin-Decarboxylase (EC 4.1.1.17) und Urease (EC 3.5.1.5) nachgewiesen werden können, wie sie im Voges-Proskauer-Test reagieren und ob sie in der Lage sind, Tryptophan zu deaminieren.

2.8.2 Chemotaxonomische Charakterisierung

Im Zuge der Neubeschreibungen wurden der prozentuale Anteil der zellulären Fettsäuren, die Zusammensetzung der polaren Lipide und die Art der respiratorischen Chinone untersucht. Diese chemotaxonomischen Charakterisierungen wurden vom Identifizierungsservice der DSMZ (Braunschweig, Deutschland) durchgeführt. Für die Extraktion der zellulären Fettsäuren wurden Aktivkulturen der *Pseudomonas*-Referenzstämme und der Typstämme der vier neuen Arten an die DSMZ gesendet. Die Extraktion und nachfolgende Analyse der zellulären Fettsäuren erfolgte nach einer leicht modifizierten Methode von Miller (1982) und Kuykendall *et al.* (1998). Zuvor waren die Zellen bei 28°C über 24 Stunden inkubiert worden. Zum Zeitpunkt der Analyse nutzte die DSMZ dafür einen Agilent-6890N-Gas-Chromatographen und die Version 6.1 der Software MIDI Inc. Sherlock MIS (Datenbank MIDI, Inc., TSBA 40 4.10). Von den Typstämmen der neuen Arten wurden zudem, ausgehend von 200 mg gefriergetrockneter Zellen, die Zusammensetzung der polaren Lipide bestimmt sowie die respiratorischen Chinone identifiziert. Hierfür wurden die Bakterienstämme bei 25 °C für 24 Stunden schüttelnd inkubiert, anschließend zentrifugiert und das Zellpellet mit steriler Ringer-Lösung (¼ stark) gewaschen. Zuerst wurden die respiratorischen Chinone nach der Methode von Tindall (1990a, b) extrahiert und mittels Dünnschichtchromatographie und nachfolgender HPLC-Analyse identifiziert. Im Anschluss daran erfolgte die Extraktion der polaren Lipide mittels einer abgeänderten Methode von Bligh and Dyer (1959). Die Identifikation der polaren Lipide erfolgte nach Tindall *et al.* (2007).

2.8.3 Hinterlegung in öffentlichen Stammsammlungen

Von der neubeschriebenen Art *Pseudomonas helleri* sp. nov. wurde der Typstamm WS4917^T sowie ein zusätzliches Isolat WS4995 bei der DSMZ und bei der BCCM™/LMG Bacteria Collection (Belgian Co-ordinated Collection of Micro-organismes/Laboratorium voor Microbiologie, Universiteit Gent) hinterlegt (WS4917^T = DSM 29165^T = LMG 28433^T, WS4995 = DSM 29141 = LMG 28434). Gleiches gilt für den Typstamm WS4993^T (= DSM 29166^T = LMG 28437^T) und das zusätzliche Isolat WS4994 (= DSM 29140 = LMG 28438) der neubeschriebenen Art *Pseudomonas weihenstephanensis* sp. nov. Ebenfalls bei den soeben genannten öffentlichen Stammsammlungen hinterlegt wurden die Typstämme der beiden neubeschriebenen Arten *Pseudomonas lactis* sp. nov. (WS4992^T = DSM 29167^T = LMG 28435^T) und *Pseudomonas paralactis* sp. nov. (WS4672^T = DSM 29164^T = LMG 28439^T).

2.9 Konservierung der isolierten Mikroorganismen

Alle repräsentativen Isolate (siehe 2.3) wurden für spätere Arbeiten in einer Glycerin-Lösung bei -80 °C eingefroren. Zunächst wurde von jedem Isolat auf geeignetem Medium ein Massenausstrich erstellt und für ein bis zwei Tage unter den benötigten Bedingungen inkubiert. Danach wurde die gesamte gewachsene Kultur von der Agarplatte abgenommen und in die Glycerinlösung eingerührt. Die Kulturen wurden anschließend über Nacht bei 6 °C gelagert, damit die Zellen das Glycerin aufnehmen konnten, wodurch sie vor Zellschädigungen durch das Einfrieren geschützt sind. Zur Reaktivierung der Isolate zu einem späteren Zeitpunkt wurde mit einer sterilen Impföse ein kleiner Teil der gefrorenen Glycerinkultur entnommen, auf geeignetem Medium ausgestrichen und unter den benötigten Bedingungen inkubiert.

2.10 Agardiffusions-Tests zur Visualisierung lipolytischer und proteolytischer Enzyme

Die Visualisierung lipolytischer und proteolytischer Enzyme erfolgte mit den beiden Medien Tributyrin-Agar (KGaA, 2005) und Proteolyse-Agar. Die Trübung der beiden Medien ist auf den hohen Anteil des fein emulgiert vorliegenden Tributyrins bzw. des Magermilchpulvers zurückzuführen. Von den zu testenden Isolaten wurde jeweils eine Impföse voll Zellmaterial in $100\text{ }\mu\text{l H}_2\text{O}$ suspendiert. Nach Homogenisieren der Suspension wurden jeweils $10\text{ }\mu\text{l}$ auf die beiden Medien aufgetropft und diese in zwei parallelen Ansätzen jeweils bei 30 °C (25 °C zur Beschreibung neuer *Pseudomonas*-Arten) für zwei Tage und bei 6 °C (4 °C zur Beschreibung neuer *Pseudomonas*-Arten) für 10 Tage inkubiert. Bei Sekretion von extrazellulären Peptidasen bzw. Lipasen hydrolysieren diese die Milchproteine bzw. das Tributyrin, wodurch das Medium seine Trübung im Bereich der aufgetropften Isolatsuspension verliert (siehe Abbildung 2-2). Isolate, die auf dem entsprechenden Medium nach Inkubation bei der jeweiligen Temperatur einen Hydrolysehof zeigten, wurden als positiv gewertet. War keine Medienaufhellung im Bereich der aufgetropften Isolatsuspension zu erkennen, wurde dies als negatives Ergebnis gewertet (siehe Abbildung 2-2 A, links oben, B rechts oben).

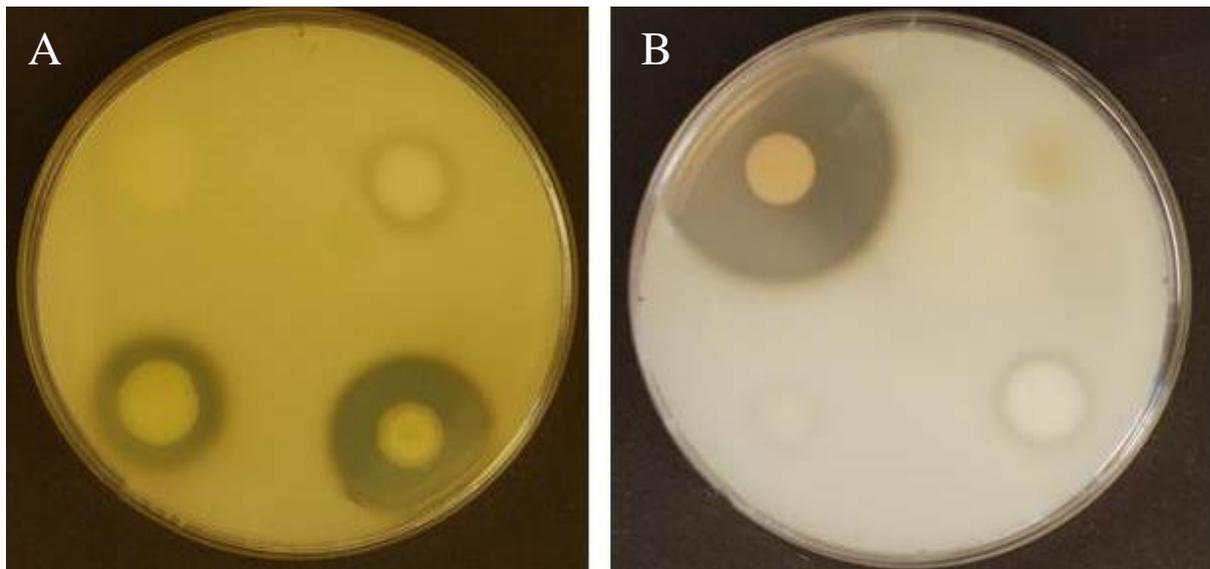


Abbildung 2-2: Hydrolysehof auf einer Proteolyse-Agarplatte und Tributyrin-Agarplatte. Proteolyse-Agarplatte (A, rechts unten) bzw. Tributyrin-Agarplatte (B, links oben).

Die Untersuchungen bei 6 °C dienten der Überprüfung der Enzymbildungsfähigkeit der Isolate bei Milchlagerungstemperatur, da nur Enzyme, die bei dieser Temperatur auch tatsächlich gebildet werden, in die Milchprozessierungskette und die daraus resultierenden Produkte Einzug finden können. Die Untersuchungen bei 30 °C dienten der Überprüfung der Enzymbildungsfähigkeit der Isolate unter standardmäßig verwendeten Laborbedingungen.

2.11 Statistik

Alle statistischen Auswertungen erfolgten mit dem Programm IBM® SPSS® Statistic 23 und den darin enthaltenen Methoden. Insbesondere wurden in der vorliegenden Arbeit der Shapiro-Wilk-Test (Shapiro & Wilk, 1965), der Mann-Whitney-U-Test (Mann & Whitney, 1947), der *t*-Test (Student, 1908) und die Korrelationsanalyse nach Spearman verwendet. Die Auswahl der Verfahren erfolgte anhand der Erläuterungen von Alan and Wayne (2006) sowie Moore *et al.* (2009). Sofern möglich, wurden alle Tests mit einem Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$ durchgeführt. Der Shapiro-Wilk-Test wurde verwendet, um zu überprüfen, ob die zu prüfenden Daten einer Normalverteilung folgen. Bei Vorliegen einer Normalverteilung wurde zur Ermittlung eines möglichen statistisch signifikanten Unterschieds zwischen Datenreihen der *t*-Test verwendet. Als Pendant zum *t*-Test für nicht normalverteilte Daten wurde der Mann-Whitney-U-Test verwendet und die Korrelationsanalyse nach Spearman wurde angewandt, um mögliche Korrelationen zwischen unterschiedlichen Datenreihen zu ermitteln.

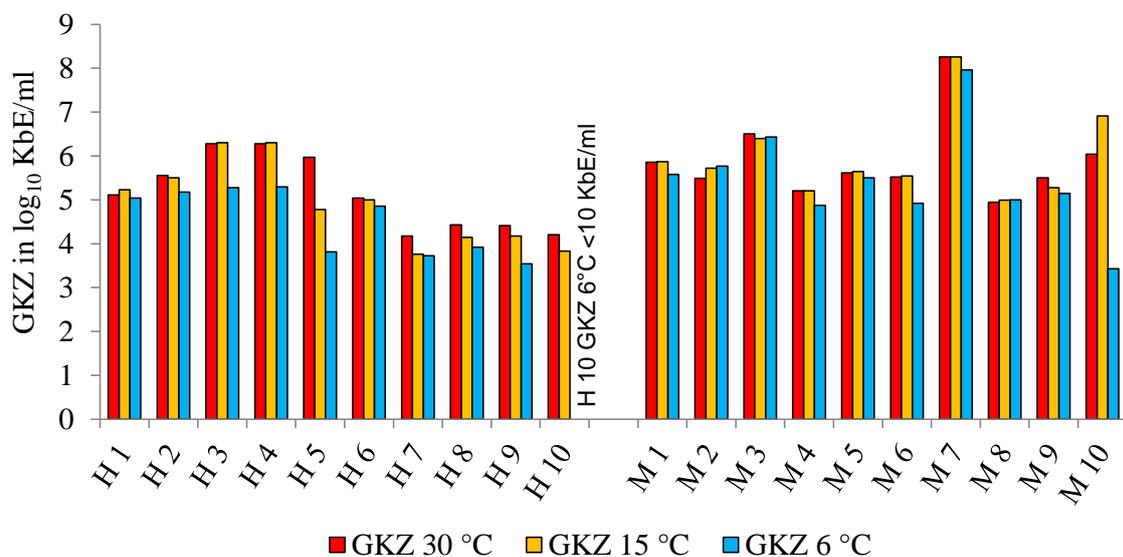
3 ERGEBNISSE

3.1 Mikrobielle Biodiversität in Rohmilchen und Milchhalbfabrikaten

3.1.1 Gesamtkeimzahlen der Rohmilchen und Milchhalbfabrikate

Um die Biodiversität der aerob kultivierbaren Rohmilch- und Milchhalbfabrikat-Mikrobiota beurteilen zu können, wurde in einem ersten Schritt die Gesamtkeimzahl (GKZ) jeder einzelnen Probe bestimmt (siehe Tabelle 6-4).

In Abbildung 3-1 sind die Ergebnisse der GKZ aller 20 untersuchten Rohmilchen (H = Hofmilchen; M = Molkereitankmilchen) dargestellt.



ERGEBNISSE

Abbildung 3-1: Gewichtetes arithmetisches Mittel der Gesamtkeimzahlen der Rohmilchen von Höfen (H) und Molkereitanks (M). GKZ 30 °C (rot), 15 °C (orange) und 6 °C (türkis).

Wie auf den ersten Blick zu erkennen ist, lag die ermittelte GKZ pro Probe bei 30 °C und 15 °C bei fast allen Proben in einem vergleichbaren Bereich, bei der Hälfte der Proben galt dies sogar für alle drei Temperaturen. Lediglich bei den Proben H 5 und M 10 wurden stärkere Abweichungen in der GKZ zwischen den einzelnen Temperaturen beobachtet. Ergänzend dazu ist in Abbildung 3-1 zu sehen, dass die GKZ nicht immer bei 30 °C am höchsten war. Bei den Hofmilchen 1, 3 und 4 sowie bei den Molkereitankmilchen 1, 2, 5, 6, 8 und 10 war die ermittelte GKZ bei 15 °C höher als bei 30 °C. Die Proben M 2 und M 3 hingegen wiesen bei 6 °C eine höhere GKZ auf als bei 15 °C, wobei die GKZ bei 6 °C bei den meisten Proben niedriger war als bei 15 °C und 30 °C. Des Weiteren fällt auf, dass die ermittelten GKZ von Probe zu Probe stark variierten, teilweise sogar über zwei Potenzen. Außerdem ist zu erkennen, dass die Gesamtkeimzahlen der Hofmilchen generell etwas niedriger ausfallen als die der Molkereitankmilchen. Um überprüfen zu können, ob es sich dabei um einen statistisch signifikanten Unterschied handelt oder nicht, wurde überprüft, ob die GKZ der Hofmilchen und Molkereitankmilchen bei 30 °C, 15 °C und 6 °C einer Normalverteilung folgen. Dabei wurde die GKZ der Probe H 10 bei 6 °C, deren Wert als kleiner 10 Kbe/ml angegeben ist, mit ihrer maximal möglichen GKZ von 9 Kbe/ml in die Wertung miteinbezogen. Sowohl für die Gesamtkeimzahlen der Hofmilchen als auch für die GKZ der Molkereitankmilchen konnte mittels des Shapiro-Wilk-Tests eine statistisch signifikante Abweichung ($p < 0.05$) von einer angenommenen Normalverteilung (siehe Tabelle 6-5) ermittelt werden. Eine statistisch signifikante Abweichung ($p < 0.05$) der Gesamtkeimzahlen bei 30 °C und 6 °C GKZ ergab sich auch teilweise von einer angenommenen logarithmischen Normalverteilung. Lediglich bei den Gesamtkeimzahlen bei 15 °C konnte keine statistisch signifikante Abweichung von einer logarithmischen Normalverteilung ermittelt werden (siehe Tabelle 6-5). Diesen Ergebnissen zufolge waren die Gesamtkeimzahlen nur teilweise (logarithmisch) normalverteilt. Demzufolge wurde zur statistischen Überprüfung der (einseitigen) These, dass die Gesamtkeimzahlen der Hofmilchen signifikant niedriger ausfallen als die der Molkereitankmilchen, für die GKZ bei 15 °C der t -Test (siehe Tabelle 6-6) verwendet und der nichtparametrische Mann-Whitney-U-Test für die GKZ bei 30 °C und 6 °C (siehe Tabelle 6-7). Dabei dienten die logarithmierten Gesamtkeimzahlen der 20 Rohmilchen als Datengrundlage. Die Gesamtkeimzahlen der Hofmilchen waren bei 15 °C und 6 °C statistisch signifikant niedriger als die der Molkereitankmilchen (15 °C $p = 0,011$; 6 °C $U = 24$, $p = 0,026$). Bei 30 °C konnte kein statistisch signifikanter Unterschied ($U = 30$, $p = 0,069$) ermittelt werden (siehe Tabelle 6-7). Anzumerken ist an dieser Stelle, dass zusätzlich zu den GKZ bei 15 °C auch die GKZ bei 30 °C, nicht aber bei 6 °C, nach Ausschluss der Ausreißer (M 7 bei 30 °C, 15 °C und 6 °C sowie H 10 und M 10 bei 6 °C; Abbildung 3-3) logarithmisch normalverteilt vorlagen. Ein auf dieser Datengrundlage durchgeführter t -Test für die GKZ bei 30 °C führte zu einem vergleichbaren Ergebnis wie der zuvor durchgeführte Mann-Whitney-U-Test.

ERGEBNISSE

Ein weitaus diverseres Bild ergab sich bei der Ermittlung der GKZ der Proben der vier Milchhalbfabrikat-Gruppen Magermilchkonzentrat (MmK), Milcheiweißkonzentrat (EwK), Rahm (Sahne) und eiweißangereichertes Molkenkonzentrat (EwagMk). Deren Gesamtkeimzahlen sind in Abbildung 3-2 dargestellt, in der außerdem auch Milchhalbfabrikate aufgeführt sind, deren Mikrobiota nicht analysiert wurde (alle Proben mit den Probennummern 6, 7, 8 oder 9).

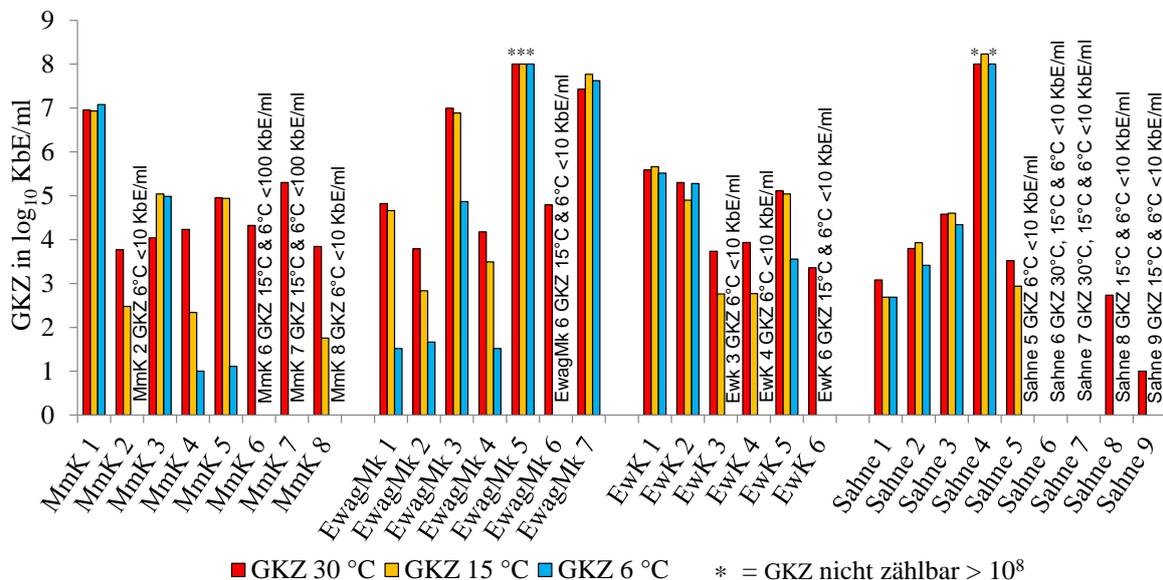


Abbildung 3-2: Gewichtetes arithmetisches Mittel der Gesamtkeimzahlen der Milchhalbfabrikate. Magermilchkonzentrat (MmK), eiweißangereichertes Molkenkonzentrat (EwagMk), Milcheiweißkonzentrat (EwK) und Sahne. GKZ 30 °C (rot), 15 °C (orange) und 6 °C (türkis). * = GKZ nicht zählbar = Wert > 1*10⁸.

In Abbildung 3-2 fällt sofort auf, dass sich die Gesamtkeimzahlen sowohl insgesamt als auch innerhalb der Proben bei den drei untersuchten Temperaturen sehr stark voneinander unterschieden. Bei 18 der 30 Proben war die GKZ bei 15 °C und 6 °C am niedrigsten, oft sogar kleiner 100 bzw. 10 KbE/ml. Bei den Proben Sahne 6 und Sahne 7 war dies sogar bei allen drei untersuchten Temperaturen der Fall. Im Gegensatz dazu standen die Proben EwagMk 5 und Sahne 4, deren GKZ bei den gewählten Verdünnungsstufen meist nicht zählbar war und aufgrund der Verdünnungsstufen als größer 8 log₁₀ gewertet wurde. Bei einigen Proben konnten jedoch auch für alle drei Temperaturen vergleichbare GKZ ermittelt werden (MmK 1, EwagMk 5, EwagMk 7, EwK 2, EwK 3 und Sahne 1-4).

Um die Gesamtkeimzahlen aller Proben bei den drei Temperaturen besser vergleichen und beurteilen zu können, wurde der Median aus den einzelnen logarithmierten Gesamtkeimzahlen sowohl für die Rohmilchen der 10 Höfe und der 10 Molkereitanks als auch für die 30 Milchhalbfabrikate berechnet (siehe Abbildung 3-3). Alle Proben, deren Gesamtkeimzahlen als kleiner 100 KbE/ml bzw. kleiner 10 KbE/ml angegeben sind, wurden mit ihrer maximal möglichen GKZ (99 bzw. 9 KbE/ml) in die Wertung miteinbezogen; alle

ERGEBNISSE

Proben, deren Gesamtkeimzahlen als größer 8 \log_{10} KbE/ml angegeben sind, wurden als 8 \log_{10} KbE/ml bewertet.

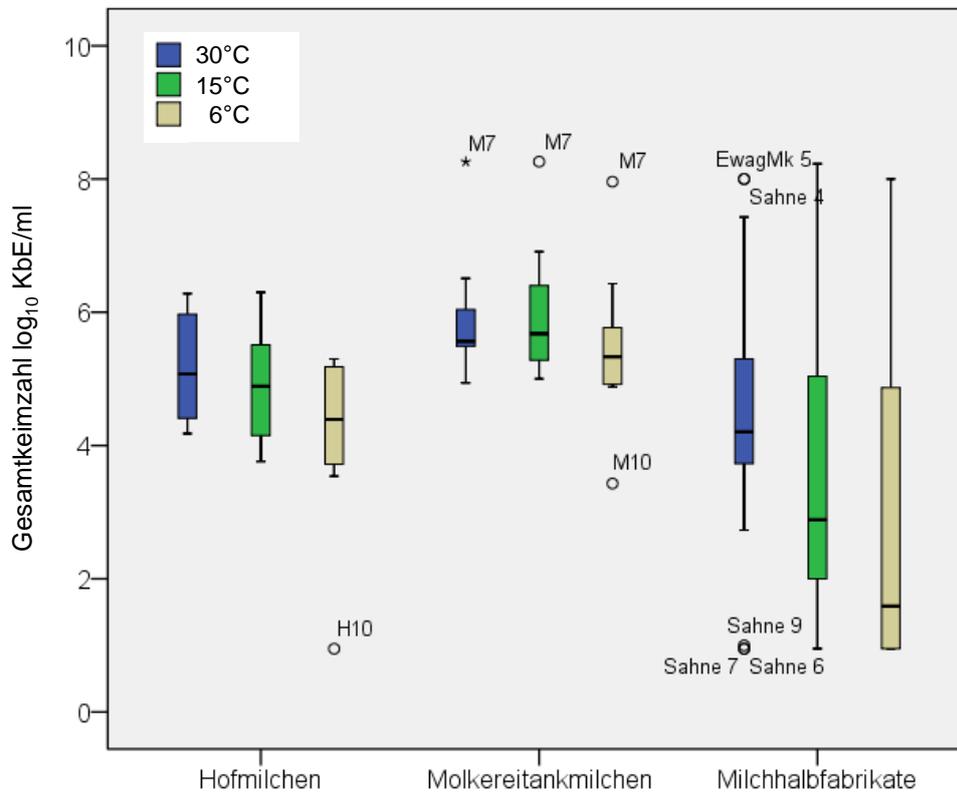


Abbildung 3-3: Boxplot der Gesamtkeimzahlen der Hofmilchen, Molkereitankmilchen und Milchhalbfabrikate. GKZ 30 °C (blau), 15 °C (grün) und 6 °C (beige).

Die Mediane der Gesamtkeimzahlen der Molkereitankmilchen lagen im Vergleich zu den Hofmilchen bei jeder der drei Temperaturen um etwa eine halbe bis ganze Log-Stufe höher, wobei, wie schon zuvor bei der Analyse der Rohmilchen erwähnt, nur für die Temperaturen 15 °C und 6 °C ein statistisch signifikanter Unterschied ermittelt werden konnte. Die Mediane der GKZ der Milchhalbfabrikate bei 30 °C, 15 °C bzw. 6 °C hingegen lagen zwischen ein bis drei Log-Stufen niedriger als bei den Rohmilchproben allgemein. Die Lage der meisten Mediane außerhalb der „Box-Mitte“ deutet zudem darauf hin, dass die GKZ der Milchhalbfabrikate wahrscheinlich nicht normalverteilt vorlagen (Alan & Wayne, 2006).

Für die Überprüfung der These, dass die Milchhalbfabrikate eine statistisch signifikant niedrigere Gesamtkeimzahl bei den drei untersuchten Temperaturen aufwiesen als die Rohmilchen (Hofmilchen und Molkereitankmilchen) wurden ebenfalls der *t*-Test und der Mann-Whitney-U-Test angewandt. Die GKZ beider Gruppen (Rohmilchen und Milchhalbfabrikate) zeigten bei 30 °C keine statistisch signifikante Abweichung von einer logarithmischen Normalverteilung, bei 15 °C und 6 °C war dies nur bei den Rohmilchen der Fall, nicht aber bei den Milchhalbfabrikaten (siehe Tabelle 6-8). Eine statistisch signifikant niedrigere GKZ der Milchhalbfabrikate konnte bei 30 °C ($p = 0,005$), 15 °C ($U = 141$, $p = 0,001$) und 6 °C ($U = 147$, $p = 0,001$) bestätigt werden (siehe Tabelle 6-9 und Tabelle 6-10).

3.1.2 Biodiversitäts-Analyse der Rohmilchen und Milchhalbfabrikate

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden insgesamt 4812 Mikroorganismen isoliert und identifiziert. Davon stammten 2906 Isolate aus den Rohmilchproben und 1906 Isolate aus den Milchhalbfabrikaten. Die Isolate bildeten die Grundlage für die Biodiversitäts-Analysen, die im Nachfolgenden zuerst für die Rohmilchen und dann für die Milchhalbfabrikate dargestellt sind. Die Biodiversitäts-Analysen der Milchhalbfabrikate stehen dabei teilweise im Vergleich zu denen der Rohmilchen.

Biodiversitäts-Analyse der untersuchten Rohmilchen auf Basis taxonomischer Großgruppen

In der nachfolgenden Abbildung 3-4 ist die mikrobielle Biodiversität der 10 Hofmilchen und der 10 Molkereitankmilchen anhand des prozentualen Anteils einzelner taxonomischer Großgruppen dargestellt. Dabei wurde zwischen den folgenden Großgruppen unterschieden: fakultativ anaerobe, gramnegative Bakterien (orange); obligat aerobe, gramnegative Bakterien (rot); grampositive Bakterien, High GC (hoher GC-Gehalt in der DNA; grau); grampositive, aerob sporenbildende Bakterien (Sporenbildner; violett); „Andere“ grampositive Bakterien (blau); Milchsäurebakterien (MSB; türkis) und Hefen (grün).

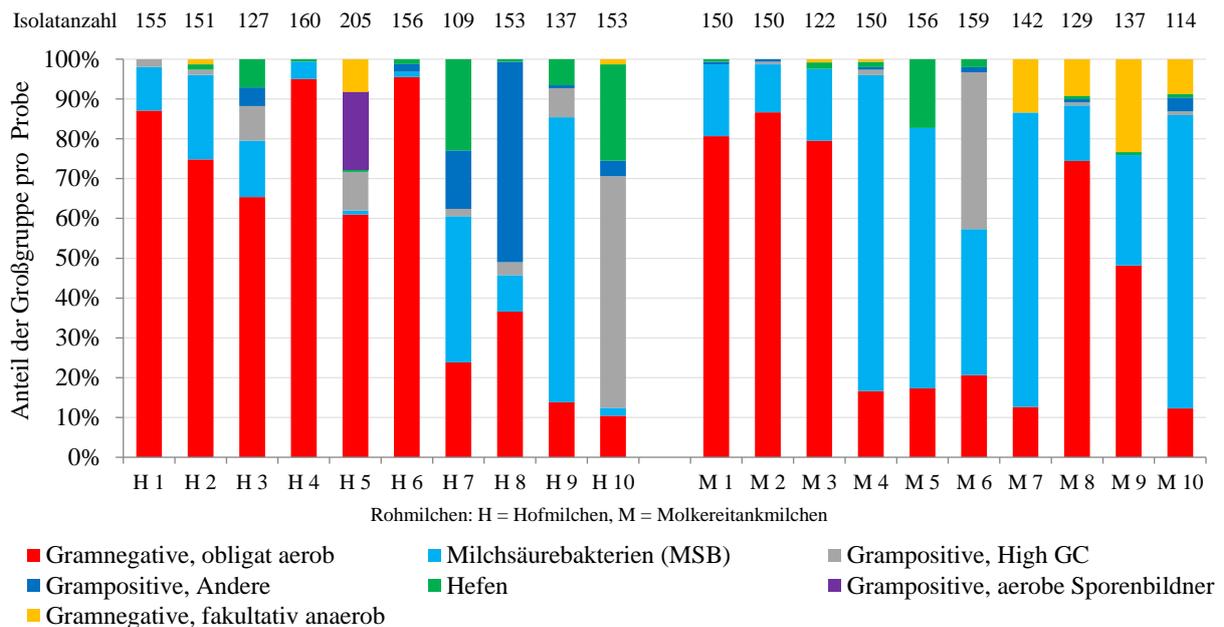


Abbildung 3-4: Zusammensetzung der mikrobiellen Biodiversität einzelner Hof- und Molkereitankmilchen in taxonomischen Großgruppen. Angegeben ist der Anteil der taxonomischen Großgruppen an der Mikrobiota in Prozent, die absolute Isolatanzahl ist über der jeweiligen Probe angegeben.

In sechs (H 1–H 6) der zehn Hofmilchen sowie in vier (M 1–M 3 und M 8) der zehn Molkereitankmilchen wurde die Mikrobiota von gramnegativen, obligat aeroben Bakterien dominiert (Anteil > 60 %). Des Weiteren zeigte sich in fünf Proben (H 9, M 4, M 5, M 7 und M 10) eine deutliche Dominanz der Milchsäurebakterien (Anteil > 60 %), wodurch auch der durchschnittliche Anteil an Milchsäurebakterien in den Molkereitankmilchen höher liegt. Außerdem handelte es sich bei den Proben M 7 und M 10 um die Proben mit der höchsten

ERGEBNISSE

ermittelten GKZ bei 15 °C. Die dominierende Großgruppe in der Mikrobiota der Hofmilchprobe H 10 hingegen war die Gruppe der grampositiven High GCs (Anteil ~ 60 %), wobei diese fast ausschließlich der Gattung *Microbacterium* zugeordnet werden konnte. In der Hofmilchprobe H 8 konnte eine deutliche Dominanz (Anteil ~ 50 %) der Großgruppe der „Anderen“ grampositiven Bakterien festgestellt werden, wobei diese alle zur Gattung *Staphylococcus* gehörten. „Andere“ grampositive Bakterien konnten aus 11 Proben isoliert werden, wobei deren Anteil an der Mikrobiota in der Regel bei unter 5 % lag. Der prozentuale Anteil der Hefen und Enterobakterien (gramnegative, fakultativ anaerobe Bakterien) an der Mikrobiota der einzelnen Proben variierte zwischen 0 bis etwa 25 %. Fasst man die Mikrobiota der 20 Proben zu einer „Gesamtmikrobiota“ zusammen, dann besteht diese zu 55 % aus gramnegativen Bakterien, zu 41 % aus grampositiven Bakterien und zu 4 % aus Hefen. Die Anteile der einzelnen Großgruppen an der Gesamtmikrobiota sind in Tabelle 3-1 zu sehen

Tabelle 3-1: Anteil einzelner taxonomischer Großgruppen an der Gesamtmikrobiota der Rohmilchen. Hierfür wurden alle Isolate aller 20 Proben zusammengefasst.

Großgruppe	Anteil an der Gesamtmikrobiota
Gramnegative, obligat aerob	51,6 %
Milchsäurebakterien (MSB)	28,3 %
Grampositive, High GC	7,1 %
Grampositive, „Andere“	4,1 %
Hefen	4,3 %
Grampositive, aerobe Sporenbildner	1,4 %
Gramnegative, fakultativ anaerob	3,3 %
	100 %

In der Milchwirtschaft gilt die gängige These, dass höhere Gesamtkeimzahlen in Rohmilch auf einen höheren Anteil an gramnegativen Bakterien hindeuten. Aus diesem Grund wurde der Korrelationskoeffizient nach Spearman berechnet, um eine mögliche Korrelation zwischen dem Auftreten bestimmter taxonomischer Großgruppen und der Höhe der Gesamtkeimzahl zu ermitteln. Dabei wurde mit der zweiseitigen These gearbeitet, dass keine Korrelation besteht, somit deutet ein statistisch signifikantes Ergebnis ($p < 0,05$) auf eine Korrelation hin, jedoch ohne deren Richtung zu beschreiben. Ein rein optischer Vergleich der Abbildung 3-1 (15-C°-Daten) und Abbildung 3-4 zeigt in beiden Gruppen einerseits Proben mit sehr hoher Gesamtkeimzahl (H 4 = 6,3 log₁₀ KbE/ml; M 7 = 8,26 log₁₀ KbE/ml) und andererseits auch Proben mit sehr niedriger Gesamtkeimzahl (H 10 = 3,83 log₁₀ KbE/ml; M 8 = 5,00 log₁₀ KbE/ml), deren Mikrobiota sich auf Ebene taxonomischer Großgruppen deutlich unterscheidet. Die These, dass die Gesamtkeimzahlen mit dem Anteil an gramnegativen Bakterien korrelieren, konnte nicht bestätigt werden. Gleiches gilt für grampositive Bakterien allgemein sowie für alle einzelnen taxonomischen Großgruppen, mit

ERGEBNISSE

Ausnahme der „Anderen“ grampositive Bakterien, für die eine statistisch signifikante Korrelation mit der GKZ bei 15 °C besteht (siehe Tabelle 6-11). Um die beiden Probengruppen Hofmilchen und Molkereitankmilchen auch untereinander statistisch in Hinblick auf den Anteil taxonomischer Großgruppen zu vergleichen, wurden die Datenreihen zuerst auf Normalverteilung untersucht (siehe Tabelle 6-12). Im Anschluss daran wurden sowohl *t*-Test (siehe Tabelle 6-13) als auch Mann-Whitney-U-Test angewandt (siehe Tabelle 6-14). Dadurch konnte bestätigt werden, dass in den Molkereitankmilchen ein statistisch signifikant höherer Anteil an MSB vorliegt ($U = 17, p = 0,006$). Des Weiteren konnte ein statistisch signifikant niedrigerer Anteil an „Anderen“ grampositive Bakterien in den Molkereitankmilchen ermittelt werden ($U = 23, p = 0,019$). Für alle anderen taxonomischen Großgruppen konnte kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den beiden Probenkategorien Hofmilch und Molkereitankmilch festgestellt werden. Die Kategorie der grampositiven, aeroben Sporenbildner wurde hierbei jedoch nicht berücksichtigt; alle Isolate wurden aus einer einzigen Hofmilchen isoliert und konnten alle der Art *Bacillus cereus* sensu lato zugeordnet werden. Entscheidend für die Beurteilung der in den Proben vorliegenden Biodiversität ist jedoch die Verteilung der Isolate auf die jeweiligen zugehörigen Gattungen und Arten. Eine erste Übersicht ist in Abbildung 3-5 zu sehen.

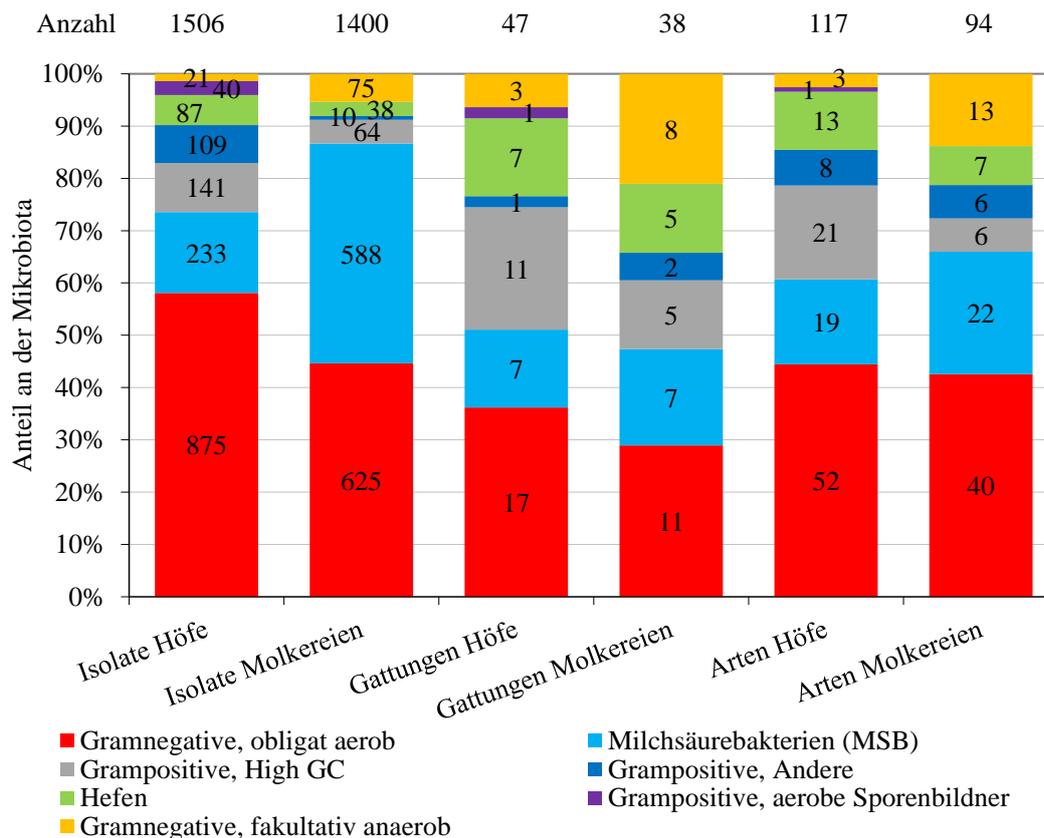


Abbildung 3-5: Biodiversitätsvergleich der zusammengefassten Hof- und Molkereitankmilchen auf Ebene der Isolate, Gattungen und Arten in taxonomischen Großgruppen. Angegeben ist der Anteil der taxonomischen Großgruppen in Prozent; die Anzahl der Isolate, Gattungen und Arten ist über der jeweiligen Kategorie angegeben.

Die insgesamt 2906 Isolate aus den 20 Rohmilchen wurden mittels hierarchischer Cluster-Analyse der FTIR-Spektren auf 966 repräsentative Isolate reduziert. Alle repräsentativen Isolate wurden anschließend mittels spezifischer Markergene identifiziert und das Identifizierungsergebnis auf das ursprüngliche Cluster extrapoliert. Beim Vergleich der zusammengefassten Hof- und Molkereitankmilchen fällt neben den bereits genannten höheren Anteil an MSB in den Molkereitankmilchen auf, dass diese rein zahlenmäßig insgesamt eine niedrigere Biodiversität auf Gattungs- und Artebene aufwiesen. Bei genauerer Betrachtung zeigte sich jedoch, dass die Mikrobiota der Hofmilchen zwar eine höhere Biodiversität der grampositiven High GCs aufwies, andererseits aber die Mikrobiota der Molkereitankmilchen eine höhere Diversität der gramnegativen, fakultativ anaeroben Bakterien auf Gattungs- und Artebene zeigte. Ein statistisch signifikanter Unterschied in der normalverteilten (siehe Tabelle 6-15) Anzahl der Gattungen und Arten, die pro Probe isoliert wurden, konnte nicht ermittelt werden (siehe Tabelle 6-16). Aus den Hofmilchen konnten 117 Arten aus 47 Gattungen isoliert werden, aus den Molkereitankmilchen 94 Arten aus 38 Gattungen.

Biodiversitäts-Analyse der untersuchten Rohmilchen auf Gattungs- und Artebene

Die 2906 Isolate aus den Rohmilchen konnten über ihre repräsentativen Vertreter 169 Arten aus 62 Gattungen zugeordnet werden. Die Mikrobiota der Hof- und Molkereitankmilchen zeigte jedoch nicht nur Unterschiede in der Biodiversität, sondern auch einige Gemeinsamkeiten, wie aus der nachfolgenden Abbildung 3-6 hervorgeht.

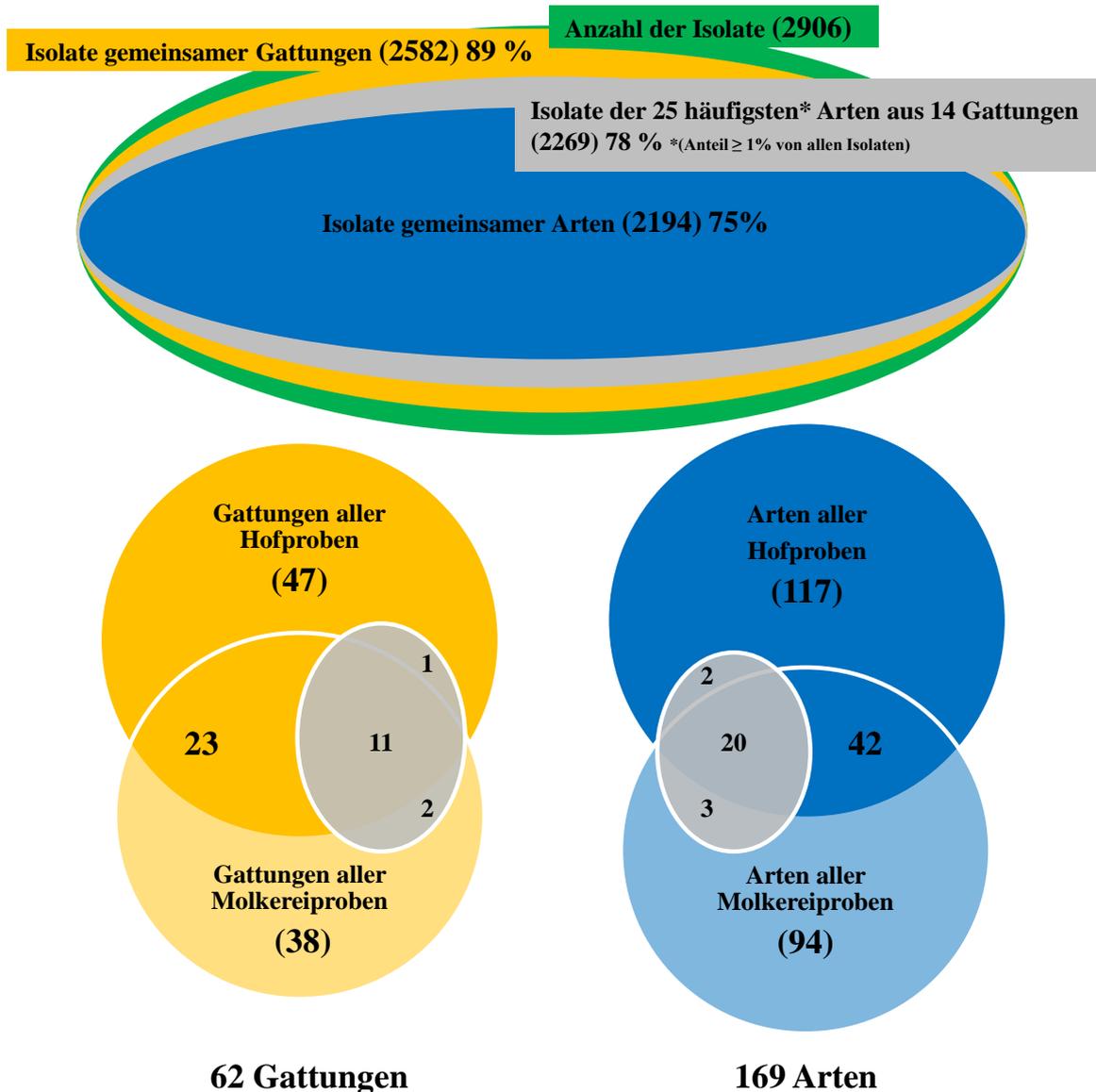


Abbildung 3-6: Vergleich der mikrobiellen Biodiversität der Hof- und Molkereitankmilchen in Hinblick auf gemeinsame Gattungen und Arten. Im oberen Teil der Abbildung: in Grün, Gesamtanzahl der Isolate; in Orange: Isolate gemeinsamer Gattungen; in Grau, Isolate der 25 häufigsten Arten aus 14 Gattungen mit einem Anteil von $> 1\%$ an der Gesamtmikrobiota und in Blau, Isolate gemeinsamer Arten. Im unteren Teil der Abbildung: in Orange, Anzahl der Gattungen in Hof- und Molkereiprobe sowie Anzahl der gemeinsamen Gattungen (Schnittmenge); in Blau, Anzahl der Arten in Hof- und Molkereiprobe sowie Anzahl der gemeinsamen Arten (Schnittmenge); jeweils in Grau, Anzahl der 25 häufigsten Arten aus 14 Gattungen mit Zuordnung zu Hof- und Molkereiprobe sowie Anzahl der jeweiligen gemeinsamen (Schnittmenge) Gattungen und Arten.

Mehr als ein Drittel der 62 Gattungen konnte sowohl aus mindestens einer Hofmilch als auch aus mindestens einer Molkereitankmilch isoliert werden. Diese 23 Gattungen stellen 89 % (2582) aller Isolate. Bei Betrachtung der Schnittmenge der Mikrobiota der Hof- und Molkereiprobe auf Artebene ließen sich 42 Arten finden, die jeweils aus mindestens einer Probe beider Kategorien isoliert werden konnten. Diesen etwa 25 % aller aus den Rohmilchen isolierten Arten konnten 75 % (2194) aller Isolate zugeordnet werden. Unter Berücksichtigung aller Gattungen und Arten beider Probenursprünge traten 15 Gattungen und

ERGEBNISSE

25 Arten in den Vordergrund, die jede für sich in ihrer relativen Häufigkeit einen Anteil von $\geq 1\%$ aller Isolate stellten. Diese so definierten 25 Arten gehörten zu 14 der 15 häufigsten Gattungen und entsprachen einem Anteil von 78 % (2269) aller Isolate.

Der prozentuale Anteil (relative Häufigkeit) der 15 häufigsten Gattungen an der Gesamt-Rohmilch-Mikrobiota ist in Abbildung 3-7 dargestellt, die prozentualen Anteile (relative Häufigkeit) der 25 häufigsten Arten sind der Abbildung 3-8 zu entnehmen. Alle Gattungen bzw. Arten mit einem Anteil von weniger als einem Prozent an der Gesamt-Rohmilch-Mikrobiota wurden in der jeweiligen Abbildung zusammengefasst, sind jedoch namentlich in Tabelle 3-2 (47 Gattungen), Tabelle 3-3 (Arten 1–72) und Tabelle 3-4 (Arten 73–144) aufgelistet.

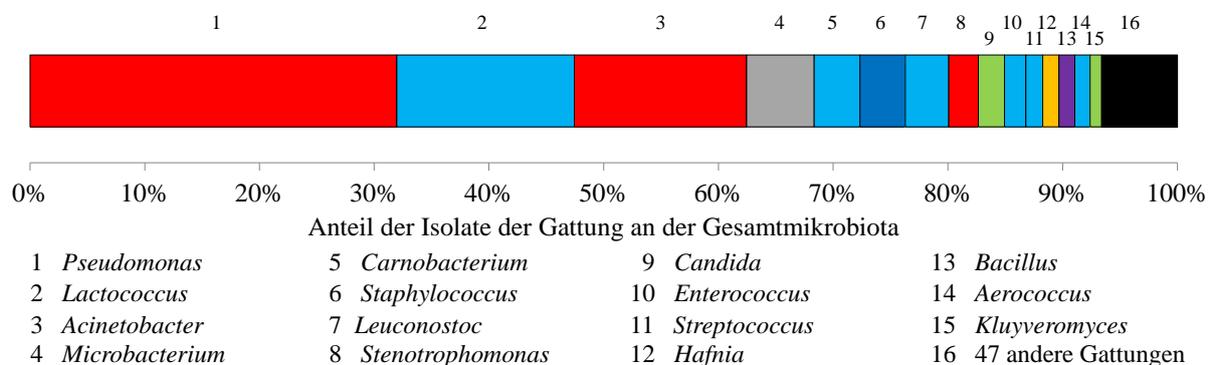


Abbildung 3-7: Prozentualer Anteil der 15 häufigsten Gattungen an der Gesamt-Rohmilch-Mikrobiota. Die farbliche Codierung bezieht sich auf den Farbcode der taxonomischen Großgruppen: fakultativ anaerobe, gramnegative Bakterien (orange); obligat aerobe, gramnegative Bakterien (rot); grampositive Bakterien, High GC (grau); grampositive, aerobe Sporenbildner (violett); „Andere“ grampositive Bakterien (blau); Milchsäurebakterien (türkis) und Hefen (grün).

Die Isolate der 15 häufigsten Gattungen entsprachen einem Anteil von 93 % von der Gesamt-Rohmilch-Mikrobiota und somit stellten die restlichen 47 Gattungen lediglich 7 % aller Isolate. Außerdem fällt auf, dass die drei Gattungen *Pseudomonas*, *Lactococcus* und *Acinetobacter* mit 63 % den mit Abstand größten Teil der Isolate stellten. Zudem konnten sie aus nahezu allen Rohmilchproben isoliert werden (aus 19, 19 bzw. 16 Proben). Zu erwähnen ist auch, dass etwas mehr als 30 % der Isolate allein der Gattung *Pseudomonas* zugeordnet werden konnten. In der Häufigkeit an vierter Stelle stand die Gattung *Microbacterium* mit einem Anteil von rund 6 %, gefolgt von den Gattungen *Carnobacterium*, *Staphylococcus* und *Leuconostoc* mit jeweils etwa 4 %. Die Anteile der Isolate, die den Gattungen *Stenotrophomonas*, *Candida*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Hafnia*, *Bacillus*, *Aerococcus* und *Kluyveromyces* zugeordnet werden konnten, lagen zwischen rund 3–1 %. Hervorzuheben ist jedoch ebenfalls, dass sich unter den 15 häufigsten Gattungen sechs Milchsäurebakterien-Gattungen sowie zwei Hefe-Gattungen befanden. Des Weiteren konnte eine potentielle neue Gattung (Gen. nov. sp. nov.(1)) [Gen. nov. = *lat.*: *genus novum*; sp. nov. = *lat.*: *species nova*] isoliert werden. Auf diese sowie auf die in Abbildung 3-8 und den Tabellen 3-3 und 3-4

ERGEBNISSE

aufgeführten potentiellen neuen Arten wird unter dem Punkt „Potentielle neue Gattungen und Arten aus Rohmilchen und Milchhalbfabrikaten“ gesondert eingegangen.

Tabelle 3-2: Auflistung der in Abbildung 3-8 zusammengefassten anderen Gattungen (47). Deren Anteil an der Gesamt-Rohmilch-Mikrobiota lag jeweils unter einem Prozent. Die Gattungen sind nach Großgruppen sortiert. Die farbliche Codierung bezieht sich auf den Farbcode der taxonomischen Großgruppen: fakultativ anaerobe, gramnegative Bakterien (orange); obligat aerobe, gramnegative Bakterien (rot); grampositive Bakterien, High GC (grau); „Andere“ grampositive Bakterien (blau); Milchsäurebakterien (türkis) und Hefen (grün).

1	<i>Enterobacter</i>	13	<i>Chryseobacterium</i>	25	<i>Rhizobium</i>	37	<i>Renibacterium</i>
2	<i>Citrobacter</i>	14	<i>Comamonas</i>	26	<i>Sphingobacterium</i>	38	<i>Rhodococcus</i>
3	<i>Escherichia</i>	15	<i>Delftia</i>	27	<i>Sphingobium</i>	39	<i>Macrococcus</i>
4	<i>Klebsiella</i>	16	<i>Devosia</i>	28	<i>Arthrobacter</i>	40	<i>Lactobacillus</i>
5	<i>Kluyvera</i>	17	<i>Diaphorobacter</i>	29	<i>Corynebacterium</i>	41	<i>Weissella</i>
6	<i>Obesumbacterium</i>	18	<i>Empedobacter</i>	30	<i>Curtobacterium</i>	42	<i>Filobasidium</i>
7	<i>Raoultella</i>	19	Gen. nov. sp. nov. (1)	31	<i>Exiguobacterium</i>	43	<i>Saprochaete</i>
8	<i>Serratia</i>	20	<i>Janthinobacterium</i>	32	<i>Frigoribacterium</i>	44	<i>Holtermanniella</i>
9	<i>Yersinia</i>	21	<i>Leucobacter</i>	33	<i>Kurthia</i>	45	<i>Pichia</i>
10	<i>Acetobacter</i>	22	<i>Luteibacter</i>	34	<i>Micrococcus</i>	46	<i>Rhodotorula</i>
11	<i>Acidovorax</i>	23	<i>Moraxella</i>	35	<i>Plantibacter</i>	47	<i>Trichosporon</i>
12	<i>Brevundimonas</i>	24	<i>Ochrobactrum</i>	36	<i>Pseudoclavibacter</i>		

Ein ähnliches Verteilungsmuster wie auf Gattungsebene zeigte sich bei der Analyse der Biodiversität auf Artebene (siehe Abbildung 3-8).

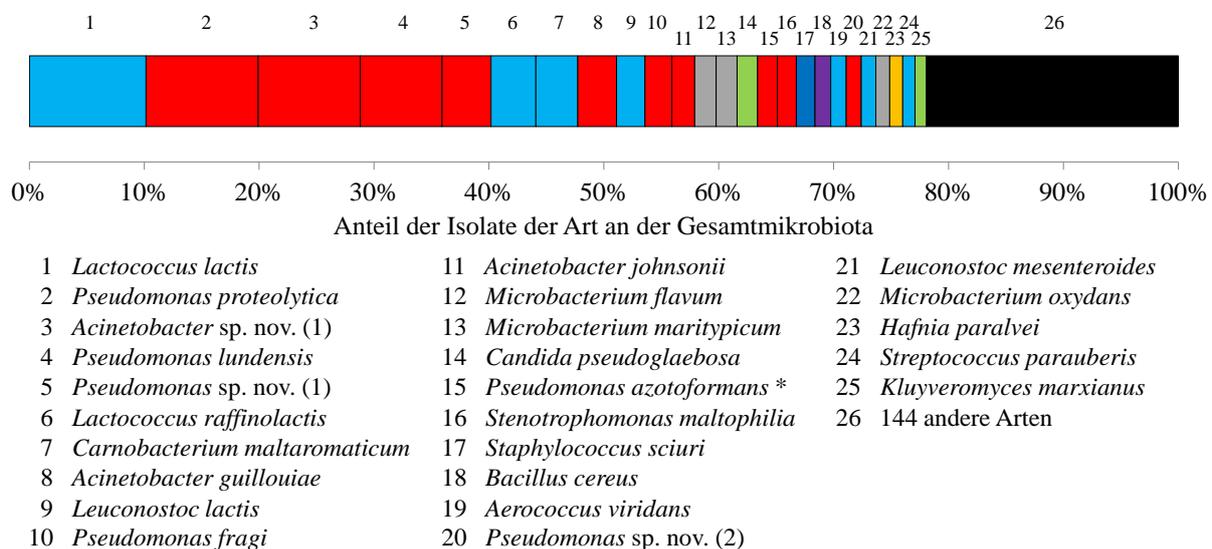


Abbildung 3-8: Prozentualer Anteil der 25 häufigsten Arten an der Gesamt-Rohmilch-Mikrobiota. Die farbliche Codierung bezieht sich auf den Farbcode der taxonomischen Großgruppen. Die farbliche Codierung bezieht sich auf den Farbcode der taxonomischen Großgruppen: fakultativ anaerobe, gramnegative Bakterien (orange); obligat aerobe, gramnegative Bakterien (rot); grampositive Bakterien, High GC (grau); grampositive, aerobe Sporenbildner (violett); „Andere“ grampositive Bakterien (blau); Milchsäurebakterien (türkis) und Hefen (grün). * Alle Isolate dieser *Pseudomonas*-Art konnten nur mittels des 16S-rRNA-Gens identifiziert werden und sind eventuell verschiedenen Arten zuzuordnen.

Die Gesamt-Rohmilch-Mikrobiota bestehend aus 169 Arten wurden von 25 Arten dominiert. Diese repräsentierten etwa 78 % aller Isolate, somit wurden im Umkehrschluss die

ERGEBNISSE

restlichen 144 Arten von lediglich 22 % der Isolate repräsentiert. Die drei häufigsten Arten waren *Lactococcus lactis*, *Pseudomonas proteolytica* sowie die potentiell neue Art *Acinetobacter* sp. nov. (1). Diese drei Arten stellten etwa 30 % aller Isolate, wobei nur die beiden erstgenannten aus über der Hälfte der Proben isoliert werden konnten (siehe Abbildung 3-9). Insgesamt befanden sich neben verschiedenen anderen Arten sechs *Pseudomonas*-, drei *Acinetobacter*- und zwei *Lactococcus*-Arten unter den 25 häufigsten Arten. Zu diesen 11 Arten wurden über die Hälfte aller Isolate gezählt. Für viele Gattungen konnte unter den Isolaten zudem eine hohe Diversität auf Artebene festgestellt werden, darunter zahlreiche potentiell neue Arten. Die Gattung *Pseudomonas* wurde durch 33 Arten repräsentiert, die Gattungen *Acinetobacter* und *Staphylococcus* durch jeweils zehn Arten, die Gattung *Enterococcus* durch neun Arten und die Gattungen *Lactococcus* und *Microbacterium* durch jeweils sieben Arten (siehe Abbildung 3-8 und Tabelle 3-4).

Tabelle 3-3: Auflistung der in Abbildung 3-9 zusammengefassten anderen Arten (1–72). Deren Anteil an der Gesamt-Rohmilch-Mikrobiota lag jeweils unter einem Prozent. Die Gattungen sind nach Großgruppen sortiert. Die farbliche Codierung bezieht sich auf den Farbcode der taxonomischen Großgruppen: fakultativ anaerobe, gramnegative Bakterien (orange); obligat aerobe, gramnegative Bakterien (rot). * Alle Isolate dieser *Pseudomonas*-Art wurden nur mittels des 16S-rRNA-Gens identifiziert und sind eventuell verschiedenen Arten zuzuordnen. † Isolate der Art *Ochrobactrum anthropi* können anhand der 16S-rRNA-Gensequenz nicht von den Arten *Ochrobactrum cytisi* und *Ochrobactrum lupini* unterschieden werden.

1	<i>Citrobacter murlinae</i>	19	<i>Acinetobacter bohemicus</i>	37	<i>Janthinobacterium lividum</i>	55	<i>Pseudomonas</i> sp. nov. (4)
2	<i>Enterobacter amnigenus</i>	20	<i>Acinetobacter parvus</i>	38	<i>Leucobacter komagatae</i>	56	<i>Pseudomonas</i> sp. nov. (5)
3	<i>Enterobacter cowanii</i>	21	<i>Acinetobacter pittii</i>	39	<i>Luteibacter anthropi</i>	57	<i>Pseudomonas</i> sp. nov. (6)
4	<i>Enterobacter kobei</i>	22	<i>Acinetobacter variabilis</i>	40	<i>Moraxella osloensis</i>	58	<i>Pseudomonas</i> sp. nov. (7)
5	<i>Escherichia coli</i>	23	<i>Acinetobacter</i> sp. nov. (2)	41	<i>Ochrobactrum anthropi</i> *	59	<i>Pseudomonas</i> sp. nov. (8)
6	<i>Hafnia alvei</i>	24	<i>Brevundimonas bullata</i>	42	<i>Ochrobactrum pecoris</i>	60	<i>Pseudomonas</i> sp. nov. (10)
7	<i>Klebsiella oxytoca</i>	25	<i>Brevundimonas nasdae</i>	43	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	61	<i>Pseudomonas</i> sp. nov. (11)
8	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	26	<i>Chryseobacterium ginsenosidimutans</i>	44	<i>Pseudomonas brenneri</i>	62	<i>Pseudomonas</i> sp. nov. (12)
9	<i>Kluyvera intermedia</i>	27	<i>Chryseobacterium jejuense</i>	45	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	63	<i>Pseudomonas</i> sp. nov. (13)
10	<i>Obesumbacterium proteus</i>	28	<i>Chryseobacterium oncorhynchi</i>	46	<i>Pseudomonas geniculata</i> *	64	<i>Pseudomonas</i> sp. nov. (16)
11	<i>Raoultella planticola</i>	29	<i>Chryseobacterium piscium</i>	47	<i>Pseudomonas gessardii</i>	65	<i>Pseudomonas</i> sp. nov. (17)
12	<i>Raoultella terrigena</i>	30	<i>Chryseobacterium scopthalmum</i>	48	<i>Pseudomonas lurida</i>	66	<i>Pseudomonas</i> sp. nov. (18)
13	<i>Serratia marcescens</i>	31	<i>Comamonas koreensis</i>	49	<i>Pseudomonas meridiana</i>	67	<i>Pseudomonas</i> sp. nov. (23)
14	<i>Yersinia massiliensis</i>	32	<i>Delftia lacustris</i>	50	<i>Pseudomonas mucidolens</i>	68	<i>Pseudomonas</i> sp. nov. (25)
15	<i>Acetobacter cibirongensis</i>	33	<i>Devosia submarina</i>	51	<i>Pseudomonas panacis</i>	69	<i>Pseudomonas</i> sp. nov. (26)
16	<i>Acidovorax temperans</i>	34	<i>Diaphorobacter</i> sp. nov. (1)	52	<i>Pseudomonas protegens</i>	70	<i>Rhizobium herbae</i>
17	<i>Acinetobacter baumannii</i>	35	<i>Empedobacter brevis</i>	53	<i>Pseudomonas rhodesiae</i>	71	<i>Rhizobium radiobacter</i>
18	<i>Acinetobacter bereziniae</i>	36	Gen.nov.sp. nov. (1)	54	<i>Pseudomonas</i> sp. nov. (3)	72	<i>Sphingobacterium multivorum</i>

ERGEBNISSE

Tabelle 3-4: Auflistung der in Abbildung 3-9 zusammengefassten anderen Arten (73–144). Deren Anteil an der Gesamt-Rohmilch-Mikrobiota lag jeweils unter einem Prozent. Die Gattungen sind nach Großgruppen sortiert. Die farbliche Codierung bezieht sich auf den Farbcode der taxonomischen Großgruppen: obligat aerobe, gramnegative Bakterien (rot); grampositive Bakterien, High GC (grau); „Andere“ grampositive Bakterien (blau); Milchsäurebakterien (türkis) und Hefen (grün).

73	<i>Sphingobacterium siyangense</i>	91	<i>Micrococcus luteus</i>	109	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	127	<i>Streptococcus uberis</i>
74	<i>Sphingobacterium spiritivorum</i>	92	<i>Plantibacter flavus</i>	110	<i>Enterococcus devriesei</i>	128	<i>Weissella confusa</i>
75	<i>Sphingobium lactosutens</i>	93	<i>Pseudoclavibacter helvolus</i>	111	<i>Enterococcus durans</i>	129	<i>Weissella paramesenteroides</i>
76	<i>Stenotrophomonas chelatiphaga</i>	94	<i>Renibacterium salmoninarum</i>	112	<i>Enterococcus faecalis</i>	130	<i>Weissella viridescens</i>
77	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>	95	<i>Rhodococcus fascians</i>	113	<i>Enterococcus faecium</i>	131	<i>Candida deformans</i>
78	<i>Arthrobacter arilaitensis</i>	96	<i>Rhodococcus qingshengii</i>	114	<i>Enterococcus italicus</i>	132	<i>Candida inconspicua</i>
79	<i>Arthrobacter</i> sp. nov. (1)	97	<i>Macrococcus caseolyticus</i>	115	<i>Enterococcus malodoratus</i>	133	<i>Candida parapsilosis</i>
80	<i>Arthrobacter</i> sp. nov. (2)	98	<i>Staphylococcus arlettae</i>	116	<i>Enterococcus saccharolyticus</i>	134	<i>Candida zeylanoides</i>
81	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	99	<i>Staphylococcus aureus</i>	117	<i>Lactobacillus gasseri</i>	135	<i>Filobasidium globisporum</i>
82	<i>Corynebacterium stationis</i>	100	<i>Staphylococcus cohnii</i>	118	<i>Lactobacillus oligofermentans</i>	136	<i>Saprochaete clavata</i>
83	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>	101	<i>Staphylococcus equorum</i>	119	<i>Lactococcus chungangensis</i>	137	<i>Holtermanniella takashimae</i>
84	<i>Exiguobacterium profundum</i>	102	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	120	<i>Lactococcus garvieae</i>	138	<i>Pichia cactophila</i>
85	<i>Frigoribacterium faeni</i>	103	<i>Staphylococcus hominis</i>	121	<i>Lactococcus piscium</i>	139	<i>Pichia fermentans</i>
86	<i>Kurthia gibsonii</i>	104	<i>Staphylococcus succinus</i>	122	<i>Lactococcus plantarum</i>	140	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>
87	<i>Microbacterium dextranolyticum</i>	105	<i>Staphylococcus vitulinus</i>	123	<i>Lactococcus</i> sp. nov. (1)	141	<i>Trichosporon domesticum</i>
88	<i>Microbacterium hominis</i>	106	<i>Staphylococcus xylosus</i>	124	<i>Leuconostoc citreum</i>	142	<i>Trichosporon dulticum</i>
89	<i>Microbacterium lacticum</i>	107	<i>Carnobacterium divergens</i>	125	<i>Streptococcus australis</i>	143	<i>Trichosporon oleaginosus</i>
90	<i>Microbacterium testaceum</i>	108	<i>Enterococcus aquimarinus</i>	126	<i>Streptococcus parasanguinis</i>	144	<i>Trichosporon scarabaeorum</i>

Insgesamt konnten 88 Arten gramnegativer Bakterien, 65 Arten grampositiver Bakterien sowie 16 verschiedene Arten von Hefen isoliert werden. Die genaue Anzahl der Gattungen und Arten der jeweiligen taxonomischen Großgruppe ist Tabelle 3-5 zu entnehmen.

Tabelle 3-5: Anzahl der Gattungen und Arten aus den einzelnen taxonomischen Großgruppen.

Großgruppe	Gattungen (62)	Arten (169)
Gramnegative, obligat aerobe	21	73
Milchsäurebakterien (MSB)	8	31
Grampositive, High GC	12	22
Hefen	8	16
Gramnegative, fakultativ anaerobe	10	15
Grampositive, „Andere“	2	11
Grampositive, aerobe Sporenbildner	1	1

ERGEBNISSE

Neben der Betrachtung der relativen Häufigkeit der einzelnen Arten ist jedoch auch deren jeweiliger prozentualer Anteil in den einzelnen Proben von Interesse. Dieser ist in der folgenden Abbildung 3-9 für 19 Arten dargestellt, die unabhängig von ihrer relativen Häufigkeit aus mindestens 5 Proben isoliert werden konnten.

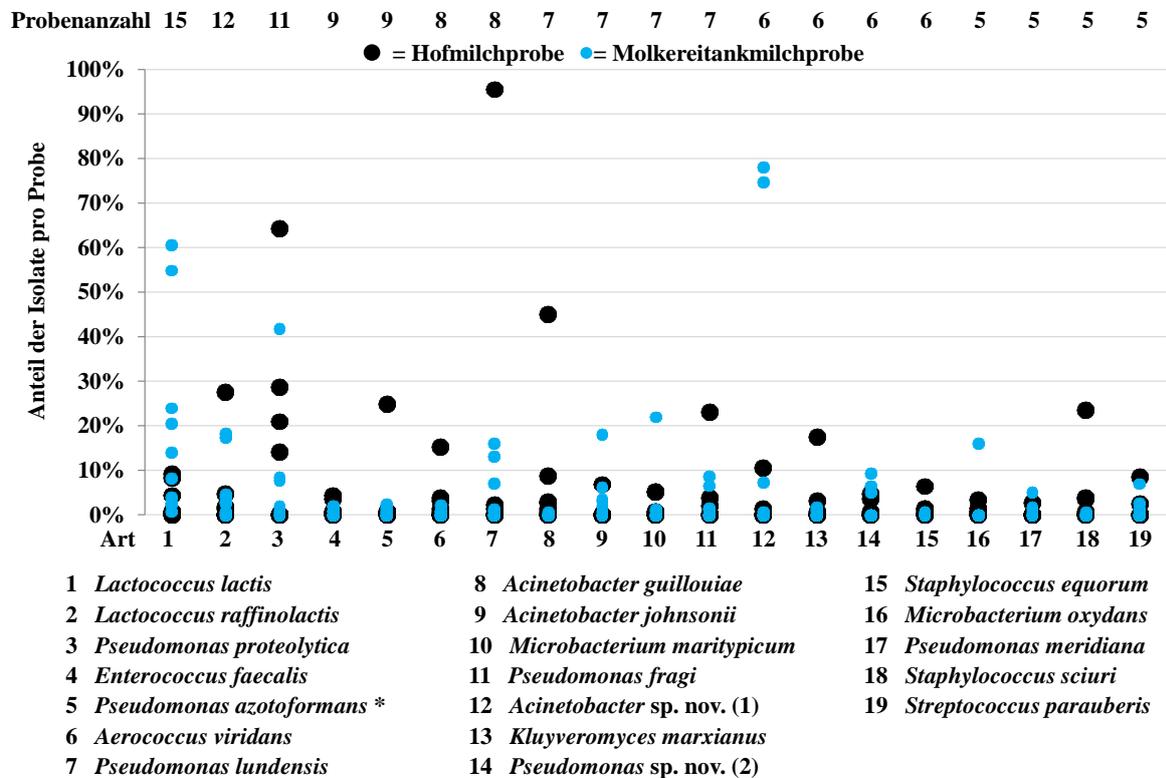


Abbildung 3-9: Prozentualer Anteil von 19 Arten, die aus mindesten 5 Proben isoliert werden konnten. Hofmilchen = schwarze Kreise; Molkereitankmilchen = türkise Kreise. Jeder Kreis steht für eine Probe. Die Anzahl der Proben, aus denen die jeweilige Art isoliert wurde, ist über der Abbildung angegeben.

Die Arten *Lactococcus lactis* und *Lactococcus raffinolactis* konnten aus der größten Anzahl von Proben isoliert werden (aus 15 bzw. 12 der 20 Proben). Die in Abbildung 3-8 genannte zweithäufigste Art *Pseudomonas proteolytica* konnte aus 11 Proben isoliert werden. Die dritthäufigste Art *Acinetobacter* sp. nov. (1) hingegen konnte lediglich aus sechs Proben isoliert werden, stellte jedoch in zwei Proben etwa 70 % der Isolate. Ganz generell geht aus Abbildung 3-9 hervor, dass der Anteil der einzelnen Arten pro Probe stark variierte und dabei meist unter 30 % lag. Teilweise konnte aber eine deutliche Dominanz einzelner Arten in den untersuchten Proben festgestellt werden. Beispielweise konnte die Art *Pseudomonas lundensis* aus sieben Proben isoliert werden, wobei ihr Anteil in sechs der Proben unter 20 % lag. Demgegenüber steht eine Probe, deren Mikrobiota zu 95 % aus dieser Art bestand. Andererseits konnten auch die Arten *Enterococcus faecalis* und *Kluyveromyces marxianus* aus relativ vielen Proben isoliert werden (aus 12 bzw. 6 Proben), wobei der Anteil ihrer Isolate pro Probe generell sehr niedrig war.

Biodiversitäts-Analyse der untersuchten Milchhalbfabrikate auf Basis taxonomischer Großgruppen

Die nachfolgende Abbildung 3-10 zeigt die mikrobielle Biodiversität der 20 untersuchten Milchhalbfabrikate anhand des prozentualen Anteils einzelner taxonomischer Großgruppen. Analog zu den Rohmilchen wurde zwischen den Gruppen fakultativ anaerobe, gramnegative Bakterien (orange), obligat aerobe, gramnegative Bakterien (rot), grampositive Bakterien, High GC (grau), grampositive, aerob sporenbildende Bakterien (violett), „Andere“ grampositive Bakterien (blau), Milchsäurebakterien (türkis) und Hefen (grün) unterschieden.

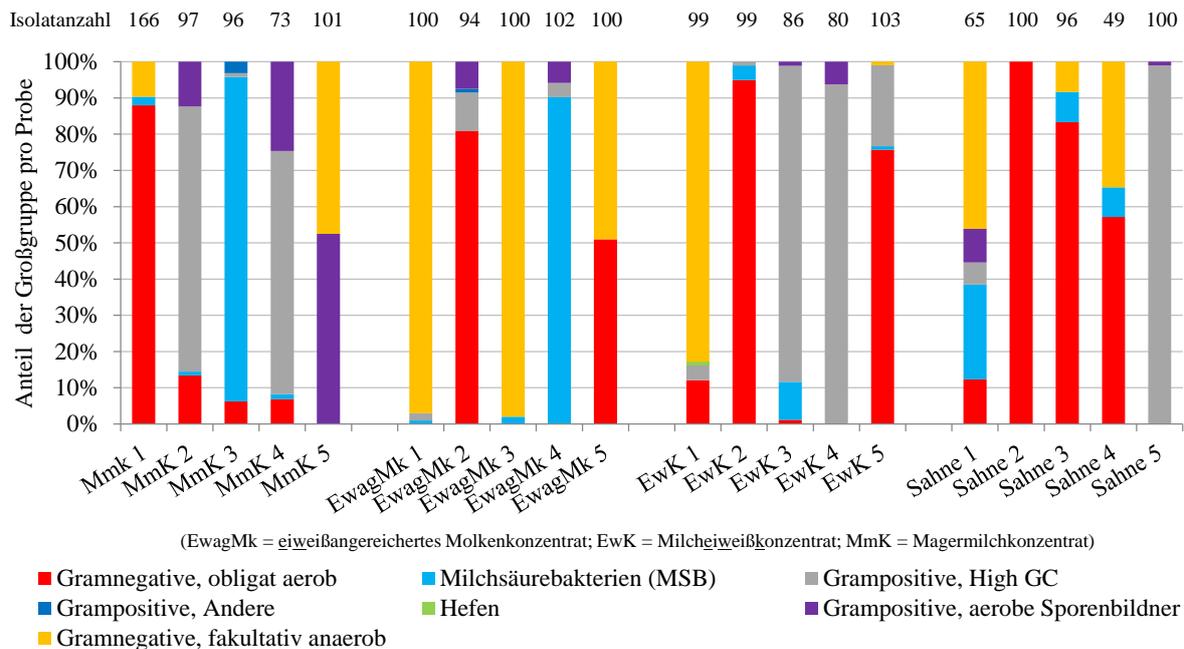


Abbildung 3-10: Zusammensetzung der mikrobiellen Biodiversität einzelner Milchhalbfabrikate in taxonomischen Großgruppen. Angegeben ist der Anteil der taxonomischen Großgruppen an der Mikrobiota in Prozent, die absolute Isolatanzahl ist über der jeweiligen Probe angegeben.

Die Mikrobiota der einzelnen Proben zeigte im direkten Vergleich eine sehr diverse Zusammensetzung. Bei genauerer Betrachtung ließ sich jedoch ein gewisser Trend zu einem hohen Anteil an gramnegativen Bakterien und grampositiven High GCs erkennen. In 12 Proben konnte eine deutliche Dominanz (Anteil > 60 %) gramnegativer Bakterien ermittelt werden. In sieben (EwagMk 2, EwK 2, EwK 5, MmK 1 und Sahne 2–4) Proben überwogen die gramnegativen, obligat aeroben Bakterien, in vier Proben (EwagMk 1, EwagMk 3, EwK 1 und Sahne 1) die gramnegativen, fakultativ anaeroben Bakterien und in einer Probe (EwagMk 5) bestand die Mikrobiota zu jeweils etwa 50 % aus den beiden zuvor genannten Großgruppen. Zu ebenfalls jeweils etwa 50 % bestand die Mikrobiota der Probe MmK 5 aus gramnegativen, fakultativ anaeroben Bakterien und grampositiven, aeroben Sporenbildnern. Etwa 50 % gramnegative, fakultativ anaerobe Bakterien konnten auch für die Probe Sahne 1 ermittelt werden. Grampositive High GCs waren hingegen die vorherrschende Gruppe (Anteil > 70 %) in der Mikrobiota fünf weiterer Proben (EwK 3, EwK 4, MmK 2, MmK 4 und Sahne 5).

ERGEBNISSE

Zur besseren Übersicht wurde die Mikrobiota der Milchhalbfabrikate sowohl nach Halbfabrikat-Typ als auch insgesamt zusammengefasst und in Abbildung 3-11 der Mikrobiota der Rohmilchen gegenübergestellt.

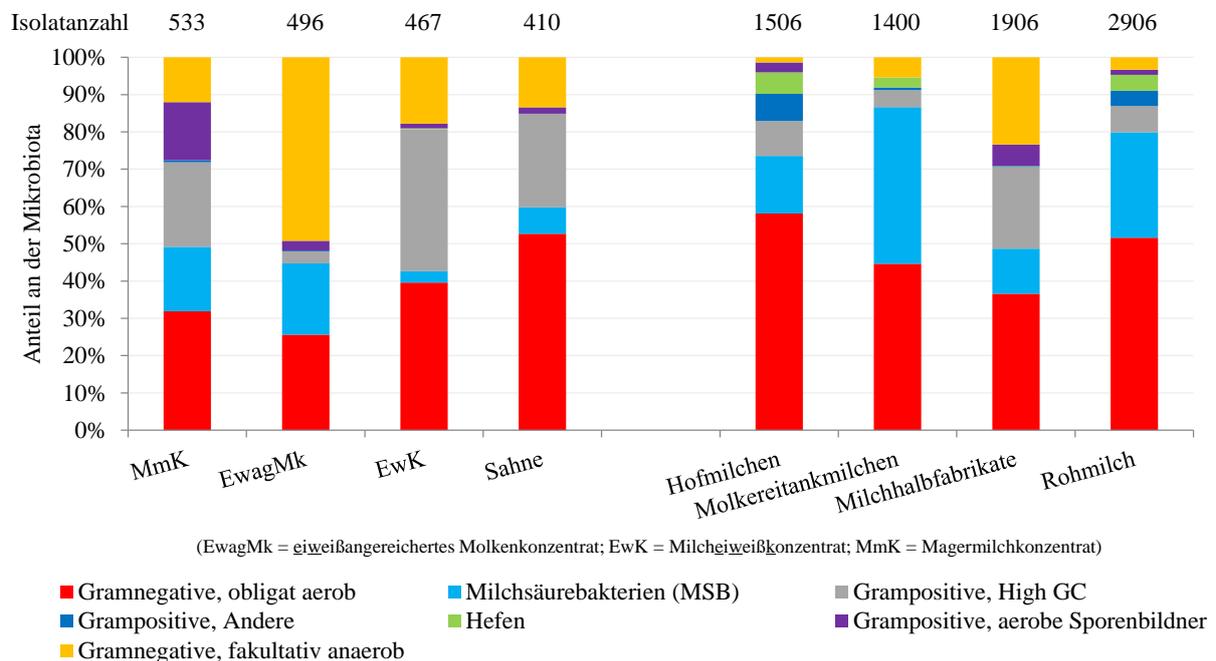


Abbildung 3-11: Biodiversitätsvergleich der zusammengefassten Milchhalbfabrikatgruppen, Hofmilchen und Molkereitankmilchen sowie der Milchhalbfabrikate und Rohmilchen insgesamt auf Ebene der Isolate in taxonomischen Großgruppen. Angegeben ist der Anteil der taxonomischen Großgruppen an der Mikrobiota in Prozent, die absolute Isolatanzahl ist über der jeweiligen Probe angegeben.

Insgesamt konnten 1906 Isolate aus den Milchhalbfabrikaten isoliert werden, davon stammten 496 Isolate aus den eiweißangereicherten Molkenkonzentraten (EwagMk), 467 Isolate aus den Milcheiweißkonzentraten (EwK), 533 Isolate aus den Magermilchkonzentraten (MmK) und 410 Isolate aus den Sahneprouben (Sahne). Der hohe Anteil an gramnegativen, fakultativ anaeroben Bakterien sowie ein ebenfalls hoher Anteil an grampositiven High GCs in den Milchhalbfabrikaten zeigt sich in Abbildung 3-11 besonders deutlich im Vergleich zur Mikrobiota der Rohmilchen. Ausgehend von den Hofmilchen über die Molkereitankmilchen bis hin zu den Milchhalbfabrikaten sinkt der Anteil an gramnegativen, obligat aeroben Bakterien, wohingegen der Anteil gramnegativer, fakultativ anaerober Bakterien von unter 5 % auf über 20 % steigt. Ebenfalls auf etwa 20 % gestiegen ist der Anteil der grampositiven High GCs. Im Vergleich zu den Rohmilchen zeigte sich in den Milchhalbfabrikaten ein deutlich niedrigerer Milchsäurebakterien-Anteil. Im Gegensatz dazu nahm der Anteil der grampositiven, aeroben Sporenbildner zu, jedoch in einem geringeren Umfang. Für die statistische Überprüfung der Vermutung, dass die Milchhalbfabrikate im Vergleich zu den Rohmilchen einen statistisch signifikant höheren Anteil (relative Häufigkeit) an gramnegativen, fakultativ anaeroben Bakterien, grampositiven High GCs und aeroben Sporenbildnern aufweisen, wurde der Mann-Whitney-U-Test (siehe Tabelle 6-18) angewandt, da die Verteilung der mikrobiellen Isolate auf die taxonomischen Großgruppen sowohl in den

einzelnen Rohmilchen als auch in den einzelnen Milchhalbfabrikaten keiner Normalverteilung folgten ($p < 0,05$ Tabelle 6-17). Gleichzeitig wurde überprüft, ob die Isolate der Milchsäurebakterien und gramnegativen, obligat aeroben Bakterien in den einzelnen Milchhalbfabrikaten im Vergleich zu den einzelnen Rohmilchen einen statistisch signifikant niedrigeren Anteil (relative Häufigkeit) ausmachen. Hefen und „Andere“ grampositive Bakterien wurden aufgrund der geringen Isolatanzahl bei der statistischen Berechnung außen vor gelassen. Ein statistisch signifikanter niedriger Anteil an Milchsäurebakterien ($U = 55,5, p = 0,000$) und gramnegativen, obligat aeroben Bakterien ($U = 88, p = 0,001$) sowie ein statistisch signifikant höherer Anteil an grampositiven, aeroben Sporenbildnern ($U = 123,5, p = 0,004$) in den Milchhalbfabrikaten konnte bestätigt werden (siehe Tabelle 6-18). Für die relative Häufigkeit der Isolate aller anderen taxonomischen Großgruppen konnte kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den beiden Probenkategorien „Rohmilch“ und „Milchhalbfabrikat“ festgestellt werden.

Biodiversitäts-Analyse der untersuchten Milchhalbfabrikate auf Gattungsebene

Die 1906 Isolate der 20 Milchhalbfabrikate wurden analog zum Vorgehen bei den Rohmilchen mittels hierarchischer Cluster-Analyse der FTIR-Spektren auf insgesamt 379 repräsentative Isolate reduziert. Die Identifizierung der repräsentativen Isolate erfolgte größtenteils mittels FTIR-Spektroskopie und das Identifizierungsergebnis wurde auf das ursprüngliche HCA-Cluster extrapoliert. Insgesamt konnten die Isolate aus den Milchhalbfabrikaten 49 Gattungen zugeordnet werden. Von diesen 49 Gattungen stellten 16 Gattungen rund 90 % aller Isolate, wobei jede einzelne der 16 Gattungen jeweils über 1 % aller Isolate stellte. Der prozentuale Anteil dieser 16 Gattungen an der Gesamt-Milchhalbfabrikat-Mikrobiota ist in Abbildung 3-12 dargestellt. Die restlichen 33 Gattungen, deren Anteil unter 1 % lag, wurden in der Abbildung zusammengefasst und sind namentlich in Tabelle 3-6 aufgeführt. Die farbliche Codierung in den nachfolgenden Abbildungen und der nachfolgenden Tabelle entspricht der zuvor verwendeten Farbcodierung der taxonomischen Großgruppen: fakultativ anaerobe, gramnegative Bakterien (orange); obligat aerobe, gramnegative Bakterien (rot); grampositive Bakterien, High GC (grau); grampositive, aerobe Sporenbildner (violett); „Andere“ grampositive Bakterien (blau); Milchsäurebakterien (türkis) und Hefen (grün).

ERGEBNISSE

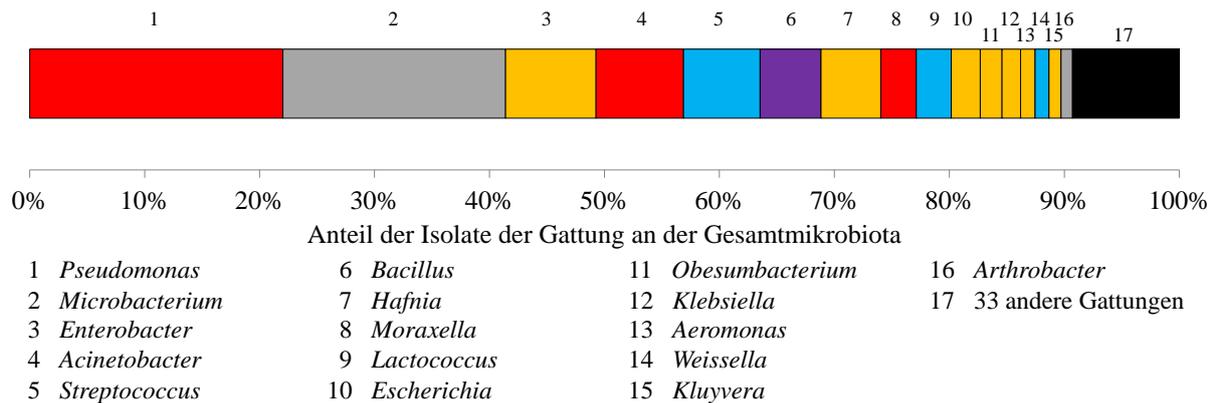


Abbildung 3-12: Prozentualer Anteil der 16 häufigsten Gattungen an der Gesamt-Milchhalbfabrikat-Mikrobiota. Die farbliche Codierung bezieht sich auf den Farbcode der taxonomischen Großgruppen: fakultativ anaerobe, gramnegative Bakterien (orange); obligat aerobe, gramnegative Bakterien (rot); grampositive Bakterien, High GC (grau); grampositive, aerobe Sporenbildner (violett); „Andere“ grampositive Bakterien (blau) und Milchsäurebakterien (türkis).

Die vier häufigsten Gattungen, die aus den Milchhalbfabrikaten isoliert werden konnten, waren die Gattungen *Pseudomonas*, *Microbacterium*, *Enterobacter* und *Acinetobacter*. Deren summierter Anteil an der Gesamt-Milchhalbfabrikat-Mikrobiota entsprach etwa 57 %, wobei jeweils etwa 20 % der Isolate zu den Gattungen *Pseudomonas* und *Microbacterium* gehörten und jeweils etwa 8 % zu den Gattungen *Enterobacter* und *Acinetobacter*. Der Gattung *Microbacterium* konnten zudem 85 % der Isolate der taxonomischen Großgruppe der grampositiven High GCs zugeordnet werden, obwohl insgesamt 10 Gattungen dieser Großgruppe isoliert werden konnten (siehe Abbildung 3-12 und Tabelle 3-6). Des Weiteren fällt auf, dass die Großgruppe der gramnegativen, fakultativ anaeroben Bakterien mit sieben (*Aeromonas*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Hafnia*, *Klebsiella*, *Kluyvera* und *Obesumbacterium*) von insgesamt 13 Gattungen unter den 16 häufigsten Gattungen vertreten war.

Tabelle 3-6: Auflistung der in Abbildung 3-13 zusammengefassten anderen Gattungen (37). Deren Anteil an der Gesamt-Milchhalbfabrikat-Mikrobiota lag jeweils unter einem Prozent. Die Gattungen sind nach Großgruppen sortiert. Die farbliche Codierung bezieht sich auf den Farbcode der taxonomischen Großgruppen: fakultativ anaerobe, gramnegative Bakterien (orange); obligat aerobe, gramnegative Bakterien (rot); grampositive Bakterien, High GC (grau); grampositive, aerobe Sporenbildner (violett); „Andere“ grampositive Bakterien (blau); Milchsäurebakterien (türkis) und Hefen (grün).

1 <i>Citrobacter</i>	10 <i>Delftia</i>	19 <i>Corynebacterium</i>	28 <i>Macroccoccus</i>
2 <i>Pantoea</i>	11 <i>Janthinobacterium</i>	20 <i>Curtobacterium</i>	29 <i>Staphylococcus</i>
3 <i>Rahnella</i>	12 <i>Leucobacter</i>	21 <i>Kocuria</i>	30 <i>Aerococcus</i>
4 <i>Serratia</i>	13 <i>Pseudoxanthomonas</i>	22 <i>Kurthia</i>	31 <i>Lactobacillus</i>
5 <i>Vibrio</i>	14 <i>Psychrobacter</i>	23 <i>Micrococcus</i>	32 <i>Leuconostoc</i>
6 <i>Yersinia</i>	15 <i>Ralstonia</i>	24 <i>Plantibacter</i>	33 <i>Rhodotorula</i>
7 <i>Brevundimonas</i>	16 <i>Sphingomonas</i>	25 <i>Rhodococcus</i>	
8 <i>Chryseobacterium</i>	17 <i>Stenotrophomonas</i>	26 <i>Lysinibacillus</i>	
9 <i>Cupriavidus</i>	18 <i>Actinobaculum</i>	27 <i>Paenibacillus</i>	

ERGEBNISSE

Die fünfthäufigste Gattung, die aus den Milchhalbfabrikaten isoliert werden konnte, war mit rund 7 % aller Isolate die Gattung *Streptococcus*. Neben dieser zählten auch die beiden Milchsäurebakterien-Gattungen *Lactococcus* und *Weissella* zu den 16 am häufigsten isolierten Gattungen. Drei weitere Milchsäurebakterien-Gattungen trugen mit jeweils unter 1 % der Isolate zur Gesamt-Milchhalbfabrikat-Mikrobiota bei. Isolate der Gattungen *Microbacterium* und *Pseudomonas* konnten aus jeweils 10 Milchhalbfabrikatproben isoliert werden, Isolate der Gattung *Bacillus* aus neun Proben und die Isolate der Gattungen *Lactococcus* und *Streptococcus* stammten aus sieben bzw. sechs der 20 Milchhalbfabrikate. Aus jeweils vier Proben konnten die Gattungen *Acinetobacter*, *Enterobacter* und *Kluyvera* isoliert werden. Weitere vier Gattungen konnten aus jeweils drei Proben isoliert werden, 16 Gattungen aus jeweils zwei Proben und die Isolate der restlichen 21 Gattungen stammten jeweils nur aus einer Probe. Auffällig war außerdem, dass die auf Ebene taxonomischer Großgruppen beschriebene Dominanz in den einzelnen Proben meist auf eine oder zwei dominierende Gattungen zurückzuführen war (siehe Tabelle 3-7). Diesen Gattungen konnten in der Regel etwa 50–90 % der Isolate der jeweiligen Probe zugeordnet werden.

Tabelle 3-7: Dominierende Gattungen in einzelnen Milchhalbfabrikaten.

MmK	Dominierende Gattungen	Ewag Mk	Dominierende Gattungen	EwK	Dominierende Gattungen	Sahne	Dominierende Gattungen
1	<i>Pseudomonas</i>	1	<i>Enterobacter</i> / <i>Escherichia</i>	1	<i>Hafnia</i>	1	<i>Aeromonas</i> / <i>Lactococcus</i>
2	<i>Microbacterium</i> / <i>Bacillus</i>	2	<i>Moraxella</i>	2	<i>Pseudomonas</i>	2	<i>Acinetobacter</i> / <i>Pseudomonas</i>
3	<i>Lactococcus</i> / <i>Streptococcus</i>	3	<i>Kluyvera</i> / <i>Klebsiella</i>	3	<i>Microbacterium</i>	3	<i>Pseudomonas</i> / <i>Acinetobacter</i>
4	<i>Microbacterium</i> / <i>Bacillus</i>	4	<i>Streptococcus</i> / <i>Weissella</i>	4	<i>Microbacterium</i> / <i>Bacillus</i>	4	<i>Aeromonas</i> / <i>Pseudomonas</i>
5	<i>Bacillus</i> / <i>Escherichia</i>	5	<i>Pseudomonas</i> / <i>Obesumbacterium</i>	5	<i>Acinetobacter</i> / <i>Pseudomonas</i>	5	<i>Microbacterium</i>

Potentielle neue Gattungen und Arten aus Rohmilchen und Milchhalbfabrikaten

Neben den 169 Arten, die aus den 20 Rohmilchen isoliert wurden, konnten 35 weitere Arten unter den 20 Milchhalbfabrikat-Isolaten ermittelt werden. Unter den 1096 auf Artebene identifizierten repräsentativen Isolaten befanden sich 154 Isolate, die zum Zeitpunkt der Auswertung unter den gewählten Kriterien (siehe 2.7.1) keiner offiziell anerkannten Art eindeutig zugeordnet werden konnten. Folglich gehörten etwa 14 % der untersuchten Isolate zu potentiellen neuen Arten. Aus den Rohmilchen und Milchhalbfabrikaten konnten insgesamt 204 Arten aus 74 Gattungen isoliert werden. Bei 33 davon handelte es sich um potentielle neue Arten und bei einer sogar um eine potentielle neue Gattung. Somit waren rund 16 % der isolierten Arten unbekannt. Diese sind namentlich und in Verbindung mit ihrer am nächsten verwandten Art in Tabelle 3-8 aufgelistet und stammten aus 22 der 40 untersuchten Proben.

ERGEBNISSE

Tabelle 3-8: Potentiell neue Gattungen und Arten aus Rohmilchen und Milchhalbfabrikaten.

Potentiell neue Art	Anzahl der repräsentativen Isolate	Anzahl der Isolate	Aus Anzahl der Proben	Ähnlichkeit (%)	Gen (partiell)	Nächstverwandte Art
Gen. nov. sp. nov.(1)*	2	8	1	95,5	16S	<i>Empedobacter falsenii</i>
<i>Acinetobacter</i> sp. nov.(1)	46	258	6	97,4	16S	<i>Acinetobacter haemolyticus</i>
<i>Acinetobacter</i> sp. nov.(2)	1	1	1	97,8	16S	<i>Acinetobacter lwoffii</i>
<i>Arthrobacter</i> sp. nov.(1)	1	1	1	97,4	16S	<i>Arthrobacter globiformis</i>
<i>Arthrobacter</i> sp. nov.(2)	1	2	1	97,4	16S	<i>Arthrobacter pascens</i>
<i>Diaphorobacter</i> sp. nov.(1)	1	1	1	97,9	16S	<i>Diaphorobacter aerolatus</i>
<i>Lactococcus</i> sp. nov.(1)	1	2	1	97,5	16S	<i>Lactococcus chungangensis</i>
<i>Pseudomonas</i> sp. nov.(1)	22	124	4	94,7	<i>rpoD</i>	<i>Pseudomonas libanensis</i>
<i>Pseudomonas</i> sp. nov.(2)	20	103	8	95,8	<i>rpoD</i>	<i>Pseudomonas fragi</i>
<i>Pseudomonas</i> sp. nov.(3)	18	28	5	88,9	<i>rpoD</i>	<i>Pseudomonas lini</i>
<i>Pseudomonas</i> sp. nov.(4)	4	8	3	94,8	<i>rpoD</i>	<i>Pseudomonas brenneri</i>
<i>Pseudomonas</i> sp. nov.(5)	3	9	2	93,1	<i>rpoD</i>	<i>Pseudomonas fragi</i>
<i>Pseudomonas</i> sp. nov.(6)	3	6	1	93,8	<i>rpoD</i>	<i>Pseudomonas mediterranea</i>
<i>Pseudomonas</i> sp. nov.(7)	2	3	2	94,2	<i>rpoD</i>	<i>Pseudomonas deceptionensis</i>
<i>Pseudomonas</i> sp. nov.(8)	2	3	1	91,8	<i>rpoD</i>	<i>Pseudomonas frederiksbergensis</i>
<i>Pseudomonas</i> sp. nov.(9)	2	9	2	95,6	<i>rpoD</i>	<i>Pseudomonas grimontii</i>
<i>Pseudomonas</i> sp. nov.(10)	2	8	1	83,7	<i>rpoD</i>	<i>Pseudomonas japonica</i>
<i>Pseudomonas</i> sp. nov.(11)	2	3	2	94,8	<i>rpoD</i>	<i>Pseudomonas libanensis</i>
<i>Pseudomonas</i> sp. nov.(12)	2	2	2	95,0	<i>rpoD</i>	<i>Pseudomonas lurida</i>
<i>Pseudomonas</i> sp. nov.(13)	2	5	1	96,7	<i>rpoD</i>	<i>Pseudomonas moraviensis</i>
<i>Pseudomonas</i> sp. nov.(14)	2	6	1	94,5	<i>rpoD</i>	<i>Pseudomonas moraviensis</i>
<i>Pseudomonas</i> sp. nov.(15)	2	16	1	90,6	<i>rpoD</i>	<i>Pseudomonas peli</i>
<i>Pseudomonas</i> sp. nov.(16)	2	5	1	93,6	<i>rpoD</i>	<i>Pseudomonas veronii</i>
<i>Pseudomonas</i> sp. nov.(17)	1	2	1	95,3	<i>rpoD</i>	<i>Pseudomonas salomonii</i>
<i>Pseudomonas</i> sp. nov.(18)	1	2	1	94,0	<i>rpoD</i>	<i>Pseudomonas constantinii</i>
<i>Pseudomonas</i> sp. nov.(19)	1	1	1	94,9	<i>rpoD</i>	<i>Pseudomonas fragi</i>
<i>Pseudomonas</i> sp. nov.(20)	1	1	1	90,5	<i>rpoD</i>	<i>Pseudomonas japonica</i>
<i>Pseudomonas</i> sp. nov.(21)	1	1	1	85,6	<i>rpoD</i>	<i>Pseudomonas japonica</i>
<i>Pseudomonas</i> sp. nov.(22)	1	1	1	95,9	<i>rpoD</i>	<i>Pseudomonas koreensis</i>
<i>Pseudomonas</i> sp. nov.(23)	1	6	1	94,8	<i>rpoD</i>	<i>Pseudomonas lurida</i>
<i>Pseudomonas</i> sp. nov.(24)	1	2	1	94,2	<i>rpoD</i>	<i>Pseudomonas marginalis</i>
<i>Pseudomonas</i> sp. nov.(25)	1	1	1	92,0	<i>rpoD</i>	<i>Pseudomonas migulae</i>
<i>Pseudomonas</i> sp. nov.(26)	1	5	1	96,5	<i>rpoD</i>	<i>Pseudomonas moraviensis</i>
<i>Pseudomonas</i> sp. nov.(27)	1	12	1	90,3	<i>rpoD</i>	<i>Pseudomonas peli</i>

* Potentiell neue Gattung; die **fett** markierten Arten wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit erstbeschrieben.

Die Gattung *Pseudomonas* zeigte mit insgesamt 47 Arten nicht nur die größte Diversität, über die Hälfte der isolierten Arten (27 von 47) waren potentiell neue Arten. Des Weiteren wurden jeweils zwei potentiell neue *Acinetobacter*- und *Arthrobacter*-Arten isoliert. Außerdem konnten jeweils eine potentiell neue *Diaphorobacter*- und *Lactococcus*-Art identifiziert werden. Die am nächsten verwandte Art zu der isolierten potentiellen neuen Gattung ist

Empedobacter falsenii. Für die mit insgesamt 258 Isolaten am häufigsten isolierte potentiell neue Art *Acinetobacter* sp. nov. (1) ist die am nächsten verwandte Art *Acinetobacter haemolyticus*. Die 103 Isolate der zweithäufigsten potentiell neuen *Pseudomonas*-Art *Pseudomonas* sp. nov. (2) hingegen konnten aus acht Proben isoliert werden. Von den 27 potentiell neuen *Pseudomonas*-Arten konnten 18 nur aus jeweils einer Probe isoliert werden. Fünf weitere Arten stammten aus jeweils 2 Proben und jeweils eine Art konnte aus drei, vier und fünf Proben isoliert werden. Ergänzend zur Gensequenz-Ähnlichkeit wurde die phylogenetische Position der repräsentativen Isolate innerhalb ihrer Gattungen oder in Verbindung mit den nächstverwandten Gattungen anhand der Nukleotidsequenz der verwendeten Markergene ermittelt. Hierfür wurden phylogenetische Bäume aus Gensequenzen von Typstämmen der jeweiligen Gattungen und Arten in Verbindung mit den Gensequenzen der zu untersuchenden Isolate berechnet (siehe 2.7.2.)

Die nachfolgenden Abbildungen 3-13 bis 3-15 zeigen gemeinsam exemplarisch die phylogenetische Position der 27 potentiell neuen *Pseudomonas*-Arten. Die phylogenetische Position der zwei potentiell neuen *Acinetobacter*-Arten, der beiden potentiell neuen *Arthrobacter*-Arten, der potentiell neuen *Lactococcus*-Art sowie der potentiell neuen *Diaphorobacter*-Art sind in den Abbildungen 6-1 bis 6-4 zu sehen. Die phylogenetische Position der potentiell neuen Gattung innerhalb der Familie der *Flavobacteriaceae* ist in Abbildung 6-5 zu sehen.

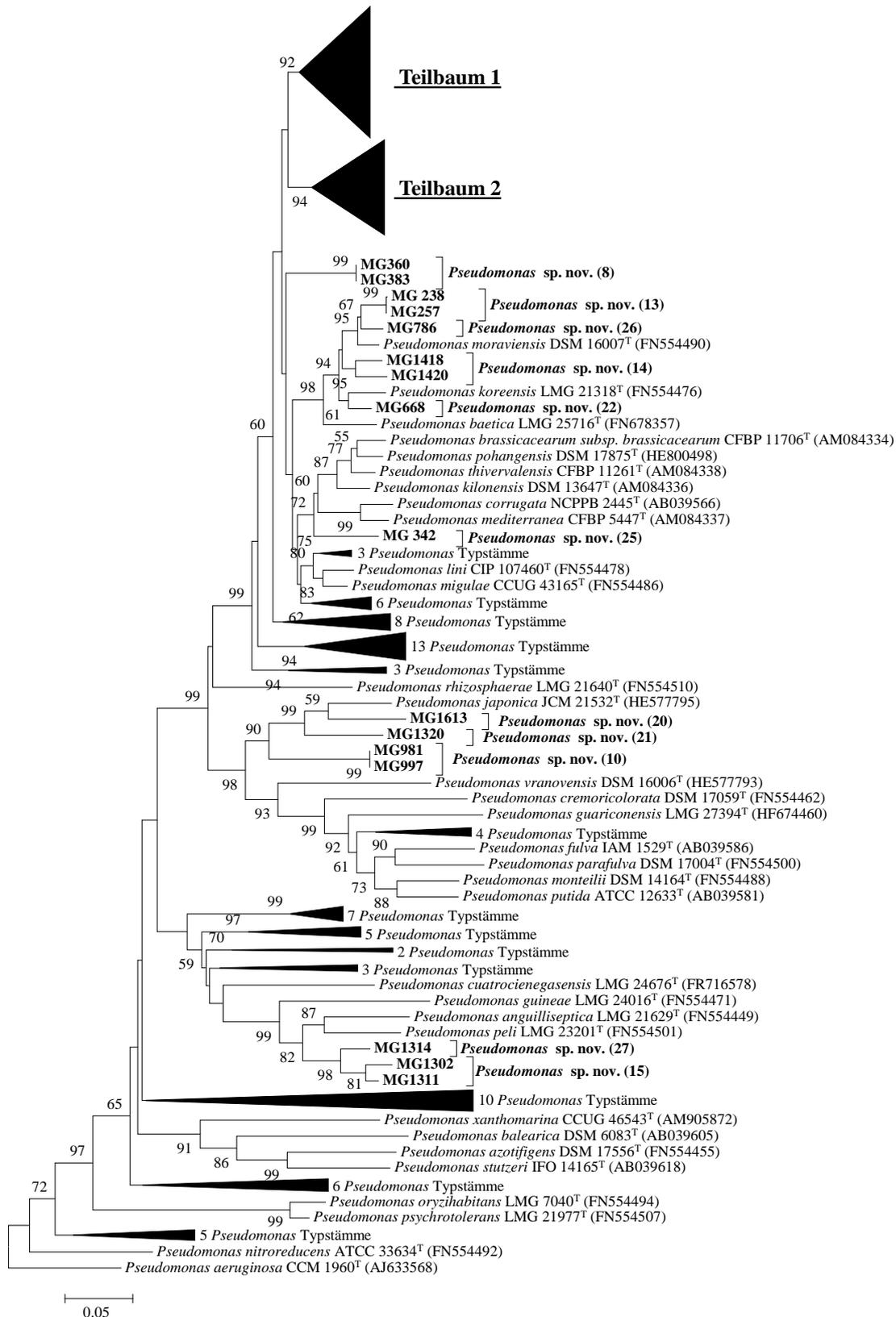


Abbildung 3-13: Phylogenetischer Neighbor-Joining-Baum, basierend auf partiellen *rpoD*-Gensequenzen, der die phylogenetische Position der 27 potentiell neuen *Pseudomonas*-Arten zeigt. In die Berechnung flossen 656 Nukleotidpositionen von insgesamt 242 partiellen *rpoD*-Gensequenzen mit ein. Die Berechnung wurde 1000-mal wiederholt (bootstrap), Bootstrap-Werte über 50 % wurden an den jeweiligen Knotenpunkten angegeben. Als Bezugssequenz (Wurzel) diente die *rpoD*-Gensequenz der Typspezies *Pseudomonas aeruginosa* CCM 1960^T. Die Länge des Balkens entspricht 0,05 abweichenden Basen pro Nukleotidposition. Der als **Teilbaum 1** bezeichnete oberste Ast des Baumes ist im Detail in Abbildung 3-14 dargestellt. Der als **Teilbaum 2** bezeichnete Ast des Baumes ist im Detail in Abbildung 3-15 dargestellt.

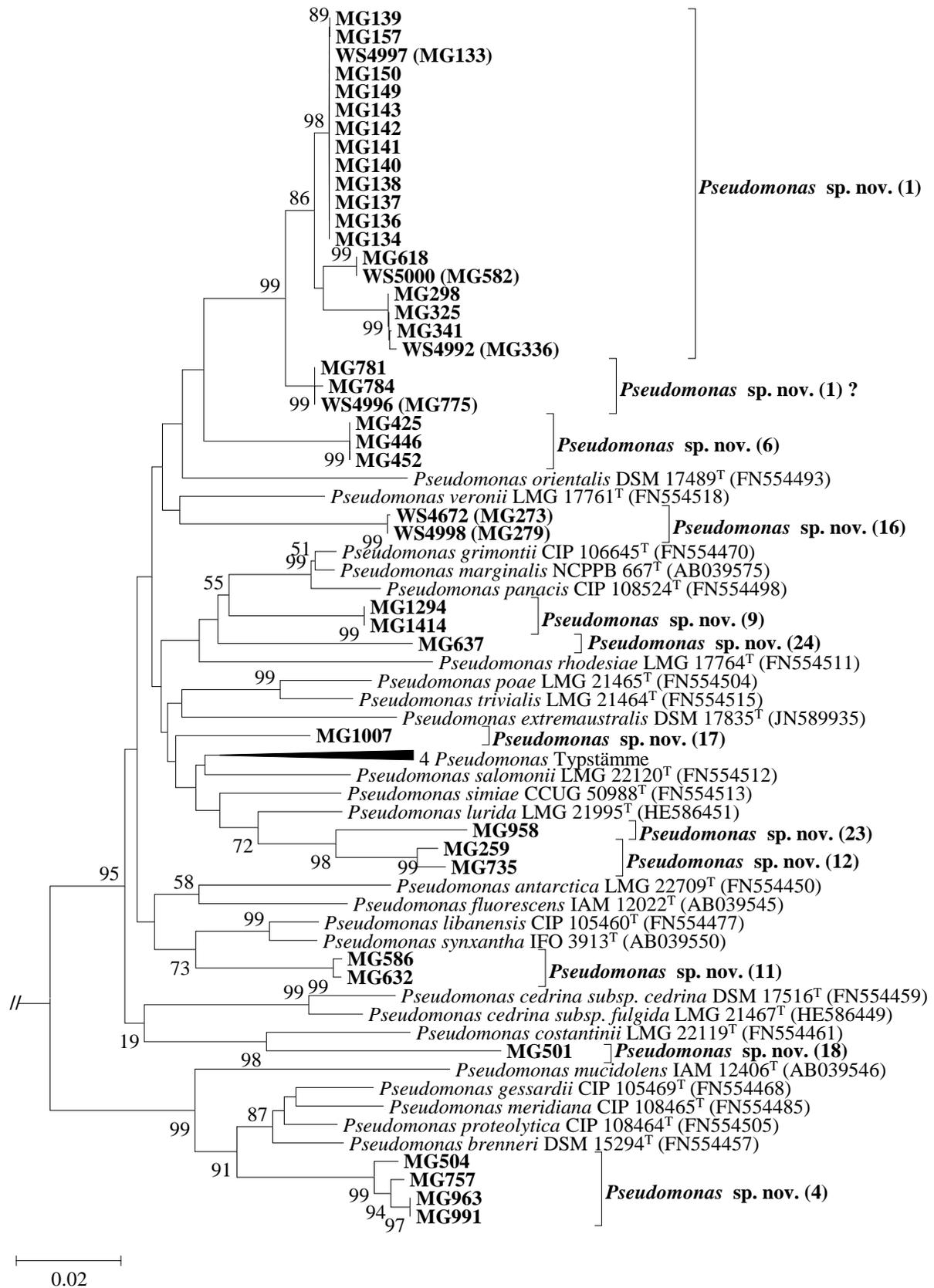


Abbildung 3-14: Der als Teilbaum 1 bezeichnete Ast des Baumes aus Abbildung 3-13. Die Länge des Balkens entspricht 0,02 abweichenden Basen pro Nukleotidposition.

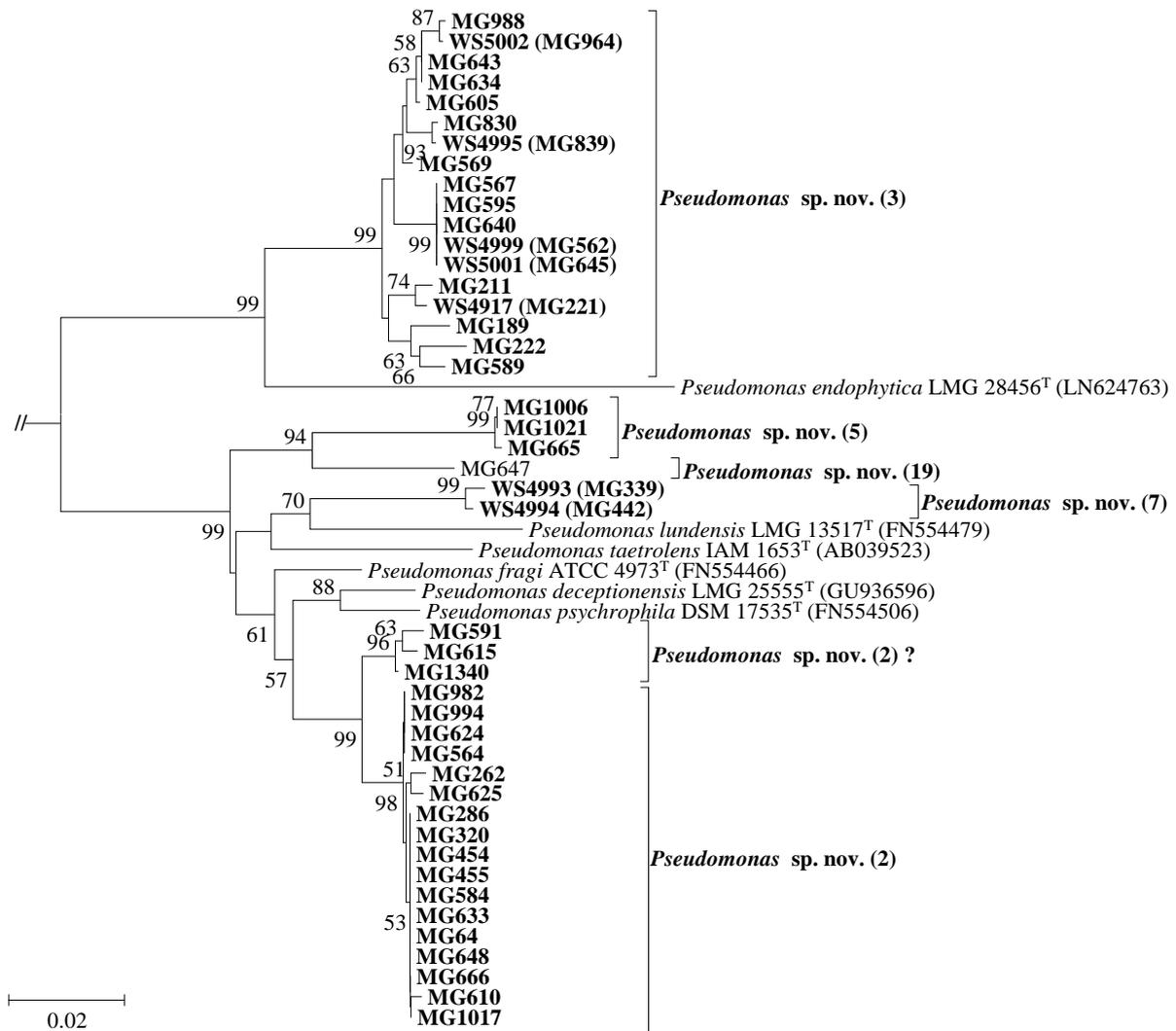


Abbildung 3-15: Der als Teilbaum 2 bezeichnete Ast des Baumes aus Abbildung 3-13. Die Länge des Balkens entspricht 0,02 abweichenden Basen pro Nukleotidposition.

Bei genauerer Betrachtung der Abbildungen 3-13 bis 3-15 sowie der Abbildungen 6-1 bis 6-5 in Verbindung mit Tabelle 3-8 fällt auf, dass die genetisch am nächsten verwandten Arten nicht immer mit den phylogenetisch am nächsten liegenden Arten übereinstimmen. Alle sieben Abbildungen stimmen jedoch darin überein, dass die Gensequenzen der potentiell neuen Arten und der potentiell neuen Gattung in ihrem jeweiligen phylogenetischen Baum jede für sich eine separate Gruppe bilden. Die phylogenetischen Abstände der potentiell neuen Arten zu offiziell anerkannten Arten sind dabei vergleichbar mit denen, die die anerkannten Arten untereinander aufweisen.

3.2 Lipolytische und proteolytische Aktivität der repräsentativen Mikrobiota

Die Fähigkeit von 1345 repräsentativen Isolaten, aus den Rohmilchen und Milchhalbfabrikaten lipolytische und proteolytische Enzyme zu bilden, wurde wie unter Punkt 2.10 beschrieben mittels Agardiffusions-Tests untersucht. Die Isolate wurden anhand ihrer enzymatischen Aktivität in drei Gruppen eingeteilt: Isolate mit proteolytischer Aktivität, Isolate mit lipolytischer Aktivität und Isolate mit sowohl lipolytischer als auch proteolytischer Aktivität. Für einen ersten Überblick wurden die enzymatischen Aktivitäten für die jeweilige Gesamtmikrobiota (Rohmilchen/Milchhalbfabrikate) zusammengefasst (siehe Tabelle 3-9).

Tabelle 3-9: Zusammengefasste enzymatische Aktivität der Gesamtmikrobiota der Rohmilchen und Milchhalbfabrikate bei 30 °C und 6 °C. Der jeweilige Anteil an der Gesamtmikrobiota ist gerundet ohne Nachkommastelle in % angegeben.

Art der enzymatischen Aktivität	Anteil an der Gesamtmikrobiota der <u>Rohmilchen</u>		Anteil an der Gesamtmikrobiota der <u>Milchhalbfabrikate</u>	
	bei 30 °C	bei 6 °C	bei 30 °C	bei 6 °C
	Proteolytisch	29 %	22 %	36 %
Lipolytisch	17 %	16 %	11 %	16 %
Proteolytisch & lipolytisch	22 %	20 %	26 %	19 %
Nicht aktiv	33 %	27 %	27 %	41 %
Nicht gewachsen	0 %	14 %	0 %	11 %

Sowohl unter den Isolaten der Rohmilchen als auch unter den Isolaten der Milchhalbfabrikate waren alle drei Aktivitätsarten vertreten. Dies galt für die Untersuchungen bei 30 °C und für die Untersuchungen bei 6 °C gleichermaßen. Der jeweilige Anteil der Isolate, die die einzelnen Aktivitäten aufwiesen, lag generell zwischen 11–36 %. Die Anteile waren bei den Rohmilchisolaten bei beiden Temperaturen für proteolytisch und lipolytisch aktive Isolate sowie rein lipolytisch aktive Isolate annähernd vergleichbar. Der Anteil proteolytisch aktiver Isolate war bei 6 °C um 7 % niedriger als bei 30 °C.

Ebenfalls um 7 % niedriger war der Anteil proteolytisch und lipolytisch aktiver Isolate bei den Milchhalbfabrikaten, der Anteil der Isolate mit rein proteolytischer Aktivität war mit 36 % bei 30 °C deutlich höher als bei 6 °C (13 %). Der Anteil der lipolytischen Isolate war bei beiden Temperaturen annähernd vergleichbar. Alle untersuchten Isolate wuchsen bei 30 °C, auch wenn sie keine der drei Aktivitäten aufwiesen. Generell zeigten rund 30 % der Rohmilchisolate keine der untersuchten enzymatischen Aktivitäten, gleiches galt für die Untersuchung der Milchhalbfabrikat-Isolate bei 30 °C. Bei 6 °C lag der Anteil nicht aktiver Isolate bei 41 %. Der Anteil der Isolate an der Mikrobiota, die bei 6 °C Wachstum zeigten und demnach einen psychrotoleranten Charakter aufweisen, lag bei den Rohmilchen bei 86 %, bei den Milchhalbfabrikaten waren es 89 %.

Die proteolytische und/oder lipolytische Aktivität der repräsentativen Isolate der 15 häufigsten Gattungen aus den Rohmilchen (siehe Abbildung 3-7) ist in Abbildung 3-16

ERGEBNISSE

dargestellt. Die enzymatische Aktivität der restlichen 47 Gattungen wurde dabei summiert. In der darauffolgenden Abbildung 3-17 ist die proteolytische und/oder lipolytische Aktivität der repräsentativen Isolate der 16 häufigsten Gattungen aus den Milchhalbfabrikaten (siehe Abbildung 3-12) aufgeführt, dabei wurde die enzymatische Aktivität der restlichen 37 Gattungen summiert dargestellt. Alle nachfolgenden Abbildungen, die die enzymatischen Aktivitäten beschreiben, besitzen die gleiche Farbcodierung (in den Abbildungen von vorne nach hinten gerichtet) und sind jeweils in die Teile A (Aktivität bei 30 °C) und B (Aktivität und Wachstum bei 6 °C) unterteilt.

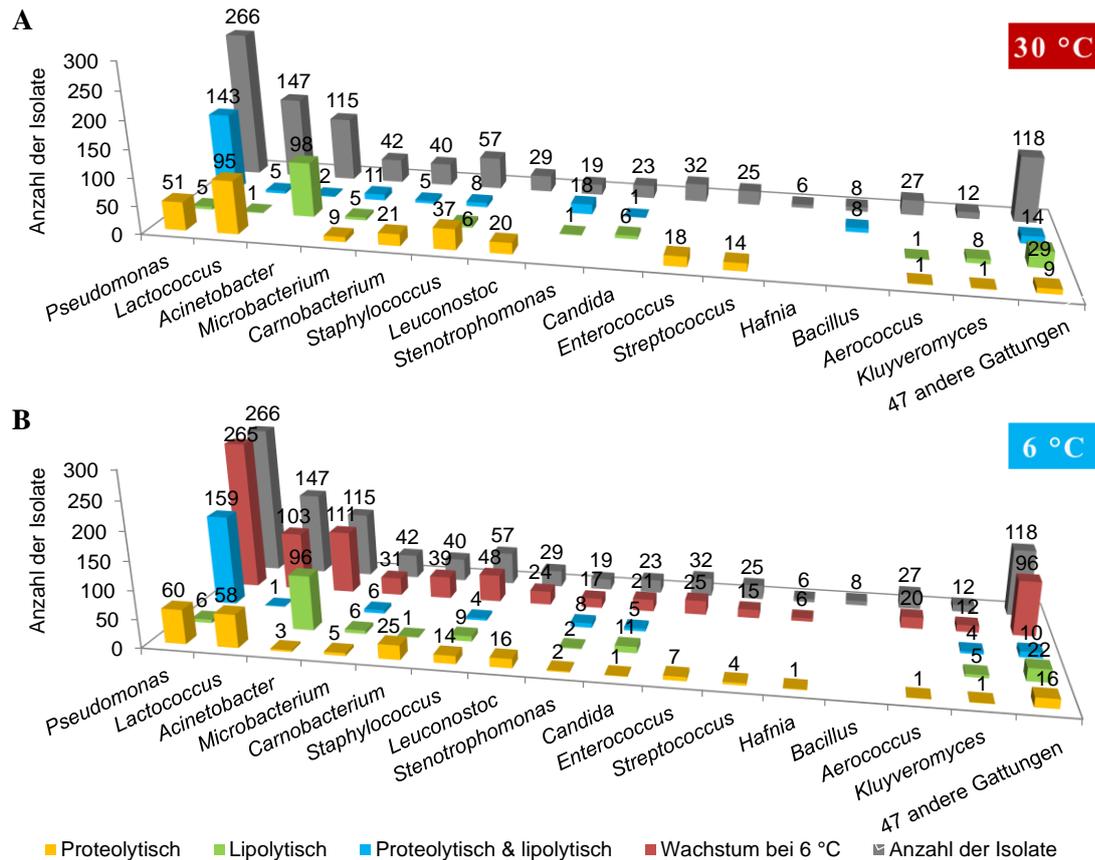


Abbildung 3-16: Proteolytische und lipolytische Aktivität der repräsentativen Isolate der 15 häufigsten Gattungen aus Rohmilchen. Aktivität bei 30 °C (A), Aktivität bei 6 °C (B).

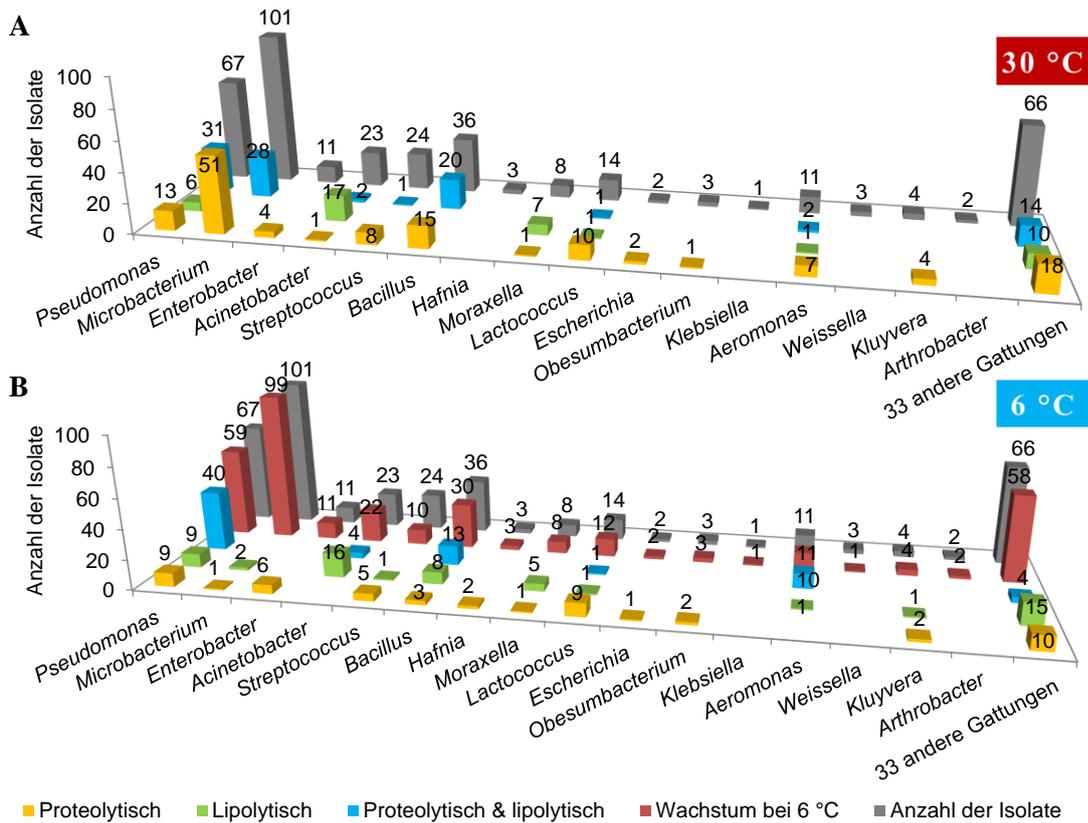


Abbildung 3-17: Proteolytische und lipolytische Aktivität der repräsentativen Isolate der 16 häufigsten Gattungen aus Milchhalbfabrikaten. Aktivität bei 30 °C (A), Aktivität bei 6 °C (B).

Bei der Betrachtung der vier Grafiken in den beiden Abbildungen fällt auf, dass es teilweise sehr starke Unterschiede zwischen den einzelnen Gattungen in der Ausprägung der enzymatischen Aktivität gab. Außerdem ist erkennbar, dass sich die Isolate der einzelnen Gattungen auch in ihrem Wachstumsverhalten bei 6 °C unterschieden. Dies galt sowohl innerhalb der jeweiligen Gattung als auch im Vergleich zu anderen Gattungen. Die Isolate der Gattung *Pseudomonas* beispielsweise zeigten insgesamt zu 75 % bei 30 °C und zu 88 % bei 6 °C einen der untersuchten Aktivitätstypen, wobei lediglich 9 Isolate bei 6 °C kein Wachstum zeigten. Somit war die Anzahl der enzymatisch aktiven Isolate bei 6 °C höher als bei 30 °C. Eine deutliche Tendenz zur gleichzeitigen Produktion von Peptidasen und Lipasen oder auch nur Peptidasen alleine konnte unabhängig von der Temperatur für die Gattung *Pseudomonas* festgestellt werden, wohingegen die ausschließliche Produktion von Lipasen kaum auftrat. Die überwiegende gleichzeitige Produktion von Peptidasen und Lipasen galt auch für die Rohmilchisolate der Gattung *Stenotrophomonas*. Im Gegensatz dazu zeigten rund 95 % aller enzymatisch aktiven Isolate (etwa 90 % bei beiden Temperaturen) der Gattung *Acinetobacter* ausschließlich Lipolyse. Mit Ausnahme von 7 Isolaten zeigten alle bei 6 °C Wachstum, während proteolytische Aktivität generell nur vereinzelt festgestellt werden konnte. Innerhalb der Gattung *Lactococcus* hingegen war die Produktion von Lipasen unabhängig von der Temperatur so gut wie nicht vorhanden, gleiches gilt auch für die anderen untersuchten Milchsäurebakterien-Gattungen *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Leuconostoc* und *Streptococcus*. Anzumerken ist jedoch auch, dass nur 70 % der Milchsäurebakterien bei 6

ERGEBNISSE

°C Wachstum zeigten und davon nur die Hälfte enzymatisch aktiv waren, was etwa 37 % aller MSB entspricht. Bei 30 °C lag der Anteil enzymatisch aktiver Isolate mit 58 % deutlich höher. Generell konnte fast ausschließlich proteolytische Aktivität bei den Milchsäurebakterien festgestellt werden. Ein etwas differenzierteres Bild ergab sich für die Gattung *Microbacterium*. Die Isolate aus den Rohmilchen waren bei 30 °C zu etwa 54 % und bei 6 °C zu etwa 60 % enzymatisch aktiv, wobei alle Aktivitätstypen relativ gleichmäßig vertreten waren. Die Isolate aus den Milchhalbfabrikaten hingegen zeigten bei 30 °C zu etwa zwei Drittel proteolytische Aktivität und zu etwa einem Drittel lipolytische und proteolytische Aktivität. Jedoch waren nur 3 der 99 bei 6 °C gewachsenen Isolate enzymatisch aktiv. Bei den Isolaten der Gattung *Staphylococcus* aus den Rohmilchen konnte bei 30 °C mehrheitlich proteolytische Aktivität festgestellt werden, bei 6 °C ergab sich ein differenzierteres Bild. Für die Isolate der Gattung *Bacillus* konnte bei 30 °C und 6 °C eine mehrheitlich gleichzeitige Produktion von Peptidasen und Lipasen festgestellt werden. Jedoch zeigten bei 30 °C auch 15 von 36 Isolaten aus den Milchhalbfabrikaten ausschließlich Proteolyse und bei 6 °C zeigten acht Isolate ausschließlich Lipolyse. Anzumerken ist aber auch, dass keines der Rohmilchisolate, bei denen es sich ausschließlich um *Bacillus cereus* sensu lato handelte, bei 6 °C Wachstum zeigte. Aufgrund der teilweise sehr geringen Isolatanzahl aller anderen untersuchten Gattungen ließen sich für diese im Einzelnen keine exakten oder tendenziellen Aussagen treffen. Auf Ebene taxonomischer Großgruppen ließen sich jedoch für Hefen und gramnegative, fakultativ anaerobe Bakterien mehr oder weniger starke Tendenzen in der enzymatischen Aktivität erkennen (siehe Tabelle 3-10).

Tabelle 3-10: Zusammengefasste proteolytische und lipolytische Aktivität der Hefen und der gramnegativen, fakultativ anaeroben Bakterien bei 30 °C und 6 °C.

	Gramnegative, fakultativ anaerobe Bakterien	Hefen
Anzahl der Isolate	76	53
30 °C		
Proteolytisch	23	1
Lipolytisch	5	22
Proteolytisch & lipolytisch	4	1
Anzahl der Isolate mit Wachstum bei 6 °C	61	51
6 °C		
Proteolytisch	32	4
Lipolytisch	4	23
Proteolytisch & lipolytisch	<u>13</u>	<u>11</u>

Aus beiden Großgruppen zeigten mehr Isolate enzymatische Aktivität bei 6 °C als bei 30 °C. Basierend auf den Daten aller untersuchten gramnegativen, fakultativ anaeroben Bakterien zeigten diese bei 30 °C mehrheitlich proteolytische Aktivität, obwohl alle Aktivitätstypen vertreten waren. Bei 6 °C zeigte sich die gleiche Tendenz, wobei der Anteil der Isolate mit proteolytischer und lipolytischer Aktivität höher lag. Die Hefen-Isolate wiesen bei 30 °C fast ausschließlich lipolytische Aktivität auf, darunter 4 Isolate der häufigsten Hefeart *Candida pseudoglaebosa* und 8 Isolate der zweithäufigsten Art *Kluyveromyces marxianus*. Bei 6 °C

zeigten 22 der 38 enzymatisch aktiven Isolate ausschließlich lipolytische Aktivität und 11 Isolate sowohl proteolytische als auch lipolytische Aktivität. Auch bei 6 °C stellten die beiden häufigsten Hefearten die Mehrheit der aktiven Isolate (*Candida pseudoglaebosa*: 7 x lipolytisch, 1 x proteolytisch, 3 x proteolytisch und lipolytisch; *Kluyveromyces marxianus*: 5 x lipolytisch, 1 x proteolytisch, 4 x proteolytisch und lipolytisch). Anzumerken ist auch, dass in 14 der 16 Hefearten enzymatisch aktive Isolate bei mindestens einer der beiden Temperaturen auftraten.

Um die unterschiedlichen Aktivitätsausprägungen innerhalb der Gattungen näher zu untersuchen, ist in den folgenden Abbildungen die proteolytische und lipolytische Aktivität auf Artebene dargestellt. Der Fokus wurde dabei auf die Gattungen *Pseudomonas*, *Acinetobacter* und *Lactococcus* (in Verbindung mit den anderen MSB-Gattungen) sowie *Microbacterium* und *Staphylococcus* gelegt. Auf alle anderen Gattungen und Arten wird an dieser Stelle nicht weiter eingegangen. Für die Auswertung auf Artebene wurden nur die Daten der mittels spezifischer Markergene identifizierten Rohmilchisolate verwendet. Die Ausnahme bildete hierbei die Gattung *Pseudomonas*, für die auch Isolate aus den Milchhalbfabrikaten auf Artebene identifiziert worden waren. Die proteolytische und lipolytische Aktivität der insgesamt 47 *Pseudomonas*-Arten aus den Rohmilchen und Milchhalbfabrikaten ist in Abbildung 3-18 dargestellt, wobei zur besseren Übersicht 35 *Pseudomonas*-Arten zusammengefasst wurden, von denen weniger als 5 Isolate untersucht worden waren. Eine ausführliche Darstellung der 47 *Pseudomonas*-Arten ist in Abbildung 6-6 zu sehen. Die überwiegende Anzahl der *Pseudomonas*-Arten zeigte sowohl bei 30 °C als auch bei 6 °C proteolytische und lipolytische Aktivität. Besonders gut erkennbar war dies bei der am häufigsten isolierten Art *Pseudomonas proteolytica* und der potentiell neuen Art *Pseudomonas* sp. nov. (1), die in Rahmen dieser Arbeit als *Pseudomonas lactis* sp. nov. beschrieben wurde. In beiden Arten traten außerdem Isolate auf, die nur proteolytische Aktivität aufwiesen. Jedoch zeigten alle Isolate dieser beiden Arten bei beiden Temperaturen Wachstum und enzymatische Aktivität. Andererseits traten auch Arten auf, bei denen der Anteil der rein proteolytisch aktiven Isolate überwog. Bei der Art *Pseudomonas lundensis* zeigten die Isolate bei beiden Temperaturen überwiegend proteolytische Aktivität. Die Isolate der Art *Pseudomonas fragi* zeigten bei 6 °C ebenfalls fast ausschließlich proteolytische Aktivität, bei 30 °C hingegen waren die Isolate kaum aktiv. Generell zeigten mehr Isolate der beiden letztgenannten Arten enzymatische Aktivität bei 6 °C als bei 30 °C. Isolate mit ausschließlich lipolytischer Aktivität traten vereinzelt auf, jedoch zeigte keine Art, von der mindestens 5 Isolate untersucht worden waren, ausschließlich diesen Aktivitätstyp. Insgesamt betrachtet zeigten die Isolate der besonders häufigen Arten weitestgehend proteolytische und lipolytische Aktivität oder rein proteolytische Aktivität. Die Art *Pseudomonas* sp. nov. (3) trat dabei besonders hervor, da keines der 14 Isolate enzymatische Aktivität aufwies. Diese wurde im Rahmen dieser Arbeit als *Pseudomonas helleri* sp. nov. beschrieben. Zwar traten weiter Arten mit ausschließlich nicht enzymatisch aktiven Isolaten auf (siehe Abbildung 6-6), jedoch konnte für diese aufgrund der geringen Isolatanzahl keine Aussage getroffen werden, da auch

ERGEBNISSE

bei Arten mit enzymatischer Aktivität vereinzelt nicht aktive Isolate aufgetreten sind. Insgesamt wurden von 35 Arten jeweils weniger als 5 Isolate untersucht, für die im Einzelnen keine Aussage über den vorliegenden Aktivitätstyp gemacht werden konnte.

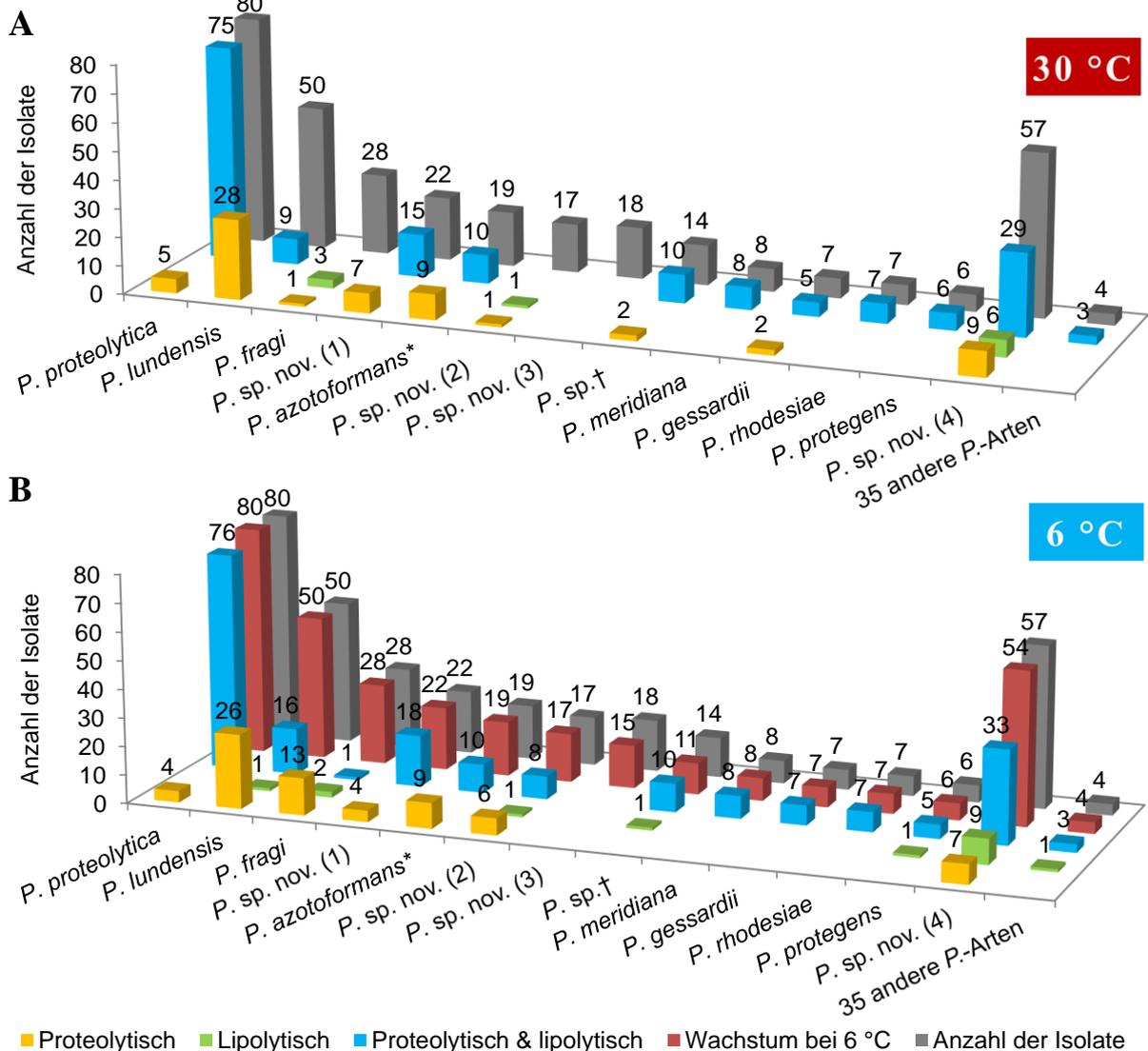


Abbildung 3-18: Proteolytische und lipolytische Aktivität der häufigsten *Pseudomonas*-Arten aus Rohmilchen und Milchhalbfabrikaten. Aktivität bei 30 °C (A), Aktivität bei 6 °C (B). *P.* = *Pseudomonas*.. * Alle Isolate dieser *Pseudomonas*-Art konnten nur mittels des 16S-rRNA-Gens identifiziert werden und sind eventuell verschiedenen Arten zuzuordnen; † Alle diese Isolate konnten nur mittels FTIR-Spektroskopie identifiziert werden und wurden keiner Art eindeutig zugeordnet.

Bei den 10 Arten der Gattung *Acinetobacter* (siehe Abbildung 3-19) ergab sich ein ähnliches Häufigkeits-Diversitäts-Muster wie bei der Gattung *Pseudomonas*. Drei Arten waren besonders häufig isoliert worden und hatten auch maßgeblich die auf Gattungsebene festgestellte enzymatische Aktivität (überwiegend lipolytisch) geprägt. Acht von 10 Arten zeigten bei 30 °C fast ausschließlich diesen Aktivitätstyp, bei 6 °C waren es sieben Arten. Die Isolate der häufigsten Art *Acinetobacter* sp. nov. (1) wiesen sowohl bei 30 °C als auch bei 6 °C fast ausschließlich Lipolyse auf, lediglich zwei Isolate zeigten bei 30 °C zusätzlich

ERGEBNISSE

proteolytische Aktivität. Die Isolate der ebenfalls häufig isolierten Arten *Acinetobacter johnsonii* und *Acinetobacter guillouiae* zeigten bei beiden Temperaturen ausschließlich lipolytische Aktivität. Rein proteolytische Aktivität zeigten einzig die beiden bei 6 °C gewachsenen *Acinetobacter baumannii* Isolate und das Einzelisolat von *Acinetobacter parvus*, welches bei 30 °C jedoch keine Aktivität gezeigt hatte. Die geringe Anzahl der getesteten Isolate ließ für die sieben nicht so häufig isolierten Arten keine eindeutige Aussage zu.

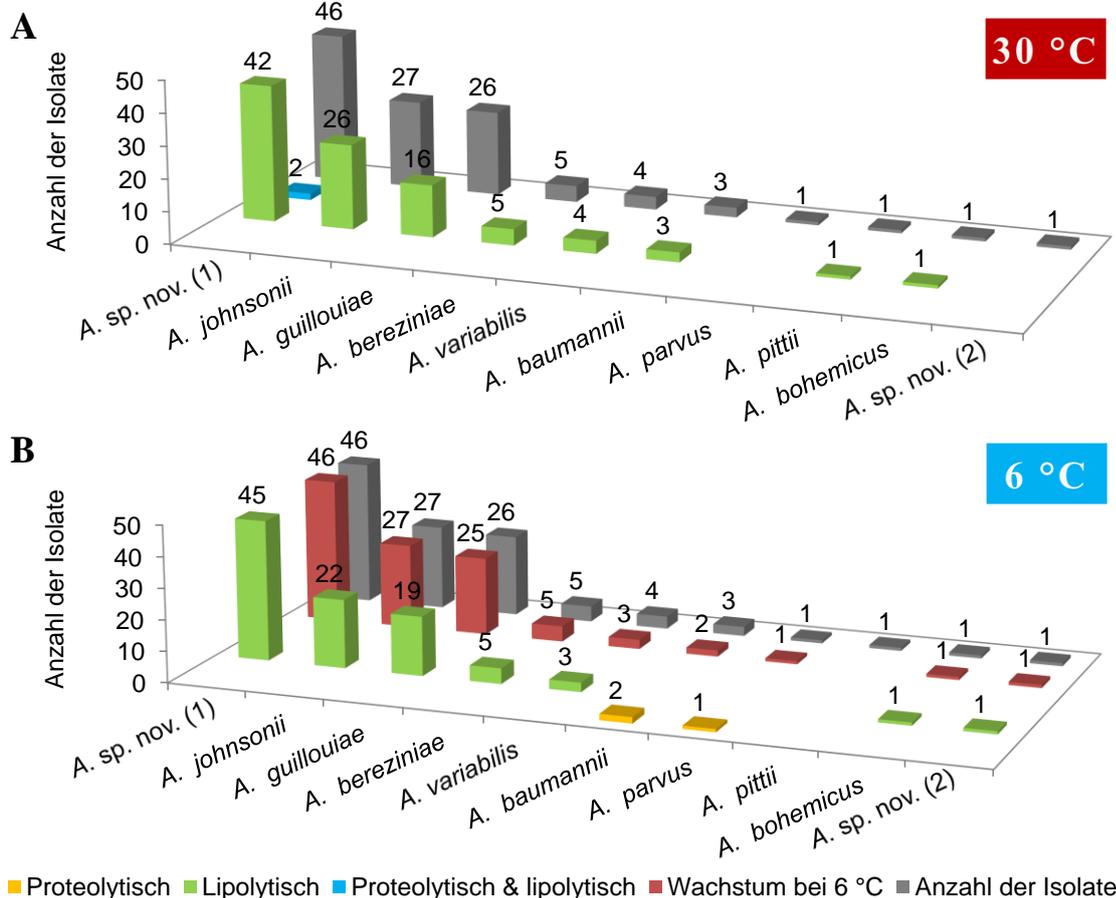


Abbildung 3-19: Proteolytische und lipolytische Aktivität der *Acinetobacter*-Arten aus Rohmilchen. A. = *Acinetobacter*. Aktivität bei 30 °C (A), Aktivität bei 6 °C (B).

Die bereits auf Gattungsebene festgestellte fast ausschließlich proteolytische Aktivität der Milchsäurebakterien ist in Abbildung 3-20 auf Artebene dargestellt. Abgebildet sind 17 der 31 untersuchten Arten. Die restlichen 14 Arten wurden in der Abbildung zusammengefasst, da deren Isolate bei keiner der beiden untersuchten Temperaturen proteolytische oder lipolytische Aktivitäten gezeigt hatten. Im Gegensatz dazu zeigten die häufigsten Arten *Lactococcus lactis* und *Lactococcus raffinolactis* bei 30 °C und 6 °C fast ausschließlich Proteolyse. Dabei wiesen bei 6 °C weniger *Lactococcus lactis* Isolate (49 % der gewachsenen Isolate) enzymatische Aktivität auf als bei 30 °C (88 %). Im Gegensatz dazu stieg die Anzahl der aktiven *Lactococcus raffinolactis* Isolate von ~41 % bei 30 °C auf ~70 % bei 6 °C.

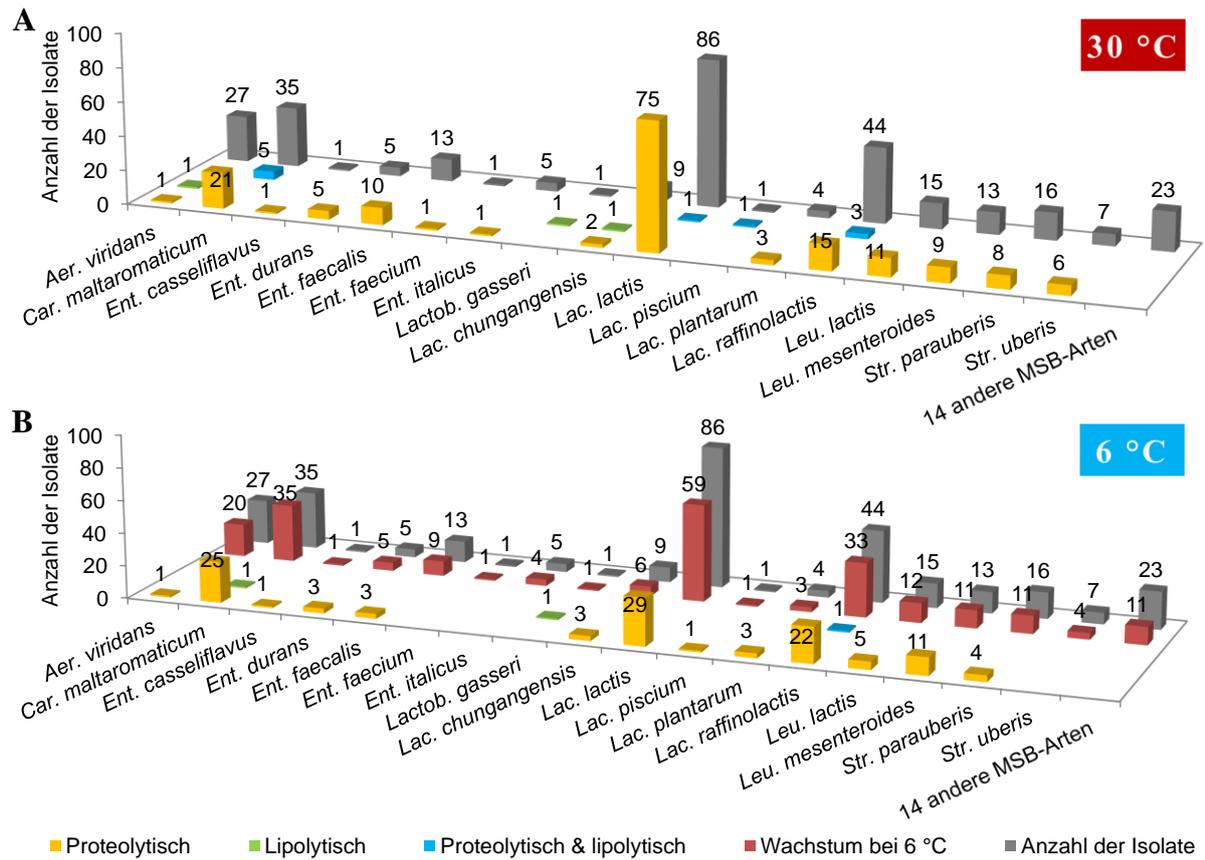


Abbildung 3-20: Proteolytische und lipolytische Aktivität der Milchsäurebakterien-Arten aus Rohmilchen. Aktivität bei 30 °C (A), Aktivität bei 6 °C (B). Aer. = *Aerococcus*, Car. = *Carnobacterium*, Ent. = *Enterococcus*, Lactob.= *Lactobacillus*, Lac. = *Lactococcus*, Leu. = *Leuconostoc*, Str. = *Streptococcus*, MSB = Milchsäurebakterien.

Generell zeigte sich, dass unabhängig von der Art die Anzahl aktiver Isolate bei 6 °C niedriger war als bei 30 °C. Die einzigen Ausnahmen bilden *Lactococcus raffinolactis* und *Carnobacterium maltaromaticum*. Außerdem wuchsen unabhängig von der Art bei 6 °C deutlich weniger Isolate als bei 30 °C, die Isolate der Art *Carnobacterium maltaromaticum* und *Enterococcus durans* ausgenommen.

Abbildung 3-21 zeigt die proteolytische und lipolytische Aktivität der Arten der Gattungen *Microbacterium* (7 Arten) und *Staphylococcus* (10 Arten).

ERGEBNISSE

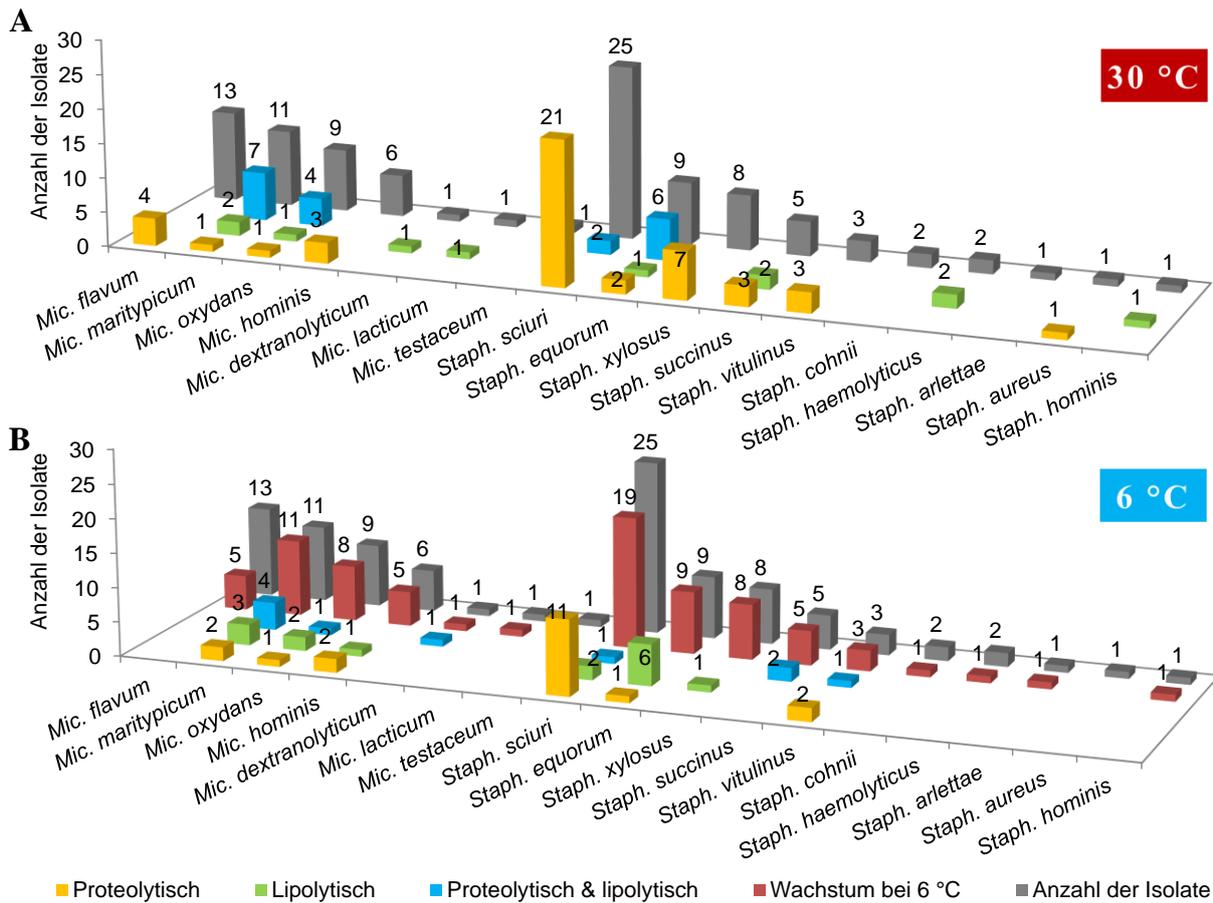


Abbildung 3-21: Proteolytische und lipolytische Aktivität der *Microbacterium*- und *Staphylococcus*-Arten aus Rohmilchen. Aktivität bei 30 °C (A), Aktivität bei 6 °C (B). *Mic.* = *Microbacterium*, *Staph.* = *Staphylococcus*.

Da die Aktivitätsausprägung auch innerhalb der Arten stark variierte und meist nur wenige Isolate der einzelnen Arten vorlagen, die auch enzymatische Aktivität zeigten, konnte für den überwiegenden Teil der Arten keine Aussage getroffen werden. Jedoch konnte für die Art *Staphylococcus sciuri* sowohl bei 30 °C als auch bei 6 °C eine Tendenz zu rein proteolytischer Aktivität festgestellt werden. Gleiches gilt bei 30 °C für sieben der acht Isolate der Art *Staphylococcus xylosus*. Das bei 30 °C nicht aktive Isolat zeigte jedoch als einziges bei 6 °C enzymatische Aktivität (lipolytische Aktivität). Bei der Art *Staphylococcus equorum* wiederum zeigten die Isolate bei 6 °C überwiegend rein lipolytische Aktivität, wohingegen bei 30 °C der Anteil proteolytisch und lipolytisch aktiver Isolate überwog. Eine leichte Tendenz zu proteolytisch und lipolytischer Aktivität zeigten bei 30 °C auch die Isolate der beiden Arten *Microbacterium maritopicum* und *Microbacterium oxydans*. Bei 6 °C hingegen konnte diese Tendenz nicht festgestellt werden.

3.3 Genetische Variabilität und Phylogenie des *apr*-Operons der Gattung *Pseudomonas*

Auf Basis der bisher bekannten Daten zur genetischen Organisation und Phylogenie des *apr*-Operons (siehe 1.2) innerhalb der Gattung *Pseudomonas* scheint vieles noch unklar zu sein. Daher wurde ein systematischer Ansatz zur Untersuchungen des *apr*-Operons gewählt, um dessen Variabilität und Verbreitung innerhalb der Gattung anhand verschiedener Arten mit unterschiedlicher phylogenetischer Verwandtschaft zu überprüfen. Die Grundlage für die Auswahl der zu untersuchenden Arten und Stämme bildete ein phylogenetischer Neighbor-Joining-Baum aus 527 partiellen *rpoD*-Sequenzen von 140 *Pseudomonas*-Typstämmen, 318 *Pseudomonas*-Isolaten aus Rohmilch und Milchhalbfabrikaten sowie 69 *Pseudomonas*-Isolaten aus der Weihenstephaner Stammsammlung. Für jede ausgewählte Art wurde neben dem Typstamm auch das Genom von einem oder mehreren Isolaten (sofern vorhanden) untersucht. Von den drei Arten *Pseudomonas fragi*, *Pseudomonas lundensis* und *Pseudomonas proteolytica* wurden jeweils insgesamt 9–10 Isolate ausgewählt, um auch mögliche Intraspezies-Unterschiede zu ermitteln. Ausgewählt wurden in erster Linie Arten, die aus den Rohmilchen und Milchhalbfabrikaten isoliert werden konnten (siehe 3.1), sowie nahe verwandte Arten der vier, im Rahmen dieser Arbeit neubeschriebenen *Pseudomonas*-Arten (siehe 3.4). Ergänzend dazu wurden auch entfernter verwandte Arten in die Untersuchung miteinbezogen, um einen möglichst großen Bereich der Gattung abzudecken. Wenn für eine Art neben dem Typstamm mehrere Isolate in die Analyse miteinfließen sollten, wurden in der Regel Isolate unterschiedlichen Ursprungs gewählt. Für die Art *Pseudomonas proteolytica* waren es beispielsweise 10 Isolate aus unterschiedlichen Rohmilch- und Milchhalbfabrikatproben. Zur übersichtlicheren Darstellung sind die 56 ausgewählten Arten in einem phylogenetischen Neighbor-Joining-Baum partieller *rpoD*-Gensequenzen von 145 *Pseudomonas*-Typstämmen in blauer Schrift hervorgehoben (siehe Abbildung 3-22 und Abbildung 3-23). Hierbei wurde auch die *rpoD*-Gensequenz des Referenzstamms *Pseudomonas endophytica* BSTT44^T mitaufgenommen, der für die Artbeschreibungen von *Pseudomonas helleri* sp. nov. und *Pseudomonas weihenstephanensis* sp. nov. verwendet wurde. Dessen *rpoD*-Gensequenz lag zum Zeitpunkt der Stammauswahl (April 2014) noch nicht vor. *Pseudomonas*-Arten, von denen zum Zeitpunkt der Analyse keine *rpoD*-Gensequenz vorlag, wurden nicht miteinbezogen.

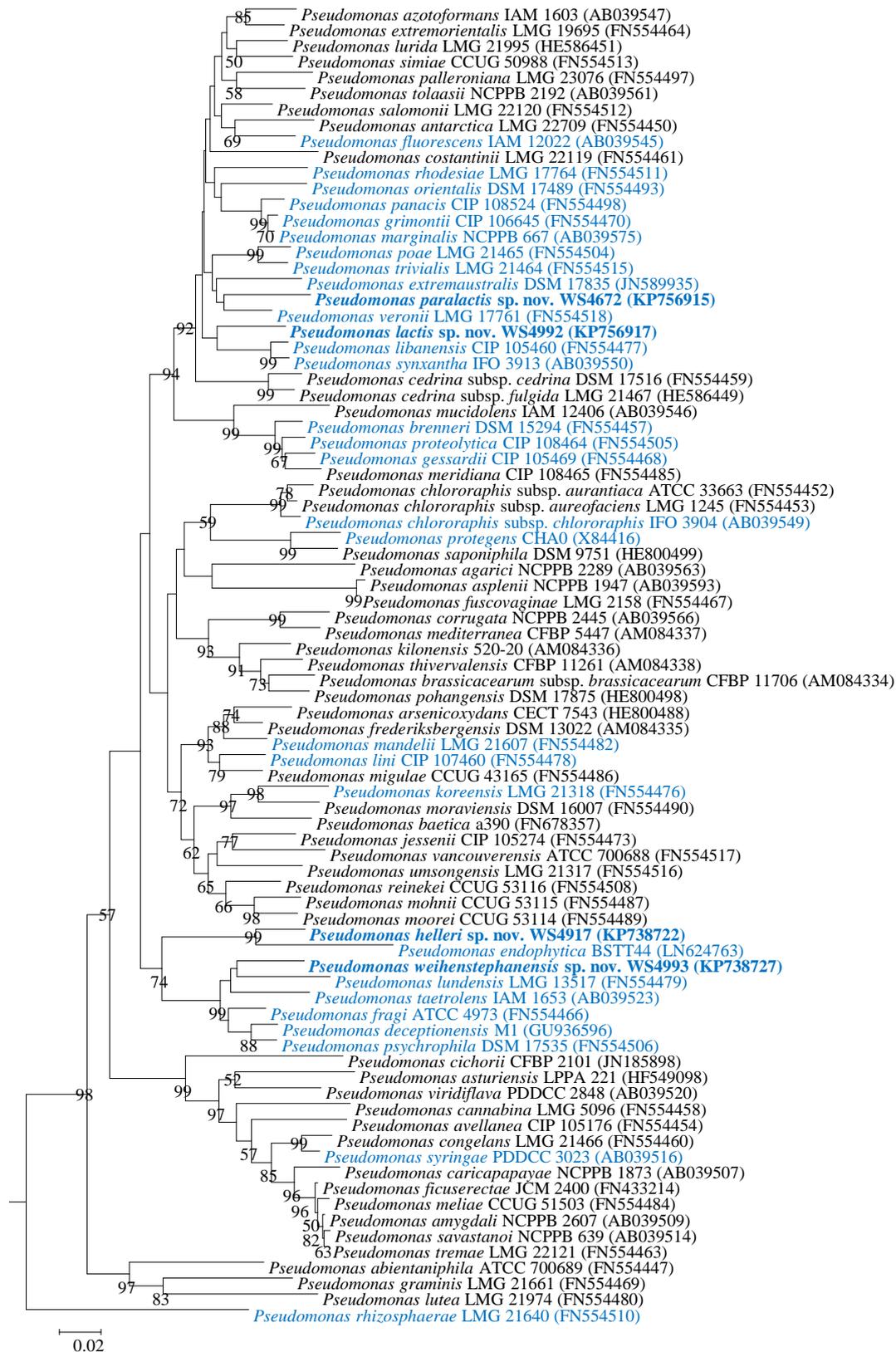


Abbildung 3-23: Teilbaum der in Abbildung 3-22 zusammengefassten 83 *Pseudomonas*-Arten. Der eingezeichnete Balken entspricht der Anzahl von 0,02 Nucleotidsubstitutionen pro Position. Zur *apr*-Operon-Analyse ausgewählte Arten/Stämme sind blau beschriftet.

Nach erfolgter Stammauswahl und nachdem die *draft*-Genome der 107 *Pseudomonas*-Stämme vorlagen (siehe 2.2.3 und 2.6.7), wurden diese nach homologen Gen- bzw. Aminosäuresequenzen der mit dem *apr*-Operon assoziierten Gene untersucht (siehe 2.7.4). Für alle nachfolgend aufgelisteten Operonstrukturen konnten die einzelnen Gene in fast allen Isolaten in direkter Abfolge in den *contigs* identifiziert werden, nur vereinzelt lagen die Gene auf unterschiedlichen *contigs* vor.

3.3.1 Untersuchung der genetischen Variabilität des *apr*-Operons

Bei der Untersuchung der genetischen Variabilität des *apr*-Operons zeigte sich, dass das *apr*-Operon für 27 der 56 untersuchten Arten nicht nachgewiesen werden konnte. Dies wiederum bedeutet, dass über die Hälfte der untersuchten Arten das *apr*-Operon besitzen (29 Arten). Eine detaillierte Auflistung für alle 107 untersuchten *Pseudomonas*-Stämme ist in Tabelle 6-20 aufgeführt.

Unter den 29 *apr*-Operon tragenden Arten konnten sechs verschiedene Operonstrukturen ermittelt werden. Eine Übersicht der sechs ermittelten *apr*-Operonstrukturen und der ihnen zugeordneten Arten ist in Tabelle 3-11 zu sehen. Zwei der sechs ermittelten *apr*-Operonstrukturen konnten jeweils nur in einer einzigen Art nachgewiesen werden: „D E F A I“ nur in *Pseudomonas aeruginosa* und „A I D E F L1 pA pB L2“ nur in *Pseudomonas protegens*. Die am häufigsten vertretene Operonstruktur war „A I D E F pA pB L2“ (12 Arten), gefolgt von „A I D E F L2“ (acht Arten). Auffallend war zudem, dass für die beiden als *Pseudomonas lundensis* identifizierten Milchisolate MG657 und MG790 (siehe Tabelle 6-20) im Gegensatz zu den anderen *Pseudomonas lundensis* Isolaten kein Lipasegen detektiert werden konnte. Die neun Isolate der Art *Pseudomonas fragi* und die 10 Isolate der Art *Pseudomonas proteolytica* zeigten hingegen innerhalb der jeweiligen Art eine einheitliche *apr*-Operonstruktur. Gleiches gilt für alle anderen Arten, von denen jeweils zwei Stämme untersucht worden waren.

Zusätzlich zu den fünf bisher bekannten Operonstrukturen der Gene des *apr*-Operons (siehe Tabelle 1-1) konnten nach Genvorhersage durch das Programm „Prodigal“ und den BLAST-Vergleichen (siehe 2.7.4) zwei weitere Operonstrukturen ermittelt werden. Die *apr*-Operonstruktur von *Pseudomonas protegens* weist ein zweites Lipasegen auf (Operonstruktur (5‘-3‘) Kurzform: A I D E F L1 pA pB L2)), was sich bereits bei der Auswahl der Referenzsequenzen (siehe 2.7.4) gezeigt hatte, wohingegen die Operonstruktur der Arten *Pseudomonas entomophila*, *Pseudomonas mossellii* und *Pseudomonas syringae* subsp. *syringae* ausgehend von den *draft*-Genomen kein Lipasegen aufweist (Operonstruktur (5‘-3‘) Kurzform: A I D E F)). Gleiches gilt, wie bereits erwähnt, für die Operonstruktur von zwei untersuchten *Pseudomonas lundensis* Stämmen.

ERGEBNISSE

Tabelle 3-11: Ermittelte *apr*-Operonstrukturen und regulationsassoziierte Gene von 29 *Pseudomonas*-Arten.

Art	Operonstruktur (5'-3') Kurzform	<i>gacS</i>	<i>gacA</i>	<i>rsmA</i>	<i>rsmE</i>	<i>rsmX</i>	<i>rsmY</i>	<i>rsmZ</i>
<i>P. aeruginosa</i> (T)	D E F A I	+	+	+	+	-	+	-
<i>P. entomophila</i> (T)	A I D E F	+	+	+	+	-	+	+
<i>P. mosselii</i> (T) <i>P. syringae</i> (T)		+	+	+	+	+	+	+
<i>P. protegens</i> (T)	A I D E F L1 pA pB L2	+	+	+	+	+	+	+
<i>P. chlororaphis subsp. chlororaphis</i> (T) <i>P. koreensis</i> (T) <i>P. lini</i> (T) <i>P. mandelii</i> (T)	A I D E F pA pB L1 L2	+	+	+	+	+	+	+
<i>P. brenneri</i> (T) <i>P. fluorescens</i> (T) <i>P. gessardii</i> (T) <i>P. libanensis</i> (T) <i>P. orientalis</i> (T) <i>P. poae</i> (T) <i>P. proteolytica</i> (T) <i>P. rhodesiae</i> (T) <i>P. lactis</i> sp. nov. (T) <i>P. paralactis</i> sp. nov. (T) <i>P. synxantha</i> (T) <i>P. trivialis</i> (T)	A I D E F pA pB L2	+	+	+	+	-	+	+
<i>P. veronii</i> (T) <i>P. grimontii</i> (T) <i>P. marginalis</i> (T) <i>P. panacis</i> (T) <i>P. deceptionensis</i> (T) <i>P. fragi</i> (T) <i>P. lundensis</i> (T)* <i>P. weihenstephanensis</i> sp. nov. (T)	A I D E F L2	+	+	+	+	-	+	+

* Nachgewiesen in acht von 10 Isolaten.

Außerdem ist in Tabelle 3-11 aufgeführt, welche der regulationsassoziierten Gene des *apr*-Operons in den *draft*-Genomen der 29 *Pseudomonas*-Arten nachgewiesen werden konnten. Diese wurden, wie unter Punkt 2.7.4 beschrieben, auf Basis ihrer Gen- und/oder Aminosäuresequenzen identifiziert.

Die Gene für die zentralen Elemente GacA/GacS sowie RsmE/RsmA konnten in allen untersuchten Arten identifiziert werden. Gleiches gilt für die regulatorische sRNA RsmY. Die beiden regulatorischen sRNAs RsmX und RsmZ hingegen konnten in sieben bzw. 28 Arten nachgewiesen werden. Außerdem wurde, wie unter Punkt 2.7.4 beschrieben, die 5'UTR von 28 verschiedenen *Pseudomonas*-Arten auf das Vorhandensein bekannter Domänen untersucht. Als Referenz zur Identifizierung der bekannten Domänen diente die DNA-Sequenz von *Pseudomonas fluorescens* DSM 50090^T. Bei den 28 *Pseudomonas*-Arten handelte es sich um 27 *Pseudomonas*-Typstämme und ein Eigenisolat der Art *Pseudomonas lundensis*, da der entsprechende Bereich im *draft*-Genom des Typstamms nicht identifiziert werden konnte. Die Ergebnisse der Analyse sind in Tabelle 3-12 dargestellt.

Tabelle 3-12: DNA-Sequenz des vermuteten Promotorbereichs des *apr*-Operons (5'-UTR vor *aprA*) 28 verschiedener *Pseudomonas*-Arten. Referenz: DNA-Sequenz von *Pseudomonas fluorescens* DSM 5090^T (Sequenz unterstrichen). Nach Burger et al. (2000): gelb markiert, homologe -35 Region; pink markiert, homologe -10 Region; hellgrün markiert, homologe Region um den vermuteten Transkriptionsstart (+1 = fett markiertes A). Türkis markiert ist die vermutete Ribosomenbindestelle mit dem darin enthaltenen zentralen RsmA/RsmE Bindemotiv GGA (ACANGGANGU) nach Lapouge et al. (2008). Rot markiert ist das Start-Codon der *aprA* Gensequenz und in grau markiert sind mögliche weitere RsmA/RsmE Bindemotive (GGA) nach Schubert et al. (2007) und Lapouge et al. (2007). Die zur Referenzsequenz homologen Bereiche in den anderen DNA-Sequenzen sind ebenfalls in den entsprechenden Farben markiert. Jeweils abwechselnd grau oder weiß hinterlegt sind die Nummern untereinander näher verwandter Arten.

Art	DNA-Sequenz des vermuteten Promotorbereichs des <i>apr</i> -Operons (5'-UTR vor <i>aprA</i>)
1	5'...TTTGTAGACGAAAGATTTCAGTTGAGTTCAGTTTCGATACGGCCCTCAAAAGAGGGGAGTGATAGGACGATCTCGCCCGCGAGGTTCCCTATCGACCCCAAGACTGATGCACCTTGCACAAAGGAGGTACGTTTATG... (aprA)...3'
2	5'...GATGTAGACGGAAGATTTCAAGTTGTTGTCAGTTTCTTACGGCCCTCAAAAGAGCGAGTGATAGGACGATCTCGCCAGCGGGTTCCCTATCGACCCAAAGACTGATGCACCTTGCACAAAGGAGGTACGTTTATG... (aprA)...3'
3	5'...GTGGTAGACGAAAGATTTCAAGTTGTTGTCAGTTTCTTACGGCCCTCAAAAGAGGTGAGTGATAGGACATCTCTCGCCCGCGAGGTTCCCTATCGAACAAAGACTGATGCACCTTGCACAAAGGAGGTACGTTTATG... (aprA)...3'
4	5'...GTGGTAGACGAAAGATTTCAAGTTGTTGTCAGTTTCTTACGGCCCTCAAAAGAGGTGAGTGATAGGACATCTCTCGCCCGCGAGGTTCCCTATCGAACAAAGACTGATGCACCTTGCACAAAGGAGGTACGTTTATG... (aprA)...3'
5	5'...GATGTAGACGAAAGATTTCAAGTTGTTGTCAGTTTCTTACGGCCCTCAAAAGAGGTGAGTGATAGGACATCTCTCGCCCGCGAGGTTCCCTATCGAACAAAGACTGATGCACCTTGCACAAAGGAGGTACGTTTATG... (aprA)...3'
6	5'...GGTGTAGACGAAAGATTTCAAGTTGTTGTCAGTTTCTTACGGCCCTCAAAAGAGGTGAGTGATAGGACATCTCTCGCCCGCGAGGTTCCCTATCGAACAAAGACTGATGCACCTTGCACAAAGGAGGTACGTTTATG... (aprA)...3'
7	5'...GATGTAGACGAAAGATTTCAAGTTGTTGTCAGTTTCTTACGGCCCTCAAAAGAGCGAGTGATAGGACGATCTCGCCAGCGGGTTCCCTATCGACCCCAAGACTGATGCACCTTGCACAAAGGAGGTACGTTTATG... (aprA)...3'
8	5'...TGTGTAGACGAAAGATTTCAAGTTGTTGTCAGTTTCTTACGGCCCTCAAAAGAGGTGAGTGATAGGACATCTCTCGCCCGCGAGGTTCCCTATCGAACAAAGACTGATGCACCTTGCACAAAGGAGGTACGTTTATG... (aprA)...3'
9	5'...GATGTAGACGAAAGATTTCAAGTTGTTGTCAGTTTCTTACGGCCCTCAAAAGAGCGGAGTGATAGGACGATCTCGCCCGCGAGGTTCCCTATCGACCCCAAGACTGATGCACCTTGCACAAAGGAGGTACGTTTATG... (aprA)...3'
10	5'...GAGGTAGACGAAAGATTTCAAGTTGTTGTCAGTTTCTTACGGCCCTCAAAAGAGCGGAGTGATAGGACGATCTCGCCCGCGAGGTTCCCTATCGACCCCAAGACTGATGCACCTTGCACAAAGGAGGTACGTTTATG... (aprA)...3'
11	5'...GATGTAGACGAAAGATTTCAAGTTGTTGTCAGTTTCTTACGGCCCTCAAAAGAGCGGAGTGATAGGACGATCTCGCCCGCGAGGTTCCCTATCGACCCCAAGACTGATGCACCTTGCACAAAGGAGGTACGTTTATG... (aprA)...3'
12	5'...GATGTAGACGAAAGATTTCAAGTTGTTGTCAGTTTCTTACGGCCCTCAAAAGAGCGGAGTGATAGGACGATCTCGCCCGCGAGGTTCCCTATCGACCCCAAGACTGATGCACCTTGCACAAAGGAGGTACGTTTATG... (aprA)...3'
13	5'...GATGTAGACGAAAGATTTCAAGTTGTTGTCAGTTTCTTACGGCCCTCAAAAGAGCGGAGTGATAGGACGATCTCGCCCGCGAGGTTCCCTATCGACCCCAAGACTGATGCACCTTGCACAAAGGAGGTACGTTTATG... (aprA)...3'

Stämme: 1, *Pseudomonas fluorescens* DSM 5090^T; 2, *Pseudomonas rhodesiae* DSM 14020^T; 3, *Pseudomonas libanensis* DSM 17149^T; 4 *Pseudomonas synxantha* DSM 18928^T; 5, *Pseudomonas lactis* sp. nov. WS4992^T; 6, *Pseudomonas paratactis* sp. nov. WS4672^T; 7, *Pseudomonas veronii* DSM 11331^T; 8, *Pseudomonas orientalis* DSM 17489^T; 9, *Pseudomonas poae* DSM 14936^T; 10, *Pseudomonas trivialis* DSM 14937^T; 11, *Pseudomonas panacis* DSM 18529^T; 12, *Pseudomonas grimontii* DSM 17515^T; 13, *Pseudomonas marginalis* DSM 13124^T.

Fortsetzung Tabelle 3-12

Art	DNA-Sequenz des vermuteten Promotorbereichs des apr-Operons (5'-UTR vor aprA)
14	5...GTGCTGGACGTCTGATTTAAATTTGTGTCAAGTTCTTTGGCCCTTCATAAGAGGCGAGTGATAGGACGGCTCTCGCCGGAGAGCGTCGCCTATCGGACAAAACACTGTTCCACTTGCACAAAGGAAGTACGTTTATG...(aprA)...3'
15	5...ATACGGACGTGTGATTTAAATTTGTGTCAAGTTCTTTGGCCCTTCATAAGAGGCGAGTGATAGGACGGCTCTCGCCAGAGCGTCATATCGGACAAAACACTGTTCCACTTGCACAAAGGAAGTACGTTTATG...(aprA)...3'
16	5...ATACGGACGTGTGATTTAAATTTGTGTCAAGTTCTTTGGCCCTTCATAAGAGGCGAGTGATAGGACGGCTCTCGCCAGAGCGTCATATCGGACAAAACACTGTTCCACTTGCACAAAGGAAGTACGTTTATG...(aprA)...3'
17	5...GTGCTGGACTAAATATTTCCAGATTGTGTCAAGTTCTTTGGCCCTTCATAAGAGGCGAGTGATAGGACGGCTCTCGCCAGAGCGTCGTTCTACTGCTAAACAGGAAGTGTGTACATG...(aprA)...3'
18	5...GTACTGGACTGGATATTTCCAGATTGTGTCAAGTTCTTTGGCCCTTCATAAGAGGCGAGTGATAGGACGGCTCTCGCCAGAGCGTCGTTCTACTGCTAAACAGGAAGTGTTTAATG...(aprA)...3'
19	5...GTGCTGGACTGAATATTTCCGAAGTGTGTCAAGTTCTTTGGCCCTTCATAAGAGGCGAGTGATAGGACGGCTCTCGCCAGAGCGTCGTTCTACTGCTAAACAGGAAGTGTGTACATG...(aprA)...3'
20	5...ATGCTGGACTAAATATTTCCAAAATGTGTCAAGTTCTTTGGCCCTTCATAAGAGGCGAGTGATAGGACGGCTCTCGCCAGAGCGTCGTTCTACTGCTAAACAGGAAGTGTGTACATG...(aprA)...3'
21	5...AATGTAGACGTTCGATTTCCGAAATGTGTCAAGTTCTTTGGCCCTTCATTGGCGGAGTGATAGGACGGCTCTCGCCAGAGTTCCATTGCTAAACAGGAAGTGTGTATG...(aprA)...3'
22	5...AATGTAGACGTTTGATTTCCGAAATGTGTCAAGTTTATAAGCCCTTCATTGGCGGAGTGATAGGACGGCTCTCGCCAGAGTTGTCGTTCCGACAAAACACTGTTCCACTTGCACAAAGGAAGTGTGTATG...(aprA)...3'
23	5...ACGCTGGACTAATGTTCAATGTTGTCAAGTTTCTTTGGCCCTTCATAAGAGGCGAGTGACAGGAGTTCTCGCCCGGTGGAGAACCCCTGTCGGACATCAACTGCTTTTGTACACAGGAAGTAACTGTCATG...(aprA)...3'
24	5...GGCTGGACAGGAAGTTCCATAATGTGTCAAGTTTCTTTGGCCCTGCATAAAGCGAGTGACAGGACGCTCTCGCCAGTTGAGAAAACCTCCTGTCGACATCAACTGCTTTTGTAAACAGGAAGTAACTGTCATG...(aprA)...3'
25	5...ACGCTAGACGACAGATTTCCAAATGTGTCAAGTTCTTTACGGCTTCATTGGCGGAGTGATAGGACGGCTCTCGCCAGAGTTGTCGCTATCTGACAAAACACTGTTCCACTTGCACAAAGGAAGTGTGTATG...(aprA)...3'
26	5...GATGTGGACGCCTGATTTCCAAATGTGTCAAGTTTCTTTGGCCCTGCTTAGGGCGAGTGATAGGACGGCTCTCGCCAGAGTTGTCGCTATCTGACAAAACACTGTTCCACTTGCACAAAGGAAGTGTGTATG...(aprA)...3'
27	5...GATGTGGACGCCTGATTTCCAAATGTGTCAAGTTCTTTGGCCCTCGGATAGGGCGAGTGATAGGACGGCTCTCGCCAGAGTTGTCGCTATCGGACAAAACACTGTTCCACTTGCACAAAGGAAGTGTGTATG...(aprA)...3'
28	5...GTGCTGGACACAAGATTTCCAGGATGTGTCAAGTTTGTTCGGAAATACGATTTTATGCTTCCAAAGCGGAGTGACGGACTCTCTCGCTACAGGGAGAGCTCGTGTACCTAACACAGCAACAAGGAAGTGTGATG...(aprA)...3'

Stämme: 14, *Pseudomonas brenneri* DSM 15294^T; 15, *Pseudomonas gessardii* DSM 17152^T; 16, *Pseudomonas proteolytica* DSM 15321^T; 17, *Pseudomonas fragi* B52^T; 18, *Pseudomonas deceptionensis* DSM 26521^T; 19, *Pseudomonas lundensis* WS5095 (MG1011); 20, *Pseudomonas weihenstephanensis* sp.nov. WS4993^T; 21, *Pseudomonas mandelii* DSM 17967^T; 22, *Pseudomonas lini* DSM 16768^T; 23, *Pseudomonas mosselii* DSM 17497^T; 24, *Pseudomonas entomophila* DSM 28517^T; 25, *Pseudomonas koreensis* DSM 16610^T; 26, *Pseudomonas protegens* DSM 19095^T; 27, *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *chlororaphis* DSM 50083^T; 28, *Pseudomonas syringae* subsp. *syringae* DSM 10604^T.

Wie aus Tabelle 3-12 hervorgeht, konnten zu allen in der Referenzsequenz von *Pseudomonas fluorescens* DSM 50090^T markierten Bereichen (-35-Region, -10-Region, Transkriptionstart, RBS, RsmE/RsmA-Bindemotiv) homologe Bereiche in den DNA-Sequenzen der diesbezüglich untersuchten Arten identifiziert werden. Die jeweiligen Bereiche unterscheiden sich mehr oder weniger stark, jedoch zeigen phylogenetisch nah verwandte Arten (siehe Tabelle 3-12, Nummern 1–10 sowie 11–13) ein nahezu identisches Muster in Bezug auf die Nukleotidsequenz in den markierten Bereichen. Die Anzahl möglicher weiterer RsmA/RsmE-Bindemotive („GGA“-Motive) variiert teilweise deutlich. Bei der Nukleotidsequenz von *Pseudomonas syringae* subsp. *syringae* DSM 10604^T (siehe Tabelle 3-12, Stamm Nummer 28) fällt außerdem auf, dass im Vergleich zu allen anderen untersuchten Nukleotidsequenzen die Anzahl der Nukleotide zwischen potentiellm Transkriptionsstart und der potentiellen Ribosomenbindestelle größer ist.

3.3.2 Untersuchung der Phylogenie des *apr*-Operons

Neben den genetischen Unterschieden im Aufbau des *apr*-Operons wurde auch die phylogenetische Verwandtschaft der Gene des *apr*-Operons untersucht. Um für die phylogenetische Untersuchung eine gemeinsame Basis zu schaffen, wurde der als konserviert angesehene Bereich (siehe 1.2.1), bestehend aus den Genen *aprA*, *aprI*, *aprD*, *aprE* und *aprF*, gewählt. Die in den *draft*-Genomen identifizierten Nukleotidsequenzen der einzelnen Gene wurden in der soeben genannten Reihenfolge konkateniert. Dabei wurden die Nukleotidsequenzen, so wie sie nach Extraktion aus dem *draft*-Genom mit anschließender Überprüfung vorlagen, aneinandergesetzt (siehe 2.7.4). Die intergenischen Bereiche wurden nicht berücksichtigt. Um die Art *Pseudomonas aeruginosa* trotz bekanntermaßen abweichender *apr*-Operonstruktur (siehe Tabelle 1-1) als Typspezies der Gattung in die phylogenetische Untersuchung miteinzubeziehen, wurden die Gene ebenfalls in der genannten Reihenfolge konkateniert. Als phylogenetischer Vergleichsmarker wurden die Nukleotidsequenzen des *rpoD*-Gens aus den Genomdaten aller 73 *apr*-Operon tragender *Pseudomonas*-Stämme (siehe Tabelle 6-20) verwendet. Die phylogenetischen Neighbor-Joining-Bäume sind entsprechend der unterschiedlich ermittelten *apr*-Operonstrukturen (siehe Tabelle 3-11) farblich hinterlegt. Abbildung 3-24 zeigt die Gegenüberstellung zweier phylogenetischer Neighbor-Joining-Bäume, basierend auf *rpoD*-Gensequenzen bzw. basierend auf den konkatenierten Nukleotidsequenzen der Gene *aprA*, *aprI*, *aprD*, *aprE* und *aprF*. Daraus geht hervor, dass die phylogenetischen Bäume der Abbildungsteile A und B eine vergleichbare Phylogenie zeigen. Nah verwandte Arten liegen in beiden phylogenetischen Bäumen in deutlicher Nähe zueinander und weisen auch meist die gleiche Operonstruktur auf. Die einzige Ausnahme bildet dabei in beiden phylogenetischen Bäumen die Art *Pseudomonas veronii*, die eine andere Operonstruktur aufweist als ihre phylogenetisch am nächsten verwandten Arten.

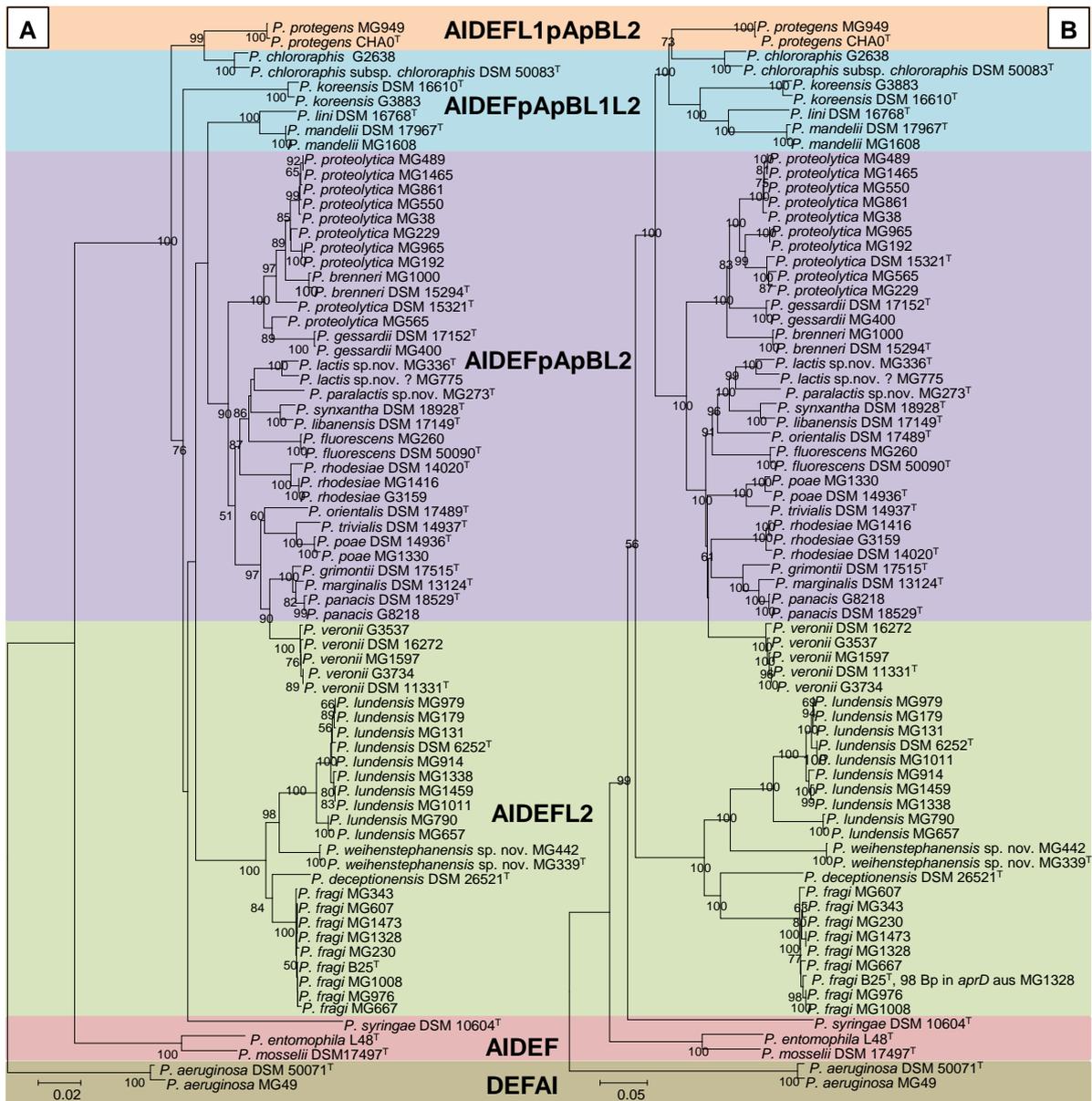


Abbildung 3-24: Gegenüberstellung phylogenetischer Neighbor-Joining-Bäume 73 verschiedener *Pseudomonas*-Stämme. *P.* = *Pseudomonas*. **Abbildungsteil A** basiert auf 73 *rpoD*-Gensequenzen. Dabei flossen jeweils 1844 Nukleotide in die Berechnung mit ein. Bootstrap-Wert >50 %, basierend auf 1000 Wiederholungen, sind an den Knotenpunkten angegeben. Der eingezeichnete Balken entspricht der Anzahl von 0,02 Nukleotidsubstitutionen pro Position. **Abbildungsteil B** basiert auf 73, jeweils in der Reihenfolge *aprA*, *aprI*, *aprD*, *aprE* und *aprF* konkatenierter Gensequenzen. Dabei flossen jeweils 6025 Nukleotide in die Berechnung mit ein. Bootstrap-Wert >50 %, basierend auf 1000 Wiederholungen, sind an den Knotenpunkten angegeben. Der eingezeichnete Balken entspricht der Anzahl von 0,05 Nukleotidsubstitutionen pro Position. Jeweils mit der gleichen Farbe hinterlegt sind *Pseudomonas*-Arten und -Stämme, die die gleiche *apr*-Operonstruktur besitzen. Die *apr*-Operon-Kurzform gemäß Tabelle 3-11 ist mittig angegeben.

Um die Verteilung der verschiedenen Strukturen des *apr*-Operons innerhalb der Gattung *Pseudomonas* besser veranschaulichen zu können, wurden diese im zuvor gezeigten phylogenetischen Neighbor-Joining-Baum, basierend auf 145 partiellen *rpoD*-Gensequenzen von *Pseudomonas*-Typstämmen, markiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3-25 (phylogenetischer Baum analog zu Abbildung 3-22) und Abbildung 3-26 (phylogenetischer Baum analog zu Abbildung 3-23) dargestellt.

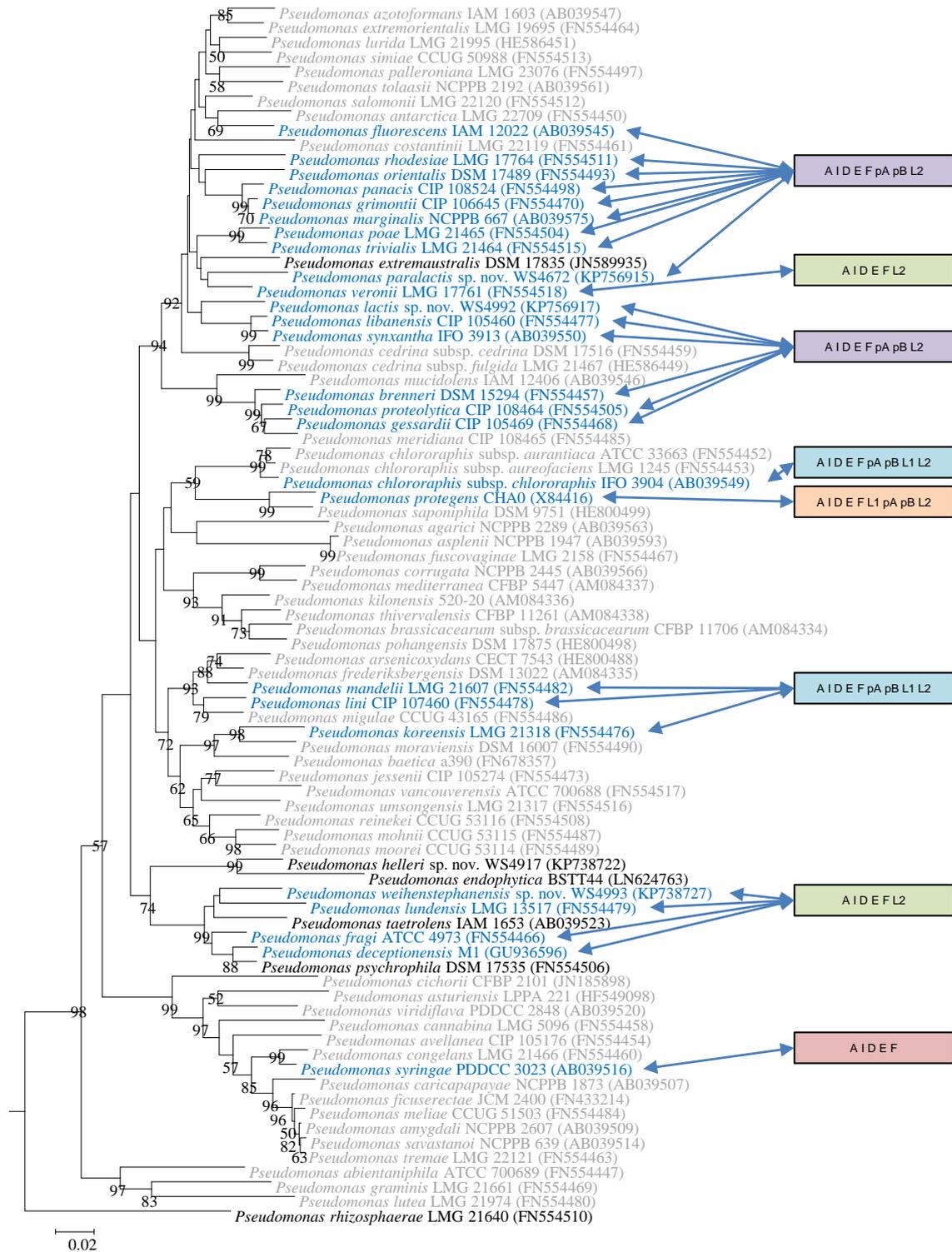


Abbildung 3-26: Teilbaum der in Abbildung 3-25 zusammengefassten 83 *Pseudomonas*-Arten. Der eingezeichnete Balken entspricht der Anzahl von 0,02 Nukleotidsubstitutionen pro Position. Alle nicht untersuchten Arten sind in grau beschriftet, in schwarz beschriftet sind untersuchte Arten, die kein *apr*-Operon besitzen, und mit blauer Schrift hervorgehoben sind Arten, die ein *apr*-Operon besitzen. Die ermittelte Operonstruktur ist in Kurzform entsprechend angegeben.

Wie auf den ersten Blick zu erkennen ist, liegt eine sehr heterogene Verteilung des *apr*-Operons innerhalb der Gattung vor. Die überwiegende Anzahl der *apr*-Operon tragenden Arten ist in Abbildung 3-26 zu sehen (Teilbaum von 83 in Abbildung 3-25

zusammengefasster *Pseudomonas*-Arten). Von 24 untersuchten Arten in Abbildung 3-25 tragen nur 3 das *apr*-Operon, in Abbildung 3-26 sind es hingegen 26 von 31 untersuchten Arten. Trotz Einbeziehung von insgesamt 72 weiterer *Pseudomonas*-Arten zeigte sich in den Abbildungen 3-25 und 3-26 eine zu Abbildung 3-24 vergleichbare phylogenetische Verteilung der unterschiedlichen *apr*-Operonstrukturen. Die sich im Vergleich zu Abbildung 3-24 in Abbildung 3-26 abwechselnden Operonstrukturen sind auf die unterschiedliche Drehung der einzelnen Äste um die Horizontalachsen zurückzuführen.

3.4 Beschreibung neuer *Pseudomonas*-Arten

Ausgehend von den unter den Punkten 3.1 und 3.2 vorgestellten Ergebnissen zur Biodiversität und der zugehörigen enzymatischen Aktivität von Rohmilch- und Milchhalbfabrikatisolaten kommt der Gattung *Pseudomonas* eine besondere Bedeutung zu. Sie war die am häufigsten isolierte Gattung mit der größten Biodiversität und die überwiegende Anzahl der Arten zeigten auch deutlich proteolytische und lipolytische Aktivität. Für vier der 27 potentiellen neuen Arten wurden in einem polyphasischen Ansatz Untersuchungen zu deren taxonomischer Einordnung durchgeführt.

Ausgewählt wurden die vier Arten anhand ihrer absoluten Häufigkeit und ihrer lipolytischen und proteolytischen Aktivitätsausprägung. Bei den Arten handelte (siehe Tabelle 3-8, Abbildung 3-14 und Abbildung 6-6) es sich um die häufige, aber enzymatisch nicht aktive Art *Pseudomonas* sp. nov. (3) (*Pseudomonas helleri* sp. nov.) und die enzymatisch stark aktive Art *Pseudomonas* sp. nov. (7) (*Pseudomonas weihenstephanensis* sp. nov.) sowie um die häufigste und enzymatisch stark aktive Art *Pseudomonas* sp. nov. (1) (*Pseudomonas lactis* sp. nov.) und die mit ihr sehr nah verwandte Art *Pseudomonas* sp. nov. (16) (*Pseudomonas paralactis* sp. nov.). Da die Arten *Pseudomonas helleri* sp. nov., *Pseudomonas weihenstephanensis* sp. nov. und *Pseudomonas lactis* sp. nov. aus verschiedenen Proben isoliert werden konnten, wurden Isolate aus mehreren Proben in die Analysen miteinbezogen. Für die Art *Pseudomonas helleri* sp. nov. wurden die Stämme WS4917^T, WS4995, WS4999, WS5001 und WS5002 untersucht und für die Art *Pseudomonas weihenstephanensis* sp. nov. die Stämme WS4993^T und WS4994. Die Stämme WS4992^T, WS4997 und WS5000 dienten der Beschreibung der Art *Pseudomonas lactis* sp. nov. Von der Art *Pseudomonas paralactis* sp. nov. waren insgesamt nur zwei Isolate isoliert worden (WS4672^T und WS4998), diese wurden beide zur Artbeschreibung verwendet.

Von allen gewählten Referenzstämmen und von den Stämmen WS4917^T, WS4995, WS4993^T, WS4994, WS4992^T und WS4672^T wurden außerdem im Rahmen dieser Arbeit die Genome komplett sequenziert (*draft*-Genomsequenzen) und veröffentlicht. Einzig das Genom des Stamms *Pseudomonas fragi* DSM 3456^T wurde nicht sequenziert, da das Genom des Typstamms *Pseudomonas fragi* B25^T bereits öffentlich hinterlegt war, sodass dieses für sämtliche Analysen verwendet wurde. Eine Auflistung der einzelnen GenBank/EMBL/DDBJ Accession-Nummern der *draft*-Genome findet sich in Tabelle 6-2 und unter Punkt 2.2.3.

Für den polyphasischen Ansatz wurden genetische, phylogenetische, chemotaxonomische, physiologische und biochemische Methoden eingesetzt. Die Ergebnisse sind im Nachfolgenden aufgeführt, jeweils abwechselnd für die gemeinsam beschriebenen Arten *Pseudomonas helleri* sp. nov. und *Pseudomonas weihenstephanensis* sp. nov. sowie für die gemeinsam beschriebenen Arten *Pseudomonas lactis* sp. nov. und *Pseudomonas paralactis* sp. nov.

3.4.1 Genetische und phylogenetische Analysen

Die genetische und phylogenetische Position der 12 Stämme der vier neuen *Pseudomonas*-Arten wurde zunächst auf Basis fast vollständiger 16S-rRNA- und partieller *rpoD*-Gensequenzen ermittelt. Die Gensequenzen wurden bei der Genbank®-Datenbank von NCBI veröffentlicht. Eine Auflistung der Stämme, Gene und korrespondierenden GenBank/EMBL/DDBJ-Accession-Nummern der Gensequenzen ist in Tabelle 6-19 zu finden. Neben den phylogenetischen Einzelgen-Sequenzanalysen wurden auch Multi-Locus-Sequenz-Analysen (MLSA) und ANIb-Vergleiche durchgeführt, um die genetische und phylogenetische Position der vier neuen Arten zu bestimmen (siehe 2.7.2. und 2.7.3).

***Pseudomonas helleri* sp. nov. und *Pseudomonas weihenstephanensis* sp. nov.**

Beim paarweisen Vergleich der partiellen *rpoD*-Nukleotidsequenzen zeigten die Stämme WS4917^T, WS4995, WS4999, WS5001 und WS5002 eine Ähnlichkeit von 98,0–99,1 %, die Ähnlichkeit der Stämme WS4993^T und WS4994 lag bei 99,5 %. Die Ähnlichkeit der partiellen *rpoD*-Gensequenzen der Stämme WS4917^T und WS4993^T lag bei 86,6 %. Die Stämme WS4917^T, WS4995, WS4999, WS5001 und WS5002 zeigten im paarweisen Vergleich mit den *rpoD*-Gensequenzen aus öffentlichen Datenbanken mit 90,9 % bis 91,7 % die größte Ähnlichkeit zum Typstamm *Pseudomonas endophytica* BSTT44^T, gefolgt von einer Ähnlichkeit von etwa 88 % zu den Typstämmen *Pseudomonas fragi* ATCC 4973^T, *Pseudomonas lini* CIP 107460^T, *Pseudomonas mandelii* LMG 21607^T und *Pseudomonas psychrophila* DSM 17535^T. Die Stämme WS4993^T und WS4994 zeigten die größte *rpoD*-Gensequenzähnlichkeit (etwa 94 % bis 95 %) zu den Typstämmen *Pseudomonas deceptionensis* M1^T, *Pseudomonas fragi* ATCC 4973^T und *Pseudomonas psychrophila* DSM 17535^T, gefolgt von einer Ähnlichkeit von etwa 92 % bis 93 % zu den Typstämmen *Pseudomonas lundensis* LMG 13517^T und *Pseudomonas taetrolens* IAM 1653^T. Des Weiteren zeigten die Stämme WS4917^T, WS4995, WS4999, WS5001 und WS5002 sowie WS4993^T und WS4994 auf Basis der fast vollständigen 16S-rRNA-Gensequenzen mit einer Übereinstimmung von 99,7 % bis 98,7 % die größte Ähnlichkeit zu den Typstämmen *Pseudomonas deceptionensis* M1^T, *Pseudomonas endophytica* BSTT44^T, *Pseudomonas fragi* ATCC 4973^T, *Pseudomonas lundensis* ATCC 49968^T und *Pseudomonas psychrophila* E-3^T.

In der nachfolgenden Abbildung 3-27 ist die phylogenetische Position der sieben Stämme der beiden neuen Arten basierend auf partiellen *rpoD*-Gensequenzen dargestellt, Abbildung 3-28 zeigt die phylogenetische Position der sieben Stämme auf Basis fast vollständiger 16S-rRNA-Gensequenzen.

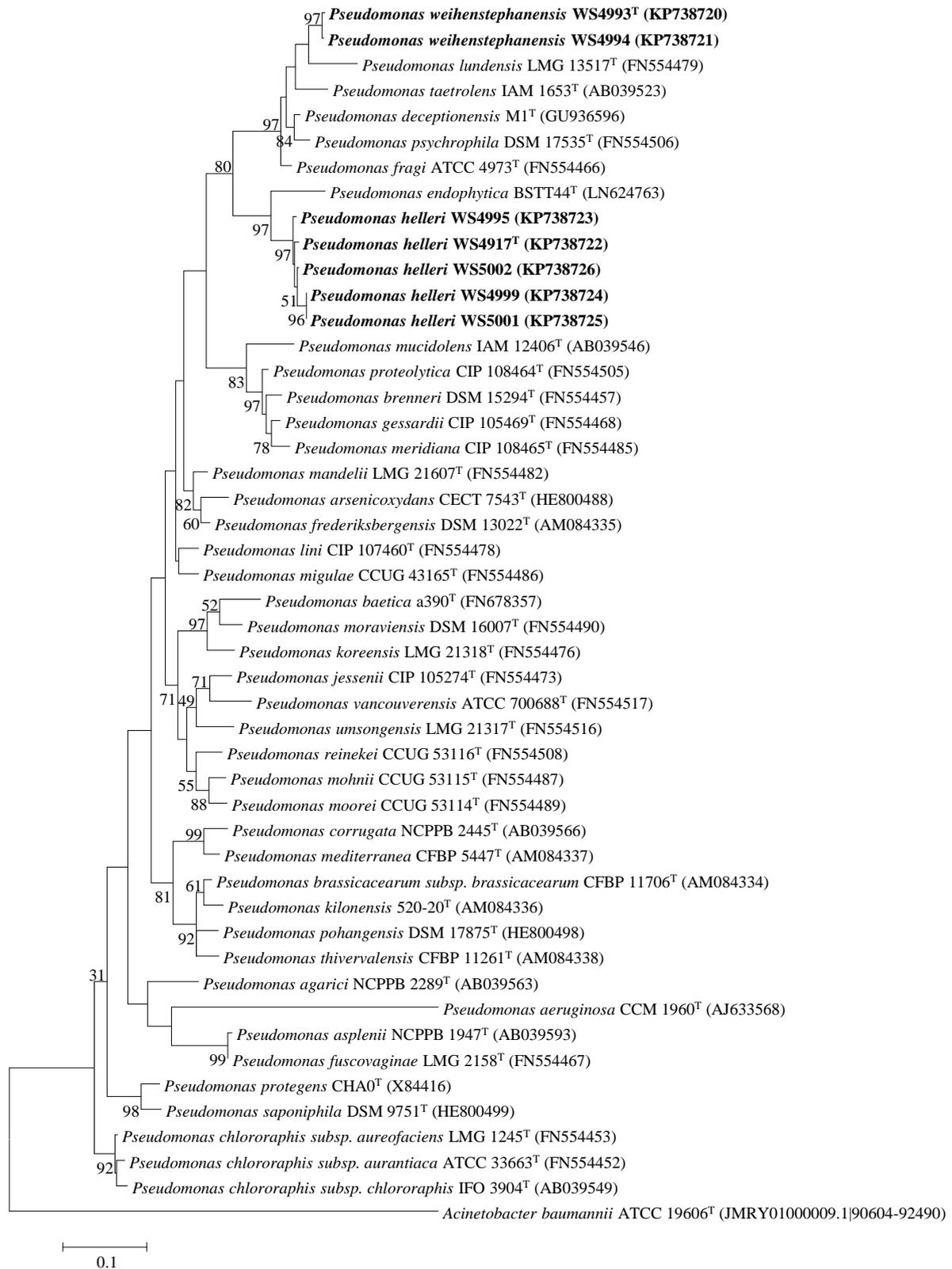


Abbildung 3-27: Phylogenetischer Maximum-Likelihood-Baum, basierend auf 48 partiellen *rpoD*-Gensequenzen. Dabei flossen jeweils 643 Nukleotidpositionen pro Sequenz in die Berechnung mit ein. Der Baum spiegelt die phylogenetische Position der fünf Stämme der Art *Pseudomonas helleri* (WS4917^T, WS4995, WS4999, WS5001 und WS5002), der zwei Stämme der Art *Pseudomonas weihenstephanensis* (WS4993^T und WS4994) und den am nächsten verwandten *Pseudomonas*-Arten wider. Bootstrap-Wert >50 %, basierend auf 1000 Wiederholungen, sind an den Knotenpunkten angegeben. Die *rpoD*-Gensequenz von *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606^T diente als Outgroup. Der eingezeichnete Balken entspricht der Anzahl von 0,1 Nukleotidsubstitutionen pro Position.

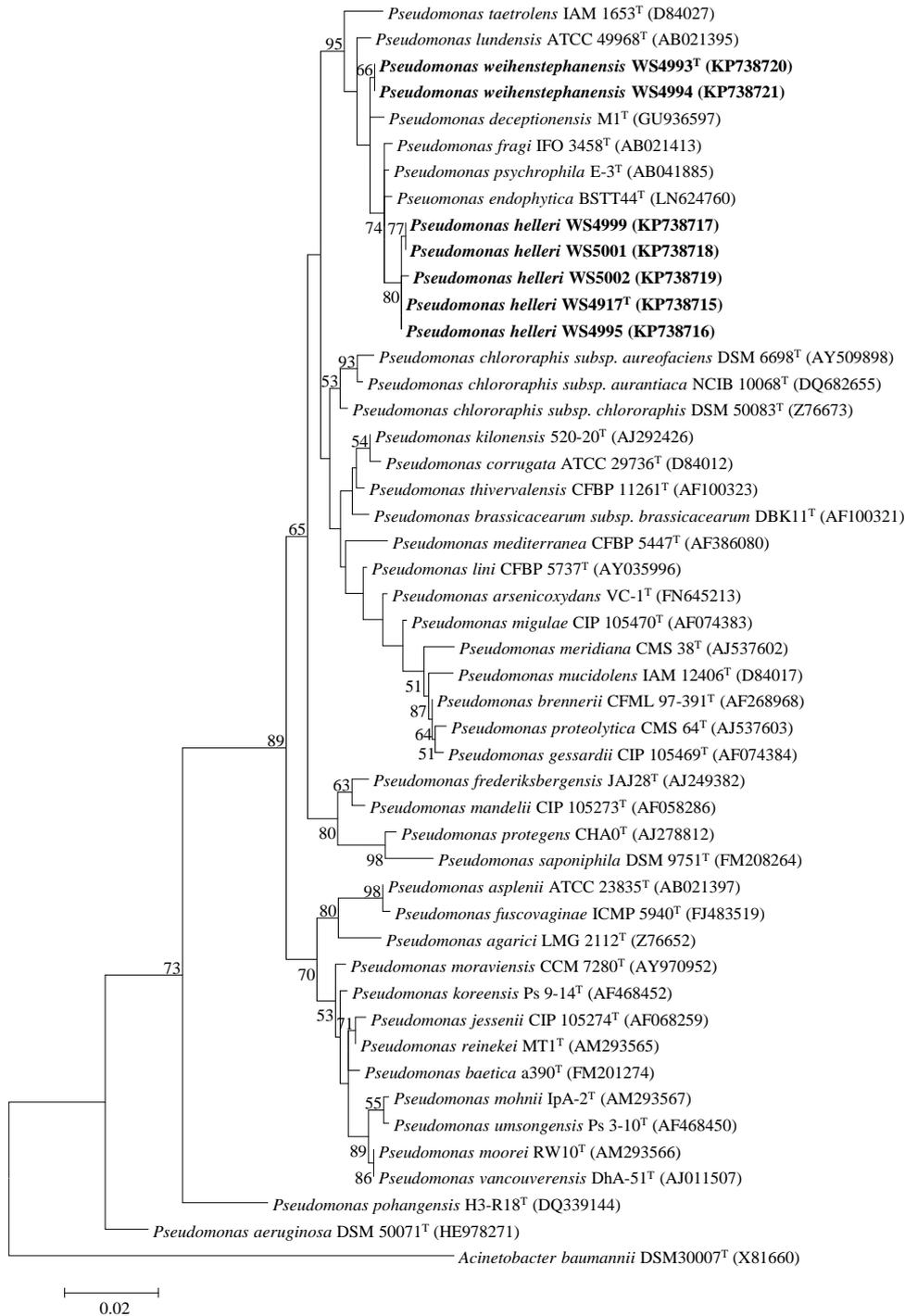


Abbildung 3-28: Phylogenetischer Maximum-Likelihood-Baum, basierend auf 48 fast vollständigen 16S-rRNA-Gensequenzen. Dabei flossen jeweils 1409 Nukleotidpositionen pro Sequenz in die Berechnung mit ein. Der Baum spiegelt die phylogenetische Position der fünf Stämme der Art *Pseudomonas helleri* (WS4917^T, WS4995, WS4999, WS5001 und WS5002), der zwei Stämme der Art *Pseudomonas weihenstephanensis* (WS4993^T und WS4994) und den am nächsten verwandten *Pseudomonas*-Arten wider. Bootstrap-Wert >50 %, basierend auf 1000 Wiederholungen, sind an den Knotenpunkten angegeben. Die 16S-rRNA-Gensequenz von *Acinetobacter baumannii* DSM 30007^T diente als Outgroup. Der eingezeichnete Balken entspricht der Anzahl von 0,02 Nukleotidsubstitutionen pro Position.

In beiden phylogenetischen Bäumen (siehe Abbildung 3-27 und Abbildung 3-28) zeigte sich, dass die beiden Stammgruppen WS4917^T, WS4995, WS4999, WS5001 und WS5002 sowie WS4993^T und WS4994 zwei eigenständige Gruppen bildeten. Diese waren gleichzeitig Teil einer größeren Gruppe, bestehend aus den Arten *Pseudomonas deceptionensis*, *Pseudomonas endophytica*, *Pseudomonas fragi*, *Pseudomonas lundensis*, *Pseudomonas psychrophila* und *Pseudomonas taetrolens*. Eine deutliche Abgrenzung jeweils zweier repräsentativer Stämme der beiden neuen Arten von den Referenzstämmen zeigte sich auch in der Multi-Locus-Sequenz-Analyse (siehe 2.7.2). Abbildung 3-29 zeigt einen phylogenetischen Neighbor-Joining-Baum, basierend auf den partiellen, konkatenierten Nukleotidsequenzen der 16S-rRNA-, *gyrB*-, *rpoD*- und *rpoB*-Gene.

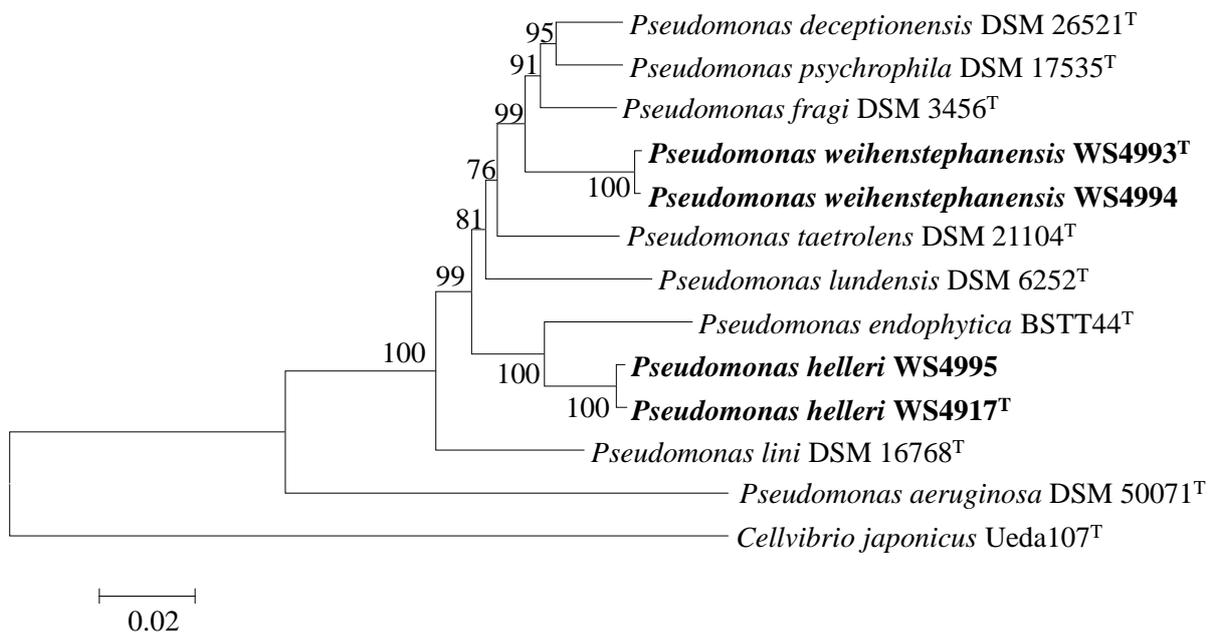


Abbildung 3-29: Phylogenetischer Neighbor-Joining-Baum, basierend auf partiellen, konkatenierten Nukleotidsequenzen der 16S-rRNA-, *gyrB*-, *rpoD*- und *rpoB*-Gene. Dabei flossen jeweils 3552 Nukleotidpositionen pro Sequenz in die Berechnung mit ein. Der Baum spiegelt die phylogenetische Position der Stämme WS4917^T und WS4995 der Art *Pseudomonas helleri*, der Stämme WS4993^T und WS4994 der Art *Pseudomonas weihenstephanensis* und den am nächsten verwandten Referenzstämmen wider. Bootstrap-Wert >50 %, basierend auf 1000 Wiederholungen, sind an den Knotenpunkten angegeben. Die partiellen, konkatenierten Gensequenzen von *Cellvibrio japonicus* Ueda107^T dienen als Outgroup. Der eingezeichnete Balken entspricht der Anzahl von 0,02 Nukleotidsubstitutionen pro Position.

Die Stämme der beiden neuen Arten bildeten in dem phylogenetischen MLSA-Baum zwei eigenständige Gruppen, was durch die Bootstrap-Werte von 99–100 % an den Knotenpunkten untermauert wurde.

Der *draft*-Genomvergleich (ANIb) zwischen den Stämmen WS4917^T, WS4995, WS4993^T und WS4994 und den acht gewählten Referenzstämmen führte zu einem vergleichbaren Ergebnis. Die ermittelten ANIb-Werte sind in Tabelle 3-13 dargestellt. Die Stämme WS4917^T und WS4995 bildeten eine eigene Gruppe (ANIb = 97,3 %) und die Stämme WS4993^T und WS4994 ebenfalls (ANIb = 99,2 %), wobei die beiden ersteren zu den beiden letztgenannten

ERGEBNISSE

jeweils einen ANIb-Wert von unter 82 % aufwiesen. Die Ähnlichkeit der Stämme der beiden neuen Arten zu den Referenzstämmen lag in allen Fällen unter 85 %.

Tabelle 3-13: ANIb-Ähnlichkeit (%) zwischen allen sequenzierten Stämmen der beiden neuen Arten *Pseudomonas helleri* und *Pseudomonas weihenstephanensis* und den Referenzstämmen. Intraspezies-ANIb-Werte der neuen Arten sind fett markiert. Die Accession-Nummern der Genome sind in Klammern angegeben. Stämme: 1, *Pseudomonas helleri* WS4917^T (JYLD00000000); 2, *Pseudomonas helleri* WS4995 (JYLE00000000); 3, *Pseudomonas weihenstephanensis* WS4993^T (JYLF00000000); 4, *Pseudomonas weihenstephanensis* WS4994 (JYLG00000000); 5, *Pseudomonas endophytica* BSTT44^T (LLWH00000000); 6, *Pseudomonas deceptionensis* DSM 26521^T (JYKX00000000); 7, *Pseudomonas fragi* DSM 3456^T (AHZX00000000); 8, *Pseudomonas lini* DSM 16768^T (JYLB00000000); 9, *Pseudomonas lundensis* DSM 6252^T (JYKY00000000); 10, *Pseudomonas psychrophila* DSM 17535^T (JYKZ00000000); 11, *Pseudomonas taetrolens* DSM 21104^T (JYLA00000000); 12, *Pseudomonas aeruginosa* DSM 50071^T (JYLC00000000).

ANIb	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	97.2	81.8	81.9	85.0	83.2	83.2	78.5	81.5	82.5	82.0	73.6
2		81.8	81.7	85.0	83.2	83.3	78.4	81.4	82.7	82.1	73.5
3			99.2	80.2	83.0	82.7	78.2	84.3	82.5	82.0	73.0
4				80.2	83.1	82.8	78.2	84.2	82.5	82.0	73.1
5					81.4	81.0	77.0	79.8	81.0	80.5	71.9
6						86.8	79.3	82.6	88.2	84.1	74.0
7							79.3	82.6	86.7	83.7	74.4
8								78.6	78.7	78.6	74.7
9									82.0	81.9	73.5
10										83.5	73.4
11											73.4

Auch auf Basis der Genomgröße, der Anzahl der Gene und der Anzahl der proteincodierenden Gene unterschieden sich die Referenzstämmen und die Typstämmen der beiden neuen Arten. Eine Gegenüberstellung dieser und weiterer differenzierender Merkmale ist in Tabelle 4-2 (siehe 4.4.1) zu sehen.

***Pseudomonas lactis* sp. nov. und *Pseudomonas paralactis* sp. nov.**

Die partiellen *rpoD*-Gensequenzen der Stämme WS4992^T, WS4997 und WS5000 zeigten im paarweisen Vergleich eine Ähnlichkeit von 98,2 % bis 98,3 %, die Ähnlichkeit der Stämme WS4672^T und WS4998 lag bei 100 %. Die Ähnlichkeit der partiellen *rpoD*-Gensequenzen der Stämme WS4672^T und WS4992^T lag bei 91,2 %. Die Stämme WS4992^T, WS4997 und WS5000 sowie auch die Stämme WS4672^T und WS4998 zeigten im paarweisen Vergleich mit den *rpoD*-Gensequenzen aus öffentlichen Datenbanken mit 90,1 % bis 93,6 % die größte Ähnlichkeit zu den Typstämmen *Pseudomonas extremorientalis* LMG 19695^T, *Pseudomonas libanensis* CIP 105460^T, *Pseudomonas lurida* P513/18^T, *Pseudomonas orientalis* DSM 17489^T, *Pseudomonas poae* LMG 21465^T, *Pseudomonas salomonii* LMG 22120^T, *Pseudomonas simiae* CCUG 50588^T, *Pseudomonas synxantha* DSM 18928^T, *Pseudomonas trivialis* LMG 21464^T und *Pseudomonas veronii* LMG 17761^T. Auf Basis der fast vollständigen 16S-rRNA-Gensequenzen war die Ähnlichkeit der Stämme WS4992^T, WS4997 und WS5000 sowie auch der Stämme WS4672^T und WS4998 mit 98,6 % bis 99,6 % zu den Typstämmen *Pseudomonas azotoformans* NBRC 12693^T, *Pseudomonas cedrina* subsp. *cedrina* CIP 105541^T, *Pseudomonas cedrina* subsp. *fulgida* DSM 14938^T, *Pseudomonas gessardii* CIP 105469^T, *Pseudomonas libanensis* CIP 105460^T, *Pseudomonas mucidolens* IAM 12406^T, *Pseudomonas orientalis* CFML 96-170^T, *Pseudomonas poae* DSM 14936^T, *Pseudomonas synxantha* IAM 12356^T, *Pseudomonas trivialis* LMG 21464^T und *Pseudomonas veronii* CIP 104663^T am größten.

In der nachfolgenden Abbildung 3-30 ist die phylogenetische Position der fünf Stämme der beiden neuen Arten basierend auf partiellen *rpoD*-Gensequenzen dargestellt, Abbildung 3-31 zeigt die phylogenetische Position der fünf Stämme auf Basis fast vollständiger 16S-rRNA-Gensequenzen.

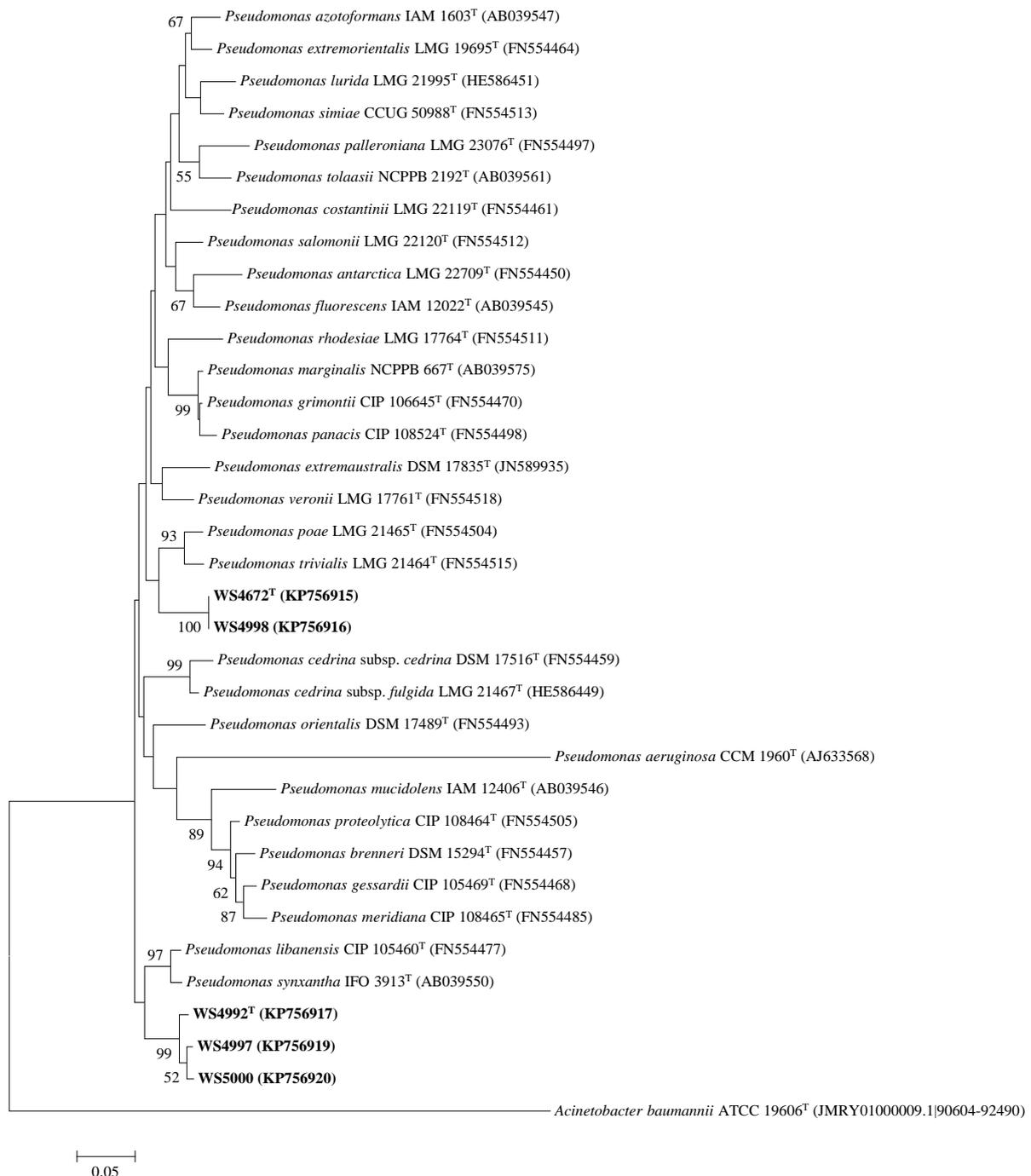


Abbildung 3-30: Phylogenetischer Maximum-Likelihood-Baum, basierend auf 35 partiellen *rpoD*-Gensequenzen. Dabei flossen jeweils 671 Nukleotidpositionen pro Sequenz in die Berechnung mit ein. Der Baum spiegelt die phylogenetische Position der drei Stämme der Art *Pseudomonas lactis* sp. nov. (WS4992^T, WS4997 und WS5000), der zwei Stämme der Art *Pseudomonas paralactis* sp. nov. (WS4672^T und WS4998) und den am nächsten verwandten *Pseudomonas*-Arten wider. Bootstrap-Wert >50 %, basierend auf 1000 Wiederholungen, sind an den Knotenpunkten angegeben. Die *rpoD*-Gensequenz von *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606^T diente als Outgroup. Der eingezeichnete Balken entspricht der Anzahl von 0,05 Nukleotidsubstitutionen pro Position.

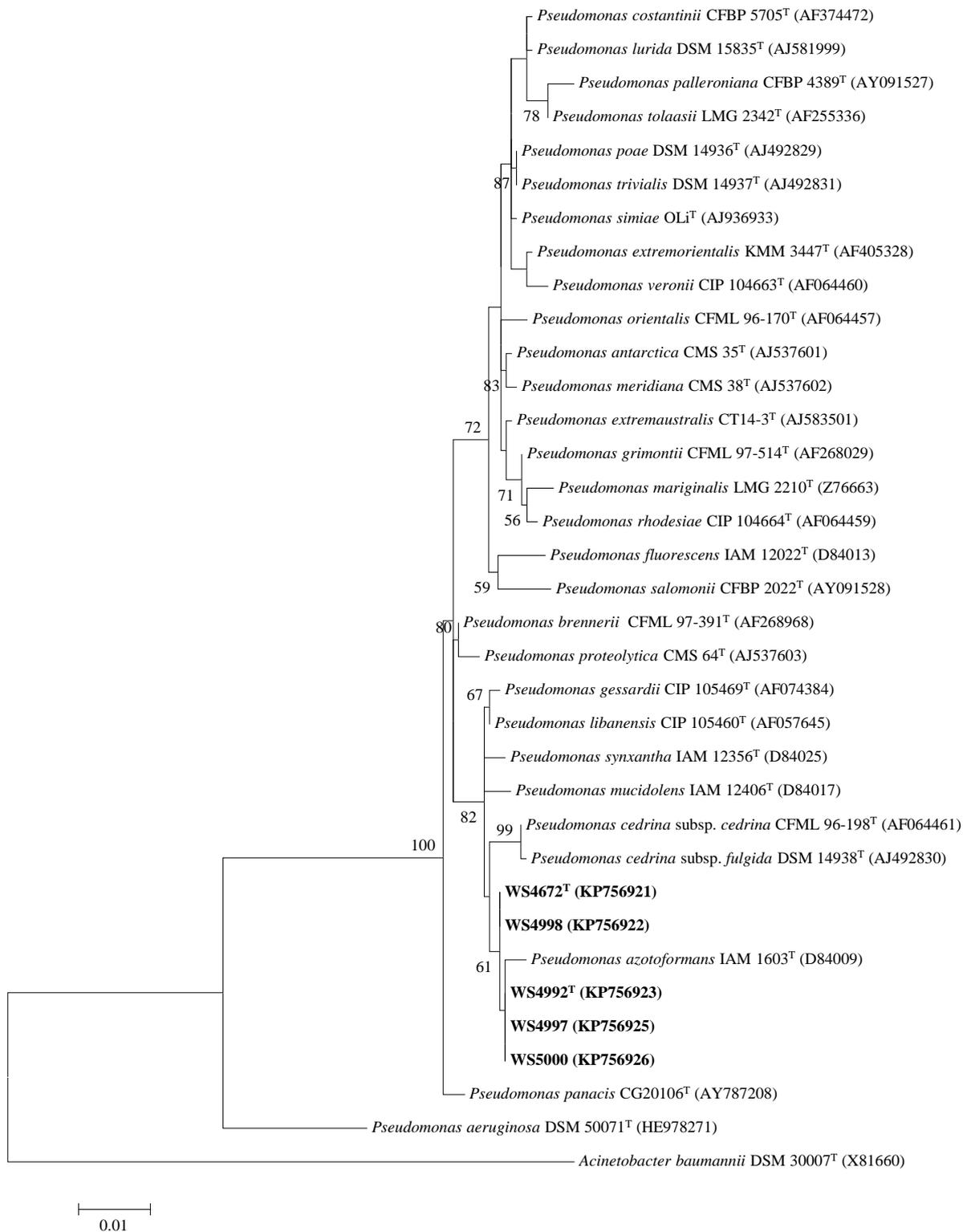


Abbildung 3-31: Phylogenetischer Maximum-Likelihood-Baum, basierend auf 35 fast vollständigen 16S-rRNA-Gensequenzen. Dabei flossen jeweils 1380 Nukleotidpositionen pro Sequenz in die Berechnung mit ein. Der Baum spiegelt die phylogenetische Position der drei Stämme der Art *Pseudomonas lactis* sp. nov. (WS4992^T, WS4997 und WS5000), der zwei Stämme der Art *Pseudomonas paralactis* sp. nov. (WS4672^T und WS4998) und den am nächsten verwandten *Pseudomonas*-Arten wieder. Bootstrap-Wert >50 %, basierend auf 1000 Wiederholungen, sind an den Knotenpunkten angegeben. Die 16S-rRNA-Gensequenz von *Acinetobacter baumannii* DSM 30007^T diente als Outgroup. Der eingezeichnete Balken entspricht der Anzahl von 0,01 Nukleotidsubstitutionen pro Position.

Aus dem phylogenetischen Baum, basierend auf den partiellen *rpoD*-Gensequenzen (siehe Abbildung 3-30), ging hervor, dass die beiden Stammgruppen WS4992^T, WS4997 und WS5000 sowie WS4672^T und WS4998 zwei eigenständige Gruppen bildeten. Dabei waren die Stämme WS4992^T, WS4997 und WS5000 phylogenetisch am nächsten verwandt zu den Arten *Pseudomonas libanensis* und *Pseudomonas synxantha*. Bei den Stämmen WS4672^T und WS4998 waren es die Arten *Pseudomonas poae* und *Pseudomonas trivialis*. Ein etwas anderes Bild zeigte sich bei der phylogenetischen Analyse, basierend auf den fast vollständigen 16S-rRNA-Gensequenzen (siehe Abbildung 3-31). Die fünf Stämme WS4992^T, WS4997, WS5000, WS4672^T und WS4998 bildeten gemeinsam mit den Arten *Pseudomonas azotoformans*, *Pseudomonas cedrina* subsp. *cedrina*, *Pseudomonas cedrina* subsp. *fulgida*, *Pseudomonas gessardii*, *Pseudomonas libanensis*, *Pseudomonas synxantha* und *Pseudomonas mudicolens* eine phylogenetisch sehr eng miteinander verwandte Gruppe. Dabei war unter den Stämmen der beiden neuen Arten eine vergleichbare Abgrenzung in zwei eigenständige Gruppen zu erkennen, wie sie auch unter den verwendeten Typstämmen zu finden war.

Um die Phylogenie der beiden neuen Arten differenzierter zu betrachten, wurde eine Multi-Locus-Sequenz-Analyse mit den vorgeschlagenen Typstämmen der beiden neuen Arten und den gewählten Referenzstämmen durchgeführt. Abbildung 3-32 zeigt einen phylogenetischen Neighbor-Joining-Baum, basierend auf den partiellen, konkatenierten Sequenzen der 16S-rRNA-, *gyrB*-, *rpoD*- und *rpoB*-Gene.

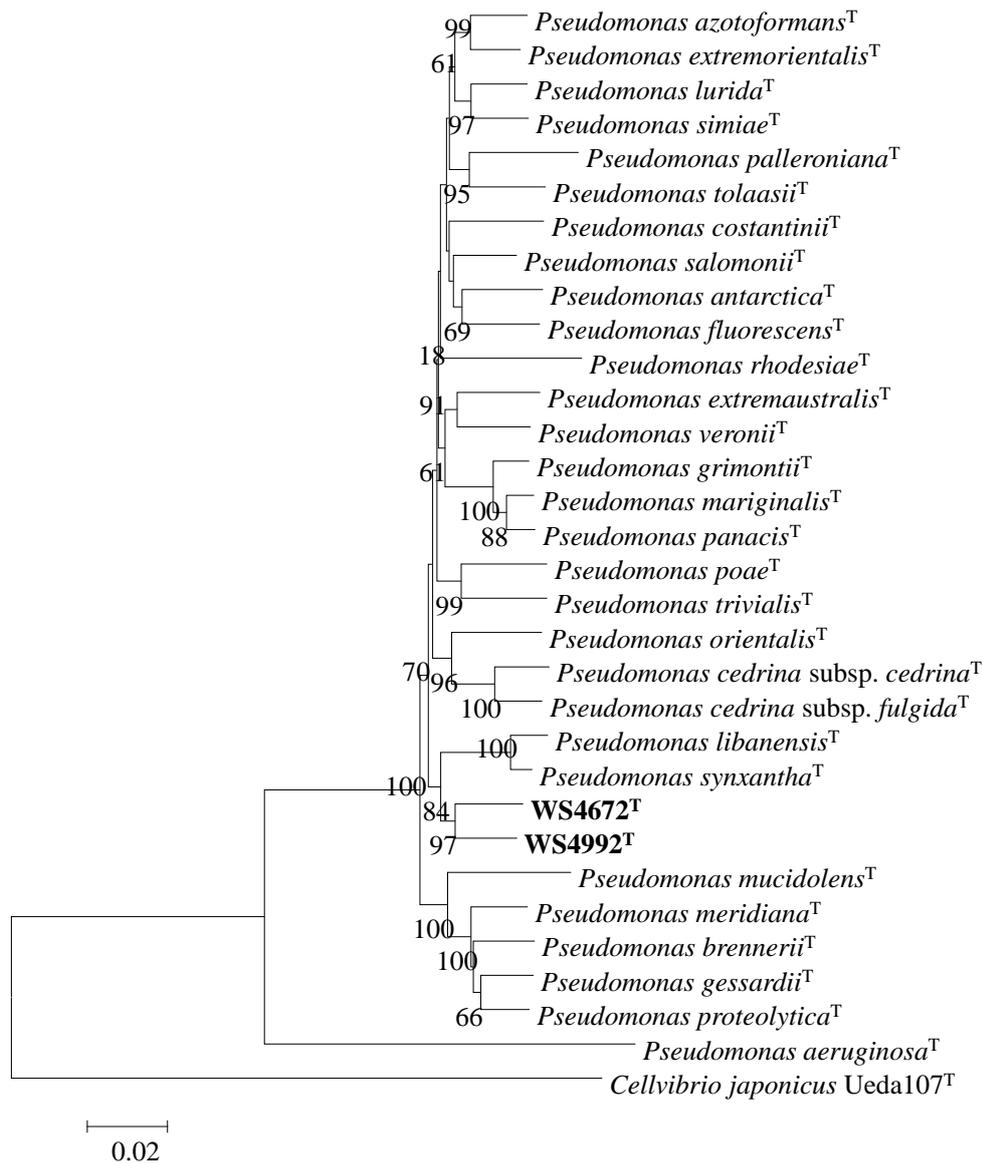


Abbildung 3-32: Phylogenetischer Neighbor-Joining-Baum, basierend auf 32 partiellen, konkatenierten Nukleotidsequenzen der 16S-rRNA-, *gyrB*-, *rpoD*- und *rpoB*-Gene. Dabei flossen jeweils 3635 Nukleotidpositionen pro Sequenz in die Berechnung mit ein. Der Baum spiegelt die phylogenetische Position der Arten *Pseudomonas lactis* sp. nov. (WS4992^T), *Pseudomonas paralactis* sp. nov. (WS4672^T) und den am nächsten verwandten Arten wider. Bootstrap-Wert >50 %, basierend auf 1000 Wiederholungen, sind an den Knotenpunkten angegeben. Die partiellen, konkatenierten Gensequenzen von *Cellvibrio japonicus* Ueda107^T dienen als Outgroup. Der eingezeichnete Balken entspricht der Anzahl von 0,02 Nukleotidsubstitutionen pro Position.

Die vorgeschlagenen Typstämme der Arten *Pseudomonas lactis* sp. nov. (WS4992^T) und *Pseudomonas paralactis* sp. nov. (WS4672^T) bildeten in dem phylogenetischen MLSA-Baum zwei eigenständige Gruppen. Die phylogenetische Abgrenzung konnte durch die Bootstrap-Werte von 84 % bis 97 % an den Knotenpunkten bestätigt werden. Diese waren damit teilweise sogar höher als die Bootstrap-Werte unter den verwendeten Referenzstämmen.

ERGEBNISSE

Der Vergleich der *draft*-Genomsequenzen (ANIb) zwischen den Stämmen WS4992^T und WS4672^T sowie den aufgrund ihrer genetischen oder phylogenetischen Ähnlichkeit ausgewählten Referenzstämmen führte zu einem sehr deutlichen Ergebnis. Die ermittelten ANIb-Werte zwischen den 12 Stämmen sind in Tabelle 3-14 dargestellt.

Tabelle 3-14: ANIb-Ähnlichkeit (%) zwischen den Typstämmen der beiden neuen Arten *Pseudomonas lactis* sp. nov. und *Pseudomonas paralactis* sp. nov. und den gewählten Referenzstämmen. Die Accession-Nummern der Genome sind in Klammern angegeben. Stämme: 1, *Pseudomonas lactis* sp. nov. WS 4992^T (JYLO00000000); 2, *Pseudomonas paralactis* sp. nov. WS 4672^T (JYLN00000000); 3, *Pseudomonas libanensis* DSM 17149^T (JYLH00000000); 4, *Pseudomonas gessardii* DSM 17152^T (MNPU00000000); 5, *Pseudomonas synxantha* DSM 18928^T (JYLJ00000000); 6, *Pseudomonas azotoformans* DSM 18862^T (MNPV00000000); 7, *Pseudomonas cedrina* subsp. *cedrina* DSM 17516^T (MNPW00000000); 8, *Pseudomonas trivialis* DSM 14937^T (JYLK00000000); 9, *Pseudomonas veronii* DSM 11331^T (JYLL00000000); 10, *Pseudomonas poae* DSM 14936^T (JYLI00000000); 11, *Pseudomonas orientalis* DSM 17489^T (JYLM00000000); 12, *Pseudomonas aeruginosa* DSM 50071^T (JYLC00000000).

ANIb	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	89,8	89,3	84,0	88,7	86,3	85,8	85,9	86,5	85,7	87,2	74,6
2		89,3	84,1	89,0	86,3	85,8	85,8	86,3	85,6	87,2	74,5
3			84,3	95,0	86,5	86,1	86,0	86,5	85,7	87,2	74,8
4				84,1	84,3	84,2	84,2	85,2	84,0	84,1	75,2
5					86,3	85,7	85,8	86,6	85,6	87,2	74,6
6						88,1	86,4	87,0	86,2	86,6	74,9
7							86,1	86,6	85,9	86,8	74,9
8								86,4	93,7	86,4	75,3
9									86,1	86,8	75,4
10										86,2	75,1
11											75,0

Die Stämme WS4992^T und WS4672^T wiesen eine ANIb-Ähnlichkeit von 89,8 % auf, die größte Ähnlichkeit hatten beide Stämme mit 89,3 % zum Typstamm der Art *Pseudomonas libanensis*. Wie schon zuvor beim der Multi-Locus-Sequenz-Analyse zeigte sich, dass manche der Referenzstämmen untereinander eine deutlich nähere Verwandtschaft aufwiesen. Die Stämme *Pseudomonas libanensis* DSM 17149^T und *Pseudomonas synxantha* DSM 18928^T hatten mit 95,0 % die größte Ähnlichkeit unter den Referenzstämmen gezeigt. Die Stämme WS4992^T und WS4672^T unterschieden sich voneinander und von den Referenzstämmen außerdem in der Größe ihres Genoms, der Anzahl ihrer Gene und in der Anzahl der proteincodierenden Gene. Eine Gegenüberstellung dieser und weiterer differenzierender Merkmale ist in Tabelle 4-3 (siehe 4.4.2) zu sehen.

3.4.2 Morphologische und physiologische Charakterisierung

Neben der Zellmorphologie wurden die 12 Stämme der vier neuen Arten und die Referenzstämme auf ihre Fähigkeit hin untersucht, auf verschiedenen Agarmedien wachsen zu können. Außerdem wurde überprüft, ob sie bestimmte Enzymaktivitäten aufweisen und bei welchen Temperaturen, pH-Werten und NaCl-Konzentrationen sie wachsen können. Des Weiteren wurde getestet, welche der in Tabelle 2-1 genannten Kohlenstoffquellen-Lösungen den untersuchten Stämmen als einzige Energie- und Kohlenstoffquelle dienen können. Bei der Ermittlung der Zellform und Zellgröße (siehe Abbildung 3-33 bis Abbildung 3-36) repräsentierten die gewählten Typstämme jeweils die neuen Arten. Bei allen anderen zuvor genannten Eigenschaften wurden alle 12 Stämme der vier neuen Arten untersucht. Für die Arten *Pseudomonas lactis* sp. nov. und *Pseudomonas paralactis* sp. nov. wurden außerdem weitere Analysen durchgeführt (siehe 2.8.1).

***Pseudomonas helleri* sp. nov. und *Pseudomonas weihenstephanensis* sp. nov.**

Die Zellen des Typstamms der Art *Pseudomonas helleri* sp. nov. (WS4917^T) waren stäbchenförmig und hatten eine durchschnittliche Größe von etwa 3,1 µm Länge und 0,75 µm Breite (siehe Abbildung 3-33). Ebenfalls stäbchenförmig waren die Zellen des Typstamms der Art *Pseudomonas weihenstephanensis* sp. nov. (WS4993^T), deren Größe lag im Durchschnitt bei etwa 2,1 µm Länge und 0,75 µm Breite (siehe Abbildung 3-34). Alle Stämme der beiden Arten *Pseudomonas helleri* (WS4917^T, WS4995, WS4999, WS5001 und WS5002) und *Pseudomonas weihenstephanensis* (WS4993^T und WS4994) bildeten innerhalb von 24 h nach Wachstum auf TSG bei 25 °C beige, runde Kolonien mit glatter Oberfläche und einem Durchmesser von etwa 0,5–1,0 mm. Die optimale Wachstumstemperatur der Stämme der Art *Pseudomonas helleri* sp. nov. lag zwischen 25–29 °C, außerdem zeigten die Stämme Wachstum in TSB in einem pH-Bereich von 5 bis 8 und tolerierten NaCl-Konzentrationen von bis zu 6 % (w/v). Generell zeigten die Stämme Wachstum zwischen 4–31 °C, wobei die maximale Wachstumstemperatur variierte. Die Stämme WS4917^T, WS4999 und WS5001 wuchsen bis maximal 31 °C, die Stämme WS4995 und WS5002 bis maximal 33 °C. Die optimale Wachstumstemperatur der Stämme der Art *Pseudomonas weihenstephanensis* sp. nov. lag zwischen 23–27 °C, während sie generell im Temperaturbereich von 4–33 °C Wachstum zeigten. Die Stämme tolerierten eine NaCl-Konzentration im Medium von bis zu 5 % (w/v) und wuchsen bei pH-Werten von 5 bis 8. Die Fähigkeit zum Wachstum bei Temperaturen unter 4 °C wurde für keine der beiden Arten untersucht.

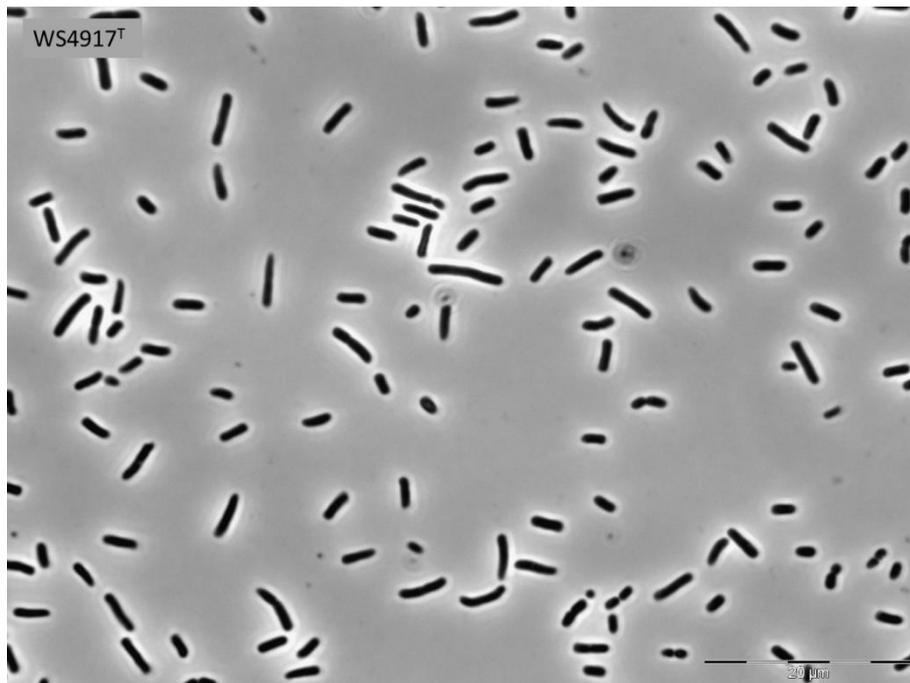


Abbildung 3-33: Phasenkontrastaufnahme von *Pseudomonas helleri* sp. nov. WS4917^T. Erstellt mit dem Fluoreszenzmikroskop BX51 (Olympus) nach Wachstum in TSB bei 25 °C über 24 h. Der eingezeichnete Größenbalken entspricht einer Länge von 20 μm.

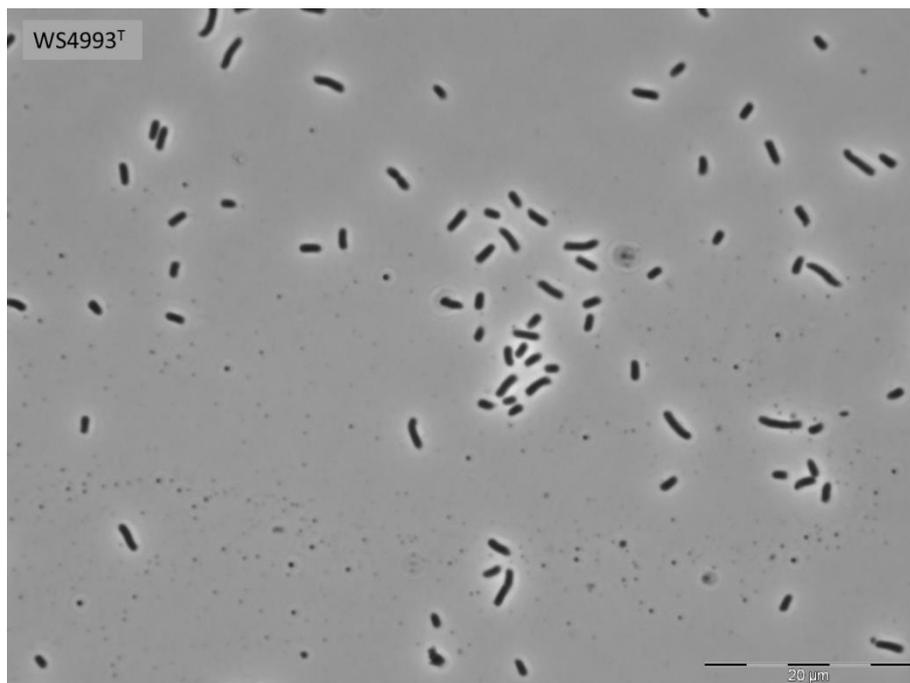


Abbildung 3-34: Phasenkontrastaufnahme von *Pseudomonas weihenstephanensis* sp. nov. WS4993^T. Erstellt mit dem Fluoreszenzmikroskop BX51 (Olympus) nach Wachstum in TSB bei 25 °C über 24 h. Der eingezeichnete Größenbalken entspricht einer Länge von 20 μm.

Die Stämme WS4917^T, WS4995, WS4999, WS5001 und WS5002 sowie WS4993^T und WS4994 und die Referenzstämme *Pseudomonas deceptionensis* DSM 26521^T, *Pseudomonas endophytica* BSTT44^T, *Pseudomonas fragi* DSM 3456^T, *Pseudomonas lini* DSM 16768^T, *Pseudomonas lundensis* DSM 6252^T, *Pseudomonas psychrophila* DSM 17535^T,

Pseudomonas taetrolens DSM 21104^T und *Pseudomonas aeruginosa* DSM 50071^T waren alle gramnegativ, Katalase und Oxidase positiv, waren beweglich und zeigten Wachstum auf R2A-Agar. Unter anaeroben Bedingungen konnte kein Wachstum festgestellt werden, die Indolbildung war ebenfalls negativ. Keiner der Stämme war in der Lage, Stärke zu hydrolysieren oder zeigte Proteolyse auf Proteolyse-Agar und Lipolyse auf Tributyrin-Agar bei 4 °C. Alle Stämme zeigten Wachstum auf D-Glucose, D-Fructose, D-Ribose, Glycerol und Kalium-Gluconat als einzige Energie- und Kohlenstoffquelle. Bei keinem der Stämme konnte hingegen Wachstum auf Amygdalin, Arbutin, D-Adonitol, D-Cellobiose, D-Fucose, D-Lactose, D-Maltose, D-Melezitose, D-Tagatose, D-Turanose, Dulcitol, Erythritol, Gentiobiose, Glycogen, L-Arabitol, L-Rhamnose, L-Sorbose, Methyl- α -D-Glucoside, Methyl- α -D-Mannoside, Methyl- β -D-Xylopyranose, Salicin und Xylitol festgestellt werden. Während der phänotypischen Analysen wurde zudem festgestellt, dass nicht alle Stämme der neuen Arten die gleichen Eigenschaften in allen Tests zeigten. Einige Merkmale waren unterschiedlich ausgeprägt. Die Stämme WS4917^T, WS4999, WS5001 und WS5002 der Art *Pseudomonas helleri* sp. nov. waren in der Lage, D-Arabitol, D-Mannitol und D-Trehalose als einzige Energie- und Kohlenstoffquelle zu nutzen, nicht jedoch der Stamm WS4995. Für den Stamm WS5001 konnte außerdem auf nahezu allen verstoffwechselten Kohlenstoffquellen die Bildung eines gelblichen bis rötlichen Pigments beobachtet werden. Zudem bildeten dessen Kolonien nach Wachstum auf PCM-Agar für länger als fünf Tage bei 22 °C eine harte, verrunzelte und vertrocknete Oberfläche aus, während die anderen vier Stämme ihre glatte Kolonieoberfläche beibehielten.

Eine Gegenüberstellung der an dieser Stelle nicht aufgeführten differenzierenden Merkmale für die Arten *Pseudomonas helleri* sp. nov. und *Pseudomonas weihenstephanensis* sp. nov. und die gewählten Referenzstämme ist in Tabelle 4-2 (siehe 4.4.1) zu sehen.

***Pseudomonas lactis* sp. nov. und *Pseudomonas paralactis* sp. nov.**

Die Zellen des Typstamms der Art *Pseudomonas lactis* sp. nov. (WS4992^T) zeigten die Form von Stäbchen und hatten eine durchschnittliche Größe von etwa 2,6 µm Länge und 0,75 µm Breite (siehe Abbildung 3-35). Stäbchenförmig waren auch die Zellen des Typstamms der Art *Pseudomonas paralactis* sp. nov. (WS4672^T), deren Größe lag im Durchschnitt bei etwa 2,4 µm Länge und 0,75 µm Breite (siehe Abbildung 3-36). Alle Stämme beider Arten bildeten innerhalb von 24 h nach Wachstum auf TSG bei 25 °C beige, runde Kolonien mit glatter Oberfläche und einem Durchmesser von etwa 0,5–1,0 mm.

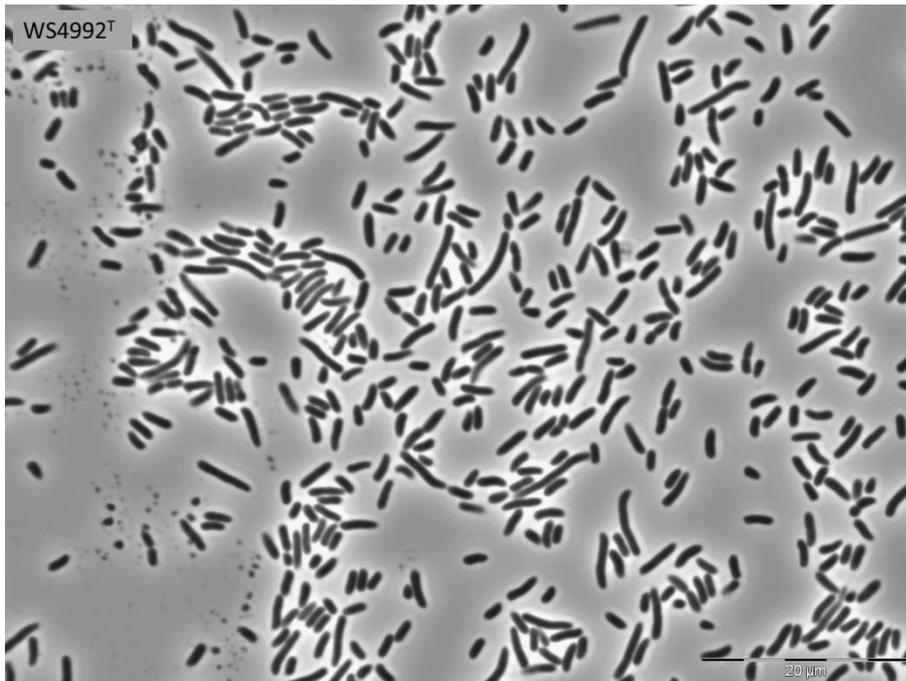


Abbildung 3-35: Phasenkontrastaufnahme von *Pseudomonas lactis* sp. nov. WS4992^T. Erstellt mit dem Fluoreszenzmikroskop BX51 (Olympus) nach Wachstum in TSB bei 25 °C über 24 h. Der eingezeichnete Größenbalken entspricht einer Länge von 20 µm.

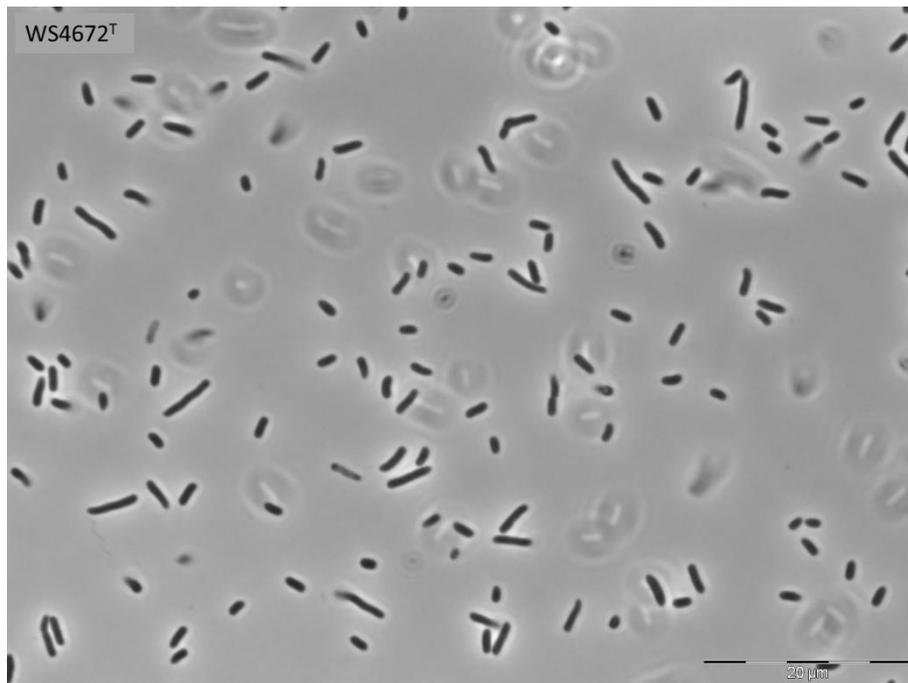


Abbildung 3-36: Phasenkontrastaufnahme von *Pseudomonas paralactis* sp. nov. WS672^T. Erstellt mit dem Fluoreszenzmikroskop BX51 (Olympus) nach Wachstum in TSB bei 25 °C über 24 h. Der eingezeichnete Größenbalken entspricht einer Länge von 20 µm.

Die Stämme WS4992^T, WS4997 und WS5000 sowie WS4672^T und WS4998 und die Referenzstämme *Pseudomonas azotoformans* DSM 18862^T, *Pseudomonas gessardii* DSM 17152^T, *Pseudomonas cedrina* subsp. *cedrina* DSM 17516^T, *Pseudomonas libanensis* DSM 17149^T, *Pseudomonas orientalis* DSM 14489^T, *Pseudomonas poae* DSM 14936^T, *Pseudomonas synxantha* DSM 18928^T, *Pseudomonas trivialis* DSM 14937^T, *Pseudomonas veronii* DSM 11331^T und *Pseudomonas aeruginosa* DSM 50071^T waren alle gramnegativ, beweglich sowie Katalase und Oxidase positiv. Alle Stämme zeigten Wachstum auf Cetrimid-Agar und R2A-Agar und zeigten Lipolyse auf Tributyrin-Agar bei 25 °C. Wachstum unter anaeroben Bedingungen konnte bei keinem der Stämme festgestellt werden. Gleiches gilt für die Hydrolyse von Stärke, die Indolbildung und die Voges-Proskauer-Reaktion. Außerdem konnte bei keinem der Stämme mittels API[®] 20E *strips* der Nachweis für die Enzyme Lysin-Decarboxylase, Ornithin-Decarboxylase, Urease und Tryptophan-Deaminase erbracht werden. Alle Stämme wuchsen unter Verwendung von D-Arabitol, D-Glucose, D-Fructose, D-Mannitol, D-Trehalose, D-Ribose, Glycerol und Kalium-Gluconat als einzige Energie- und Kohlenstoffquelle. Hierfür konnten andererseits Amygdalin, D-Arabinose, D-Cellobiose, D-Fucose, D-Lactose, D-Maltose, D-Melezitose, D-Raffinose, D-Tagatose, D-Turanose, Dulcitol, Gentiobiose, Glycogen, L-Fucose, L-Sorbose, L-Xylose, Methyl- α -D-Glucoside, Methyl- α -D-Mannoside, Methyl- β -D-Xylopyranose und Salicin von keinem der Stämme genutzt werden. Mit Ausnahme der nahe verwandten Arten/Stämme *Pseudomonas poae* DSM 14936^T und *Pseudomonas trivialis* DSM 14937^T sowie auch *Pseudomonas aeruginosa* DSM 50071^T zeigten alle untersuchten Stämme einen psychrotoleranten Charakter, der sich im Wachstum bei 4 °C widerspiegelte.

Tabelle 4-3 (siehe 4.4.2) zeigt eine Gegenüberstellung der an dieser Stelle nicht aufgeführten differenzierenden Eigenschaften für die Arten *Pseudomonas lactis* sp. nov. und *Pseudomonas paralactis* sp. nov. und die gewählten Referenzstämme.

3.4.3 Chemotaxonomische Charakterisierung

Die chemotaxischen Untersuchungen wurden alle bei der DSMZ in Auftrag gegeben und durchgeführt (siehe 2.8.2). Die zellulären Fettsäuren wurden für die Typstämme der vier neuen Arten und alle Referenzstämme ermittelt. Die respiratorischen Chinone und die polaren Lipide wurden nur für die Typstämme der vier neuen Arten (WS4917^T, WS4993^T, WS4992^T und WS4672^T) bestimmt.

***Pseudomonas helleri* sp. nov. und *Pseudomonas weihenstephanensis* sp. nov.**

Die dominierenden zellulären Fettsäuren des Stamms WS4917^T (*Pseudomonas helleri* sp. nov.) waren: C16:0 (32,4 %), *summed feature* C16:1 ω7c/C15:0 iso 2OH (21,1 %), C17:0 cyclo (17,0 %), C18:1 ω7c (7,4 %) und C19:0 cyclo ω8c (4,2 %). Beim Stamm WS4993^T (*Pseudomonas weihenstephanensis* sp. nov.) waren es: *summed feature* C16:1 ω7c/C15:0 iso 2OH (37,3 %), C16:0 (30,9 %) und C18:1 ω7c (12,2 %). Die komplette Zusammensetzung der zellulären Fettsäuren der beiden Stämme sowie der Referenzstämme ist in Tabelle 3-15 zu sehen.

ERGEBNISSE

Tabelle 3-15: Zusammensetzung der zellulären Fettsäuren (%) der Stämme *Pseudomonas helleri* sp. nov. WS4917^T und *Pseudomonas weihenstephanensis* sp. nov. WS4993^T, der Referenzstämmen und der Typspezies *Pseudomonas aeruginosa*. Stämme: 1, *Pseudomonas helleri* WS4917^T; 2, *Pseudomonas weihenstephanensis* WS4993^T; 3, *Pseudomonas endophytica* BSTT44^T; 4, *Pseudomonas deceptionensis* DSM 26521^T; 5, *Pseudomonas fragi* DSM 3456^T; 6, *Pseudomonas lundensis* DSM 6252^T; 7, *Pseudomonas psychrophila* DSM 17535^T; 8, *Pseudomonas taetrolens* DSM 21104^T; 9, *Pseudomonas lini* DSM 16768^T; 10, *Pseudomonas aeruginosa* DSM 50071^T. Fettsäuren mit einem Anteil ≥ 5 % sind fett markiert. Abkürzungen: tr = traces (dt. = Spuren) ≤ 1 %; -- = nicht detektiert.

Fettsäure-Typ	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Gesättigt										
C 10:0	tr									
C 12:0	3,2	2,9	3,8	3,4	4,1	1,4	4,0	3,1	4,8	3,2
C 14:0	tr									
C 15:0	--	tr	--	tr						
C 16:0	32,4	30,9	30,8	33,9	30,4	33,2	31,7	30,9	24,3	22,3
C 17:0 iso	--	--	tr	tr	tr	tr	--	tr	--	--
C 17:0	tr	--	tr							
C 18:0	tr									
C 19:0 iso	tr	--	--	tr	tr	--	tr	tr	--	--
Ungesättigt										
C 16:1 ω 5c	--	--	--	--	tr	tr	--	--	tr	tr
C 17:1 ω 8c	--	--	--	--	--	--	--	--	tr	tr
C 18:1 ω 5c	--	--	--	--	--	--	--	--	tr	--
C 18:1 ω 6c	1,6	--	--	--	--	--	--	--	--	--
C 18:1 ω 7c	7,4	12,2	11,1	11,0	12,3	12,3	10,6	11,8	22,1	42,2
Hydroxy-										
C 10:0 3OH	3,7	3,2	3,0	3,6	3,5	3,5	3,3	3,5	4,1	3,3
C 11:0 iso 3OH	--	--	--	tr	tr	tr	tr	tr	--	--
C 12:0 2OH	3,7	4,0	3,0	3,4	3,2	4,9	3,0	3,8	2,5	4,0
C 12:1 3OH	--	--	--	--	--	--	--	--	tr	--
C 12:0 3OH	3,7	3,8	3,2	3,8	3,7	4,1	3,6	4,0	3,8	3,9
Cyclopropyl-										
C 17:0 cyclo	17,0	3,7	10,6	11,8	8,3	1,2	12,2	12,9	2,4	tr
C 19:0 cyclo ω 8c	4,2	tr	1,2	tr	tr	tr	tr	2,2	tr	tr
Summed features										
C 14:0 3OH/C16:1 iso	--	--	--	--	--	--	--	--	tr	--
C 16:1 ω 7c/C15:0 iso 2OH	21,1	37,3	31,5	26,4	31,5	37,2	29,3	26,1	32,9	18,3

Die ermittelten polaren Lipide der Stämme WS4917^T (*Pseudomonas helleri* sp. nov.) und WS4993^T (*Pseudomonas weihenstephanensis* sp. nov.) waren Phosphatidylethanolamin (PE), Phosphatidylglycerol (PG) und Diphosphatidylglycerol (DPG) (siehe Abbildung 3-37). Das ermittelte respiratorische Chinon war bei beiden Stämmen Q-9, während bei Stamm WS4917^T auch kleine Mengen des respiratorischen Chinons Q-8 gefunden wurden.

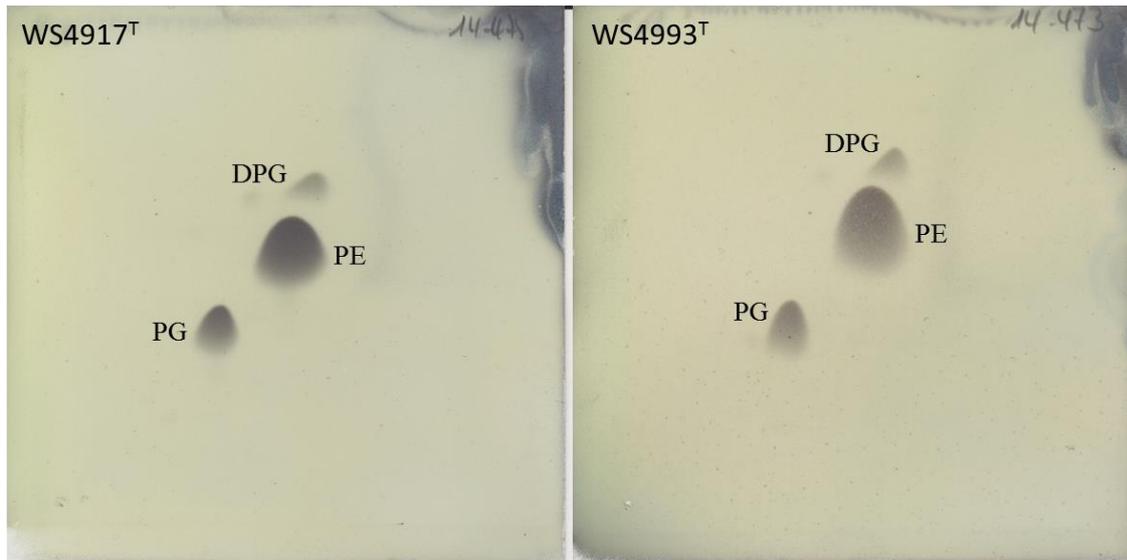


Abbildung 3-37: Mittels zweidimensionaler Dünnschichtchromatographie aufgetrennte polare Lipide der Stämme WS4917^T (links) und WS4993^T (rechts). Abkürzungen: DPG = Diphosphatidylglycerol; PE = Phosphatidylethanolamine; PG = Phosphatidylglycerol.

***Pseudomonas lactis* sp. nov. und *Pseudomonas paralactis* sp. nov.**

Die dominierenden zellulären Fettsäuren des Stamms WS4992^T (*Pseudomonas lactis* sp. nov.) waren: C16:0 (31,7 %), *summed feature* C16:1 ω7c/C15:0 iso 2OH (29,5 %), C18:1 ω7c (17,0 %), C17:0 cyclo (5,9 %), C12:0 2OH (4,1 %), C12:0 3OH (3,9 %), C10:0 3OH (2,8 %) und C12:0 (2,6 %). Beim Stamm WS4672^T (*Pseudomonas paralactis* sp. nov.) waren es: *summed feature* C16:1 ω7c/C15:0 iso 2OH (33,1 %), C16:0 (29,1 %), C18:1 ω7c (18,4 %), C12:0 (3,9 %), C12:0 3OH (3,8 %), C12:0 2OH (3,4 %) und C10:0 3OH (3,4 %). Die komplette Zusammensetzung der zellulären Fettsäuren der beiden Stämme sowie der Referenzstämme ist in Tabelle 3-16 zu sehen.

ERGEBNISSE

Tabelle 3-16: Zusammensetzung der zellulären Fettsäuren (%) der Stämme *Pseudomonas lactis* sp. nov. WS4992^T und *Pseudomonas paralactis* sp. nov. WS4672^T, der Referenzstämmen und der Typspezies *Pseudomonas aeruginosa*. Stämme: 1, *Pseudomonas lactis* sp. nov. WS4992^T; 2, *Pseudomonas paralactis* sp. nov. WS4672^T; 3, *Pseudomonas libanensis* DSM 17149^T; 4, *Pseudomonas gessardii* DSM 17152^T; 5, *Pseudomonas synxantha* DSM 18928^T; 6, *Pseudomonas azotoformans* DSM 18862^T; 7, *Pseudomonas cedrina* subsp. *cedrina* DSM 17516^T; 8, *Pseudomonas trivialis* DSM 14937^T; 9, *Pseudomonas veronii* DSM 11331^T; 10, *Pseudomonas poae* DSM 14936^T; 11, *Pseudomonas orientalis* DSM 17489^T; 12, *Pseudomonas aeruginosa* DSM 50071^T. Fettsäuren mit einem Anteil $\geq 5\%$ sind fett markiert. Abkürzungen: tr = traces (dt. = Spuren) $\leq 1\%$; -- = nicht detektiert.

Fettsäure-Typ	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Gesättigt												
C10:0	tr											
C12:0	2,6	3,9	2,8	2,2	2,6	2,9	3,5	2,5	2,3	2,9	2,8	3,2
C14:0	tr											
C15:0	--	--	--	tr	--	--	--	--	--	--	--	tr
C16:0	31,7	29,1	30,0	33,8	27,1	31,9	29,7	29,4	31,5	29,1	28,8	22,3
C17:0 ISO	--	tr	--	tr	--	--	tr	--	--	tr	--	--
C17:0	tr	tr	tr	tr	--	tr	tr	tr	--	tr	--	tr
C18:0	1,1	tr	1,1	tr	1,3	tr	tr	1,1	1,4	1,2	1,1	tr
Ungesättigt												
C16:1 ω 5c	--	tr	tr	tr								
C17:1 ω 8c	--	--	--	tr	--	--	--	--	--	--	--	tr
C18:1 ω 5c	--	--	--	--	--	--	--	--	--	tr	tr	--
C18:1 ω 7c	17,0	18,4	16,6	10,3	23,1	16,1	17,0	20,3	19,8	21,7	21,0	42,2
Hydroxy-												
C10:0 3OH	2,8	3,4	3,6	3,6	5,1	3,1	3,0	3,1	2,7	2,6	2,7	3,3
C12:0 2OH	4,1	3,4	4,1	4,5	3,9	3,8	3,6	4,4	3,8	3,9	3,7	4,0
C12:1 3OH	--	--	--	--	1,5	--	--	--	--	--	--	--
C12:0 3OH	3,9	3,8	4,0	3,9	5,1	3,6	4,0	4,0	3,5	3,7	3,8	3,9
Cyclopropyl-												
C17:0 CYCLO	5,9	3,1	7,3	tr	5,4	4,2	2,8	2,0	4,4	1,6	2,1	tr
C19:0 CYCLO ω 8c	tr	tr	1,6	tr	1,0	tr	tr	--	tr	--	tr	tr
Summed features												
C15:1 iso I/H/C13:0 3OH	--	--	--	--	--	--	--	--	tr	--	--	--
C16:1 ω 7c/C15:0 iso 2OH	29,5	33,1	28,4	38,5	23,5	32,6	35,2	32,6	29,1	32,4	33,2	18,3
Methyl-												
11 methyl C18:1 ω 7c	--	--	--	--	--	--	--	--	--	tr	--	--

Die ermittelten polaren Lipide der Stämme WS4992^T (*Pseudomonas lactis* sp. nov.) und WS4672^T (*Pseudomonas paralactis* sp. nov.) waren Phosphatidylethanolamin (PE), Phosphatidylglycerol (PG), Diphosphatidylglycerol (DPG) und Phospholipid (PL) (siehe Abbildung 3-38). Das ermittelte respiratorische Chinon war bei beiden Stämmen Q-9.

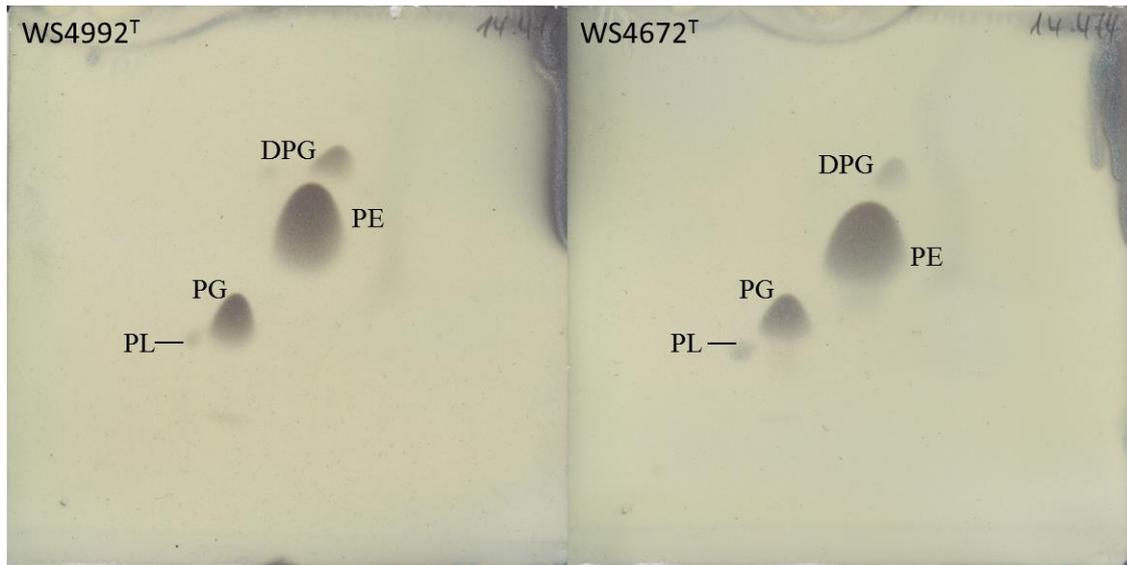


Abbildung 3-38: Mittels zweidimensionaler Dünnschichtchromatographie aufgetrennte polare Lipide der Stämme WS4992^T (links) und WS4672^T (rechts). Abkürzungen: DPG = Diphosphatidylglycerol; PE = Phosphatidylethanolamine; PG = Phosphatidylglycerol; PL = Phospholipid.

4 DISKUSSION

4.1 Biodiversität der Rohmilch- und Milchhalbfabrikat-Mikrobiota

Der Fokus der Biodiversitäts- und Enzymaktivitätsanalyse, deren Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit präsentiert wurden, lag darin, die Zusammensetzung der Mikrobiota kaltgelagerter roher Kuhmilchen kurz vor deren Verarbeitung und kaltgelagerter Zwischenprodukte der Milchindustrie zu ermitteln. Demzufolge sind die Ergebnisse der mikrobiellen Biodiversität sowie auch die ermittelten Gesamtkeimzahlen vor dem Hintergrund der Kaltlagerung zu betrachten.

In einigen Studien wurden durch selektive Ansätze oft nur ganz bestimmte Organismengruppen wie beispielsweise aerob sporenbildende Bakterien (Coorevits *et al.*, 2008, De Jonghe *et al.*, 2010) oder Milchsäurebakterien (Dasen *et al.*, 2003, Delavenne *et al.*, 2012, Franciosi *et al.*, 2009) untersucht. Eine gezielte Selektion bestimmter Mikroorganismen war jedoch nicht das Ziel der vorliegenden Arbeit und der gewählte Ansatz (Anzucht auf PCM-Agar bei 15 °C über sieben Tage) ermöglichte es, ein breites Spektrum der aerob kultivierbaren Mikrobiota, inklusive der Hefen, abzudecken.

Um bakterielle Isolate anhand ihrer 16S-rRNA-Gensequenzen zu identifizieren, wurden in der Regel nur die ersten zwei Drittel der Gensequenz verwendet. Dieses Fragment enthält die Regionen mit der höchsten genetischen Variabilität (Baker *et al.*, 2003, Chakravorty *et al.*, 2007, Van de Peer *et al.*, 1996). Dennoch besteht die Möglichkeit, dass ein einer bestimmten Art zugeordnetes Isolat bei Verwendung der gesamten 16S-rRNA-Gensequenz einer anderen Art zugeordnet werden müsste. Dies gilt insbesondere für sehr nah verwandte Gattungen einiger *Enterobacteriaceae* (Mollet *et al.*, 1997) und gleichermaßen für bestimmte Arten innerhalb einiger Gattungen wie beispielsweise *Acinetobacter*, *Bacillus* und *Streptococcus* (Fox *et al.*, 1992, Janda & Abbott, 2007, Mignard & Flandrois, 2006). Die Wahl anderer Markergene anstatt des 16S-rRNA-Gens hätte somit für einige Bakteriengattungen eine stärkere Differenzierung ermöglicht. Beispielsweise hätte auch ein MSLA-Ansatz unter Verwendung der Gene 16S rRNA, *rpoB* und *recA* zur Differenzierung von *Lactococcus*-Arten (Perez *et al.*, 2011), insbesondere zur Unterscheidung der vier Subspezies von *Lactococcus lactis*, angewandt werden können. Da jedoch die Gattung *Pseudomonas* im Milch- und Molkereiumfeld bekanntermaßen besonders häufig auftritt (Quigley *et al.*, 2013b) und einzelnen Vertretern der Gattung *Staphylococcus* eine besondere Bedeutung als Mastitis-Erreger und Humanpathogen zukommt (Bochniarz & Wawron, 2012, Le Loir *et al.*, 2003, Rajic-Savic *et al.*, 2015), wurden nur diese Isolate anhand phylogenetisch stärker differenzierender Markergene identifiziert. Wie bereits erwähnt, stellt das *rpoD*-Gen für die Gattung *Pseudomonas* das am stärksten differenzierende Gen dar (Mulet *et al.*, 2010). Aus diesem Grund wurde es bereits mehrfach als alleiniges Markergen zur taxonomischen Zuordnung von Isolaten zu beschriebenen *Pseudomonas*-Arten verwendet (Mulet *et al.*, 2011, Sanchez *et al.*, 2014a, Scotta *et al.*, 2012) und auch in der vorliegenden Arbeit hierfür genutzt. In einer neueren Studien konnte außerdem gezeigt werden, dass die resultierende Phylogenie

in Form eines Maximum-Likelihood-Baumes auf Basis des *rpoD*-Gens mit der Phylogenie auf Basis des 16S-rRNA-Gens korreliert (Ghyselinck *et al.*, 2013). Die bisher für die Gruppen- oder Artzugehörigkeit, basierend auf der Nukleotidsequenzähnlichkeit partieller *rpoD*-Gensequenzen, verwendeten Grenzwerte lagen bei 95–96 % (Mulet *et al.*, 2011, Sanchez *et al.*, 2014a). In der vorliegenden Arbeit wurde mit 97 % ein etwas strengeres Kriterium angewandt. Innerhalb der Gattung *Staphylococcus* gilt das *rpoB*-Gen als phylogenetisch am stärksten differenzierend und scheint bei Verwendung der gesamten Gensequenz sogar einem MLST-Ansatz überlegen zu sein (Seong *et al.*, 2013). Dies liegt vermutlich an der starken Korrelation der *rpoB*-Gensequenzähnlichkeit und der durchschnittlichen Nukleotid-Übereinstimmung (ANI) von Genomen (Adekambi *et al.*, 2008). Zwar wurde in der vorliegenden Arbeit nicht die gesamte *rpoB*-Gensequenz zur Identifizierung von *Staphylococcus*-Isolaten genutzt, aber auch der verwendete Bereich des *rpoB*-Gens gilt als stärker differenzierend als das 16S-rRNA-Gen (Adékambi *et al.*, 2009, Mellmann *et al.*, 2006). Zur Identifizierung von Hefe-Isolaten wurden partielle 26S-rRNA-Gensequenzen verwendet, in der die variablen Regionen D1 und D2 enthalten sind, da sich gezeigt hatte, dass dieser Bereich innerhalb einiger Hefe-Gattungen eine stärkere Differenzierung erlaubt als das 18S-rRNA-Gen (Kurtzman & Robnett, 1998). Auf eine Differenzierung von Arten in unterschiedliche Subspezies wurde generell bei allen Gattungen verzichtet.

Aufgrund des experimentellen zeitlichen Ablaufs der Biodiversitäts-Analysen lagen die Ergebnisse der Rohmilchen zum Zeitpunkt der Untersuchung der Milchhalbfabrikate bereits vor. Gleiches gilt für die unter Punkt 3.2 beschriebene lipolytische und proteolytische Aktivität der repräsentativen Isolate aus den Rohmilchen. Basierend auf den Ergebnissen der Rohmilchen war kein relevanter zusätzlicher Informationsgewinn durch die Isolate der Milchhalbfabrikate zu erwarten gewesen. Deshalb wurde eine niedrigere Stichprobengröße gewählt und bei den Isolaten wurde auf eine Artidentifizierung mittels PCR und DNA-Sequenzierung im Allgemeinen verzichtet. Nur die Isolate der Gattung *Pseudomonas* und vereinzelte andere Isolate wurden auf Artebene identifiziert. Daher und auch aufgrund der nicht immer eindeutigen Artidentifizierung mittels FTIR-Spektren und den dazugehörigen Referenzdatenbanken (Wenning *et al.*, 2014, Wenning *et al.*, 2008) wurde die Biodiversitäts-Analyse der Mikrobiota der Milchhalbfabrikate auf Gattungsebene durchgeführt.

Mikrobielle Biodiversität der Rohmilchen

Die Rohmilch-Mikrobiota besteht in der Regel aus mesophilen Kontaminationskeimen (Vacheyrou *et al.*, 2011), deren optimale Wachstumstemperatur definitionsgemäß zwischen 20 °C und 42 °C liegt. Die meisten mesophilen Keime sollten demnach bei den Milchlagertemperaturen von etwa 4–6 °C relativ schlecht wachsen. Hierbei ist jedoch zu erwähnen, dass das mikrobielle Wachstum in Hoflagertanks durch den kurzzeitigen Anstieg der Milchttemperatur im Sammelntank nach Zugabe eines frischen und warmen Gemelks (i. d. R. zweimal pro Tag) begünstigt wird. Je länger die Milch also auf dem Hof gelagert wird, umso häufiger tritt dieses Ereignis auf. Das geometrische Mittel der Gesamtkeimzahlen der

Hofmilchen lag bei 30 °C und 15 °C bei etwa 5 log₁₀ KbE/ml und bei 6 °C bei etwa 4 log₁₀ KbE/ml (siehe Abbildung 3-3). Dabei lag bei allen drei Temperaturen das geometrische Mittel der GKZ der Molkereitankmilchen um jeweils etwa eine Potenz höher. Die mittleren Gesamtkeimzahlen waren aber auch insgesamt etwas höher als die, die in anderen Studien ermittelt wurden (Fricker *et al.*, 2011, Mallet *et al.*, 2012). Dies ist vermutlich auf das Wachstum psychrotoleranter Mikroorganismen während der Kaltlagerung zurückzuführen (De Jonghe *et al.*, 2011, Gargouri *et al.*, 2013, Lafarge *et al.*, 2004). Unter Berücksichtigung der transportbedingten zusätzlichen eintägigen Kaltlagerung der Proben ist jedoch von einer deutlich geringeren ursprünglichen Gesamtkeimzahl in den Hofmilchen zum Probenahmezeitpunkt auszugehen. Diese Annahme wird auch durch die Tatsache gestützt, dass vier der zehn Hofmilchen auch zum Untersuchungszeitpunkt noch die gesetzliche Vorgabe für Anlieferungsmilch von maximal 100000 (5,0 log₁₀) KbE/ml (Verordnung (EG) NR. 853/2004, Anhang III, Abschnitt IX, Kapitel I, Teil III, Nr. 3.a)) erfüllten. Die GKZ der Hofmilchprobe H 6 lag nur knapp über diesem Wert. Über das genaue Alter der Molkereitankmilchen kann an dieser Stelle keine Aussage getroffen werden, es wird aber auch bei diesen Proben von einer niedrigeren Gesamtkeimzahl zum Probenahmezeitpunkt ausgegangen, die sich im Zuge der Kaltlagerung während dem Transport bis zum Ansatz der Analysen erhöht hatte. Auffallend war hierbei die Probe M 7, für die im Vergleich zu den restlichen Molkereitankproben eine extrem hohe GKZ ermittelt wurde.

Aus dem statistischen Vergleich der Gesamtkeimzahlen der Hof- und Molkereitankmilchen ging hervor, dass bei 15 °C und 6 °C die Hofmilchen eine statistisch signifikant niedrigere Gesamtkeimzahl aufwiesen, nicht aber bei 30 °C. Ein höherer Anteil psychrotoleranter Mikroorganismen an der Mikrobiota der Molkereitankmilchen könnte aufgrund der längeren Lagerzeiten eine mögliche Ursache dafür sein. Bei 30 °C hingegen könnte wiederum ein höherer Anteil mesophiler, nicht psychrotoleranter aber persistierender Mikroorganismen mit höheren Wachstumsraten in den Hofmilchen zu einer höheren GKZ geführt haben, die mit der GKZ der Molkereitankmilchen bei 30 °C vergleichbar ist. Sowohl ein höherer Anteil psychrotoleranter Keime in den Molkereitankmilchen als auch ein höherer Anteil mesophiler Keime in den Hofmilchen hätte sich aber vermutlich auch in der Zusammensetzung der Mikrobiota bei 15 °C widerspiegeln müssen. Nach Lafarge *et al.* (2004) und Fricker *et al.* (2011) wäre mit einer Verschiebung der Mikrobiota hin zu einem höheren Anteil gramnegativer Bakterien in den Molkereitankmilchen zu rechnen gewesen. Den statistischen Untersuchungen zufolge bestand aber (mit Ausnahme der grampositiven, „Anderen“ Bakterien) weder eine Korrelation zwischen der Höhe der Gesamtkeimzahlen bei 15 °C und dem Anteil bestimmter taxonomischer Großgruppen noch konnte ein statistisch signifikant höherer Anteil gramnegativer Bakterien in den Molkereitankmilchen bestätigt werden. Eine höhere Gesamtkeimzahl bedeutet diesen Daten zufolge, entgegen der gängigen Meinung der Milchindustrie, nicht zwangsläufig einen höheren Anteil gramnegativer Bakterien. Zudem konnte ein statistisch signifikant höherer Anteil an Milchsäurebakterien in den Molkereitankmilchen ermittelt werden. Dies deckt sich mit den Ergebnissen von Fricker *et al.*

(2011), aus deren Ergebnissen neben dem höheren Anteil gramnegativer Bakterien auch ein etwas höherer Anteil an Milchsäurebakterien in Molkereitankmilchen im Vergleich zu Hofmilchen hervorgeht (wenn auch in einem geringeren Umfang). In einer anderen Studie, in der ebenfalls kaltgelagerte Hofmilchen untersucht worden waren, wurden überwiegend grampositive Bakterien isoliert (Mallet *et al.*, 2012), daher besteht auch die Möglichkeit, dass eine Verschiebung der Mikrobiota bereits vor Beginn der Analyse der Hofmilchen stattgefunden hatte. Aus den Daten der vorliegenden Arbeit geht zudem hervor, dass etwa Dreiviertel aller untersuchten MSB einen psychrotoleranten Charakter aufwiesen, wobei der Anteil psychrotoleranter Isolate in den einzelnen Proben zwischen 90 % und 100 % lag (Ergebnisse nicht dargestellt). Milchsäurebakterien sind bekanntermaßen als eine der dominierenden Bakteriengruppen in Rohmilch anzusehen (Masoud *et al.*, 2012, Quigley *et al.*, 2013b) und einige Studien (Foulquie Moreno *et al.*, 2006, Matamoros *et al.*, 2009, Nieminen *et al.*, 2011, Pothakos *et al.*, 2012, Pothakos *et al.*, 2014) berichteten außerdem von psychrotoleranten Milchsäurebakterien in gekühlt gelagerten Lebensmitteln. Daher liegt die Vermutung nahe, dass Psychrotoleranz auch unter Milchsäurebakterien eine weit verbreitete Eigenschaft ist, deren Bedeutung für die Rohmilch eventuell auch in Hinblick auf mikrobiellen Verderb bisher unterschätzt wurde. Diese Psychrotoleranz wird auch dadurch bestätigt, dass die Mikrobiota der Rohmilchproben mit den höchsten Gesamtkeimzahlen (M 7 und M 10) von Milchsäurebakterien dominiert wurden. Aus den unter den Punkten 3.1 und 3.2 präsentierten Ergebnissen geht zudem hervor, dass ~86 % aller aus den Rohmilchen isolierten und untersuchten repräsentativen Mikroorganismen bei 6 °C Wachstum zeigten. Im Vergleich dazu zeigte ein etwas höherer Anteil der repräsentativen Isolate aus den Molkereitankmilchen Wachstum bei 6 °C (89 %). Möglicherweise hatte dieser rein zahlenmäßig höhere Anteil psychrotoleranter Mikroorganismen in Verbindung mit der längeren Lagerzeit zu den höheren Gesamtkeimzahlen bei 15 °C und 6 °C in den Molkereitankmilchen geführt. Aufgrund der Tatsache, dass alle Isolate während der Subkultivierung bei 30 °C Wachstum gezeigt hatten, kann jedoch ein höherer Anteil mesophiler Keime in den Hofmilchen weder bestätigt noch ausgeschlossen werden. Die rechnerische Korrelation zwischen der Höhe der GKZ und dem Auftreten der grampositiven „Anderen“ Bakterien wird als falsch positives Ergebnis interpretiert. Deren Anteil an der Mikrobiota lag meist unter 5 % und nur in zwei (H 7 und H 8) der 12 Proben, aus denen grampositive „Andere“ Bakterien isoliert werden konnten, lag ein höherer Anteil vor. In den beiden Hofmilchproben H 9 und H 10 lag der Anteil ebenfalls bei unter 5 %, obwohl diese eine mit den Proben H 7 und H 8 vergleichbare GKZ bei 15 °C aufwiesen. Der ermittelte niedrige Anteil an grampositiven „Anderen“ Bakterien, bei denen es sich fast ausschließlich um *Staphylococcus*-Arten handelte, ist aller Wahrscheinlichkeit nach auf ein schlechteres Wachstum bei kalten Temperaturen und/oder in Konkurrenz zurückzuführen, wie es bei einigen *Staphylococcus*-Arten der Fall zu sein scheint (Kloos *et al.*, 1976, Kraft & Ayres, 1966, Taponen *et al.*, 2012).

Die Zusammensetzung der Mikrobiota der 20 Rohmilchen war im Vergleich zueinander auf Basis höherer taxonomischer Gruppen deutlich variabel. Dies deckt sich mit den Ergebnissen aus anderen Studien (Hantsis-Zacharov & Halpern, 2007, Lafarge *et al.*, 2004, Schmidt *et al.*, 2012a). Dabei wies die zusammengefasste Mikrobiota der Hofmilchen in absoluten Zahlen übereinstimmend mit Raats *et al.* (2011) eine höhere Biodiversität auf als die der Molkereitankmilchen. Erstaunlicherweise zeigte sich aber neben der deutlichen Dominanz der gramnegativen, obligat aeroben Bakterien und der Milchsäurebakterien, dass insgesamt nur wenige der 61 Gattungen (23) und 169 Arten (42) aus beiden Probenursprüngen isoliert werden konnten, diese aber gleichzeitig den Hauptanteil ($\geq 75\%$) aller Rohmilchisolate ausmachten. Diese Dominanz wurde, bezogen auf die relative Häufigkeit einzelner Gattungen und Arten, sogar noch deutlicher. Die 25 häufigsten Arten stellten insgesamt rund 78 % aller Isolate und gehörten zu 14 der 15 häufigsten Gattungen (siehe Abbildung 3-7). Zu einem ähnlichen Ergebnis waren auch Quigley *et al.* (2013a) gekommen, in deren Studie die Mehrheit der untersuchten 16S-rRNA-Gensequenzen wenigen Gattungen zugeordnet werden konnten und *Lactococcus* und *Pseudomonas* die dominierenden Gattungen darstellten. Diese beiden Gattungen waren in umgekehrter Reihenfolge auch die beiden häufigsten, die aus den 20 Rohmilchen isoliert werden konnten, vor *Acinetobacter* und *Microbacterium*. Die Dominanz dieser vier Gattungen setzte sich auch auf Artebene fort bzw. hat vielmehr dort ihren Ursprung. Dass 25 Arten fast 80 % aller Isolate ausmachten, war erstaunlich, und umso überraschender war es, dass allein 14 Arten der vier häufigsten Gattungen (6 *Pseudomonas*-, 3 *Acinetobacter*-, 3 *Microbacterium*- und 2 *Lactococcus*-Arten) knapp 60 % aller Rohmilchisolate zugeordnet werden konnten. Jede einzelne der 15 häufigsten Gattungen sowie auch die meisten anderen Gattungen konnten bereits aus Milch, Milchprodukten (Chaves-Lopez, 2006, Cousin, 1982, Quigley *et al.*, 2013b), Produktionsanlagen (Gunduz & Tuncel, 2006, Marchand *et al.*, 2012) oder auch aus dem Stallumfeld (Albuquerque & Zurek, 2014, Vacheyrou *et al.*, 2011) isoliert werden. Dies gilt auch für die im Rahmen dieser Untersuchungen isolierten Hefegattungen *Candida*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Rhodotorula* und *Trichosporon*, die ebenfalls zu den typischen Mitgliedern der mikrobiellen Flora von Rohmilchen und Milchprodukten zählen (Delavenne *et al.*, 2011, Fadda *et al.*, 2010, Fleet, 1990, Roostita & Fleet, 1996). Die ebenfalls isolierte Gattung *Saprochaete* nimmt dabei eine Sonderstellung ein, da es sich dabei morphologisch nicht um typische Hefen, sondern um schimmelähnliche Hefen handelt, die ein Pseudomycel bilden, phylogenetisch aber den sogenannten „echten Hefen“ (*Saccharomycotina*) zugeordnet werden (De Hoog, 2004, Morel *et al.*, 2015). Die insgesamt für die 20 kaltgelagerten Rohmilchen ermittelte mikrobielle Biodiversität (62 Gattungen und 169 Arten, basierend auf 2906 Isolaten) ist zahlenmäßig in etwa vergleichbar mit der, die in der Studie von Mallet *et al.* (2012) für frische Rohmilch ermittelt wurde (61 Gattungen und 129 Arten, basierend auf 1697 Isolaten). Die Studie teilte sich in einen quantitativen und einen qualitativen Ansatz, bei dem jedoch keine eindeutige Identifizierung der Isolate erfolgte. Zwar wurden Hefen miteinbezogen (etwa 8 % der Isolate), jedoch lag insgesamt basierend auf einer selektiven Isolatauswahl eine geringere Stichprobengröße pro Probe vor. Zudem wurde eine höhere Temperatur zur Primärzucht

gewählt. Im Gegensatz dazu ermöglichen die hier präsentierten Daten aufgrund der randomisierten Isolat-Auswahl und deren Identifizierung sowohl eine quantitative als auch eine qualitative Aussage über die Zusammensetzung der Mikrobiota. Dabei konnte zudem beobachtet werden, dass die größte Anzahl der Isolate für die meisten Gattungen und Arten aus den Hofmilchen stammte. Einer der Hauptgründe für die zuvor erwähnte höhere Biodiversität der Mikrobiota der Hofmilchen ist vermutlich, dass die Molkereitankmilchen eine Mischung verschiedener Hofmilchen darstellen. Dadurch können sich Unterschiede in der mikrobiellen Zusammensetzung einzelner Hofmilchen sowohl ausgleichen als auch verstärken. Interessanterweise hatte sich bei der Betrachtung des prozentualen Anteils einzelner Arten an der ermittelten Mikrobiota ihrer Ursprungsprobe gezeigt, dass dieser meist zwischen 0–30 % lag. Gleichzeitig wurde aber auch ersichtlich, dass einzelne Arten in der Mikrobiota von Hof- oder Molkereitankmilchproben nicht nur stark vertreten sein können, sondern diese teilweise klar dominieren (siehe Abbildung 3-9). Aufgrund der längeren Lagerzeiten war es nicht überraschend, dass sich dieses Ereignis in mehr Molkereitankmilchen als Hofmilchen gezeigt hatte. Hierfür könnte jedoch auch der soeben erwähnte Verstärkungseffekt verschiedener Hofmilchen ausschlaggebend gewesen sein. Neben den häufig auftretenden Gattungen ließen sich aber auch Vertreter von Gattungen isolieren, die eher selten, aber dennoch bereits aus Rohmilch, dem Milchproduktions- oder Hofumfeld isoliert werden konnten. Zu nennen sind beispielsweise die gramnegativen Gattungen *Ochrobactrum* und *Devosia* sowie die grampositiven Gattungen *Exiguobacterium* und *Renibacterium* (Kämpfer *et al.*, 2011, Mallet *et al.*, 2012, Quigley *et al.*, 2013b, Verdier-Metz *et al.*, 2012). Besonders auffallend waren dabei die Arten *Renibacterium salmoninarum* (aus Probe H 10) und *Devosia submarina* (aus Probe M 1), da diesen eher Gewässer als Lebensraum zugeordnet werden. Die Art *Devosia submarina*, der der isolierte Stamm zugeordnet werden konnte, wurde erstmalig aus Tiefseesediment isoliert (Romanenko *et al.*, 2013) und die Art *Renibacterium salmoninarum* der monotypischen Gattung *Renibacterium* ist der Erreger der bakteriellen Nierenerkrankung (*bacterial kidney disease*, BKD) innerhalb der Familie der *Salmonidae*, zu der auch Lachse und Forellen gehören (Hall *et al.*, 2015, Purcell *et al.*, 2015). Das in den Erstbeschreibungen der beiden Arten aufgeführte Habitat ist zwar keine allgemeingültige Begrenzung der Arten auf dieses Habitat, könnte aber als Indiz für deren Ursprung gewertet werden. Daher wird vermutet, dass die beiden isolierten Stämme über Trink- oder Betriebswasser in den Stall bzw. die Molkerei eingebracht wurden.

Mikrobielle Biodiversität der Milchhalbfabrikate

Über die mikrobielle Biodiversität von innerbetrieblich gelagerten Zwischenprodukten der Milchindustrie war bisher kaum etwas bekannt, da offizielle und öffentlich zugängliche Vergleichsdaten fehlten. Somit stellen die in der vorliegenden Arbeit präsentierten Ergebnisse vermutlich eine der ersten Veröffentlichungen zu diesem Thema dar. Die milchtechnologische Verarbeitungskette beinhaltet im Allgemeinen keimreduzierende Maßnahmen. Daher wurde von einer von der Rohmilch abweichenden Zusammensetzung der Mikrobiota ausgegangen. Diese Vermutung wurde jedoch nur teilweise bestätigt, da sich auch viele Gemeinsamkeiten in der Mikrobiota von Rohmilchen und Milchhalbfabrikaten gezeigt hatten. Die Mediane der Gesamtkeimzahlen der 30 Milchhalbfabrikate (siehe Abbildung 3-3) lagen bei allen drei untersuchten Temperaturen um etwa eine Potenz niedriger als bei den Hofmilchen und um eineinhalb bis zweieinhalb Potenzen niedriger als bei den Molkereitankmilchen. Dabei hätten die zur Produktion angewendeten Verfahren zur Keimreduzierung (siehe 2.2) theoretisch zu einer durchschnittlichen GKZ von unter $3,0 \log_{10}$ KbE/ml führen müssen. Dies war zumindest für die Gesamtkeimzahlen bei 6 °C der Fall. Transportbedingt wird jedoch, wie auch bei den Rohmilchen, eine niedrigere ursprüngliche GKZ vermutet, die sich während der Lagerzeit erhöht hatte. Dies wird auch dadurch bestätigt, dass 13 der 30 Proben eine GKZ von unter $4,0 \log_{10}$ bei allen drei Temperaturen zum Untersuchungszeitpunkt aufwiesen, wobei die GKZ bei 15 °C und 6 °C meist sogar unter 100 KbE/ml lag. Außerdem ergab sich eine etwas niedrigere durchschnittliche GKZ von rund $3,9 \log_{10}$ (30 °C), $2,9 \log_{10}$ (15 °C) und $2,1 \log_{10}$ (6 °C), wenn von den untersuchten Proben nur die mit einer 2-3 tägigen Lagerung (ohne Transport) in Betracht gezogen wurden, um eine übliche innerbetriebliche Zwischenlagerung zu simulieren. Die Gesamtkeimzahlen der nicht über 55 °C erhitzten Proben Sahne 3 und Sahne 5 entsprachen in etwa dem Durchschnitt und wurden daher in alle Berechnungen miteinbezogen. Die Mikrobiota der neun Proben, deren GKZ bei 15 °C unterhalb der gewählten Stichprobengröße von mindestens 100 KbE/ml lag, wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht. Gleiches gilt für die Probe EwagMk7. Eine Auswertung auf Basis der einzelnen Produktgruppen wurde aufgrund der unterschiedlichen Herstellungsverfahren, der teilweise unvollständigen Informationen über Herkunft und Herstellung und dem stark variierenden Alter der Proben nicht durchgeführt. Aus den gleichen Gründen wurde auf eine statistische Auswertung der untersuchten Proben auf Basis der Produktgruppen in Bezug auf die vorherrschenden Mikrobiota verzichtet. Dennoch konnte unabhängig von Produktgruppe, Herstellungsverfahren und Lagerzeit und unter Einbeziehung aller Proben eine statistisch signifikant niedrigere durchschnittliche GKZ in den Milchhalbfabrikaten im Vergleich zu den 20 Rohmilchen ermittelt werden. Den absoluten Zahlen zufolge konnten aus den Milchhalbfabrikaten insgesamt mehr gramnegative, fakultativ anaerobe Bakterien sowie grampositive, aerobe Sporenbildner und grampositive High GCs isoliert werden (siehe Abbildung 3-11). Ein höherer Anteil der grampositiven High GCs, von denen einige die Pasteurisierung überstehen können (Fromm & Boor, 2004, Schmidt *et al.*, 2012a, Sørhaug & Stepaniak, 1997), entsprach den Erwartungen. Dies gilt auch für die Sporen vieler grampositiver, aerober Sporenbildner. Dabei überstehen die Sporen der angewendeten

thermischen Verfahren nicht nur weitestgehend unbeschadet, sondern werden durch diesen Hitzeschock teilweise sogar zum Auskeimen angeregt (Berg & Sandine, 1970, Ghosh & Setlow, 2009, Keynan *et al.*, 1964, Krawczyk *et al.*, 2017, Luu *et al.*, 2015). Somit stellen thermische Maßnahmen zur Keimreduzierung in gewisser Art und Weise sogar eine Selektion dar und begünstigen das Wachstum dieser Gruppen durch Abtötung der Begleitflora. Aber auch unter den Milchsäurebakterien, deren Mehrheit Hitzebehandlungen von über 75 °C nicht übersteht, gibt es Gattungen oder Arten, die eine erhöhte Widerstandsfähigkeit gegenüber thermischen Verfahren besitzen (McAuley *et al.*, 2012, Sørhaug & Stepaniak, 1997). Dazu zählt beispielsweise die Gattung *Streptococcus*, deren Vertreter den Hauptteil der MSB aus den Milchhalbfabrikaten ausmachten. Jedoch hätten sämtliche gramnegative Bakterien, die etwa 60 % der Milchhalbfabrikat-Mikrobiota ausmachten, durch die angewendeten thermischen Verfahren abgetötet werden müssen. Durch eine teilweise vorgeschaltete Mikrofiltration hätten diese ebenfalls deutlich effektiver entfernt werden müssen. Daher handelt es sich bei den nachgewiesenen gramnegativen Bakterien aller Wahrscheinlichkeit nach um Sekundärkontaminationen, die über die Verarbeitungsanlagen nachträglich eingebracht wurden (Dogan & Boor, 2003, Eneroth *et al.*, 1998, Fromm & Boor, 2004, Quigley *et al.*, 2013a, Ternström *et al.*, 1993). Bei einigen Milchhalbfabrikaten kommt außerdem der Umstand hinzu, dass Mikro- und Ultrafiltration auch zum Zweck der Konzentrierung eingesetzt wurden. Dadurch kommt es gleichzeitig zu einer Anreicherung von Mikroorganismen, die vorherige keimreduzierende Maßnahmen überstanden hatten. Darauf deutet auch die Tatsache hin, dass in den einzelnen Proben meist einzelne Gattungen dominierten (siehe Tabelle 3-7).

Auf Gattungsebene zeigte sich ein der Gesamt-Rohmilch-Mikrobiota ähnliches Verteilungsmuster in Bezug auf die Dominanz einzelner Gattungen. Insgesamt 16 Gattungen traten bei den Milchhalbfabrikaten in den Vordergrund und dominierten die Gesamt-Milchhalbfabrikat-Mikrobiota. Allen voran die Gattungen *Pseudomonas* und *Microbacterium*, wobei auch sieben gramnegative, fakultativ anaerobe Bakteriengattungen zu den 16 häufigsten Gattungen zählten. Beim Vergleich der Mikrobiota der Milchhalbfabrikate (siehe Abbildung 3-12 und Tabelle 3-6) und der Rohmilchen (siehe Abbildung 3-7 und Tabelle 3-2) konnte festgestellt werden, dass die Gattungen *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Hafnia*, *Lactococcus*, *Microbacterium*, *Pseudomonas* und *Streptococcus* jeweils zu den am häufigsten isolierten Gattungen zählten. Dabei fiel die absolute Biodiversität der Milchhalbfabrikate mit 49 Gattungen etwas geringer aus als die der Rohmilchen (62 Gattungen). Zusammengefasst wurden in den 40 untersuchten Proben 75 Gattungen detektiert, davon konnten 36 Gattungen sowohl aus den Milchhalbfabrikaten als auch aus den Rohmilchen isoliert werden. Erstaunlicherweise konnten 91 % der insgesamt 4812 Isolate aus den Rohmilchen und Milchhalbfabrikaten einer dieser 36 Gattungen zugeordnet werden (siehe Tabelle 4-1). Diese zählen größtenteils zu den typischen Vertretern der Milchkrobiota oder wurden bereits in der milchverarbeitenden Industrie nachgewiesen (Coton *et al.*, 2010, Munsch-Alatossava & Alatossava, 2006, Quigley *et al.*, 2013b, Vacheyrou *et al.*, 2011). Somit ist das generell

vorkommende Keimspektrum der hier untersuchten Milchhalbfabrikate auf Gattungsebene qualitativ mit dem von kaltgelagerter Rohmilch vergleichbar.

Tabelle 4-1: Gemeinsame Gattungen der Rohmilchen und Milchhalbfabrikate.

1	<i>Citrobacter</i>	13	<i>Janthinobacteriu</i>	25	<i>Plantibacter</i>
2	<i>Enterobacter</i>	14	<i>Leucobacter</i>	26	<i>Rhodococcus</i>
3	<i>Escherichia</i>	15	<i>Moraxella</i>	27	<i>Aerococcus</i>
4	<i>Hafnia</i>	16	<i>Obesumbacterium</i>	28	<i>Lactobacillus</i>
5	<i>Klebsiella</i>	17	<i>Pseudomonas</i>	29	<i>Lactococcus</i>
6	<i>Kluyvera</i>	18	<i>Stenotrophomonas</i>	30	<i>Leuconostoc</i>
7	<i>Serratia</i>	19	<i>Arthrobacter</i>	31	<i>Streptococcus</i>
8	<i>Yersinia</i>	20	<i>Corynebacterium</i>	32	<i>Weissella</i>
9	<i>Acinetobacter</i>	21	<i>Curtobacterium</i>	33	<i>Macrococcus</i>
10	<i>Brevundimonas</i>	22	<i>Kurthia</i>	34	<i>Staphylococcus</i>
11	<i>Chryseobacterium</i>	23	<i>Microbacterium</i>	35	<i>Bacillus</i>
12	<i>Delftia</i>	24	<i>Micrococcus</i>	36	<i>Rhodotorula</i>

Potentielle neue Gattungen und Arten aus Rohmilchen und Milchhalbfabrikaten

Die Mikrobiota von Rohmilch und Molkereiprodukten wird zwar seit vielen Jahrzehnten untersucht, und doch scheint es, als ob noch vieles im Dunkeln liegt. So wurden in einigen Studien der letzten Jahre zahlreiche potentiell neue Gattungen und Arten isoliert (De Jonghe *et al.*, 2011, Fricker *et al.*, 2011, Hantsis-Zacharov & Halpern, 2007, Schmidt *et al.*, 2012a, Vithanage *et al.*, 2016) und einige aus Rohmilch isolierte Arten erstbeschrieben (Schmidt *et al.*, 2012b, Shaked *et al.*, 2010, Supre *et al.*, 2010, Vaz-Moreira *et al.*, 2011, Wiertz *et al.*, 2013, Wolfgang *et al.*, 2012). Dass es sich dabei nicht zwangsläufig um vereinzelte Isolate handelt, haben die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit gezeigt. Fünf potentiell neue Arten konnten aus mindestens drei unabhängigen Proben isoliert werden (siehe Tabelle 3-8). Der Anteil potentiell neuer Arten an der Mikrobiota lag zwar meist unter 10 %, aber die Art *Acinetobacter* sp. nov. (1) dominierte die Mikrobiota zweier Molkereitankmilchen (siehe Abbildung 3-9). Gleichzeitig war *Acinetobacter* sp. nov. (1) die dritthäufigste aus den Rohmilchen isolierte Art und konnte aus sechs Rohmilchproben isoliert werden. Insgesamt wurden unter den 204 isolierten Arten 33 potentiell neue Arten (16 % aller detektierten Arten) und eine potentiell neue Gattung ermittelt. Bezogen auf die Anzahl der repräsentativen Isolate waren es 14 %, die wiederum 13,4 % aller Isolate repräsentierten. Vergleichbare Ergebnisse hatten auch Hantsis-Zacharov and Halpern (2007) sowie Vithanage *et al.* (2016) erzielt, die in ihren Studien rund 20 % bzw. 13 % der Isolate potentiell neuen Arten oder Gattungen zuordnen konnten. Dennoch war es überraschend, dass allein 27 der 33 potentiell neuen Arten der Gattung *Pseudomonas* zugeordnet werden konnten, was mehr als der Hälfte der detektierten *Pseudomonas*-Arten entspricht. Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass das *rpoD*-Gen zur Identifizierung verwendet wurde, das, wie bereits erwähnt, eine stärkere Differenzierung der Arten innerhalb dieser Gattung ermöglicht. Außerdem kommt hinzu, dass alle Isolate über die Ähnlichkeit zu Typstamm-Gensequenzen identifiziert wurden (siehe

2.7.1). Dies ist insofern entscheidend, da viele *Pseudomonas*-Stämme (keine Typstämme), deren Genom in öffentlichen Datenbanken (Benson *et al.*, 2013) hinterlegt ist, als falsch identifiziert anzusehen sind (Gomila *et al.*, 2015). Gleiches gilt vermutlich auch für zahlreiche hinterlegte 16S-rRNA-Gensequenzen von Stämmen verschiedenster Gattungen, die selbst anhand von hinterlegten Nicht-Typstamm-Einzelgensequenzen identifiziert wurden. Da eine Charakterisierung und Klassifizierung aller 33 potentiell neuen Arten und der potentiellen neuen Gattung im Rahmen der vorliegenden Arbeit zeitlich nicht möglich war, wurden vier der 27 potentiell neuen *Pseudomonas*-Arten ausgewählt und erstbeschrieben (siehe 3.4 und 4.4). Unter dem Punkt 4.4.2 wird außerdem auf die taxonomische Einordnung der in Abbildung 3-14 mit „*Pseudomonas* sp. nov. (1) ?“ bezeichneten Isolate gesondert eingegangen.

4.2 Lipolytische und proteolytische Aktivität der repräsentativen Mikrobiota

Agardiffusions-Tests, um das lipolytische und proteolytische Potential von Isolaten zu ermitteln, kamen bereits in vielen Studien zum Einsatz (Hantsis-Zacharov & Halpern, 2007, Marchand *et al.*, 2009b, Munsch-Alatossava & Alatossava, 2006, Nörnberg *et al.*, 2010, Teh *et al.*, 2011). Nach Baur *et al.* (2015) bietet diese Methode den Vorteil eines relativ schnell zu erhaltenden, visuellen Ergebnisses, hat aber gleichzeitig auch ihre Nachteile. Zum einen bieten sie keine zuverlässige Möglichkeit, die Enzymaktivität zu quantifizieren, und zum anderen kann die Kultivierung auf festen Medien zu einem anderen Wachstumsverhalten führen, wie eine Kultivierung in Flüssigmedien, welche milchähnlichere Bedingungen bieten würden. Vor allem auch, weil die Bildung mancher hydrolytischer Enzyme von zahlreichen Umweltfaktoren beeinflusst wird, wozu auch die Nährstoffverfügbarkeit zählt (Kasana, 2010). Andererseits konnten Baur *et al.* (2015), die 231 der repräsentativen Isolate der vorliegenden Arbeit in einer gesonderten Studie auf ihre Enzymbildung in Flüssigkultur hin untersucht hatten, die Ergebnisse der Agardiffusions-Tests für viele Isolate bestätigen. Gleichzeitig konnte in dieser Studie aber auch gezeigt werden, dass auch die Messung der enzymatischen Aktivität im Kulturüberstand von Isolaten gewisse Schwächen aufweist. Dies betrifft zum einen die Untersuchungen zur proteolytischen Aktivität von Milchsäurebakterien, deren zellwandgebundene Peptidasen (Liu *et al.*, 2010) nicht im Kulturüberstand zu finden sind, und zum anderen wurde darauf hingewiesen, dass allgemein nur die Aktivität zum Untersuchungszeitpunkt detektiert wird. Im Gegensatz dazu stellen die Ergebnisse von Agardiffusions-Tests die Summe der enzymatischen Aktivität über die gesamte Inkubationszeit dar, wodurch auch Isolate mit geringerer enzymatischer Aktivität ermittelt werden können. Anzumerken ist an dieser Stelle auch, dass der verwendete Tributyrin-Agar nicht ausschließlich Lipasen detektiert, sondern aufgrund des kurzkettigen Substrats Tributyrin (CAS-Nummer: 60-01-5) auch Esterasen als spaltende Enzyme in Frage kommen können (Chen *et al.*, 2003). Daher ist der Begriff „Lipase“, wie unter Punkt 1.1 erwähnt, in der vorliegenden Arbeit mit dem eines „lipolytischen Enzyms“ (Esterase oder Lipase) gleichzusetzen, sofern nicht näher darauf eingegangen wurde. Des Weiteren werden bei dem verwendeten Proteolyse-Agar falsch-positive Ergebnisse, wie sie für Standard-Magermilch-Agar beschrieben wurden (Jones *et al.*, 2007, Morris *et al.*, 2012), aus den nachfolgenden Gründen als unwahrscheinlich erachtet. Standard-Magermilch-Agar enthält i. d. R. einen Magermilchanteil von etwa 10 %, weist dadurch aber eine relativ geringe Medientrübung auf. Diese kann durch Säuerung des Mediums aufgehoben werden und somit besteht die Möglichkeit, dass sich das Medium um die Kolonien von Isolaten, die Säuren als Stoffwechselprodukte ausscheiden, aufhellt (Jones *et al.*, 2007, Morris *et al.*, 2012). Im Gegensatz dazu enthielt der in der vorliegenden Arbeit verwendete Proteolyse-Agar einen Magermilchanteil von 50 % und war deutlich trüber als Standard-Magermilch-Agar. Die Medientrübung konnte durch Säuerung (getestet mit 1M HCl) nicht aufgehoben werden, vielmehr fielen Medienkomponenten (vermutlich das Casein) aus und färbten das leicht bräunliche Medium weiß. Bei vorliegender proteolytischer Aktivität eines Isolats und gleichzeitiger Mediensäuerung besteht dadurch aber die Möglichkeit, dass die Proteolyse

aufgrund der Stärke des Agarmediums überlagert wird. Somit sind falsch-negative Ergebnisse in Form von nicht erkannter proteolytischer Aktivität insbesondere bei Milchsäurebakterien denkbar und können somit nicht ausgeschlossen werden.

Ganz allgemein hatte sich gezeigt, dass die lipolytische und proteolytische Aktivität der repräsentativen Mikrobiota der Rohmilchen und Milchhalbfabrikate bei 30 °C und 6 °C prozentual betrachtet relativ ähnlich war (siehe Tabelle 3-9). Der höhere Anteil nicht aktiver Isolate bei 6 °C in der Mikrobiota der Milchhalbfabrikate ist dabei in erster Linie auf die bei kühlen Temperaturen kaum ausgeprägte Aktivität der Isolate der Gattung *Microbacterium* zurückzuführen (siehe Abbildung 3-17). Aus diesen Ergebnissen ging außerdem hervor, dass auch relativ häufig isolierte Gattungen oder Arten ein niedriges enzymatisches Verderbspotential besitzen können und dieses somit unabhängig von der zahlenmäßigen Dominanz zu betrachten ist. Und obwohl die Ergebnisse der repräsentativen Isolate der einzelnen Gattungen und Arten teilweise deutliche Schwankungen gezeigt hatten, ließen sich daraus mehr oder weniger stark ausgeprägte gruppen- oder gattungsspezifische Tendenzen in der Art der enzymatischen Aktivitätsausprägung ableiten. Dies gilt insbesondere für die taxonomischen Großgruppen der gramnegativen, fakultativ anaeroben Bakterien, der Hefen und der Milchsäurebakterien sowie auch für die Gattungen *Microbacterium*, *Staphylococcus*, *Acinetobacter* und *Pseudomonas*, auf die im Nachfolgenden genauer eingegangen wird.

Für die taxonomische Großgruppe der gramnegativen, fakultativ anaeroben Bakterien konnte sowohl bei 30 °C als auch bei 6 °C eine Tendenz zu rein proteolytischer Aktivität festgestellt werden, auch wenn vereinzelt rein lipolytische Aktivität aufgetreten war. Außerdem fiel auf, dass bei 6 °C mehr Isolate eine enzymatische Aktivität aufwiesen. Gleiches gilt auch für die taxonomische Großgruppe der Hefen, wobei diese eher zu rein lipolytischer Aktivität tendierten, aber auch proteolytische Aktivität auftrat. Diese Aktivitätsmuster stehen dabei im Einklang mit den Daten aus der Literatur. Proteolytische, aber auch lipolytische Aktivität und psychrotolerantes Wachstum wurden für zahlreiche gramnegative, fakultativ anaerobe Bakterien beschrieben (Chaves-Lopez, 2006, Cousin, 1982, Morales *et al.*, 2003, Wessels *et al.*, 1989). Zu den genauer untersuchten Vertretern zählt dabei auch die im Lebensmittelbereich häufig anzutreffende Art *Serratia marcescens* (Decimo *et al.*, 2014, Ercolini *et al.*, 2009, Nychas *et al.*, 2009, Pegoraro *et al.*, 2015), deren Lipase-Peptidase-Operon starke Ähnlichkeit zu dem in der Gattung *Pseudomonas* verbreiteten *apr*-Operon aufweist (Akatsuka *et al.*, 1995, Kawai *et al.*, 1998, Kawai *et al.*, 1999, Linhartova *et al.*, 2010), auf das in der vorliegenden Arbeit gesondert eingegangen wird.

Unter den Hefen scheint lipolytische Aktivität sehr weit verbreitet zu sein und deren Lipasen finden teilweise sogar industriellen Einsatz (Apte *et al.*, 2013, Aravindan *et al.*, 2007, Kabisch *et al.*, 2013, Kontkanen *et al.*, 2004, Pandey *et al.*, 1999, Vakhlu & Kour, 2006), da viele Hefen den sogenannten GRAS-Status (englische Abkürzung für: **G**enerally **R**ecognized **A**s **S**afe) besitzen. Dabei weisen die Lipasen der verschiedenen Hefen-Gattungen und -Arten eine relativ hohe Diversität in Bezug auf ihre Ähnlichkeit in der Tertiärstruktur und der

Aminosäuresequenz auf (Gupta *et al.*, 2015). Aber auch Peptidasen wurden in zahlreichen Hefen-Arten nachgewiesen (Flores *et al.*, 1999, Ogrydziak, 1993, Ustariz *et al.*, 2007). Von der am zweithäufigsten isolierten Hefe-Art *Kluyveromyces marxianus* ist beispielsweise bekannt, dass deren Vertreter sowohl eine thermostabile extrazelluläre Lipase als auch eine thermostabile extrazelluläre Peptidase bilden können (Deive *et al.*, 2003, Foukis *et al.*, 2012).

Die Ergebnisse der Milchsäurebakterien lassen auf eine generelle Tendenz zu überwiegend rein proteolytischer Aktivität schließen, wobei auch zahlreiche Isolate keine detektierbare enzymatische Aktivität gezeigt hatten. Bei 14 Arten (*Carnobacterium divergens*, *Enterococcus aquimarinus*, *Enterococcus devriesei*, *Enterococcus malodoratus*, *Enterococcus saccharolyticus*, *Lactobacillus oligofermentans*, *Lactococcus garvieae*, *Lactococcus* sp. nov. (1), *Leuconostoc citreum*, *Streptococcus australis*, *Streptococcus parasanguinis*, *Weissella confusa*, *Weissella paramesenteroides* und *Weissella viridescens*) betraf dies sogar alle Isolate, wobei diese Arten in der Regel nur durch ein oder zwei Isolate vertreten waren. Dennoch lassen die Daten zumindest für die Gattung *Weissella* vermuten, dass in dieser generell keine mittels Agardiffusions-Tests nachweisbare proteolytische Aktivität vorhanden zu sein scheint, sofern auch die isolierten Arten keine zellwandgebundene Peptidase besitzen, wie es für *Weissella cibaria* bereits nachgewiesen wurde (Lynch *et al.*, 2015). Ob es sich dabei um eine stammspezifische Eigenschaft oder um eine generelle Eigenschaft der gesamten Gattung handelt, müsste aber in weiterführenden phänotypischen und genetischen Untersuchungen überprüft werden, in die alle Arten der Gattung miteinbezogen werden.

Die kaum beobachtete lipolytische Aktivität der untersuchten Milchsäurebakterien-Isolate steht ebenfalls in Einklang mit der Literatur. Obwohl lipolytische Enzyme einiger Arten zur Reifung bestimmter Käsesorten beitragen (Collins *et al.*, 2003, Oliszewski *et al.*, 2007), gelten Milchsäurebakterien als schwach lipolytisch (Katz *et al.*, 2002, Medina *et al.*, 2004, Meyers *et al.*, 1996, Tsakalidou *et al.*, 1994). Einer der Gründe hierfür ist vermutlich, dass deren Lipasen oft auch intrazellulär vorliegen und somit erst nach Autolyse der Zellen freigesetzt werden (Meyers *et al.*, 1996, Wilkinson & Kilcawley, 2005). Andererseits könnte in einigen MSB-Gattungen oder -Arten auch eine Abhängigkeit der lipolytischen Aktivität bestehen, die auf dem Abbau oder der Aktivierung der Lipasen durch extrazelluläre Peptidasen beruht, wie es von *Lactobacillus plantarum* (Lopes *et al.*, 1999) und anderen Nicht-Milchsäurebakterien-Arten (Ayora *et al.*, 1994, Kok *et al.*, 1996) bekannt ist. Die lipolytische und proteolytische Aktivität einiger MSB gilt als sowohl art- als auch stammspezifisch (Foulque Moreno *et al.*, 2006, Katz *et al.*, 2002) und auch in der vorliegenden Arbeit konnten keine gattungsspezifischen Ausprägungen der enzymatischen Aktivität ermittelt werden. Dies könnte aber auch daran liegen, dass aus den einzelnen Gattungen und Arten teilweise nur eine geringe Anzahl enzymatisch aktiver Isolate isoliert werden konnte.

Aufgrund des ähnlichen Aufbaus des proteolytischen Systems vieler Milchsäurebakterienarten (Liu *et al.*, 2010) und den vorliegenden phänotypischen Daten wird

zwar von einer allgemeinen gruppenspezifischen Aktivitätstendenz ausgegangen, eine art- oder stammspezifische Aktivitätsausprägung wird aber als hierfür verantwortliche Ursache angesehen. Das proteolytische System der Milchsäurebakterien besteht bei den Arten einiger Gattungen aus zellwandgebundenen extrazellulären Peptidasen zur Spaltung von beispielsweise Milchproteinen in Oligopeptide, den Transportproteinen zur Aufnahme der Oligopeptide in die Zelle und intrazellulären Peptidasen zur Spaltung der Oligopeptide in kürzere Peptide und Aminosäuren (Kunji *et al.*, 1996, Liu *et al.*, 2010, Savijoki *et al.*, 2006). Zellwandgebundenen Peptidasen sind allem Anschein nach hauptsächlich auf einzelne Arten der Gattungen *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* und *Streptococcus* beschränkt (Børsting *et al.*, 2015, Fernandez-Espla *et al.*, 2000, Griffiths & Tellez, 2013, Liu *et al.*, 2010, Matthews *et al.*, 2004, Morandi *et al.*, 2006). Aber auch weitere extrazelluläre Peptidasen können vorhanden sein, wie es bei *Enterococcus durans*, *Enterococcus faecalis* und *Enterococcus faecium* (Ramakrishnan *et al.*, 2012, Shankar *et al.*, 2012) der Fall ist. Der insgesamt ermittelte niedrigere Anteil proteolytisch aktiver *Lactococcus*-Isolate bei 6 °C war insofern nicht überraschend, da die zellwandgebundene Peptidase (PrtP) bei vielen *Lactococcus* sp. Stämmen plasmidcodiert vorliegt (Christensson *et al.*, 2001, McKay & Baldwin, 1975, Teuber & Geis, 2006). Während des Wachstums in Milch und insbesondere unter suboptimalen Bedingungen, wie beispielsweise dem Wechsel des Wachstumsmediums in Verbindung mit der Temperaturänderung im Zuge der Primäransucht der Isolate, besteht daher die Möglichkeit, dass Teile der Population das Plasmid und dadurch die Peptidase verlieren. Peptidasenegative *Lactococcus lactis* Stämme treten in Gegenwart peptidasepositiver Stämme auf. Sie profitieren dabei von den durch die Caseinspaltung entstandenen Oligopeptiden (Juillard *et al.*, 1995), obwohl sie keine eigene Peptidase synthetisieren und haben dadurch einen Wachstumsvorteil gegenüber dem peptidasepositiven Populationsteil (Bachmann *et al.*, 2011, Bachmann *et al.*, 2012, Hugenholtz *et al.*, 1987). Die Existenz peptidasenegativer und peptidasepositiver Stämme wurde außerdem auch bereits bei der Art *Streptococcus thermophilus* beobachtet (Delorme *et al.*, 2010, Galia *et al.*, 2009). Daher könnte es sich auch um ein unter den MSB verbreitetes Phänomen handeln. Diese These müsste jedoch in umfangreichen, systematischen Untersuchungen überprüft werden. Die Unterschiede in der proteolytischen Aktivität der Isolate könnten aber auch auf deren Ursprung zurückzuführen sein. Beispielsweise wurden zahlreiche peptidasenegative *Lactococcus lactis* Stämme auch von Pflanzen isoliert (Liu *et al.*, 2010), wodurch ein Eintrag über das Futter oder das Einstreu im Stall der Kühe in die Rohmilch denkbar ist. Insgesamt betrachtet wird die Bedeutung der Milchsäurebakterien in Hinblick auf mikrobiellen oder enzymatischen Verderb für Rohmilch als relativ gering eingestuft, wobei einzelne Arten auch bei kühlen Temperaturen durchaus das Potential dazu besitzen.

Für die Rohmilch- und Milchhalbfabrikat-Isolate der Gattung *Microbacterium* konnte bei 30 °C eine deutliche Tendenz zu rein proteolytischer Aktivität oder lipolytischer und proteolytischer Aktivität festgestellt werden. Bei 6 °C hingegen konnte keine deutliche

Tendenz festgestellt werden, wobei auch nur sehr wenige Isolate enzymatische Aktivität gezeigt hatten. Auf Gattungsebene, wie auch für einzelne Arten, entsprach diese Tendenz der enzymatischen Aktivität der, die bereits in anderen Studien beobachtet wurde (Hantsis-Zacharov & Halpern, 2007, Vithanage *et al.*, 2016). Genauere Untersuchungen zu proteolytischen oder lipolytischen Enzymen von *Microbacterium*-Arten liegen nur vereinzelt vor (Joseph *et al.*, 2012, Kanayama & Sakai, 2005, Lu *et al.*, 2014, Thys *et al.*, 2004, Tripathi *et al.*, 2014). Dennoch lassen diese und weitere Studien (Alves *et al.*, 2015, Yu *et al.*, 2013, Zhang *et al.*, 2014) vermuten, dass die Fähigkeit, proteolytische und lipolytische Enzyme zu bilden, innerhalb der Gattung *Microbacterium* weit verbreitet ist. Ebenso konnte auch eine geringere Aktivität bei Temperaturen unter 10 °C bereits beobachtet werden (Schmidt *et al.*, 2012a). Für die Gattung *Staphylococcus* konnte ebenfalls eine Tendenz in der enzymatischen Aktivität zu überwiegend rein proteolytischer Aktivität ermittelt werden. Diese war jedoch hauptsächlich auf die Isolate der Arten *Staphylococcus sciuri* und *Staphylococcus xylosus* zurückzuführen, die bei 30 °C eine Tendenz zu rein proteolytischer Aktivität gezeigt hatten. Bei 6 °C war diese Tendenz nur bei *Staphylococcus sciuri* erkennbar. Die Isolate der Art *Staphylococcus equorum* hingegen zeigten bei 30 °C eine Tendenz zu proteolytischer und lipolytischer Aktivität und bei 6 °C zu rein lipolytischer Aktivität. Damit scheint die Wachstumstemperatur die Aktivitätsausprägung der Isolate der Art *Staphylococcus equorum* stärker zu beeinflussen, als es bei den anderen Arten der Fall war. Verschiedene Studien bestätigen das ermittelte enzymatische Potential für die Arten *Staphylococcus sciuri* (Bochniarz & Wawron, 2012, Kloos *et al.*, 1976, Stepanovic *et al.*, 2001), *Staphylococcus xylosus* (Casaburi *et al.*, 2008, Iacumin *et al.*, 2006, Mauriello *et al.*, 2004, Sørensen & Samuelsen, 1996), *Staphylococcus equorum* (Landeta *et al.*, 2013, Mauriello *et al.*, 2004) und *Staphylococcus vitulius* (Landeta *et al.*, 2013). Jedoch geht aus einigen dieser Studien ebenfalls eine uneinheitliche Aktivitätsausprägung innerhalb der einzelnen Arten hervor (Kloos *et al.*, 1976, Landeta *et al.*, 2013, Mauriello *et al.*, 2004). Daher liegt die Vermutung nahe, dass die Ausprägung der enzymatischen Aktivität bei *Staphylococcus*-Arten art- oder stammspezifisch ist und gleichzeitig die Enzymbildung regulatorischen Prozessen unterliegt, wie es für Lipasen von *Staphylococcus epidermidis* (Farrell *et al.*, 1993), *Staphylococcus hyicus* subsp. *hyicus* (Ayora *et al.*, 1994) und *Staphylococcus xylosus* (Iacumin *et al.*, 2007) gezeigt werden konnte. Zusammengefasst lassen die vorliegenden Daten in Verbindung mit den Literaturdaten darauf schließen, dass die Gattungen *Microbacterium* und *Staphylococcus* für kaltgelagerte Rohmilchen und Molkereiprodukte eine untergeordnete Rolle spielen, da bis auf wenige Arten nur ein geringes enzymatisches Verderbspotential vorliegt.

Die für die Isolate der Gattung *Acinetobacter* beobachtete fast ausschließliche lipolytische Aktivität war überraschend, da mehrere Studien auch proteolytische Aktivität für *Acinetobacter*-Isolate detektiert hatten (Adav *et al.*, 2009, Baruzzi *et al.*, 2012, Hantsis-Zacharov & Halpern, 2007, Vithanage *et al.*, 2016). Außerdem wurden mehrere *Acinetobacter*-Arten mit proteolytischer Aktivität beschrieben (Krizova *et al.*, 2015a, Nemeč *et al.*, 2016). Laut Nemeč *et al.* (2016) und Touchon *et al.* (2014) bilden diese teilweise auch

hämolytischen *Acinetobacter*-Arten mit wenigen Ausnahmen ein eigenes phylogenetisches Cluster. Die meisten davon wurden aus klinischem Humanmaterial, Böden oder Gewässern isoliert. In einem weiteren phylogenetischen Cluster liegen die in der vorliegenden Arbeit hauptsächlich isolierten Arten *Acinetobacter johnsonii*, *Acinetobacter guillouiae*, *Acinetobacter bereziniae* und *Acinetobacter variabilis*. Aus deren Artbeschreibungen (Bouvet & Grimont, 1986, Krizova *et al.*, 2015b, Nemeč *et al.*, 2010) geht hervor, dass diese, oder zumindest deren Typstämme, keine proteolytische Aktivität besitzen, was durch die Studie von Krizova *et al.* (2015a) für diese und fast alle anderen der insgesamt 38 darin untersuchten Arten bestätigt wurde. Die vorliegenden Daten der Arten *Acinetobacter* sp. nov. (1), *Acinetobacter johnsonii*, *Acinetobacter guillouiae*, *Acinetobacter bereziniae* und *Acinetobacter variabilis* deuten unabhängig von der Inkubationstemperatur auf eine gleichartige Tendenz zu überwiegend lipolytischer Aktivität hin, auch wenn einzelne Isolate keine Aktivität gezeigt hatten. Diese Aktivitätsausprägung scheint aber nicht nur für diese milchassoziierten Arten zutreffend zu sein, da auch für Arten aus anderen Habitaten lipolytische Enzyme nachgewiesen wurden (Kang *et al.*, 2011, Kim *et al.*, 2008a, Lee & Lee, 2010). Ergänzend dazu wurden zahlreiche Studien über extrazelluläre lipolytische Enzyme von *Acinetobacter*-Arten und -Isolaten veröffentlicht (Ahmed *et al.*, 2010, Chen *et al.*, 1998, Hořtacká, 2000, Jagtap *et al.*, 2010, Kim *et al.*, 2008b, Kok *et al.*, 1995, Li *et al.*, 2000, Shabtai & Gutnick, 1985, Snellman & Colwell, 2008, Snellman *et al.*, 2002). Einige der Lipasen haben sogar das Potential für den industriellen Einsatz (Snellman & Colwell, 2004), da sie neben einer gewissen Hitzeresistenz (70–90 °C) (Khoramnia *et al.*, 2011, Park *et al.*, 2009, Uttatree *et al.*, 2010) auch enzymatische Aktivität bei kühlen Temperaturen aufweisen können (Suzuki *et al.*, 2001, Wang *et al.*, 2012, Zheng *et al.*, 2011). Vor den soeben genannten Hintergründen wird von einer in der Gattung *Acinetobacter* sehr weit verbreiteten Tendenz zu lipolytischer Aktivität ausgegangen, der in Hinblick auf Fettverderb in der Milchindustrie vermutlich eine höhere Bedeutung zukommt. Ergänzend dazu sind auch proteolytische Arten bekannt (Nemeč *et al.*, 2016), wobei diese den Literaturdaten und den vorliegenden Daten zufolge im Molkereiumfeld eine eher untergeordnete Rolle einnehmen.

Die vorliegenden Daten der 47 untersuchten *Pseudomonas*-Arten lassen zusammengefasst auf eine in der Gattung sehr stark verbreitete Fähigkeit zur proteolytischen und lipolytischen Aktivität schließen, auch wenn einzelne Arten davon abwichen. Dabei scheint die Aktivität bei tieferen Temperaturen höher zu sein, zumindest hatten mehr Isolate bei 6 °C diesen Aktivitätstyp gezeigt, was die Bedeutung der Gattung im milchverarbeitenden Umfeld hervorhebt. Die Aktivitätsausprägung der Isolate innerhalb der einzelnen Arten war tendenziell gleich, obwohl gleichzeitig eine teilweise deutliche Variabilität zu beobachten war. Beispielsweise zeigten im Vergleich zu den Arten *Pseudomonas lactis* sp. nov. (*Pseudomonas* sp. nov. (1)), *Pseudomonas meridiana* und *Pseudomonas proteolytica* anteilmäßig weniger Isolate der Arten *Pseudomonas fragi*, *Pseudomonas lundensis* und *Pseudomonas* sp. nov. (2) lipolytische Aktivität (siehe Abbildung 3-18). Dieses Phänomen konnte bereits schon in anderen Studien beobachtet werden (Hantsis-Zacharov & Halpern,

2007, Marchand *et al.*, 2009a, Marchand *et al.*, 2009b), auch wenn der genaue Grund dafür unbekannt ist. Eine ähnliche Variabilität konnte auch von Baur *et al.* (2015) für die in ihrer Studie enthaltenen *Pseudomonas*-Isolate der vorliegenden Arbeit ermittelt werden, die auf ihr proteolytisches und lipolytisches Potential in Flüssigkultur hin untersucht wurden. Dabei hatte sich außerdem gezeigt, dass die Isolate der Arten *Pseudomonas lactis* sp. nov. (*Pseudomonas* sp. nov. (1)), *Pseudomonas meridiana* und *Pseudomonas proteolytica* eine deutlich stärkere Aktivität aufwiesen als die der Arten *Pseudomonas fragi* und *Pseudomonas lundensis*. Die proteolytische und lipolytische Aktivität von *Pseudomonas*-Arten ist seit langem bekannt (Burini *et al.*, 1994, Christen & Marshall, 1984, Mayerhofer *et al.*, 1973) und allem Anschein nach auf das in der Gattung weit verbreitete *apr*-Operon zurückzuführen, auf das in der vorliegenden Arbeit gesondert eingegangen wird (siehe 1.2 und 3.3). Dieses polycistronische Operon enthält in den meisten Fällen neben dem Peptidase-Gen *aprA* auch das Lipase-Gen *lipA* (McCarthy *et al.*, 2004, Woods *et al.*, 2001), wodurch das auch bereits von Christen and Marshall (1984) beobachtete gleichzeitige Auftreten von proteolytischer und lipolytischer Aktivität zu erklären ist. Die Expression und Freisetzung der beiden Enzyme ist dabei aber vermutlich sowohl von äußeren Bedingungen (Nicolaisen *et al.*, 2012) als auch von regulatorischen Prozessen (Blumer *et al.*, 1999) abhängig. Daher wird bei den hier untersuchten 47 *Pseudomonas*-Arten von einer isolatspezifischen Aktivitätsausprägung ausgegangen, sofern für diese das *apr*-Operon nachgewiesen werden konnten (siehe 3.3). Bei allen anderen proteolytischen und lipolytischen Arten wird, wenn auch bisher noch nicht nachgewiesen, das *apr*-Operon als wahrscheinlichste Ursache vermutet. Für Arten ohne detektierte Aktivität, die nicht hinsichtlich des *apr*-Operons untersucht wurden, kann jedoch keine Aussage getroffen werden.

Da die Gattung *Pseudomonas* sowohl in den Rohmilchen als auch in den Milchhalbfabrikaten dominierte und die am deutlichsten ausgeprägte proteolytische und lipolytische Aktivität bei 30 °C und insbesondere bei 6 °C gezeigt hatte, sind die Vertreter der Gattung als Verderbsorganismen im gesamten milchverarbeitenden Umfeld von zentraler Bedeutung. Zusammengefasst wurden rund 28 % aller 4812 Isolate der vorliegenden Arbeit der Gattung *Pseudomonas* zugeordnet. Die anderen sehr häufig isolierten Gattungen *Acinetobacter*, *Lactococcus* und *Microbacterium* kamen insgesamt jeweils nur auf rund 11–12 %, was die Bedeutung der Gattung *Pseudomonas* nochmals hervorhebt.

4.3 Genetische Variabilität und Phylogenie des *apr*-Operons der Gattung *Pseudomonas*

Das *apr*-Operon der Gattung *Pseudomonas* ist den vorliegenden Daten zufolge sehr variabel in seinem Aufbau. Sechs verschiedene Operonstrukturen konnten unter den 73 *apr*-Operon tragenden *Pseudomonas*-Stämmen aus 29 Arten nachgewiesen werden. Vier dieser Operonstrukturen waren bereits bekannt (siehe Tabelle 1-1), jedoch konnten zwei erstmalig in der vorliegenden Arbeit ermittelt werden (siehe 3.3.1). Eine weitere bekannte Operonstruktur („A I D E F pB L“, siehe Tabelle 1-1) konnte unter den untersuchten Isolaten nicht nachgewiesen werden. Die Variabilität des *apr*-Operons beschränkt sich den Ergebnissen zufolge, mit Ausnahme des *apr*-Operons von *Pseudomonas aeruginosa*, auf den in 3'-Richtung der Sekretionsgene liegenden Bereich. Der von Ma *et al.* (2003) anhand weniger Arten postulierte konservierte Bereich des *apr*-Operons (*aprD*, *aprE* und *aprF*) konnte erstmalig mit den vorliegenden Daten aus insgesamt 29 verschiedenen *Pseudomonas*-Arten bestätigt werden (siehe Tabelle 3-11). Ergänzend dazu lässt sich ein erweiterter konservierter Bereich innerhalb des *apr*-Operons, bestehend aus *aprA*, *aprI*, *aprD*, *aprE* und *aprF* („A I D E F“), in 28 von 29 untersuchten Arten bestätigen. *Pseudomonas aeruginosa* bildet mit der Operonstruktur „(X) D E F A I“ bisher die alleinige Ausnahme und stellt vermutlich eine Sonderform des *apr*-Operons dar. Unterschiedliche Operonstrukturen innerhalb einer Art wurden nur bei zwei Isolaten ermittelt. Die Isolate (MG657 und MG790) der Art *Pseudomonas lundensis* zeigten eine von den anderen 8 mituntersuchten Stämmen abweichende Operonstruktur (siehe Tabelle 6-20). Bei näherer Betrachtung der Phylogenie der beiden Isolate (siehe Abbildung 3-24) ist erkennbar, dass diese sowohl im phylogenetischen Neighbor-Joining-Baum partieller *rpoD*-Gensequenzen als auch im phylogenetischen Neighbor-Joining-Baum der konkatenierten Gensequenzen *aprA*, *aprI*, *aprD*, *aprE* und *aprF* abgegrenzt von den anderen 8 *Pseudomonas lundensis* Isolaten vorliegen. Demzufolge könnte das Fehlen des *lipA*-Gens in Kombination mit der phylogenetischen Position der beiden Isolate darauf hindeuten, dass diese eventuell nicht der Art *Pseudomonas lundensis* zuzuordnen sind, sondern eine eigenständige Art darstellen. Diese Hypothese wird vor allem auch dadurch gestärkt, dass andere eigenständige Arten in den beiden phylogenetischen Bäumen geringere Abstände zueinander aufweisen (siehe Abbildung 3-24). Um diesen Punkt abschließend zu klären, müsste sowohl die phylogenetische Position der beiden Isolate als auch das *apr*-Operon in weiterführenden Untersuchungen genauer überprüft werden. Insgesamt betrachtet können somit unterschiedliche Operonstrukturen innerhalb von *Pseudomonas*-Arten prinzipiell nicht ausgeschlossen werden. Dennoch wird davon ausgegangen, dass sich in jeder einzelnen Art nur eine Operonstruktur etabliert hat. Darauf deuten sowohl die Ergebnisse der Arten *Pseudomonas fragi* und *Pseudomonas proteolytica* mit 9 bzw. 10 untersuchten Isolaten als auch die Ergebnisse aller anderen untersuchten Arten hin, unter denen jeweils nur eine Operonstruktur identifiziert werden konnte.

Die Detektionsstudien des *aprA*-Gens (Caldera *et al.*, 2016, Marchand *et al.*, 2009b) ließen bereits auf eine starke Verbreitung des *apr*-Operons innerhalb der Gattung *Pseudomonas* schließen. Mit den vorliegenden Daten konnte aber erstmalig gezeigt werden, dass diese Verbreitung einen phylogenetischen Hintergrund zu haben scheint. Phylogenetisch betrachtet spiegeln die konkatenierten Gene des erweiterten konservierten Bereichs des *apr*-Operons ein mit dem *rpoD*-Gen vergleichbares Verwandtschaftsverhältnis zwischen den untersuchten Arten und Stämmen wider (siehe Abbildung 3-24). Da das *rpoD*-Gen als ein dem 16S-rRNA-Gen überlegener phylogenetischer Marker für die Gattung *Pseudomonas* gilt (Matthijs *et al.*, 2012, Mulet *et al.*, 2010), wird es als erwiesen angesehen, dass das *apr*-Operon in der Gattung *Pseudomonas* nicht nur stark verbreitet, sondern phylogenetisch tief verankert ist. Dieser Vermutung folgend sind evolutionäre Mechanismen wie Deletionen, Insertionen und Genduplikationen als die primären Ursachen für die Entstehung der unterschiedlichen Strukturen des *apr*-Operons zu betrachten, wobei aber auch horizontaler Gentransfer an der Entstehung beteiligt gewesen sein könnte. Beispielsweise weisen die Gene *pspA* und *pspB* von *Pseudomonas protegens* CHA0^T eine Ähnlichkeit von 73 % untereinander auf und haben nach Kawai *et al.* (1999) eine deutliche Homologie zu Serin-Peptidasen der Art *Serratia marcescens*. Im Gegensatz dazu konnte für die beiden Lipasegene *lipA1* und *lipA2* keine Gemeinsamkeit ermittelt werden (siehe 2.7.4).

Den vorliegenden Daten zufolge scheint das *apr*-Operon in der Gattung *Pseudomonas* nicht gleichmäßig verteilt aufzutreten, was aus der Markierung der Operonstrukturen in einem phylogenetischen Baum, basierend auf 145 partiellen *rpoD*-Gensequenzen von *Pseudomonas*-Typstämmen, hervorgeht (siehe Abbildung 3-25 und Abbildung 3-26). Aufgrund der detektierten Verbreitung ist die Vermutung naheliegend, dass das *apr*-Operon von einem Stamm einer Art, die phylogenetisch in Abbildung 3-26 dargestellt sein müsste, aufgenommen wurde und sich in diesem Verwandtschaftszweig etabliert hat. Demnach müssten Arten, die das *apr*-Operon nicht tragen, sich schon zu einem früheren Zeitpunkt entwickelt, oder das *apr*-Operon evolutionär komplett oder in Teilen verloren haben. Dies könnte, wie bereits erwähnt, auch für die beiden *Pseudomonas lundensis* Isolate MG657 und MG790 der Fall sein.

Die Verteilung deutet außerdem darauf hin, dass lebensmittelassoziierte Arten wie *Pseudomonas fragi*, *Pseudomonas grimontii*, *Pseudomonas lundensis* und *Pseudomonas proteolytica* (Caldera *et al.*, 2016, Franzetti & Scarpellini, 2007, Marchand *et al.*, 2009b, Tryfinopoulou *et al.*, 2002, Van Tassell *et al.*, 2012), um nur ein paar wenige zu nennen, eher das *apr*-Operon tragen. Viele der in Abbildung 3-25 aufgelisteten Arten, die das *apr*-Operon nicht tragen, wurden hingegen erstmalig aus sehr speziellen Habitaten isoliert. Dazu gehören unter anderem die Arten *Pseudomonas alcaligenes* (Skerman *et al.*, 1980), *Pseudomonas endophytica* (Ramirez-Bahena *et al.*, 2015), *Pseudomonas peli* (Vanparrys *et al.*, 2006) und *Pseudomonas thermotolerans* (Manaiia & Moore, 2002). Da aber auch lebensmittelassoziierte Arten auftreten, die das *apr*-Operon nicht besitzen, wie beispielsweise *Pseudomonas cremoricolorata* (Uchino *et al.*, 2001), *Pseudomonas helleri* sp. nov. (s. vorliegende Arbeit),

Pseudomonas oryzihabitans (Anzai et al., 1997), *Pseudomonas psychrophila* (Yumoto et al., 2001) und *Pseudomonas taetrolens* (Skerman et al., 1980), sind die Übergänge zwischen *apr*-Operon Besitz und Habitaten vermutlich fließend. Aufgrund des ubiquitären Vorkommens von *Pseudomonas*-Arten allgemein (siehe 1.3) spiegelt die Verteilung des *apr*-Operons somit am ehesten die evolutionsbedingte Anpassung an das jeweilige Primärhabitat wider. Erschwerend kommt jedoch hinzu, dass die Daten über das Vorkommen bestimmter *Pseudomonas*-Arten in verschiedenen Habitaten aus einigen Studien vom heutigen taxonomischen Standpunkt aus möglicherweise nicht der korrekten *Pseudomonas*-Arten zugeordnet werden können (Gomila et al., 2015). Möglicherweise profitieren aber auch *Pseudomonas*-Arten ohne *apr*-Operon in Koexistenz mit *apr*-Operon tragenden Arten von den durch Spaltung des *aprA*-Substrats entstandenen Oligopeptiden. Eine ähnliche Strategie ist von der *apr*-Operon tragenden Art *Pseudomonas fluorescens* bekannt, bei der eine peptidasenegative Subpopulation gegenüber dem peptidasepositiven Populationsteil einen Wachstumsvorteil besitzt, da keine eigene Peptidase synthetisiert wird (Allison et al., 2014). Dieses Phänomen ist von Milchsäurebakterien gleichermaßen bekannt (s. 4.2) und könnte somit auch art- oder gattungsübergreifend eine mögliche Ursache für das Vorkommen von peptidasenegativen und peptidasepositiven Arten in Koexistenz sein. Die genaue phylogenetische Entwicklung des *apr*-Operons bleibt an dieser Stelle jedoch ungeklärt.

Neben den Genen des *apr*-Operons konnten in der vorliegenden Arbeit erstmalig die regulationsassoziierten Gene des Gac/Rsm-Systems in 29 verschiedenen *Pseudomonas*-Arten nachgewiesen werden (siehe Tabelle 3-11). Aufgrund der phylogenetischen Verteilung der Arten über die gesamte Gattung (siehe Abbildung 3-25 und Abbildung 3-26) wird von einer generellen Regulation des *apr*-Operons durch das Gac/Rsm-Systems in allen *apr*-Operon tragenden Arten ausgegangen. Diese Annahme wird auch durch die Ergebnisse der Untersuchung des vermuteten *apr*-Promotorbereichs (5'-UTR) gestützt (siehe Tabelle 3-12). Für alle 28 diesbezüglich untersuchten *Pseudomonas*-Arten konnte die vermutete Ribosomenbindestelle mit darin enthaltenem RsmA/RsmE-Bindemotiv (5'...ACANGGANGU...3') nach Lapouge et al. (2008) bestätigt werden. Die ermittelten möglichen weiteren „GGA“-Motive scheinen dabei an der korrekten Bindung von RsmE/RsmA an die mRNA beteiligt zu sein, insbesondere das in allen 28 *Pseudomonas*-Arten detektierte „GGA“-Motiv etwa 50–60 Basenpaare in 5'-Richtung der RBS gelegen (Lapouge et al., 2007, Schubert et al., 2007). Ergänzend dazu ist auch die nahe Verwandtschaft einzelner *Pseudomonas*-Arten untereinander durch den Vergleich der Nukleotidsequenzen des *apr*-Promotorbereichs (5'-UTR) erkennbar. Von den für die Aufhebung der post-transkriptionellen Hemmung durch RsmA/RsmE notwendigen sRNAs RsmX, RsmY und RsmZ konnte nur RsmY in allen und RsmZ in nahezu allen untersuchten Arten nachgewiesen werden. Daraus ergeben sich mehrere Möglichkeiten. Entweder sind RsmX und RsmZ nicht in allen Arten vorhanden oder die sRNAs konnten mittels der verwendeten Referenzgene nicht in den Genomdaten identifiziert werden. Abweichungen von den Nukleotidsequenzen der Referenzgene haben aufgrund der geringen Länge einen

stärkeren Einfluss auf den BLAST-Vergleich als in längeren Sequenzen. Daher ist es möglich, dass die gesuchten Nukleotidsequenzen zwar in den Genomdaten enthalten sind, aber im Rahmen dieser Arbeit nicht ermittelt werden konnten. Diese Vermutung ist zumindest für RsmZ aus *Pseudomonas aeruginosa* zutreffend, da dieses bereits nachgewiesen wurde (Brencic *et al.*, 2009). Für RsmX im Allgemeinen ist jedoch die erste Möglichkeit am wahrscheinlichsten, da für *Pseudomonas aeruginosa* (Brencic *et al.*, 2009) und *Pseudomonas entomophila* (Vallet-Gely *et al.*, 2010) gezeigt wurde, dass diese kein RsmX besitzen. Ergänzend dazu scheint die Nukleotidsequenz von *rsmX* sehr variabel zu sein, da für *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* fünf unterschiedliche *rsmX*-Varianten nachgewiesen wurden (Moll *et al.*, 2010). Für die Arten, für die *rsmX* im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht nachgewiesen werden konnte, müsste eine weiterführende Analyse der Genomdaten stattfinden. Die Verwendung von Referenzgenen aus unterschiedlichen *Pseudomonas*-Arten wäre hierfür ein erster Ansatzpunkt, wozu auch die in der vorliegenden Arbeit ermittelten Nukleotidsequenzen als Referenz herangezogen werden könnten. Einen ähnlichen Ansatz hatten bereits Huertas-Rosales *et al.* (2016) für einen *Pseudomonas putida* Stamm gewählt. Des Weiteren könnten die bisher ermittelten *rsmX*-Nukleotidsequenzen auf Homologie und Existenz einer möglichen Konsensus-Sequenz überprüft werden, welche dann als Referenzsequenz verwendet werden könnte. Den Daten von Moll *et al.* (2010) zufolge sind zumindest kurze homologe Bereiche vorhanden.

4.4 Beschreibung neuer *Pseudomonas*-Arten

4.4.1 Neubeschreibung der Arten *Pseudomonas helleri* sp. nov. und *Pseudomonas weihenstephanensis* sp. nov.

Die phylogenetische Position der sieben Stämme der beiden neuen *Pseudomonas*-Arten wurde auf Basis des Vergleichs fast vollständiger 16S-rRNA-Gensequenzen (siehe Abbildung 3-28) und partieller *rpoD*-Gensequenzen (siehe Abbildung 3-27) ermittelt, da das 16S-rRNA-Gen allein, wie bereits erwähnt, zur Unterscheidung von *Pseudomonas*-Arten nicht ausreichend differenzierend ist (Mulet *et al.*, 2010). Die vorliegenden phylogenetischen Daten der Stämme WS4917^T, WS4995, WS4999, WS5001 und WS5002 sowie der Stämme WS4993^T und WS4994 ließen auf die Zugehörigkeit zu jeweils einer eigenständigen Art innerhalb der Gattung *Pseudomonas* schließen. Dabei gehören die Stämme WS4917^T, WS4995, WS4999, WS5001 und WS5002 zu ein und derselben Art (*Pseudomonas helleri* sp. nov.). Die Stämme WS4993^T und WS4994 sind einer anderen, aber ebenfalls ein und derselben Art (*Pseudomonas weihenstephanensis* sp. nov.) zuzuordnen. Der erste Hinweis darauf ging aus der prozentualen Ähnlichkeit der Einzelgensequenzen der beiden Arten untereinander und gegenüber den korrespondierenden Gensequenzen von Typstämmen aus öffentlichen Datenbanken (Benson *et al.*, 2013) hervor. Diese phylogenetische Einordnung konnte mit Hilfe eines MLSA-Ansatzes nach Mulet *et al.* (2010) für die Stämme WS4917^T und WS4995 sowie WS4993^T und WS4994 untermauert werden (siehe Abbildung 3-29). Der eindeutige Beweis für die phylogenetische Eigenständigkeit der beiden neuen Arten wurde anhand des Genomvergleichs (ANIb) der Stämme WS4917^T und WS4995 sowie WS4993^T und WS4994 und den Genomen der verwendeten Referenzstämme erbracht (siehe Tabelle 3-13). Dabei wiesen die Genome der beiden Stämme der beiden neuen Arten artintern ein ANIb-Ähnlichkeit von über 97 % auf, während die Ähnlichkeit zu den Typstämmen der am nächsten verwandten Arten mit unter 86 % deutlich unter der von Richter and Rossello-Mora (2009) postulierten Artgrenze von 94–96% ANIb-Ähnlichkeit lag.

Die Ergebnisse zur Untersuchung der dominierenden zellulären Fettsäuren der Stämme WS4917^T und WS4993^T (siehe Tabelle 3-15) zeigten eine für die Gattung *Pseudomonas* typische Zusammensetzung der zellulären Fettsäuren (Moore *et al.*, 2006). Beim Vergleich der Ergebnisse der mituntersuchten Referenzstämme mit bekannten Daten aus der Literatur (Carrion *et al.*, 2011, Ramirez-Bahena *et al.*, 2015) hatten sich jedoch einige Unterschiede gezeigt. Insbesondere im prozentualen Anteil der Fettsäure C17:0 cyclo unterschieden sich die in der vorliegenden Arbeit ermittelten Werte von denen der Studie von Ramirez-Bahena *et al.* (2015). Gleichzeitig waren sie aber vergleichbar mit den Werten der Studie von Carrion *et al.* (2011). Ungeachtet dessen ist die Zusammensetzung der zellulären Fettsäuren sehr stark abhängig von den Kultivierungsbedingungen, wodurch Unstimmigkeiten zwischen verschiedenen Studien möglich sind. Die ermittelten dominierenden polaren Lipide der Stämme WS4917^T und WS4993^T (Phosphatidylethanolamine (PE), Phosphatidylglycerol (PG) und Diphosphatidylglycerol (DPG)) wie auch die Dominanz des respiratorischen Chinons Q-9 stimmten ebenfalls mit den bekannten Daten der Gattung *Pseudomonas* überein

(Moore *et al.*, 2006), wobei für den Stamm WS4917^T auch geringe Mengen des respiratorischen Chinons Q-8 detektiert worden waren. Die Ergebnisse der auf ihre phänotypischen Eigenschaften untersuchten Referenzstämmen hatten ebenfalls einige Abweichungen im Vergleich zu anderen Studien gezeigt (Carrion *et al.*, 2011, Ramirez-Bahena *et al.*, 2015). Beispielsweise konnte im Gegensatz zu Ramirez-Bahena *et al.* (2015) für die Stämme *Pseudomonas endophytica* LMG 28456^T, *Pseudomonas fragi* DSM 3456^T, *Pseudomonas lundensis* DSM 6252^T und *Pseudomonas psychrophila* DSM 17535^T die Bildung von diffundierbaren, fluoreszierenden Pigmenten während des Wachstums auf King B Agar nicht nachgewiesen werden, wie es auch schon von Carrion *et al.* (2011) für *Pseudomonas psychrophila* DSM 17535^T gezeigt wurde. Da jedoch alle Stämme in den vorliegenden Artbeschreibungen unter denselben Testbedingungen untersucht wurden, sind sämtliche Ergebnisse als aussagekräftig zu betrachten. Jede der beiden neuen Arten unterschied sich in mindestens vier Merkmalen von ihren am nächsten verwandten Typstämmen (siehe Tabelle 4-2).

DISKUSSION

Tabelle 4-2: Differenzierende Merkmale für die Arten *Pseudomonas helleri* sp. nov. und *Pseudomonas weihenstephanensis* sp. nov., die Typstämme der am nächsten verwandten Arten und die Typspezies *Pseudomonas aeruginosa*. Alle Daten wurden in der vorliegenden Arbeit erhoben. Stämme: 1, *Pseudomonas helleri* sp. nov. WS4917^T; 2, *Pseudomonas weihenstephanensis* sp. nov. WS4993^T; 3, *Pseudomonas endophytica* BSTT44^T; 4, *Pseudomonas deceptionensis* DSM 26521^T; 5, *Pseudomonas fragi* DSM 3456^T; 6, *Pseudomonas lundensis* DSM 6252^T; 7, *Pseudomonas psychrophila* DSM 17535^T; 8, *Pseudomonas taetrolens* DSM 21104^T; 9 *Pseudomonas lini* DSM 16768^T; 10, *Pseudomonas aeruginosa* DSM 50071^T. + = positiv; - = negativ; w = schwach positiv. ‡ Stamm WS4995 zeigte im Gegensatz zu WS4917^T und den drei anderen Stämmen einen negativen Phänotyp. † Drei der fünf untersuchten Stämme (inkl. WS4917^T) wuchsen bis 31 °C, WS4995 und ein anderer Stamm bis 33 °C. # Die Anzahl wurde den sogenannten „master records“ der veröffentlichten Gesamtgenomsequenzierung entnommen. ** Hier ist die Anzahl der Proteine aus dem sogenannten „Genome assembly and annotation report“ angegeben.

Merkmal	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Proteolyse bei 25 °C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Lipolyse bei 25 °C	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+
Hämolyse	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-
Blaues Pigment auf King A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Fluoreszierendes Pigment auf King B	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+
β -Galactosidase-Aktivität	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Nitrat/Nitrit-Reduktion	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/+	-/+
Gelatinehydrolyse bei 30 °C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Verstoffwechselung von:										
D-Arabinose	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-
L-Arabinose	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-
D-Xylose	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-
L-Xylose	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
D-Galactose	+	-	+	+	-	-	+	+	+	-
D-Mannose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Inositol	-	+	-	+	-	+	-	+	+	-
D-Mannitol	+‡	-	-	+	+	-	+	+	+	+
D-Sorbitol	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
N-Acetylglucosamine	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
D-Melibiose	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-
D-Sucrose	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-
D-Trehalose	+‡	+	-	+	+	-	+	-	+	+
D-Raffinose	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-
D-Lyxose	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
L-Fucose	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-
D-Arabitol	+‡	-	-	+	+	-	+	+	+	+
Wachstum:										
auf Cetrimid-Agar	+	+	+	+	+	+	w	-	+	+
bei pH-Wert	5–8	5–8	5,5–8	6–8	5,5–8	5,5–8	5,5–8	5,5–8	6–8	5,5–8
bei maximaler NaCl-Konzentration (% w/v) von:										
bis zu °C	31–33†	33	31	33	33	35	31	33	33	42
Genomgröße (Mb)	5,67	4,79	4,97	5,05	5,02	4,99	5,33	4,92	6,49	6,29
DNA-GC-Gehalt (mol %)	58,1	57,3	55,2	58,6	59,4	58,5	57,5	58,3	58,8	66,6
Anzahl der Gene #	5040	4417	4598	4631	4557 **	4609	4889	4481	5817	5787
Anzahl der proteincodierenden Sequenzen #	4811	4196	4276	4460	4297 **	4365	4718	4300	5634	5698
Nachweis des apr-Operons	-	+	-	+	+	+	-	-	+	+

Ergänzend dazu wurden alle Stämme der beiden neuen Arten sowie auch die verwendeten Referenzstämme vor dem Hintergrund der vorliegenden Arbeit auf ihre lipolytische und proteolytische Aktivität bei 25 °C und 4 °C untersucht. Bei 4 °C konnte für keinen der Stämme enzymatische Aktivität festgestellt werden, bei 25 °C nur vereinzelt. Abweichend von den vorliegenden Ergebnissen der Agardiffusions-Tests konnten Glück *et al.* (2016) für den Stamm WS4993^T proteolytische Aktivität in Flüssigmedium (10 % (v/v) ESL-Milch, 90 % TSB) nachweisen. Außerdem konnten die Autoren die Peptidase des Typstamms der Art *Pseudomonas weihenstephanensis* (WS4993^T) mittels Massenspektrometrie als die AprA-Metallopeptidase identifizieren, die bereits aus einigen *Pseudomonas*-Arten bekannt ist (Koka & Weimer, 2000, McCarthy *et al.*, 2004). Aus der Untersuchung der *draft*-Genome hinsichtlich des *apr*-Operons (siehe 3.3) ging zudem hervor, dass alle im Zusammenhang mit den hier neubeschriebenen Arten untersuchten Stämme, mit Ausnahme der Stämme der neuen Art *Pseudomonas helleri* und ihrem am nächsten verwandten Typstamm der Art *Pseudomonas endophytica* sowie den Typstämmen der Arten *Pseudomonas psychrophila* und *Pseudomonas taetrolens*, das *apr*-Operon enthalten. Für die Arten *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fragi* und *Pseudomonas lundensis* konnte bereits gezeigt werden, dass diese proteolytische Aktivität besitzen (Baur *et al.*, 2015, Marchand *et al.*, 2009b). Daher ist davon auszugehen, dass alle Arten, die das *apr*-Operon besitzen, prinzipiell in der Lage sein sollten, die Metallopeptidase AprA zu produzieren, auch wenn in der vorliegenden Studie zur Artbeschreibung mittels Agardiffusions-Tests für diese keine proteolytische Aktivität nachgewiesen werden konnte.

Zusammengefasst führen die Ergebnisse der fünf Stämme WS4917^T, WS4995, WS4999, WS5001 und WS5002 zu der Annahme, dass diese zu ein und derselben neuen Art gehören. In Anerkennung des großen Beitrags zur Lebensmittelmikrobiologie von Knut Heller, eines ehemaligen Mikrobiologen vom Max-Rubner-Institut in Kiel, wird als Arname *Pseudomonas helleri* (hel'le.ri. N.L. gen. masc. n *helleri*) vorgeschlagen. Der Stamm WS4917^T wurde als Typstamm ausgewählt und bei der DSMZ unter der Stammnummer DSM 29165^T hinterlegt; bei der belgischen Stammsammlung BCCMTM/LMG wurde der Stamm WS4917^T unter der Stammnummer LMG 28433^T hinterlegt. Des Weiteren wurde der Stamm WS4995 unter den Stammnummern DSM 29141 bzw. LMG 28434 als zusätzliches Isolat der Spezies ebenfalls bei der DSMZ bzw. BCCMTM/LMG hinterlegt.

Bei den Stämmen WS4993^T und WS4994 handelt es sich den Ergebnissen zufolge ebenfalls um zwei Stämme ein und derselben neuen Art. Für diese wird in Anlehnung an den Isolationsort, den Stadtteil Weihenstephan der Stadt Freising, der Arname *Pseudomonas weihenstephanensis* (wei.hen.ste.phan.en'sis N.L. fem. adj. *weihenstephanensis*) vorgeschlagen. Der als Typstamm ausgewählte Stamm WS4993^T wurde unter der Stammnummer DSM 29166^T bei der DSMZ hinterlegt und unter der Stammnummer LMG 28437^T bei der BCCMTM/LMG. Als zusätzliches Isolat der Spezies wurde der Stamm WS4994 bei der DSMZ bzw. BCCMTM/LMG unter der Stammnummer DSM 29140 bzw. LMG 28438 hinterlegt.

4.4.2 Neubeschreibung der Arten *Pseudomonas lactis* sp. nov. und *Pseudomonas paralactis* sp. nov.

Die phylogenetische Verwandtschaft der Stämme WS4992^T, WS4997, WS5000 sowie der Stämme WS4672^T und WS4998 innerhalb der Gattung *Pseudomonas* wurde primär anhand fast vollständiger 16S-rRNA-Gensequenzen (siehe Abbildung 3-31) und partieller *rpoD*-Gensequenzen (siehe Abbildung 3-30) ermittelt. Unter Zuhilfenahme der prozentualen Ähnlichkeit der Einzelgensequenzen untereinander sowie auch gegenüber den korrespondierenden Typstamm-Gensequenzen aus öffentlichen Datenbanken (Benson *et al.*, 2013) wiesen die Ergebnisse darauf hin, dass die Stämme zwei unterschiedlichen, bisher nicht beschriebenen, aber sehr eng miteinander verwandten *Pseudomonas*-Arten zuzuordnen sind. Demzufolge gehören die Stämme WS4992^T, WS4997 und WS5000 zu ein und derselben Art (*Pseudomonas lactis* sp. nov.) und die Stämme WS4672^T und WS4998 gehören zu einer anderen, aber ebenfalls ein und derselben Art (*Pseudomonas paralactis* sp. nov.). Die phylogenetisch eigenständige Position der beiden neuen Arten wurde durch einen MLSA-Ansatz nach Mulet *et al.* (2010) für die Stämme WS4992^T und WS4672^T gestärkt (siehe Abbildung 3-32). Die genetische Eigenständigkeit der beiden neuen Arten wurde letztlich anhand des ANIb-Genomvergleichs der Stämme WS4992^T und WS4672^T und den Genomen der verwendeten Referenzstämme (siehe Tabelle 3-14) erbracht. Die Genome der beiden postulierten Typstämme der beiden neuen Arten wiesen eine Ähnlichkeit von 89,8 % auf, während die Ähnlichkeit zu den am nächsten verwandten Typstämmen bei $\leq 89,3$ % lag. Unter Anwendung der Artgrenze von 94–96 % ANIb-Ähnlichkeit (Richter & Rossello-Mora, 2009) konnten die beiden neuen Arten sowohl untereinander als auch von allen verwendeten Referenzstämmen deutlich abgegrenzt werden. Interessanterweise hatte sich dabei gezeigt, dass die Typstämme der Arten *Pseudomonas libanensis* DSM 17149^T und *Pseudomonas synxantha* DSM 18928^T mit einer ANIb-Ähnlichkeit von 95,0 % an der Artgrenze bzw. im Übergangsbereich zwischen verschiedenen und gleichen Arten liegen (Richter & Rossello-Mora, 2009). Wie jedoch aus Tabelle 4-3 und der Artbeschreibung von *Pseudomonas libanensis* (Dabboussi *et al.*, 1999a) hervorgeht, lassen sich die beiden Arten anhand physiologischer und genetischer Eigenschaften unterscheiden.

Die dominierenden zellulären Fettsäuren der Stämme WS4992^T und WS4672^T (siehe Tabelle 3-16) entsprechen in ihrer Zusammensetzung dem für die Gattung *Pseudomonas* typischen Muster (Moore *et al.*, 2006). Dies gilt auch für die meisten Referenzstämme. Abweichungen von den bekannten Zusammensetzungen hatten sich für die Arten *Pseudomonas aeruginosa* und *Pseudomonas gessardii* gezeigt. Hauptsächlich unterschieden sich hierbei die Anteile der Fettsäuren C18: C18:1 ω 7c, C17:0 cyclo und *summed feature* C16:1 ω 7c/C15:0 iso 2OH. Wie bereits erwähnt, ist die Zusammensetzung der zellulären Fettsäuren jedoch stark abhängig von den Kultivierungsbedingungen, sodass Unterschiede zwischen verschiedenen Studien möglich sind. Ebenfalls übereinstimmend mit dem für die Gattung *Pseudomonas* bekannten Muster war die Zusammensetzung der ermittelten dominierenden polaren Lipide

DISKUSSION

(Phosphatidylethanolamine (PE), Phosphatidylglycerol (PG), Diphosphatidylglycerol (DPG) und Phospholipid (PL)) sowie die Dominanz des Chinons Q-9 (Moore *et al.*, 2006).

Die möglichen Wachstumsbedingungen waren für die beiden neuen Arten und die Referenzstämme überwiegend vergleichbar. Die maximale Wachstumstemperatur lag zwischen 33 °C und 35 °C, *Pseudomonas aeruginosa* DSM 50071^T bildete mit 42 °C die Ausnahme. Bis auf *Pseudomonas synxantha* DSM 18928^T (3 %) und *Pseudomonas veronii* DSM 11331^T (4 %) tolerierten die beiden neuen Arten und Referenzstämme NaCl-Konzentrationen von 5–6 % (w/v).

Die ermittelten phänotypischen Eigenschaften der Referenzstämme hatten im Vergleich zu den Literaturdaten (Behrendt *et al.*, 2003, Dabboussi *et al.*, 1999a, b) einige Abweichungen gezeigt. Für den Stamm *Pseudomonas poae* DSM 14936^T konnte beispielsweise die von Behrendt *et al.* (2003) beschriebene Bildung eines fluoreszierenden, diffundierbaren Pigments in der vorliegenden Studie nicht nachgewiesen werden. Neben den Unterschieden zu Literaturdaten konnte aber für *Pseudomonas libanensis* DSM 17149^T erstaunlicherweise ein offenbar bisher unbekanntes Wachstumsphänomen beobachtet werden. Nach Wachstum auf Cetrimid-Agar für mehr als 10 Tage zeigten einige Kolonien schwärmendes, baumartiges und auf andere Kolonien hingerrichtetes Wachstum innerhalb der Agarschicht (siehe Abbildung 4-1), ähnlich dem *tip-splitting*-Morphotyp von *Paenibacillus dentritiformis* (Be'er *et al.*, 2009).



Abbildung 4-1: Bildausschnitte von Cetrimid-Agarplatten nach Wachstum von *Pseudomonas libanensis* DSM 17149^T für mehr als 10 Tage.

DISKUSSION

Da diese Art des Wachstums auf Cetrimid-Agar bei keinem anderen Stamm der vorliegenden Studie beobachtet werden konnte, scheint es ein Alleinstellungsmerkmal für die Art *Pseudomonas libanensis* zu sein, das zukünftig als weiteres Differenzierungsmerkmal verwendet werden könnte. Hierbei gilt es aber noch zu prüfen, ob andere *Pseudomonas libanensis* Stämme dieses Wachstumsverhalten ebenfalls zeigen oder ob es sich hierbei um eine stammspezifische Eigenschaft handelt. Des Weiteren konnte für die hier neubeschriebene Art *Pseudomonas lactis* sp. nov. beobachtet werden, dass die Fähigkeit zur Hämolyse variabel zu sein scheint. Stamm WS4992^T hatte keine Hämolyse gezeigt, während die Stämme WS4997 und WS5000 zur Hämolyse fähig waren.

Die beiden hier beschriebenen Arten *Pseudomonas lactis* sp. nov. und *Pseudomonas paralactis* sp. nov. sind zwar sehr nahe miteinander verwandt, unterschieden sich aber in mindestens drei Merkmalen von ihren am nächsten verwandten Typstämmen (siehe Tabelle 4-3).

DISKUSSION

Tabelle 4-3: Differenzierende Merkmale für die Arten *Pseudomonas lactis* sp. nov. und *Pseudomonas paralactis* sp. nov., die Typstämme der am nächsten verwandten Arten und die Typspezies *Pseudomonas aeruginosa*. Alle Daten wurden in der vorliegenden Arbeit erhoben. Stämme: *Pseudomonas lactis* sp. nov. (WS4992^T); 2, *Pseudomonas paralactis* sp. nov. (WS4672^T); 3, *Pseudomonas libanensis* DSM 17149^T; 4, *Pseudomonas gessardii* DSM 17152^T; 5, *Pseudomonas synxantha* DSM 18928^T; 6, *Pseudomonas azotoformans* DSM 18862^T; 7, *Pseudomonas cedrina* subsp. *cedrina* DSM 17516^T; 8, *Pseudomonas trivialis* DSM 14937^T; 9, *Pseudomonas veronii* DSM 11331^T; 10, *Pseudomonas poae* DSM 14936^T; 11, *Pseudomonas orientalis* DSM 17489^T; 12, *Pseudomonas aeruginosa* DSM 50071^T. + = positiv; - = negativ. † Die beiden anderen Stämme zeigten im Gegensatz zum Typstamm WS 4992^T einen positiven Phänotyp.

Merkmal	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Proteolyse bei 25 °C	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+
Proteolyse bei 4 °C	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-
Lipolyse bei 4 °C	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-
Hämolyse	-†	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-
Fluoreszierendes Pigment auf King B	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+
Nitrat/Nitrit-Reduktion	-/-	-/-	+/-	+/+	+/-	+/-	-/-	-/-	+/+	-/-	-/-	+/+
Gelatinehydrolyse bei 30	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+
Arginin-Dehydrolase	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+
Verstoffwechselung von:												
Erythritol	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-
D-Adonitol	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-
L-Rhamnose	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-
Inositol	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
D-Sorbitol	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-
N-Acetylglucosamine	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+
Arbutin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
D-Sucrose	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-
Xylitol	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-
D-Lyxose	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-
L-Arabitol	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-
Säureproduktion bei Wachstum auf:												
Erythritol	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-
D-Adonitol	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
L-Rhamnose	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-
Inositol	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
D-Sorbitol	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-
D-Cellobiose	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
D-Sucrose	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-
Xylit	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-
D-Lyxose	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-
L-Arabitol	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-
Wachstum:												
bei pH	5-8	5-8	5-8	5,5-8	5-8	5-8	5,5-8	5,5-8	5,5-8	5-8	5-8	5,5-8
bei maximaler NaCl-Konzentration (% w/v)	6	6	5	5	3	5	5	5	4	5	6	6
von:												
bis zu °C	35	35	35	33	35	33	35	33	33	33	35	42
Genomgröße (Mb)	6,73	6,02	6,21	6,51	6,79	7,17	6,51	5,59	7,00	5,88	6,29	6,29
DNA-GC-Gehalt (mol)	60,0	59,7	60,2	60,4	59,7	61,0	60,7	61,0	60,7	60,5	60,5	66,6
Anzahl der Gene #	6038	5341	5582	5858	6172	6431	5853	4984	6241	5242	5484	5787
Anzahl der proteincodierenden	5811	5167	5410	5689	5924	6310	5703	4776	6038	5053	5291	5698

Vor dem Hintergrund der vorliegenden Arbeit, der lipolytischen und proteolytischen Aktivität von Rohmilch assoziierten Mikroorganismen, wurden die fünf Stämme der beiden neuen Arten ebenfalls dahingehend untersucht. Gleiches gilt auch für die verwendeten Referenzstämme. Alle fünf Stämme zeigten sowohl bei 4 °C als auch bei 25 °C proteolytische Aktivität nach Wachstum auf Proteolyse-Agar und lipolytische Aktivität nach Wachstum auf Tributyrin-Agar. Bei 25 °C hatten alle Referenzstämme ebenfalls lipolytische Aktivität gezeigt, bei 4 °C konnte diese für die Stämme *Pseudomonas cedrina* subsp. *cedrina* DSM 17516^T, *Pseudomonas trivialis* DSM 14937^T, *Pseudomonas poae* DSM 14936^T und *Pseudomonas aeruginosa* DSM 50071^T nicht nachgewiesen werden. Bei 25 °C zeigten alle Referenzstämme proteolytische Aktivität, mit Ausnahme der Stämme *Pseudomonas gessardii* DSM 17152^T, *Pseudomonas poae* DSM 14936^T und *Pseudomonas trivialis* DSM 14937^T. Für die Stämme *Pseudomonas poae* DSM 14936^T, *Pseudomonas trivialis* DSM 14937^T und *Pseudomonas aeruginosa* DSM 50071^T konnte bei 4 °C ebenfalls keine proteolytische Aktivität beobachtet werden. Für die Stämme WS4992^T (*Pseudomonas lactis* sp. nov.) und WS4672^T (*Pseudomonas paralactis* sp. nov.) konnte außerdem bereits gezeigt werden, dass diese bei Wachstum in Flüssigmedium (10 % (v/v) ESL-Milch, 90 % TSB) eine einzige Peptidase sekretieren (Glück *et al.*, 2016), bei der es sich um die in der Gattung *Pseudomonas* verbreiteten Peptidase AprA handelt (Koka & Weimer, 2000, McCarthy *et al.*, 2004). Ergänzend dazu hatte die Untersuchung der *draft*-Genome (siehe 3.3) gezeigt, dass alle Referenzstämme mit Ausnahme der diesbezüglich nicht untersuchten Stämme *Pseudomonas azotoformans* DSM 18862^T und *Pseudomonas cedrina* subsp. *cedrina* DSM 17516^T das *apr*-Operon besitzen.

Die vorliegenden Ergebnisse legen nahe, dass es sich bei WS4992^T, WS4997 und WS5000 sowie bei WS4672^T und WS4998 um drei bzw. zwei Stämme von jeweils ein und derselben neuen Art der Gattung *Pseudomonas* handelt. Die beiden neuen Arten lassen sich genetisch eindeutig voneinander abgrenzen, weisen aber physiologisch auch viele Gemeinsamkeiten auf. Daher wird für die aus Rohmilch isolierten Stämme WS4992^T, WS4997 und WS5000 in Anlehnung an deren Ursprung der Artname *Pseudomonas lactis* (lac'tis. L. gen. n. *lactis*) vorgeschlagen. Als Typstamm wurde der Stamm WS4992^T ausgewählt und unter der Stammmummer DSM 29167^T bei der DSMZ hinterlegt. Der Stamm wurde außerdem bei der BCCMTM/LMG unter der Stammmummer LMG 28435^T hinterlegt.

Für die Stämme WS4672^T und WS4998 wird als Verweis auf den Ursprung der beiden Stämme (Rohmilch) und deren nahe Verwandtschaft zu der ebenfalls hier neubeschriebenen Art *Pseudomonas lactis* der Artname *Pseudomonas paralactis* (pa.ra.lac'tis. Gr. prep. para beside; L. gen. n. *lactis*) vorgeschlagen. Der Stamm WS4672^T wurde als Typstamm ausgewählt und unter den Stammmummern DSM 29164^T bzw. LMG 28439^T bei der DSMZ bzw. BCCMTM/LMG hinterlegt.

Ergänzend zur Artbeschreibung von *Pseudomonas lactis* sp. nov. wird im Folgenden noch auf das Isolat MG775 (WS4996) (siehe Abbildung 3-14) eingegangen. Ursprünglich wurde

vermutet, dass dieses Isolat und auch die Isolate MG781 und MG784 ebenfalls zu der als *Pseudomonas lactis* sp. nov. beschriebenen Art gehören. Trotz der Ähnlichkeit der drei genannten Isolate im phylogenetischen Vergleich anhand von partiellen *rpoD*-Gensequenzen (siehe Abbildung 3-14) hatten die drei soeben genannten Isolate eine gewisse Abgrenzung vom „Hauptast“ der Art *Pseudomonas* sp. nov. (1) (= *Pseudomonas lactis* sp. nov.) gezeigt. Zwar lag die *rpoD*-Ähnlichkeit (Gesamtgensequenz aus den *draft*-Genomen) zwischen dem Stämmen MG775 und MG336 (WS4992^T Typstamm *Pseudomonas lactis* sp. nov.) bei 98,48 % und die MLSA-Ähnlichkeit bei 99,98 %, jedoch wiesen die beiden Stämme im Gesamtgenomvergleich (ANIb) nur eine Ähnlichkeit von 94,02 % auf. Damit lagen die beiden Stämme bei Anwendung der Artgrenze von 94–96 % ANIb-Ähnlichkeit (Richter & Rossello-Mora, 2009) im Übergangsbereich zwischen verschiedenen und gleichen Arten. Da zudem für den Stamm MG775 im Vergleich zum Typstamm WS4992^T die Assimilation von Erythritol nicht nachgewiesen werden konnte, wurde der Stamm MG775 frühzeitig nicht weiter als Vertreter für das Stammcluster MG775, MG781 und MG784 in die Artbeschreibung von *Pseudomonas lactis* sp. nov. miteinbezogen. Ob diese drei Stämme der Art *Pseudomonas lactis* sp. nov. tatsächlich zugeordnet werden können oder nicht, müsste durch weitere Untersuchungen erst noch gezeigt werden, worauf jedoch im Rahmen der vorliegenden Arbeit verzichtet wurde.

5 SCHLUSSFOLGERUNG UND AUSBLICK

Die Ergebnisse dieser Arbeit haben neben der hohen Diversität der Mikrobiota von Rohmilch und Milchhalbfabrikaten die deutliche Dominanz weniger Gattungen und Arten gezeigt. Daraus ergeben sich gleichzeitig neue Anhaltspunkte für die Erforschung bestimmter Hauptgruppen. Ergänzend dazu sollten die Untersuchungen zur ermittelten lipolytischen und proteolytischen Aktivität von Arten mit nur sehr wenigen oder einzelnen Isolaten wiederholt werden, um eine verlässliche Aussage über deren enzymatische Aktivität treffen zu können. Außerdem kommt auch den potentiell neuen Taxa eine besondere Bedeutung zu. Deren Beschreibung, insbesondere der anderen potentiell neuen *Pseudomonas*-Arten, wäre ein guter Anknüpfungspunkt für eine genauere taxonomische Differenzierung der Milchkrobiota.

Die lipolytische und proteolytische Aktivität von Kontaminanten ist für die Milchindustrie von großer Bedeutung. Durch die in dieser Arbeit ermittelten Aktivitätstendenzen der Großgruppen und Gattungen können gezieltere Risikobewertungen für Rohmilchen vorgenommen werden, sodass diese in Produktionslinien eingebracht werden können, die durch die vorliegenden Mikrobiota voraussichtlich am wenigsten beeinflusst werden. Rohmilchen mit einem hohen *Acinetobacter*-Anteil könnten beispielsweise in Produktionslinien für Produkte mit niedrigem Fettgehalt gelenkt werden, um der überwiegend lipolytischen Aktivität entgegenzuwirken oder aber in Richtung von UHT-Produkten, da die bisherigen Literaturdaten keine Hitzestabilität von über 100 °C belegen, was es jedoch im Detail noch zu prüfen gilt. Fakultativ anaerobe, gramnegative Bakterien, Hefen, Milchsäurebakterien sowie die grampositiven Gattungen *Microbacterium* und *Staphylococcus* spielen dabei insgesamt betrachtet, mit wenigen Ausnahmen (Glück *et al.*, 2016), aufgrund deren Wachstum bei kühlen Temperaturen, deren ermittelter Häufigkeit und deren enzymatischer Aktivität eine eher untergeordnete Rolle für die Qualität von Rohmilch in Hinblick auf enzymatischen Verderb von Endprodukten.

Ganz im Gegensatz dazu nimmt die Gattung *Pseudomonas* die zentrale Position unter den Verderbsorganismen im Molkereiumfeld ein, was sowohl auf die stark verbreitete Psychrotoleranz als auch auf die sehr stark ausgeprägte proteolytische und lipolytische Aktivität bei 6 °C zurückzuführen ist. Die besondere Bedeutung liegt vor allem auch daran, dass sowohl für die Peptidase als auch für die Lipase des *apr*-Operons einiger *Pseudomonas*-Arten bereits deutliche Hitzeresistenzen nachgewiesen wurden (siehe 1.2.1). Dies gilt auch für viele *Pseudomonas*-Isolate der vorliegenden Arbeit (Glück *et al.*, 2016). Somit können einzelne Arten, je nach Aktivitätsausprägung, ausgehend von der Rohmilch alle nachfolgenden Prozessstufen der Milchverarbeitung bis hin zu den Endprodukten durch proteolytischen und/oder lipolytischen Verderb negativ beeinflussen.

Da das *apr*-Operon über das zentrale Gac/Rsm-System reguliert wird, ist eine überwiegende einheitliche Regulation zwar naheliegend, wie aber aus den Literaturdaten hervorgeht (s. 1.2.2), gibt es eine Vielzahl von Ursachen, die die Aktivität des *apr*-Operons steuern. Dadurch ist das Auftreten einer unterschiedlich stark ausgeprägten lipolytischen und/oder

proteolytischen Aktivität von *Pseudomonas*-Isolaten ebenfalls naheliegend, jedoch gilt es einige Details zu prüfen. Die Untersuchungen zur Variabilität und Phylogenie des *apr*-Operons der Gattung *Pseudomonas* haben hierfür viele neue Anhaltspunkte geliefert. Zu prüfen gilt unter anderem, welche Rolle die Operon-Struktur in Hinblick auf die Aktivitätsausprägung spielt. Des Weiteren ist offen, ob die Peptidase und Lipase (wenn vorhanden) immer gleichzeitig exprimiert werden oder ob womöglich zusätzliche regulatorische Elemente (z. B. Riboswitches) an der Expression der Lipase beteiligt sind, nachdem dieser Aktivitätstyp nicht immer ermittelt werden konnte. Außerdem könnten auch die Bindungsaffinitäten der sRNAs (RsmA, RsmE, RsmX, RsmY und RsmZ) aufgrund struktureller oder sequenzieller Variationen bei niedrigeren Temperaturen höher sein, wodurch eventuell die ermittelte stärkere Aktivitäts-Ausprägung zu erklären wäre, da dies auch die Promotorregion betreffen würde. Dies gilt es ebenfalls zu prüfen. Da auch sich ändernde Umweltbedingungen das Gac/Rsm-System beeinflussen können, steht auch nach wie vor die Frage im Raum, ob es in diesem komplexen Regulationssystem ein definierbares Signal gibt, das letztlich die Expression des *apr*-Operons auslöst.

6 ANHANG

Tabelle 6-1: Verwendete Chemikalien und Medien.

Chemikalie	chem. Formel	Hersteller
1-o-Methyl-a-D-Glucopyranoside	$C_7H_{14}O_6$	Serva
6 x DNA Loading Dye	-	Thermo Scientific
Adonitol	$C_5H_{12}O_5$	Fluka
Agar Nr. 1	-	Oxoid
Agarose NEEO	-	Roth
Ammoniumeisensulfat-Hexahydrat	$(NH_4)_2Fe(SO_4)_2 \times 6 H_2O$	Fluka
Ammoniummolybdate tetrahydrate	$(NH_4)_6Mo_7O_{24} \times 4 H_2O$	Sigma
Anaerocult® A	-	Merck
API® 50 CHB/E Medium	-	Biomerieux
APT-Agar	-	Merck
Arbutin	$C_{12}H_{16}O_7$	Sigma
Bactident®-Oxidase-Teststreifen	-	Merck
Borsäure	H_3BO_3	Merck
Bromphenolblau	$C_{19}H_{10}Br_4O_5S$	Merck
Calciumchlorid	$CaCl_2$	Merck
Cetrimid-Agar	-	Merck
Citronensäure-Monohydrat	$C_6H_8O_7 \times H_2O$	Roth
D-(-)-Arabinose	$C_5H_{10}O_5$	Sigma
D-(-)-Fructose	$C_6H_{12}O_6$	Merck
D-(-)-Mannit	$C_6H_{14}O_6$	AppliChem
D-(-)-Ribose	$C_5H_{10}O_5$	Roth
D-(-)-Salicin	$C_{13}H_{18}O_7$	Roth
D-(-)-Tagatose	$C_6H_{12}O_6$	Roth
D-(+)-Arabitol	$C_5H_{12}O_5$	Sigma
D-(+)-Cellobiose	$C_{12}H_{22}O_{11}$	ICN
D-(+)-Fucose	$C_6H_{12}O_5$	Fluka
D-(+)-Galactose	$C_6H_{12}O_6$	Sigma
D-(+)-Glucose Monohydrat	$C_6H_{12}O_6 \times H_2O$	Roth
D-(+)-Lactose Monohydrat	$C_{12}H_{22}O_{11} \times H_2O$	Fluka
D-(+)-Mannose	$C_6H_{12}O_6$	Roth
D-(+)-Melezitose x H ₂ O	$C_{18}H_{32}O_{16} \times H_2O$	Sigma
D-(+)-Melibiose	$C_{12}H_{22}O_{11}$	Sigma
D-(+)-Raffinose Pentahydrat	$C_{18}H_{32}O_{16} \times 5 H_2O$	Roth

ANHANG

Chemikalie	chem. Formel	Hersteller
D-(+)-Sucrose	$C_{12}H_{22}O_{11}$	Sigma
D-(+)-Trehalose Dihydrat	$C_{12}H_{22}O_{11} \times 2 H_2O$	Roth
D-(+)-Xylose	$C_5H_{10}O_5$	Roth
D-Amygdalin	$C_{20}H_{27}NO_{11}$	Sigma
D-Gluconate potassiumsalt (Kalium-Gluconat)	$C_6H_{11}O_7 \times K$	CALBIOCH
Di-Kaliumhydrogenphosphat	K_2HPO_4	Roth
D-Lyxose	$C_5H_{10}O_5$	Sigma
dNTP Mix (100 mM)	-	Thermo Scientific
D-Sorbitol	$C_6H_{14}O_6$	Sigma
D-Turanose	$C_{12}H_{22}O_{11}$	Aldrich
Dulcitol	$C_6H_{14}O_6$	Sigma
Ethanol absolut	C_2H_6O	VWR
Ethylendiamin-tetraessigsäure Dinatriumsalz Dihydrat (EDTA)	$C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8 \times 2 H_2O$	Roth
Fleisch Extrakt	-	Oxoid
Gelatine	-	Merck
Gene Ruler™ 100 bp Plus DNA Ladder	-	Fermentas
Glycerin Rotipuran®	$C_3H_8O_3$	Roth
Glycogen, Type-II-Oyster	-	Sigma
Hefeextrakt	-	Oxoid
Hefe-Glucose-Agar (mit Chloramphenicol), früher YGC	-	Roth
<i>High Performance Buffer</i> (10 x)	-	Thermo Scientific
i-Erythritol	$HOCH_2[CH(OH)]_2CH_2OH$	Sigma
IPTG	$C_9H_{18}O_5S$	Applichem
Kaliumdihydrogenphosphat, 99 %, p.a., ACS	KH_2PO_4	Roth
Kaliumhydroxid -Plättchen	KOH	Merck
Kaliumnitrat, p.a.	KNO_3	Roth
Kaliumsulfat	K_2SO_4	Roth
Kobalt(II)chlorid-hexahydrat	$CoCl_2 \times 6 H_2O$	Merck
Kovacs Indolreagenz	-	Merck
Kupfer(II)-sulfat-5-hydrat	$CuSO_4 \times 5 H_2O$	Roth
L-(-)-Arabitol	$C_5H_{12}O_5$	Sigma
L-(-)-Fucose	$C_6H_{12}O_5$	Fluka
L-(-)-Sorbose	$C_6H_{12}O_6$	Sigma
L-(-)-Xylose	$C_5H_{10}O_5$	Sigma
L-(+)-Arabinose	$C_5H_{10}O_5$	Roth

ANHANG

Chemikalie	chem. Formel	Hersteller
L-(+)-Ascorbinsäure	$C_6H_8O_6$	Merck
L-(+)-Rhamnose-Monohydrat	$C_6H_{12}O_5 \times H_2O$	Merck
L-Glutaminsäure-Natriumsalz-Monohydrat, reinst	$C_5H_8NNaO_4 \times H_2O$	AppliChem
Lugols Lösung	-	Roth
Magermilchpulver	-	Oxoid
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	$MgCl_2 \times 6 H_2O$	Roth
Magnesiumchlorid (25 mM)	$MgCl_2$	Thermo Scientific
Magnesiumsulfat-Heptahydrat, p. a.	$MgSO_4 \times 7 H_2O$	Merck
Maltose-Monohydrat	$C_{12}H_{22}O_{11} \times H_2O$	Sigma
Mangan(II)-sulfat-Monohydrat	$MnSO_4 \times H_2O$	Roth
Methyl- α -D-Mannopyranoside	$C_7H_{14}O_6$	Sigma
Methyl- β -D-Xylopyranoside	$C_6H_{12}O_5$	Sigma
Myo-Inosit	$C_6H_{12}O_6$	Merck
N-Acetyl-D-Glucosamine	$C_8H_{15}NO_6$	Sigma
Natriumcarbonat	Na_2CO_3	Merck
Natriumchlorid	$NaCl$	Roth
Natriumhydrogencarbonat, p. a.	$NaHCO_3$	Roth
Pepton aus Casein (Tryptone)	-	Oxoid
Pepton aus Fleisch	-	Merck
Pepton aus Gelatine	-	Merck
Pepton aus Soya (Phyton Pepton)	-	BD BBL
R2A-Agar	-	Merck
Salzsäure, (1 N)	HCl	Merck
Schafsblut, defibriniert	-	Oxoid
SIM-Medium	-	Merck
β -D-Gentiobiose	$C_{12}H_{22}O_{11}$	Sigma
Stärke, löslich	$(C_6H_{10}O_5)_n$	Merck
Thermo-Start DNA-Polymerase (5 U/ μ l)	-	Thermo Scientific
Tributyrin (Glycerintributyrat)	$C_{15}H_{26}O_6$	Roth
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat	$C_6H_5Na_3O_7 \times 2 H_2O$	Merck
TRIS	$C_4H_{11}NO_3$	Roth
Tryptone Soya Agar	-	Oxoid
Tween 80	-	Roth
X-Gal	$C_{14}H_{15}BrClNO_6$	Roth
Xylit	$C_5H_{12}O_5$	Roth

ANHANG

Chemikalie	chem. Formel	Hersteller
YGC-Agar	-	Merck
Zinkpulver	Zn	Merck
Zirkoniasilikatperlen	-	Biospec Products

Tabelle 6-2: Auflistung der 107 *Pseudomonas*-Stämme, deren Genom hinsichtlich des *apr*-Operons untersucht wurde. Die korrespondierenden GenBank/EMBL/DBJ-Accession-Nummern der Genome sind jeweils angegeben, sofern bereits veröffentlicht. Legende: *P.* = *Pseudomonas*; Seq. = selbst sequenziert; u. p. = bisher unpubliziert; * = siehe 4.4.2.

Konserviert als	Sequenziert unter Stammnummer	Stammnummer	Stamm Ursprung	Zugeordnet zur Art	Ursprung der Genomdaten	GenBank/EMBL/DBJ-Accession-Nummern
WS5022	MG49	MG49	Eigenisolat	<i>P. aeruginosa</i>	Seq.	u.p.
WS2062	G1273	DSM 50071	DSMZ	<i>P. aeruginosa</i> (T)	Seq.	JYLC00000000
WS5013	G7996	G7996	WS-Sammlung	<i>P. alcaligenes</i>	Seq.	u.p.
-	-	NBRC14159	-	<i>P. alcaligenes</i> (T)	NCBI-Datenbank	BATI01000000
-	-	DSM 17556	-	<i>P. azotifigens</i> (T)	NCBI-Datenbank	AUDU01000000
WS5091	MG1000	MG1000	Eigenisolat	<i>P. brenneri</i>	Seq.	u.p.
WS4666	G8128	DSM 15294	DSMZ	<i>P. brenneri</i> (T)	Seq.	u.p.
-	-	DSM 24390	-	<i>P. caeni</i> (T)	NCBI-Datenbank	ATXQ01000000
WS5019	G7597	G7597	WS-Sammlung	<i>P. chengduensis</i>	Seq.	u.p.
WS5003	G8999	DSM 26382	DSMZ	<i>P. chengduensis</i> (T)	Seq.	u.p.
WS5014	G2638	G2638	WS-Sammlung	<i>P. chlororaphis</i>	Seq.	u.p.
WS1625	G1276	DSM 50083	DSMZ	<i>P. chlororaphis</i> subsp. <i>chlororaphis</i> (T)	Seq.	u.p.
-	-	DSM 17059	-	<i>P. cremoricolorata</i> (T)	NCBI-Datenbank	AUEA01000000
WS4853	G8684	DSM 26521	DSMZ	<i>P. deceptionensis</i> (T)	Seq.	JYKX00000000
WS5129	G9472	BSTT44	Erstbeschreiber	<i>P. endophytica</i> (T)	Seq.	LLWH00000000
-	-	L48	-	<i>P. entomophila</i> (T)	NCBI-Datenbank	NC_008027
WS4974	G9152	DSM 17835	DSMZ	<i>P. extremaustralis</i> (T)	Seq.	u.p.
WS5037	MG260	MG260	Eigenisolat	<i>P. fluorescens</i>	Seq.	u.p.
WS2330	G1288	DSM 50090	DSMZ	<i>P. fluorescens</i> (T)	Seq.	u.p.
WS5094	MG1008	MG1008	Eigenisolat	<i>P. fragi</i>	Seq.	u.p.
WS5102	MG1328	MG1328	Eigenisolat	<i>P. fragi</i>	Seq.	u.p.
WS5112	MG1473	MG1473	Eigenisolat	<i>P. fragi</i>	Seq.	u.p.
WS5032	MG230	MG230	Eigenisolat	<i>P. fragi</i>	Seq.	u.p.
WS5045	MG343	MG343	Eigenisolat	<i>P. fragi</i>	Seq.	u.p.
WS5065	MG607	MG607	Eigenisolat	<i>P. fragi</i>	Seq.	u.p.
WS5073	MG667	MG667	Eigenisolat	<i>P. fragi</i>	Seq.	u.p.
WS5087	MG976	MG976	Eigenisolat	<i>P. fragi</i>	Seq.	u.p.
WS2169	-	DSM 3456 / B25	DSMZ	<i>P. fragi</i> (T)	NCBI-Datenbank	AHZX01000000
-	-	DSM 17717	-	<i>P. fulva</i> (T)	NCBI-Datenbank	JHYU01000000
WS5049	MG400	MG400	Eigenisolat	<i>P. gessardii</i>	Seq.	u.p.
WS4665	G8127	DSM 17152	DSMZ	<i>P. gessardii</i> (T)	Seq.	u.p.

ANHANG

Konserviert als	Sequenziert unter Stammnummer	Stammnummer	Stamm Ursprung	Zugeordnet zur Art	Ursprung der Genomdaten	GenBank/EMBL /DDBJ-Accession-Nummern
WS4659	G8122	DSM 17515	DSMZ	<i>P. grimontii</i> (T)	Seq.	u.p.
WS4995	MG839	MG839	Eigenisolat	<i>P. helleri</i> sp. nov.	Seq.	JYLE00000000
WS4917	MG221	MG221	Eigenisolat	<i>P. helleri</i> sp. nov.(T)	Seq.	JYLD00000000
-	-	DSM 22348	-	<i>P. japonica</i> (T)	NCBI-Datenbank	BBIR01000000
-	-	B13	-	<i>P. knackmussii</i> (T)	NCBI-Datenbank	NZ_HG322950
WS5015	G3883	G3883	WS-Sammlung	<i>P. koreensis</i>	Seq.	u.p.
WS5007	G9001	DSM 16610	DSMZ	<i>P. koreensis</i> (T)	Seq.	u.p.
WS4992	MG336	MG336	Eigenisolat	<i>P. lactis</i> sp. nov. (T)	Seq.	JYLO00000000
<u>WS4996</u>	MG775	MG775	Eigenisolat	<u><i>P. lactis</i> sp. nov. ?*</u>	Seq.	JYLP00000000
WS4854	G8685	DSM 17149	DSMZ	<i>P. libanensis</i> (T)	Seq.	JYLH00000000
WS4860	G8692	DSM 16768	DSMZ	<i>P. lini</i> (T)	Seq.	JYLB00000000
WS5095	MG1011	MG1011	Eigenisolat	<i>P. lundensis</i>	Seq.	u.p.
WS5024	MG131	MG131	Eigenisolat	<i>P. lundensis</i>	Seq.	u.p.
WS5104	MG1338	MG1338	Eigenisolat	<i>P. lundensis</i>	Seq.	u.p.
WS5110	MG1459	MG1459	Eigenisolat	<i>P. lundensis</i>	Seq.	u.p.
WS5026	MG179	MG179	Eigenisolat	<i>P. lundensis</i>	Seq.	u.p.
WS5071	MG657	MG657	Eigenisolat	<i>P. lundensis</i>	Seq.	u.p.
WS5078	MG790	MG790	Eigenisolat	<i>P. lundensis</i>	Seq.	u.p.
WS5081	MG914	MG914	Eigenisolat	<i>P. lundensis</i>	Seq.	u.p.
WS5088	MG979	MG979	Eigenisolat	<i>P. lundensis</i>	Seq.	u.p.
WS4855	G8686	DSM 6252	DSMZ	<i>P. lundensis</i> (T)	Seq.	JYKY00000000
WS5114	MG1608	MG1608	Eigenisolat	<i>P. mandelii</i>	Seq.	u.p.
WS5009	G8996	DSM 17967	DSMZ	<i>P. mandelii</i> (T)	Seq.	u.p.
WS4861	G8693	DSM 13124	DSMZ	<i>P. marginalis</i> (T)	Seq.	u.p.
-	-	DSM 14164	-	<i>P. monteilii</i> (T)	NCBI-Datenbank	JHYV01000000
-	-	DSM 17497	-	<i>P. mosselii</i> (T)	NCBI-Datenbank	JHYW01000000
WS5012	G3904	G3904	WS-Sammlung	<i>P. nitroreducens</i>	Seq.	u.p.
WS5005	G8997	DSM 14399	DSMZ	<i>P. nitroreducens</i> (T)	Seq.	u.p.
WS4927	G8783	DSM 17489	DSMZ	<i>P. orientalis</i> (T)	Seq.	JYLM00000000
WS5004	G9000	DSM 6835	DSMZ	<i>P. oryzihabitans</i> (T)	Seq.	u.p.
WS4668	G8218	MG351	Eigenisolat	<i>P. panacis</i>	Seq.	u.p.
WS4662	G8124	DSM 18529	DSMZ	<i>P. panacis</i> (T)	Seq.	u.p.
WS4672	MG273	MG273	Eigenisolat	<i>P. paralactis</i> sp. nov. (T)	Seq.	JYLN00000000

ANHANG

Konserviert als	Sequenziert unter Stammnummer	Stammnummer	Stamm Ursprung	Zugeordnet zur Art	Ursprung der Genomdaten	GenBank/EMBL /DDBJ-Accession-Nummern
-	-	DSM 17004	-	<i>P. parafulva</i> (T)	NCBI-Datenbank	AUEB01000000
-	-	CL-AP6	-	<i>P. pelagia</i> (T)	NCBI-Datenbank	ARO101000000
WS5011	MG1321	MG1321	Eigenisolat	<i>P. peli</i>	Seq.	u.p.
WS5008	G8995	DSM 17833	DSMZ	<i>P. peli</i> (T)	Seq.	u.p.
WS5103	MG1330	MG1330	Eigenisolat	<i>P. poae</i>	Seq.	u.p.
WS4856	G8687	DSM 14936	DSMZ	<i>P. poae</i> (T)	Seq.	JYLI00000000
WS5082	MG949	MG949	Eigenisolat	<i>P. protegens</i>	Seq.	u.p.
-	-	CHA0	-	<i>P. protegens</i> (T)	NCBI-Datenbank	NC_021237
WS5111	MG1465	MG1465	Eigenisolat	<i>P. proteolytica</i>	Seq.	u.p.
WS5027	MG192	MG192	Eigenisolat	<i>P. proteolytica</i>	Seq.	u.p.
WS5031	MG229	MG229	Eigenisolat	<i>P. proteolytica</i>	Seq.	u.p.
WS5021	MG38	MG38	Eigenisolat	<i>P. proteolytica</i>	Seq.	u.p.
WS5010	MG489	MG489	Eigenisolat	<i>P. proteolytica</i>	Seq.	u.p.
WS5059	MG550	MG550	Eigenisolat	<i>P. proteolytica</i>	Seq.	u.p.
WS5060	MG565	MG565	Eigenisolat	<i>P. proteolytica</i>	Seq.	u.p.
WS5079	MG861	MG861	Eigenisolat	<i>P. proteolytica</i>	Seq.	u.p.
WS5086	MG965	MG965	Eigenisolat	<i>P. proteolytica</i>	Seq.	u.p.
WS4664	G8126	DSM 15321	DSMZ	<i>P. proteolytica</i> (T)	Seq.	u.p.
WS4857	G8688	DSM 17535	DSMZ	<i>P. psychrophila</i> (T)	Seq.	JYKZ00000000
WS5017	G4781	G4781	WS-Sammlung	<i>P. psychrotolerans</i>	Seq.	u.p.
WS5006	G8998	DSM 15758	DSMZ	<i>P. psychrotolerans</i> (T)	Seq.	u.p.
-	-	NBRC 14164	-	<i>P. putida</i> (T)	NCBI-Datenbank	NC_021505
-	-	DSM 21078	-	<i>P. resinovorans</i> (T)	NCBI-Datenbank	AUIE01000000
-	-	DSM 16299	-	<i>P. rhizosphaerae</i> (T)	NCBI-Datenbank	CP009533
WS5107	MG1416	MG1416	Eigenisolat	<i>P. rhodesiae</i>	Seq.	u.p.
WS4669	G3159	G3159	WS-Sammlung	<i>P. rhodesiae</i>	Seq.	u.p.
WS4658	G8121	DSM 14020	DSMZ	<i>P. rhodesiae</i> (T)	Seq.	u.p.
WS5018	G6238	G6238	WS-Sammlung	<i>P. stutzeri</i>	Seq.	u.p.
WS4663	G8125	DSM 5190	DSMZ	<i>P. stutzeri</i> (T)	Seq.	u.p.
WS4858	G8689	DSM 18928	DSMZ	<i>P. synxantha</i> (T)	Seq.	JYLJ00000000
-	-	DSM 10604	-	<i>P. syringae</i> subsp. <i>syringae</i> (T)	NCBI-Datenbank	JALK01000000
WS4859	G8690	DSM 21104	DSMZ	<i>P. taetrolens</i> (T)	Seq.	JYLA00000000
-	-	DSM 21245	-	<i>P. taiwanensis</i> (T)	NCBI-Datenbank	AUEC01000000

ANHANG

Konserviert als	Sequenziert unter Stammnummer	Stammnummer	Stamm Ursprung	Zugeordnet zur Art	Ursprung der Genomdaten	GenBank/EMBL/DDBJ-Accession-Nummern
-	-	DSM 14292	-	<i>P. thermotolerans</i> (T)	NCBI-Datenbank	AQPA01000000
WS4852	G8691	DSM 14937	DSMZ	<i>P. trivialis</i> (T)	Seq.	JYLK00000000
WS5113	MG1597	MG1597	Eigenisolat	<i>P. veronii</i>	Seq.	u.p.
WS4670	G3537	G3537	WS-Sammlung	<i>P. veronii</i>	Seq.	u.p.
WS4671	G3734	G3734	WS-Sammlung	<i>P. veronii</i>	Seq.	u.p.
WS4660	G8109	DSM 16272	DSMZ	<i>P. veronii</i>	Seq.	u.p.
WS4661	G8123	DSM 11331	DSMZ	<i>P. veronii</i> (T)	Seq.	JYLL00000000
-	-	DSM 16006	-	<i>P. vranovensis</i> (T)	NCBI-Datenbank	AUED01000000
WS4994	MG442	MG442	Eigenisolat	<i>P. weihenstephanensis</i> sp. nov.	Seq.	JYLG00000000
WS4993	MG339	MG339	Eigenisolat	<i>P. weihenstephanensis</i> sp. nov.(T)	Seq.	JYLF00000000

Tabelle 6-3: Accession-Nummern der Gene 16S rRNA, *gyrB*, *rpoD* und *rpoB* der zur MLSA-Analyse verwendeten *Pseudomonas*-Typstämme.

Species	16S rRNA Gene Accession Nummer/Genom-Positions- Nummer (Stammnummer)	<i>gyrB</i> Gene Accession Nummer/Genom- Positions-Nummer (Stammnummer)	<i>rpoD</i> Gene Accession Nummer/Genom- Positions-Nummer (Stammnummer)	<i>rpoB</i> Gene Accession Nummer/Genom- Positions-Nummer (Stammnummer)	Gene
<i>Cellvibrio japonicus</i>	CP000934.1:1054098-1055631 (Ueda107)	CP000934.1: 3980- 6400 (Ueda107)	CP000934.1: 899813- 901714 (Ueda107)	CP000934.1: (Ueda107)	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	X06684 (DSM 50071)	AB039386 (IFO 12689)	AB039607 (IFO 12689)	AJ717442 (LMG 1242)	(LMG)
<i>Pseudomonas antarctica</i>	AJ537601 (CMS 35)	FN554169 (LMG 22709)	FN554450 (LMG 22709)	FN554727 (LMG 22709)	(LMG)
<i>Pseudomonas azotoformans</i>	D84009 (IAM 1603)	AB039411 (IAM 1603)	AB039547 (IAM 1603)	AJ717458 (CIP 106744)	(CIP)
<i>Pseudomonas brennerii</i>	AF268968 (CFML 97-391)	FN554176 (DSM 15294)	FN554457 (DSM 15294)	AJ717482 (CIP 106646)	(CIP)
<i>Pseudomonas cedrina</i> subsp. <i>cedrina</i>	AF064461 (CFML 96-198)	FN554178 (DSM 17516)	FN554459 (DSM 17516)	AJ717424 (CIP 105541)	(CIP)
<i>Pseudomonas cedrina</i> subsp. <i>fulgida</i>	AJ492830 (DSM 14938)	KP260626 (DSM 14938)	HE586449 (LMG 21467)	HE586401 (LMG 21467)	(LMG)
<i>Pseudomonas costantinii</i>	AF374472 (CFBP 5705)	FN554180 (LMG 22119)	FN554461 (LMG 22119)	FN554732 (LMG 22119)	(LMG)
<i>Pseudomonas extremaustralis</i>	AJ583501 (14-3)	HE800479 (DSM 17835)	JN589935 (DSM 17835)	JN814371 (14-3)	
<i>Pseudomonas extremorientalis</i>	AF405328 (KMM 3447)	FN554182 (LMG 19695)	FN554464 (LMG 19695)	FN554733 (LMG 19695)	(LMG)
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	D84013 (IAM 12022)	D86016 (IAM 12022)	AB039545 (IAM 12022)	AJ717451 (CIP 69.13)	(CIP)
<i>Pseudomonas gessardii</i>	AF074384 (CIP 105469)	FN554186 (CIP 105469)	FN554468 (CIP 105469)	AJ717438 (CIP 105469)	(CIP)
<i>Pseudomonas grimontii</i>	AF268029 (CFML 97-514)	FN554188 (CIP 106645)	FN554470 (CIP 106645)	AJ717439 (CIP 106645)	(CIP)
<i>Pseudomonas libanensis</i>	AF057645 (CIP 105460)	FN554195 (CIP 105460)	FN554477 (CIP 105460)	AJ717454 (CIP 105460)	(CIP)
<i>Pseudomonas lurida</i>	AJ581999 (DSM 15835)	HE800480 (P 513/18)	HE586451 (LMG 21995)	HE586402 (LMG 21995)	(LMG)
<i>Pseudomonas marignalis</i>	Z76663 (LMG 2210)	AB039448 (NCPPB 667)	AB039575 (NCPPB 667)	AJ717425 (LMG 2210)	(LMG)
<i>Pseudomonas meridiana</i>	AJ537602 (CMS 38)	FN554203 (CIP 108465)	FN554485 (CIP 108465)	FN554740 (CIP 108465)	(CIP)
<i>Pseudomonas mucidolens</i>	D84017 (IAM 12406)	AB039409 (IAM 12406)	AB039546 (IAM 12406)	AJ717427 (LMG 2223)	(LMG)

Species	16S rRNA Gene Accession Number/Genom-Positions-Number (Stammnummer)	<i>gyrB</i> Gene Accession Nummer/Genom-Positions-Nummer (Stammnummer)	<i>rpoD</i> Gene Accession Nummer/Genom-Positions-Nummer (Stammnummer)	<i>rpoB</i> Gene Accession Nummer/Genom-Positions-Nummer (Stammnummer)	Gene
<i>Pseudomonas orientalis</i>	AF064457 (CFML 96-170)	FN554209 (DSM 17489)	FN554493 (DSM 17489)	AJ717434 (CIP 105540)	(CIP 105540)
<i>Pseudomonas palleroniana</i>	AY091527 (CFBP 4389)	FN554213 (LMG 23076)	FN554497 (LMG 23076)	FN554747 (LMG 23076)	(LMG 23076)
<i>Pseudomonas panacis</i>	AY787208 (CG20106)	FN554214 (CIP 108524)	FN554498 (CIP 108524)	FN554748 (CIP 108524)	(CIP 108524)
<i>Pseudomonas poae</i>	AJ492829 (DSM 14936)	FN554219 (LMG 21465)	FN554504 (LMG 21465)	FN554751 (LMG 21465)	(LMG 21465)
<i>Pseudomonas proteolytica</i>	AJ537603 (CMS 64)	FN554220 (CIP 108464)	FN554505 (CIP 108464)	FN554752 (CIP 108464)	(CIP 108464)
<i>Pseudomonas rhodesiae</i>	AF064459 (CIP 104664)	FN554225 (LMG 17764)	FN554511 (LMG 17764)	AJ717431 (CIP 104664)	(CIP 104664)
<i>Pseudomonas salomonii</i>	AY091528 (CFBP 2022)	FN554226 (LMG 22120)	FN554512 (LMG 22120)	FN554756 (LMG 22120)	(LMG 22120)
<i>Pseudomonas simiae</i>	AJ936933 (OLi)	FN554227 (CCUG 50988)	FN554513 (CCUG 50988)	FN554757 (CCUG 50988)	(CCUG 50988)
<i>Pseudomonas synxantha</i>	D84025 (IAM 12356)	AB039415 (IFO 3913)	AB039550 (IFO 3913)	AJ717420 (LMG 2335)	(LMG 2335)
<i>Pseudomonas tolaasii</i>	AF255336 (LMG 2342)	AB039423 (NCPPB 2192)	AB039561 (NCPPB 2192)	AJ717467 (LMG 2342)	(LMG 2342)
<i>Pseudomonas trivialis</i>	AJ492831 (DSM 14937)	FN554230 (LMG 21464)	FN554515 (LMG 21464)	FN554762 (LMG 21464)	(LMG 21464)
<i>Pseudomonas veronii</i>	AF064460 (CIP 104663)	FN554233 (LMG 17761)	FN554518 (LMG 17761)	AJ717445 (CIP 104663)	(CIP 104663)

ANHANG

Tabelle 6-4: Gewichtetes arithmetisches Mittel der Gesamtkeimzahlen der Rohmilchen und Milchhalbfabrikate. GKZ bei 30 °C, 15 °C und 6 °C. Farbcodierung, siehe Tabellenende.

Probenart	Codierung	GKZ 30 °C KbE/ml	GKZ 15 °C KbE/ml	GKZ 6 °C KbE/ml	GKZ 30 °C Log ₁₀ KbE/ml	GKZ 15 °C Log ₁₀ KbE/ml	GKZ 6 °C Log ₁₀ KbE/ml
Rohmilch	H 1	1,30E+05	1,70E+05	1,10E+05	5,11	5,23	5,04
Rohmilch	H 2	3,60E+05	3,20E+05	1,50E+05	5,56	5,51	5,18
Rohmilch	H 3	1,90E+06	2,00E+06	1,90E+05	6,28	6,30	5,28
Rohmilch	H 4	1,90E+06	2,00E+06	1,98E+05	6,28	6,30	5,30
Rohmilch	H 5	9,30E+05	6,00E+04	6,50E+03	5,97	4,78	3,81
Rohmilch	H 6	1,10E+05	1,00E+05	7,20E+04	5,04	5,00	4,86
Rohmilch	H 7	1,50E+04	5,80E+03	5,30E+03	4,18	3,76	3,72
Rohmilch	H 8	2,70E+04	1,40E+04	8,30E+03	4,43	4,15	3,92
Rohmilch	H 9	2,60E+04	1,50E+04	3,50E+03	4,41	4,18	3,54
Rohmilch	H 10	1,60E+04	6,80E+03	<10	4,20	3,83	0,95
Rohmilch	M 1	7,20E+05	7,40E+05	3,80E+05	5,86	5,87	5,58
Rohmilch	M 2	3,10E+05	5,30E+05	5,90E+05	5,49	5,72	5,77
Rohmilch	M 3	3,20E+06	2,50E+06	2,70E+06	6,51	6,40	6,43
Rohmilch	M 4	1,60E+05	1,60E+05	7,50E+04	5,20	5,20	4,88
Rohmilch	M 5	4,10E+05	4,40E+05	3,20E+05	5,61	5,64	5,51
Rohmilch	M 6	3,30E+05	3,50E+05	8,40E+04	5,52	5,54	4,92
Rohmilch	M 7	1,80E+08	1,80E+08	9,10E+07	8,26	8,26	7,96
Rohmilch	M 8	8,80E+04	9,90E+04	1,00E+05	4,94	5,00	5,00
Rohmilch	M 9	3,20E+05	1,90E+05	1,40E+05	5,51	5,28	5,15
Rohmilch	M 10	1,10E+06	8,20E+06	2,70E+03	6,04	6,91	3,43
Milchhalbfabrikat	MmK 1	9,00E+06	8,60E+06	1,20E+07	6,95	6,93	7,08
Milchhalbfabrikat	MmK 2	5,90E+03	3,00E+02	<10	3,77	2,48	0,95
Milchhalbfabrikat	MmK 3	1,10E+04	1,10E+05	9,70E+04	4,04	5,04	4,99
Milchhalbfabrikat	MmK 4	1,70E+04	2,20E+02	1,00E+01	4,23	2,34	1,00
Milchhalbfabrikat	MmK 5	9,00E+04	8,70E+04	1,30E+01	4,95	4,94	1,11
Milchhalbfabrikat	MmK 6	2,10E+04	<100	<100	4,32	2,00	2,00
Milchhalbfabrikat	MmK 7	2,00E+05	<100	<100	5,30	2,00	2,00
Milchhalbfabrikat	MmK 8	7,00E+03	5,70E+01	<10	3,85	1,76	0,95
Milchhalbfabrikat	EwagMk 1	6,60E+04	4,60E+04	3,30E+01	4,82	4,66	1,52
Milchhalbfabrikat	EwagMk 2	6,20E+03	6,80E+02	4,60E+01	3,79	2,83	1,66
Milchhalbfabrikat	EwagMk 3	9,90E+06	7,70E+06	7,40E+04	7,00	6,89	4,87
Milchhalbfabrikat	EwagMk 4	1,50E+04	3,10E+03	3,30E+01	4,18	3,49	1,52
Milchhalbfabrikat	EwagMk 5	1,00E+08	1,00E+08	1,00E+08	8,00	8,00	8,00
Milchhalbfabrikat	EwagMk 6	6,20E+04	<10	<10	4,79	0,95	0,95
Milchhalbfabrikat	EwagMk 7	2,70E+07	5,90E+07	4,20E+07	7,43	7,77	7,62
Milchhalbfabrikat	EwK 1	3,90E+05	4,60E+05	3,30E+05	5,59	5,66	5,52
Milchhalbfabrikat	EwK 2	2,00E+05	7,90E+04	1,90E+05	5,30	4,90	5,28
Milchhalbfabrikat	EwK 3	5,40E+03	5,80E+02	<10	3,73	2,76	0,95
Milchhalbfabrikat	EwK 4	8,60E+03	5,90E+02	<10	3,93	2,77	0,95
Milchhalbfabrikat	EwK 5	1,30E+05	1,10E+05	3,60E+03	5,11	5,04	3,56
Milchhalbfabrikat	EwK 6	2,30E+03	<10	<10	3,36	0,95	0,95
Milchhalbfabrikat	Sahne 1	1,20E+03	4,90E+02	4,90E+02	3,08	2,69	2,69
Milchhalbfabrikat	Sahne 2	6,30E+03	8,50E+03	2,60E+03	3,80	3,93	3,41

ANHANG

Probenart	Codierung	GKZ 30 °C KbE/ml	GKZ 15 °C KbE/ml	GKZ 6 °C KbE/ml	GKZ 30 °C Log ₁₀ KbE/ml	GKZ 15 °C Log ₁₀ KbE/ml	GKZ 6 °C Log ₁₀ KbE/ml
Milchhalbfabrikat	Sahne 3	3,80E+04	4,00E+04	2,20E+04	4,58	4,60	4,34
Milchhalbfabrikat	Sahne 4	1,00E+08	1,70E+08	1,00E+08	8,00	8,23	8,00
Milchhalbfabrikat	Sahne 5	3,30E+03	8,70E+02	<10	3,52	2,94	0,95
Milchhalbfabrikat	Sahne 6	<10	<10	<10	0,95	0,95	0,95
Milchhalbfabrikat	Sahne 7	<10	<10	<10	0,95	0,95	0,95
Milchhalbfabrikat	Sahne 8	5,40E+02	<10	<10	2,73	0,95	0,95
Milchhalbfabrikat	Sahne 9	1,00E+01	<10	<10	1,00	0,95	0,95
Farbcodierung		Probe, deren Mikrobiota nicht analysiert wurde					
		GKZ nicht genau ermittelbar; GKZ mindestens 8,0 log ₁₀ KbE/ml, GKZ als 8,0 log ₁₀ KbE/ml gewertet					
		GKZ < als niedrigste gewählte Verdünnungsstufe, GKZ < 10 KbE/ml, GKZ als 9 KbE/ml gewertet					
		GKZ < als niedrigste gewählte Verdünnungsstufe, GKZ < 100 KbE/ml, GKZ als 99 KbE/ml gewertet					

Tabelle 6-5: Test der (logarithmierten) Gesamtkeimzahlen der Hof- und Molkereitankmilchen auf Abweichung von einer Normalverteilung.

Verarbeitete Fälle							
Probenursprung	Fälle						
	Gültig		Fehlend		Gesamt		
	N	Prozent	N	Prozent	N	Prozent	
30 °C Hof GKZ/GKZ log ₁₀	10	100,0 %	0	0,0 %	10	100,0 %	
	10	100,0 %	0	0,0 %	10	100,0 %	
15 °C Hof GKZ/GKZ log ₁₀	10	100,0 %	0	0,0 %	10	100,0 %	
	10	100,0 %	0	0,0 %	10	100,0 %	
6 °C Hof GKZ/GKZ log ₁₀	10	100,0 %	0	0,0 %	10	100,0 %	
	10	100,0 %	0	0,0 %	10	100,0 %	
Tests auf Abweichung von einer Normalverteilung							
Probenursprung	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk			
	Statistik	df	Signifikanz	Statistik	df	Signifikanz	
30 °C GKZ	Hof	,304	10	,009	,706	10	,001
	Molkerei	,507	10	,000	,377	10	,000
15 °C GKZ	Hof	,373	10	,000	,598	10	,000
	Molkerei	,478	10	,000	,394	10	,000
6 °C GKZ	Hof	,291	10	,016	,816	10	,023
	Molkerei	,494	10	,000	,384	10	,000
Tests auf Abweichung von einer Normalverteilung							
Probenursprung	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk			
	Statistik	df	Signifikanz	Statistik	df	Signifikanz	
30 °C GKZ log ₁₀	Hof	,204	10	,200*	,885	10	,150
	Molkerei	,238	10	,114	,789	10	,011
15 °C GKZ log ₁₀	Hof	,179	10	,200*	,916	10	,327
	Molkerei	,245	10	,089	,850	10	,057
6 °C GKZ log ₁₀	Hof	,221	10	,184	,800	10	,015
	Molkerei	,209	10	,200*	,922	10	,378
* Dies ist eine untere Grenze der echten Signifikanz.							
^a Signifikanzkorrektur nach Lilliefors.							

ANHANG

Tabelle 6-6: T-Test zur Feststellung eines Unterschieds zwischen der logarithmierten GKZ der Hof- und Molkereitankmilchen bei 15 °C.

Gruppenstatistiken										
Probenursprung		N	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler des Mittelwertes					
15 °C GKZ log ₁₀	Hof	10	4,9040	,93990	,29722					
	Molkerei	10	5,9820	,98248	,31069					
Test bei unabhängigen Stichproben										
		Levene-Test der Varianzgleichheit		T-Test für die Mittelwertgleichheit						
		F	Signifikanz	T	df	Sig. (2-seitig)	Mittlere Differenz	Standardfehler der Differenz	95 % Konfidenzintervall der Differenz	
15 °C GKZ log ₁₀		Varianzen sind gleich		-2,507	18	,022	-1,07800	,42996	-1,98132	-,17468
		Varianzen sind nicht gleich		-2,507	17,965	,022	-1,07800	,42996	-1,98144	-,17456

Tabelle 6-7: Mann-Whitney-U-Test zur Feststellung eines Unterschieds zwischen der GKZ der Hof- und Molkereitankmilchen bei 30 °C und 6 °C.

Ränge				
Probenursprung		N	Mittlerer Rang	Rangsumme
GKZ log ₁₀ 30 °C	Hof	10	8,50	85,00
	Molkerei	10	12,50	125,00
	Gesamt	20		
GKZ log ₁₀ 6 °C	Hof	10	7,90	79,00
	Molkerei	10	13,10	131,00
	Gesamt	20		
Statistik für Test ^a				
		GKZ log ₁₀ 30 °C	GKZ log ₁₀ 6 °C	
Mann-Whitney-U		30,000	24,000	
Wilcoxon-W		85,000	79,000	
Z		-1,512	-1,965	
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)		0,130	0,049	
Exakte Signifikanz [2*(1-seitige Sig.)]		0,143 ^b	0,052 ^b	
Exakte Signifikanz (2-seitig)		0,138	0,052	
Exakte Signifikanz (1-seitig)		0,069	0,026	
Punkt-Wahrscheinlichkeit		0,005	0,005	

^a Gruppenvariable: Probenursprung. ^b Nicht für Bindungen korrigiert.

ANHANG

Tabelle 6-8: Test der (logarithmierten) Gesamtkeimzahlen der Rohmilchen und Milchhalbfabrikate auf Abweichung von einer Normalverteilung.

Verarbeitete Fälle							
Probenursprung	Fälle						
	Gültig		Fehlend		Gesamt		
	N	Prozent	N	Prozent	N	Prozent	
30 °C GKZ log ₁₀	Rohmilch	20	100,0 %	0	0,0 %	20	100,0 %
	Halbfabrikat	30	100,0 %	0	0,0 %	30	100,0 %
15 °C GKZ log ₁₀	Rohmilch	20	100,0 %	0	0,0 %	20	100,0 %
	Halbfabrikat	30	100,0 %	0	0,0 %	30	100,0 %
6 °C GKZ log ₁₀	Rohmilch	20	100,0 %	0	0,0 %	20	100,0 %
	Halbfabrikat	30	100,0 %	0	0,0 %	30	100,0 %
Tests auf Abweichung von einer Normalverteilung							
Probenursprung	Kolmogorov-Smirnov ^a				Shapiro-Wilk		
	Statistik	df	Signifikanz		Statistik	df	Signifikanz
30 °C GKZ log ₁₀	Rohmilch	,112	20	,200*	,919	20	,093
	Halbfabrikat	,118	30	,200*	,940	30	,091
15 °C GKZ log ₁₀	Rohmilch	,099	20	,200*	,955	20	,458
	Halbfabrikat	,160	30	,048	,914	30	,019
6 °C GKZ log ₁₀	Rohmilch	,214	20	,017	,911	20	,065
	Halbfabrikat	,243	30	,000	,784	30	,000
* Dies ist eine untere Grenze der echten Signifikanz.							
^a Signifikanzkorrektur nach Lilliefors.							

Tabelle 6-9: T-Test zur Feststellung eines Unterschieds zwischen der logarithmierten GKZ der Rohmilchen und Milchhalbfabrikate bei 30 °C.

Gruppenstatistiken										
Probenursprung		N	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler des Mittelwertes					
30 °C GKZ log ₁₀	Rohmilch	20	5,5200	,94695	,21174					
	Halbfabrikat	30	4,4350	1,82509	,33321					
Test bei unabhängigen Stichproben										
		Levene-Test der Varianzgleichheit		T-Test für die Mittelwertgleichheit						
		F	Signifikanz	T	df	Sig. (2-seitig)	Mittlere Differenz	Standardfehler der Differenz	95 % Konfidenzintervall der Differenz Untere Obere	
30 °C GKZ log ₁₀	Varianzen sind gleich	5,205	,027	2,443	48	,018	1,08500	,44417	0,19195	1,97805
	Varianzen sind nicht gleich			2,748	45,761	,009	1,08500	,39480	0,29020	1,87980

ANHANG

Tabelle 6-10: Mann-Whitney-U-Test zur Feststellung eines Unterschieds zwischen der GKZ der Rohmilchen und Milchhalbfabrikate.

Ränge				
Probenursprung		N	Mittlerer Rang	Rangsumme
GKZ log ₁₀ 15 °C	Rohmilch	20	33,45	669,00
	Halbfabrikat	30	20,20	606,00
	Gesamt	50		
GKZ log ₁₀ 6 °C	Rohmilch	20	33,15	663,00
	Halbfabrikat	30	20,40	612,00
	Gesamt	50		
Statistik für Test ^a				
		GKZ log ₁₀ 15 °C	GKZ log ₁₀ 6 °C	
Mann-Whitney-U		141,000	147,000	
Wilcoxon-W		606,000	612,000	
Z		-3,152	-3,051	
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)		0,002	0,002	
Exakte Signifikanz (2-seitig)		0,001	0,002	
Exakte Signifikanz (1-seitig)		0,001	0,001	
Punkt-Wahrscheinlichkeit		0,000	0,000	
^a Gruppenvariable: Probenursprung.				

Tabelle 6-11: Test auf Korrelation nach Spearman zwischen den GKZ der Rohmilchen und der Anzahl an Isolatn höherer taxonomischer Gruppen.

Korrelationen												
			GKZ log ₁₀ 15 °C	G-fakultativ anaerob	Hefen	G-obligat aerob	MSB	HigGC	Aerobe Sporenbildner	G+ „Andere“	G-	G+
Spearman-Rho	GKZ log ₁₀ 15 °C	Korrelationskoeffizient	1,000	,092	-,351	,090	,296	-,390	-,219	-,524*	,184	-,151
		Sig. (2-seitig)		,699	,129	,705	,205	,089	,354	,018	,436	,526
	N		20	20	20	20	20	20	20	20	20	20

Tabelle 6-12: Test der Anzahl der Isolate verschiedener taxonomischer Großgruppen in den Hof- und Molkereitankmilchen auf Abweichung von einer Normalverteilung.

Verarbeitete Fälle							
Probenursprung	Fälle	Gültig		Fehlend		Gesamt	
		N	Prozent	N	Prozent	N	Prozent
		Anzahl G- fakultativ anaerob pro Probe	Hof	10	100,0 %	0	0,0 %
	Molkerei	10	100,0 %	0	0,0 %	10	100,0 %
Anzahl Hefen pro Probe	Hof	10	100,0 %	0	0,0 %	10	100,0 %
	Molkerei	10	100,0 %	0	0,0 %	10	100,0 %
Anzahl G- obligat aerob pro Probe	Hof	10	100,0 %	0	0,0 %	10	100,0 %
	Molkerei	10	100,0 %	0	0,0 %	10	100,0 %
Anzahl MSB pro Probe	Hof	10	100,0 %	0	0,0 %	10	100,0 %
	Molkerei	10	100,0 %	0	0,0 %	10	100,0 %
Anzahl HigGCs pro Probe	Hof	10	100,0 %	0	0,0 %	10	100,0 %
	Molkerei	10	100,0 %	0	0,0 %	10	100,0 %
Anzahl G+ „Andere“ pro Probe	Hof	10	100,0 %	0	0,0 %	10	100,0 %
	Molkerei	10	100,0 %	0	0,0 %	10	100,0 %
Tests auf Abweichung von einer Normalverteilung							
Probenursprung		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistik	df	Signifikanz	Statistik	df	Signifikanz
Anzahl G- fakultativ anaerob pro Probe	Hof	,408	10	,000	,465	10	,000
	Molkerei	,325	10	,004	,755	10	,004
Anzahl Hefen pro Probe	Hof	,304	10	,009	,718	10	,001
	Molkerei	,439	10	,000	,467	10	,000
Anzahl G- obligat aerob pro Probe	Hof	,180	10	,200*	,881	10	,135
	Molkerei	,258	10	,059	,864	10	,086
Anzahl MSB pro Probe	Hof	,272	10	,035	,740	10	,003
	Molkerei	,188	10	,200*	,867	10	,093
Anzahl High GCs pro Probe	Hof	,382	10	,000	,523	10	,000
	Molkerei	,300	10	,011	,773	10	,007
Anzahl G+ „Andere“ pro Probe	Hof	,347	10	,001	,560	10	,000
	Molkerei	,494	10	,000	,395	10	,000
* Dies ist eine untere Grenze der echten Signifikanz.							
^a Signifikanzkorrektur nach Lilliefors.							

Tabelle 6-13: T-Test zur Feststellung eines Unterschieds in der mittleren Anzahl an gramnegativen, obligat aeroben Bakterien in den Hof- und Molkereitankmilchen.

Gruppenstatistiken										
Probenursprung		N	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler des Mittelwertes					
G-, obligat aerobe Bakterien	Rohmilch	10	87,4	54,62400	17,27400					
	Halbfabrikat	10	62,5	45,08600	14,25700					
Test bei unabhängigen Stichproben										
		Levene-Test der Varianzgleichheit		T-Test für die Mittelwertgleichheit						
		F	Signifikanz	T	df	Sig. (2-seitig)	Mittlere Differenz	Standardfehler der Differenz	95 % Konfidenzintervall der Differenz	
G-, obligat aerobe Bakterien	Varianzen sind gleich	,793	,385	1,112	18	,281	24,900	22,398	-22,156	71,956
	Varianzen sind nicht gleich			1,112	17,375	,281	24,900	22,398	-22,277	72,077

Tabelle 6-14: Mann-Whitney-U-Test zur Feststellung eines Unterschieds in der mittleren Anzahl verschiedener taxonomischer Großgruppen in den Hof- und Molkereitankmilchen.

Ränge							
Probenursprung		N	Mittlerer Rang	Rangsumme			
Anzahl G- fakultativ anaerob pro Probe	Hof	10	8,90	89,00			
	Molkerei	10	12,10	121,00			
	Gesamt	20					
Anzahl Hefen pro Probe	Hof	10	11,90	119,00			
	Molkerei	10	9,10	91,00			
	Gesamt	20					
Anzahl G- obligat aerob pro Probe	Hof	10	11,90	119,00			
	Molkerei	10	9,10	91,00			
	Gesamt	20					
Anzahl MSB pro Probe	Hof	10	7,20	72,00			
	Molkerei	10	13,80	138,00			
	Gesamt	20					
Anzahl High GCs pro Probe	Hof	10	11,80	118,00			
	Molkerei	10	9,20	92,00			
	Gesamt	20					
Anzahl G+ „Andere“ pro Probe	Hof	10	13,20	132,00			
	Molkerei	10	7,80	78,00			
	Gesamt	20					
Statistik für Test ^a							
	Anzahl fakultativ anaerob pro Probe	Anzahl Hefen pro Probe	Anzahl obligat aerob pro Probe	Anzahl MSB pro Probe	Anzahl High GCs pro Probe	Anzahl G+ „Andere“ pro Probe	
Mann-Whitney-U	34,000	36,000	36,000	17,000	37,000	23,000	
Wilcoxon-W	89,000	91,000	91,000	72,000	92,000	78,000	
Z	-1,325	-1,088	-1,058	-2,499	-1,024	-2,092	
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,185	,277	,290	,012	,306	,036	
Exakte Signifikanz [2*(1-seitige Sig.)]	,247 ^b	,315 ^b	,315 ^b	,011 ^b	,353 ^b	,043 ^b	
Exakte Signifikanz (2-seitig)	,198	,292	,315	,011	,328	,038	
Exakte Signifikanz (1-seitig)	,099	,146	,157	,006	,164	,019	
Punkt-Wahrscheinlichkeit	,009	,011	,018	,001	,016	,003	
^a Gruppenvariable: Probenursprung.							
^b Nicht für Bindungen korrigiert.							

Tabelle 6-15: T-Test zur Feststellung eines Unterschieds in der mittleren Anzahl der Gattungen und Arten pro Probe der Hof- und Molkereitankmilchen.

Verarbeitete Fälle							
Probenursprung	Fälle						
	Gültig		Fehlend		Gesamt		
	N	Prozent	N	Prozent	N	Prozent	
Anzahl der Gattungen pro Probe	Hof	10	100,0 %	0	0,0 %	10	100,0 %
	Molkerei	10	100,0 %	0	0,0 %	10	100,0 %
Anzahl der Arten pro Probe	Hof	10	100,0 %	0	0,0 %	10	100,0 %
	Molkerei	10	100,0 %	0	0,0 %	10	100,0 %
Tests auf Abweichung von einer Normalverteilung							
Probenursprung	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk			
	Statistik	df	Signifikanz	Statistik	df	Signifikanz	
Anzahl der Gattungen pro Probe	Hof	,253	10	,069	,891	10	<u>,172</u>
	Molkerei	,261	10	,052	,882	10	<u>,136</u>
Anzahl der Arten pro Probe	Hof	,205	10	,200*	,890	10	<u>,172</u>
	Molkerei	,164	10	,200*	,861	10	<u>,078</u>
* Dies ist eine untere Grenze der echten Signifikanz.							
^a Signifikanzkorrektur nach Lilliefors.							

ANHANG

Tabelle 6-16: Test der Anzahl der Gattungen und Arten pro Probe der Hof- und Molkereitankmilchen auf Abweichung von einer Normalverteilung.

Gruppenstatistiken										
Probenursprung		N	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler des Mittelwertes					
Anzahl der Gattungen pro Probe	Hof	10	150,60	24,901	7,874					
	Molkerei	10	140,00	14,103	4,460					
Anzahl der Arten pro Probe	Hof	10	12,20	4,492	1,420					
	Molkerei	10	10,10	2,923	,924					
Test bei unabhängigen Stichproben										
		Levene-Test der Varianzgleichheit		T-Test für die Mittelwertgleichheit						
		F	Signifikanz	T	df	Sig. (2-seitig)	Mittlere Differenz	Standardfehler der Differenz	95 % Konfidenzintervall der Differenz	
									Untere	Obere
Anzahl der Gattungen pro Probe	<u>Varianzen sind gleich</u>	,440	,516	1,171	18	,257	10,600	9,049	-8,412	29,612
	Varianzen sind nicht gleich			1,171	14,235	,261	10,600	9,049	-8,779	29,979
Anzahl der Arten pro Probe	<u>Varianzen sind gleich</u>	1,806	,196	1,239	18	,231	2,100	1,695	-1,461	5,661
	Varianzen sind nicht gleich			1,239	15,463	,234	2,100	1,695	-1,503	5,703

Tabelle 6-17: Test der Anzahl der Isolate verschiedener taxonomischer Großgruppen der Rohmilchen und Milchhalbfabrikate auf Abweichung von einer Normalverteilung.

Verarbeitete Fälle							
Probenursprung	Fälle	Gültig		Fehlend		Gesamt	
		N	Prozent	N	Prozent	N	Prozent
		Anzahl G- fakultativ anaerob pro Probe	Rohmilch	20	100,0 %	0	0,0 %
	Milchhalbfabrikat	20	100,0 %	0	0,0 %	20	100,0 %
Anzahl G- obligat aerob pro Probe	Rohmilch	20	100,0 %	0	0,0 %	20	100,0 %
	Milchhalbfabrikat	20	100,0 %	0	0,0 %	20	100,0 %
Anzahl MSB pro Probe	Rohmilch	20	100,0 %	0	0,0 %	20	100,0 %
	Milchhalbfabrikat	20	100,0 %	0	0,0 %	20	100,0 %
Anzahl High GCs pro Probe	Rohmilch	20	100,0 %	0	0,0 %	20	100,0 %
	Milchhalbfabrikat	20	100,0 %	0	0,0 %	20	100,0 %
Anzahl G+ aerobe Sporenbildner pro Probe	Rohmilch	20	100,0 %	0	0,0 %	20	100,0 %
	Milchhalbfabrikat	20	100,0 %	0	0,0 %	20	100,0 %
Tests auf Abweichung von einer Normalverteilung							
Probenursprung		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistik	df	Signifikanz	Statistik	df	Signifikanz
Anzahl G- fakultativ anaerob pro Probe	Rohmilch	,375	20	,000	,629	20	,000
	Milchhalbfabrikat	,305	20	,000	,683	20	,000
Anzahl G- obligat aerob pro Probe	Rohmilch	,208	20	,023	,880	20	,018
	Milchhalbfabrikat	,293	20	,000	,779	20	,000
Anzahl MSB pro Probe	Rohmilch	,201	20	,034	,840	20	,004
	Milchhalbfabrikat	,388	20	,000	,465	20	,000
Anzahl High GCs pro Probe	Rohmilch	,399	20	,000	,375	20	,000
	Milchhalbfabrikat	,348	20	,000	,673	20	,000
Anzahl G+ aerobe Sporenbildner pro Probe	Rohmilch	,538	20	,000	,236	20	,000
	Milchhalbfabrikat	,328	20	,000	,506	20	,000
^a Signifikanzkorrektur nach Lilliefors.							

Tabelle 6-18: Mann-Whitney-U-Test zur Feststellung eines Unterschieds in der mittleren Anzahl verschiedener taxonomischer Großgruppen in den Rohmilchen und Milchhalbfabrikaten.

Ränge					
Probenursprung		N	Mittlerer Rang	Rangsumme	
Anzahl G- fakultativ anaerob pro Probe	Hof	20	18,85	377,00	
	Molkerei	20	22,15	443,00	
	Gesamt	40			
Anzahl G- obligat aerob pro Probe	Hof	20	26,10	522,00	
	Molkerei	20	14,90	298,00	
	Gesamt	40			
Anzahl MSB pro Probe	Hof	20	27,73	554,50	
	Molkerei	20	13,28	265,50	
	Gesamt	40			
Anzahl High GCs pro Probe	Hof	20	18,20	364,00	
	Molkerei	20	22,80	456,00	
	Gesamt	40			
Anzahl G+ aerobe Sporenbildner pro Probe	Hof	20	16,68	333,50	
	Molkerei	20	24,33	486,50	
	Gesamt	40			
Statistik für Test ^a					
	Anzahl G- fakultativ anaerob pro Probe	Anzahl G- obligat aerob pro Probe	Anzahl MSB pro Probe	Anzahl HigGCs pro Probe	Anzahl G+ aerobe Sporenbildner pro Probe
Mann-Whitney-U	167,000	88,000	55,500	154,000	123,500
Wilcoxon-W	377,000	298,000	265,500	364,000	333,500
Z	-0,965	-3,042	-3,923	-1,282	-2,722
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,334	,002	,000	,200	,006
Exakte Signifikanz [2*(1-seitige Sig.)]	,383b	,002b	,000b	,221b	,038b
Exakte Signifikanz (2-seitig)	,341	,002	,000	,205	,008
Exakte Signifikanz (1-seitig)	,171	,001	,000	,102	,004
Punkt-Wahrscheinlichkeit	,004	,000	,000	,002	,000
^a Gruppenvariable: Probenursprung.					
^b Nicht für Bindungen korrigiert.					

Tabelle 6-19: Auflistung der 12 Stämme der vier neuen Arten und der korrespondierenden GenBank/EMBL/DDBJ-Accession-Nummern der fast vollständigen 16S-rRNA- und partiellen *rpoD*-Gensequenzen.

Art	Stamm	Gen	GenBank/EMBL/DDBJ- Accession-Nummern
<i>Pseudomonas helleri</i> sp. nov.	WS4917 ^T	16S rRNA	KP738715
	WS4995	16S rRNA	KP738716
	WS4999	16S rRNA	KP738717
	WS5001	16S rRNA	KP738718
	WS5002	16S rRNA	KP738719
<i>Pseudomonas weihenstephanensis</i> sp. nov.	WS4993 ^T	16S rRNA	KP738720
	WS4994	16S rRNA	KP738721
<i>Pseudomonas lactis</i> sp. nov.	WS4992 ^T	16S rRNA	KP756923
	WS4997	16S rRNA	KP756925
	WS5000	16S rRNA	KP756926
<i>Pseudomonas paralactis</i> sp. nov.	WS4672 ^T	16S rRNA	KP756921
	WS4998	16S rRNA	KP756922
<i>Pseudomonas helleri</i> sp. nov.	WS4917 ^T	<i>rpoD</i>	KP738722
	WS4995	<i>rpoD</i>	KP738723
	WS4999	<i>rpoD</i>	KP738724
	WS5001	<i>rpoD</i>	KP738725
	WS5002	<i>rpoD</i>	KP738726
<i>Pseudomonas weihenstephanensis</i> sp. nov.	WS4993 ^T	<i>rpoD</i>	KP738727
	WS4994	<i>rpoD</i>	KP738728
<i>Pseudomonas lactis</i> sp. nov.	WS4992 ^T	<i>rpoD</i>	KP756917
	WS4997	<i>rpoD</i>	KP756919
	WS5000	<i>rpoD</i>	KP756920
<i>Pseudomonas paralactis</i> sp. nov.	WS4672 ^T	<i>rpoD</i>	KP756915
	WS4998	<i>rpoD</i>	KP756916

ANHANG

Tabelle 6-20: Ermittelte *apr*-Operonstrukturen von 107 *Pseudomonas*-Stämmen. Gleiche *apr*-Operonstrukturen sind in derselben Farbe hinterlegt. Die Tabelle ist weitestgehend nach den *apr*-Operonstrukturen sortiert.

<i>Pseudomonas</i> (P.)-Art	Stamnummer	Stamm Ursprung	Ursprung der Genomdaten	Operonstruktur Kurzform (5'-3')
<i>P. aeruginosa</i>	MG49	Eigenisolat	Seq.	D E F A I
<i>P. aeruginosa</i> (T)	DSM 50071	DSMZ	Seq.	D E F A I
<i>P. entomophila</i> (T)	DSM 28517	DSMZ	NCBI-Datenbank	A I D E F
<i>P. mosselii</i> (T)	DSM 17497	DSMZ	NCBI-Datenbank	A I D E F
<i>P. syringae</i> (T)	DSM 10604	DSMZ	NCBI-Datenbank	A I D E F
<i>P. protegens</i>	MG949	Eigenisolat	Seq.	A I D E F L1 pA pB L2
<i>P. protegens</i> (T)	DSM 19095	DSMZ	NCBI-Datenbank	A I D E F L1 pA pBL2
<i>P. chlororaphis</i>	G2638	WS-Sammlung	Seq.	A I D E F pA pB L1 L2
<i>P. chlororaphis subsp. chlororaphis</i> (T)	DSM 50083	DSMZ	Seq.	A I D E F pA pB L1 L2
<i>P. koreensis</i>	G3883	WS-Sammlung	Seq.	A I D E F pA pB L1 L2
<i>P. koreensis</i> (T)	DSM 16610	DSMZ	Seq.	A I D E F pA pB L1 L2
<i>P. lini</i> (T)	DSM 16768	DSMZ	Seq.	A I D E F pA pB L1 L2
<i>P. mandelii</i>	MG1608	Eigenisolat	Seq.	A I D E F pA pB L1 L2
<i>P. mandelii</i> (T)	DSM 17967	DSMZ	Seq.	A I D E F pA pB L1 L2
<i>P. brenneri</i>	MG1000	Eigenisolat	Seq.	A I D E F pA pB L2
<i>P. brenneri</i> (T)	DSM 15294	DSMZ	Seq.	A I D E F pA pB L2
<i>P. fluorescens</i>	MG260	Eigenisolat	Seq.	A I D E F pA pB L2
<i>P. fluorescens</i> (T)	DSM 50090	DSMZ	Seq.	A I D E F pA pB L2
<i>P. gessardii</i>	MG400	Eigenisolat	Seq.	A I D E F pA pB L2
<i>P. gessardii</i> (T)	DSM 17152	DSMZ	Seq.	A I D E F pA pB L2
<i>P. libanensis</i> (T)	DSM 17149	DSMZ	Seq.	A I D E F pA pB L2
<i>P. orientalis</i> (T)	DSM 17489	DSMZ	Seq.	A I D E F pA pB L2
<i>P. poae</i>	MG1330	Eigenisolat	Seq.	A I D E F pA pB L2
<i>P. poae</i> (T)	DSM 14936	DSMZ	Seq.	A I D E F pA pB L2
<i>P. proteolytica</i>	MG1465	Eigenisolat	Seq.	A I D E F pA pB L2
<i>P. proteolytica</i>	MG192	Eigenisolat	Seq.	A I D E F pA pB L2
<i>P. proteolytica</i>	MG229	Eigenisolat	Seq.	A I D E F pA pB L2
<i>P. proteolytica</i>	MG38	Eigenisolat	Seq.	A I D E F pA pB L2
<i>P. proteolytica</i>	MG489	Eigenisolat	Seq.	A I D E F pA pB L2
<i>P. proteolytica</i>	MG550	Eigenisolat	Seq.	A I D E F pA pB L2
<i>P. proteolytica</i>	MG565	Eigenisolat	Seq.	A I D E F pA pB L2
<i>P. proteolytica</i>	MG861	Eigenisolat	Seq.	A I D E F pA pB L2
<i>P. proteolytica</i>	MG965	Eigenisolat	Seq.	A I D E F pA pB L2
<i>P. proteolytica</i> (T)	DSM 15321	DSMZ	Seq.	A I D E F pA pB L2
<i>P. rhodesiae</i>	G3159	WS-Sammlung	Seq.	A I D E F pA pB L2
<i>P. rhodesiae</i>	MG1416	Eigenisolat	Seq.	A I D E F pA pB L2
<i>P. rhodesiae</i> (T)	DSM 14020	DSMZ	Seq.	A I D E F pA pB L2
<i>P. lactis</i> sp.nov. ?*1	MG775	Eigenisolat	Seq.	A I D E F pA pB L2
<i>P. lactis</i> sp. nov. (T)	MG336	Eigenisolat	Seq.	A I D E F pA pB L2

ANHANG

<i>Pseudomonas</i> (P.)-Art	Stamnummer	Stamm Ursprung	Ursprung der Genomdaten	Operonstruktur Kurzform (5'-3')
<i>P. paralactis</i> sp. nov. (T)	MG273	Eigenisolat	Seq.	A I D E F pA pB L2
<i>P. synxantha</i> (T)	DSM 18928	DSMZ	Seq.	A I D E F pA pB L2
<i>P. trivialis</i> (T)	DSM 14937	DSMZ	Seq.	A I D E F pA pB L2
<i>P. veronii</i>	DSM 16272	DSMZ	Seq.	A I D E F pA pB L2
<i>P. veronii</i>	G3537	WS-Sammlung	Seq.	A I D E F pA pB L2
<i>P. veronii</i>	G3734	WS-Sammlung	Seq.	A I D E F pA pB L2
<i>P. veronii</i>	MG1597	Eigenisolat	Seq.	A I D E F L2
<i>P. veronii</i> (T)	DSM 11331	DSMZ	Seq.	A I D E F L2
<i>P. grimontii</i> (T)	DSM 17515	DSMZ	Seq.	A I D E F L2
<i>P. marginalis</i> (T)	DSM 13124	DSMZ	Seq.	A I D E F L2
<i>P. panacis</i>	MG351	Eigenisolat	Seq.	A I D E F L2
<i>P. panacis</i> (T)	DSM 18529	DSMZ	Seq.	A I D E F L2
<i>P. deceptionensis</i> (T)	DSM 26521	DSMZ	Seq.	A I D E F L2
<i>P. fragi</i> ^{*2}	MG1008	Eigenisolat	Seq.	A I D E F L2
<i>P. fragi</i>	MG1328	Eigenisolat	Seq.	A I D E F L2
<i>P. fragi</i>	MG1473	Eigenisolat	Seq.	A I D E F L2
<i>P. fragi</i>	MG230	Eigenisolat	Seq.	A I D E F L2
<i>P. fragi</i>	MG343	Eigenisolat	Seq.	A I D E F L2
<i>P. fragi</i>	MG607	Eigenisolat	Seq.	A I D E F L2
<i>P. fragi</i>	MG667	Eigenisolat	Seq.	A I D E F L2
<i>P. fragi</i> ^{*2}	MG976	Eigenisolat	Seq.	A I D E F L2
<i>P. fragi</i> (T) ^{*3}	B52/ DSM 3456	DSMZ	NCBI-Datenbank	A I D E F L2
<i>P. lundensis</i>	MG657	Eigenisolat	Seq.	A I D E F ^{*4}
<i>P. lundensis</i>	MG790	Eigenisolat	Seq.	A I D E F ^{*4}
<i>P. lundensis</i>	MG1011	Eigenisolat	Seq.	A I D E F L2
<i>P. lundensis</i>	MG131	Eigenisolat	Seq.	A I D E F L2
<i>P. lundensis</i>	MG1338	Eigenisolat	Seq.	A I D E F L2
<i>P. lundensis</i>	MG1459	Eigenisolat	Seq.	A I D E F L2
<i>P. lundensis</i>	MG179	Eigenisolat	Seq.	A I D E F L2
<i>P. lundensis</i>	MG914	Eigenisolat	Seq.	A I D E F L2
<i>P. lundensis</i>	MG979	Eigenisolat	Seq.	A I D E F L2
<i>P. lundensis</i> (T) ^{*5}	DSM 6252	DSMZ	Seq.	A I D E F L2
<i>P. weihenstephanensis</i> sp. nov.	MG442	Eigenisolat	Seq.	A I D E F L2
<i>P. weihenstephanensis</i> sp. nov. (T)	MG339	Eigenisolat	Seq.	A I D E F L2
<i>P. alcaligenes</i>	G7996	WS-Sammlung	Seq.	Kein Operon
<i>P. alcaligenes</i> (T)	DSM 50342	DSMZ	NCBI-Datenbank	Kein Operon
<i>P. azotifigens</i> (T)	DSM 17556	DSMZ	NCBI-Datenbank	Kein Operon
<i>P. caeni</i> (T)	DSM 24390	DSMZ	NCBI-Datenbank	Kein Operon
<i>P. chengduensis</i>	G7597	WS-Sammlung	Seq.	Kein Operon
<i>P. chengduensis</i> (T)	DSM 26382	DSMZ	Seq.	Kein Operon
<i>P. cremoricolorata</i> (T)	DSM 17059	DSMZ	NCBI-Datenbank	Kein Operon

ANHANG

<i>Pseudomonas</i> (P.)-Art	Stamnummer	Stamm Ursprung	Ursprung der Genomdaten	Operonstruktur Kurzform (5'-3')
<i>P. endophytica</i> (T)	BSST44	Erstbeschreiber	Seq.	Kein Operon
<i>P. extremaustralis</i> (T)	DSM 17835	DSMZ	Seq.	Kein Operon
<i>P. fulva</i> (T)	DSM 17717	DSMZ	NCBI-Datenbank	Kein Operon
<i>P. helleri</i>	MG839	Eigenisolat	Seq.	Kein Operon
<i>P. helleri</i> (T)	MG221	Eigenisolat	Seq.	Kein Operon
<i>P. japonica</i> (T)	DSM 22348	DSMZ	NCBI-Datenbank	Kein Operon
<i>P. knackmussii</i> (T)	DSM 6978	DSMZ	NCBI-Datenbank	Kein Operon
<i>P. monteilii</i> (T)	DSM 14164	DSMZ	NCBI-Datenbank	Kein Operon
<i>P. nitroreducens</i>	G3904	WS-Sammlung	Seq.	Kein Operon
<i>P. nitroreducens</i> (T)	DSM 14399	DSMZ	Seq.	Kein Operon
<i>P. oryzae</i> (T)	DSM 6835	DSMZ	Seq.	Kein Operon
<i>P. parafulva</i> (T)	DSM 17004	DSMZ	NCBI-Datenbank	Kein Operon
<i>P. pelagia</i> (T)	DSM 25163	DSMZ	NCBI-Datenbank	Kein Operon
<i>P. peli</i>	MG1321	Eigenisolat	Seq.	Kein Operon
<i>P. peli</i> (T)	DSM 17833	DSMZ	Seq.	Kein Operon
<i>P. psychrophila</i> (T)	DSM 17535	DSMZ	Seq.	Kein Operon
<i>P. psychrotolerans</i>	G4781	WS-Sammlung	Seq.	Kein Operon
<i>P. psychrotolerans</i> (T)	DSM 15758	DSMZ	Seq.	Kein Operon
<i>P. putida</i> (T)	DSM 291	DSMZ	NCBI-Datenbank	Kein Operon
<i>P. resinovorans</i> (T)	DSM 21078	DSMZ	NCBI-Datenbank	Kein Operon
<i>P. rhizosphaerae</i> (T)	DSM 16299	DSMZ	NCBI-Datenbank	Kein Operon
<i>P. stutzeri</i>	G6238	WS-Sammlung	Seq.	Kein Operon
<i>P. stutzeri</i> (T)	DSM 5190	DSMZ	Seq.	Kein Operon
<i>P. taetrolens</i> (T)	DSM 21104	DSMZ	Seq.	Kein Operon
<i>P. taiwanensis</i> (T)	DSM 21245	DSMZ	NCBI-Datenbank	Kein Operon
<i>P. thermotolerans</i> (T)	DSM 14292	DSMZ	NCBI-Datenbank	Kein Operon
<i>P. vranovensis</i> (T)	DSM 16006	DSMZ	NCBI-Datenbank	Kein Operon

*¹ Siehe 4.4.2 letzter Abschnitt.

*² Die *arpD*-Sequenzen von *Pseudomonas fragi* MG1008 und MG976 wurden manuell vervollständigt.

*³ Die *aprD*-Sequenz von *Pseudomonas fragi* B25^T lag geteilt auf zwei verschiedenen *contigs* vor, sie konnte nicht komplett vervollständigt werden, es fehlen 98 Basenpaare im mittleren Bereich.

*⁴ Siehe 4.3.

*⁵ Die *aprA*-Sequenz von *Pseudomonas lundensis* DSM 6252 lag geteilt auf zwei verschiedenen *contigs* vor und wurde manuell vervollständigt.

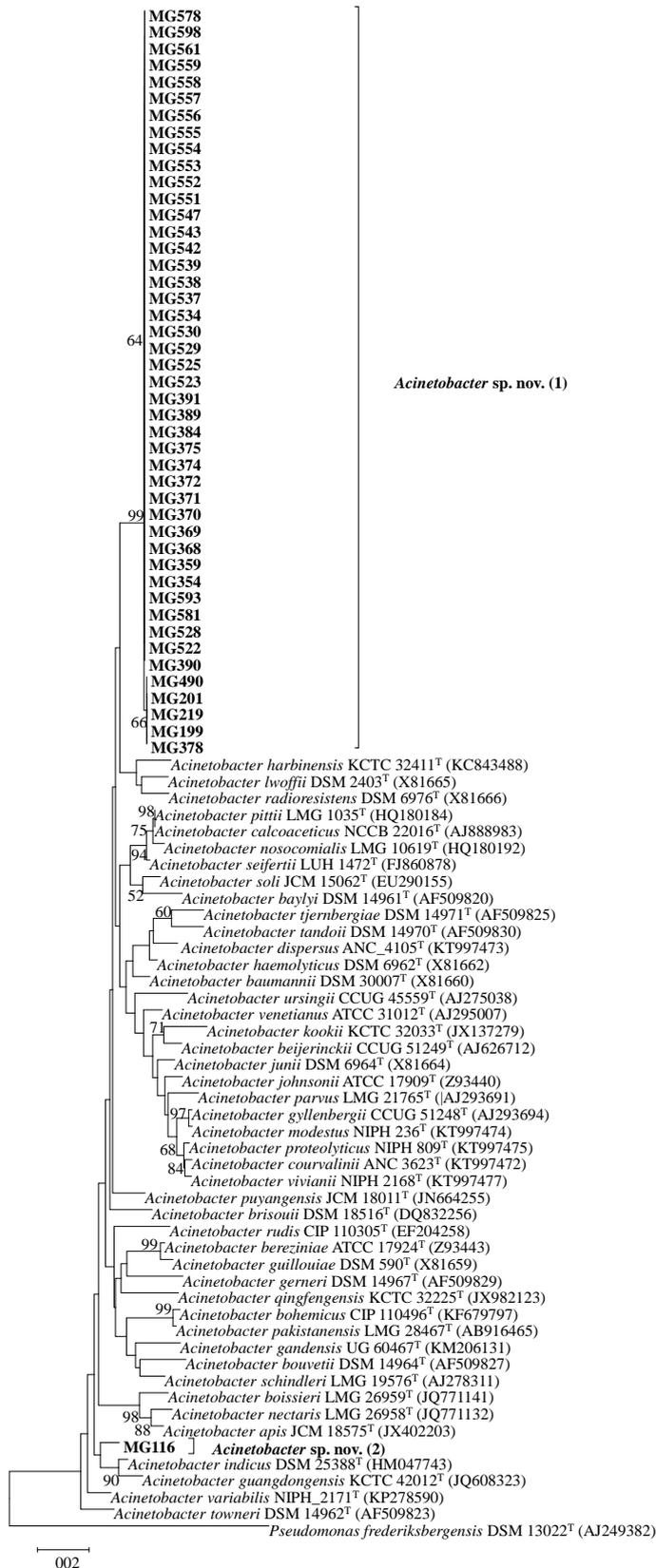


Abbildung 6-1: Phylogenetischer Neighbor-Joining-Baum, basierend auf partiellen 16S-rRNA-Sequenzen, der die phylogenetische Position der zwei potentiell neuen *Acinetobacter*-Arten zeigt. In die Berechnung flossen 789 Nukleotidpositionen von insgesamt 92 partiellen 16S-rRNA-Sequenzen mit ein. Die Berechnung wurde 1000-mal wiederholt (bootstrap), Bootstrap-Werte über 50 % wurden an den jeweiligen Knotenpunkten angegeben. Als Outgroup diente die 16SrRNA-Sequenz des Typstamms *Pseudomonas frederiksbergensis* DSM 13022^T. Die Länge des Balkens entspricht 0,02 abweichenden Basen pro Nukleotidposition.

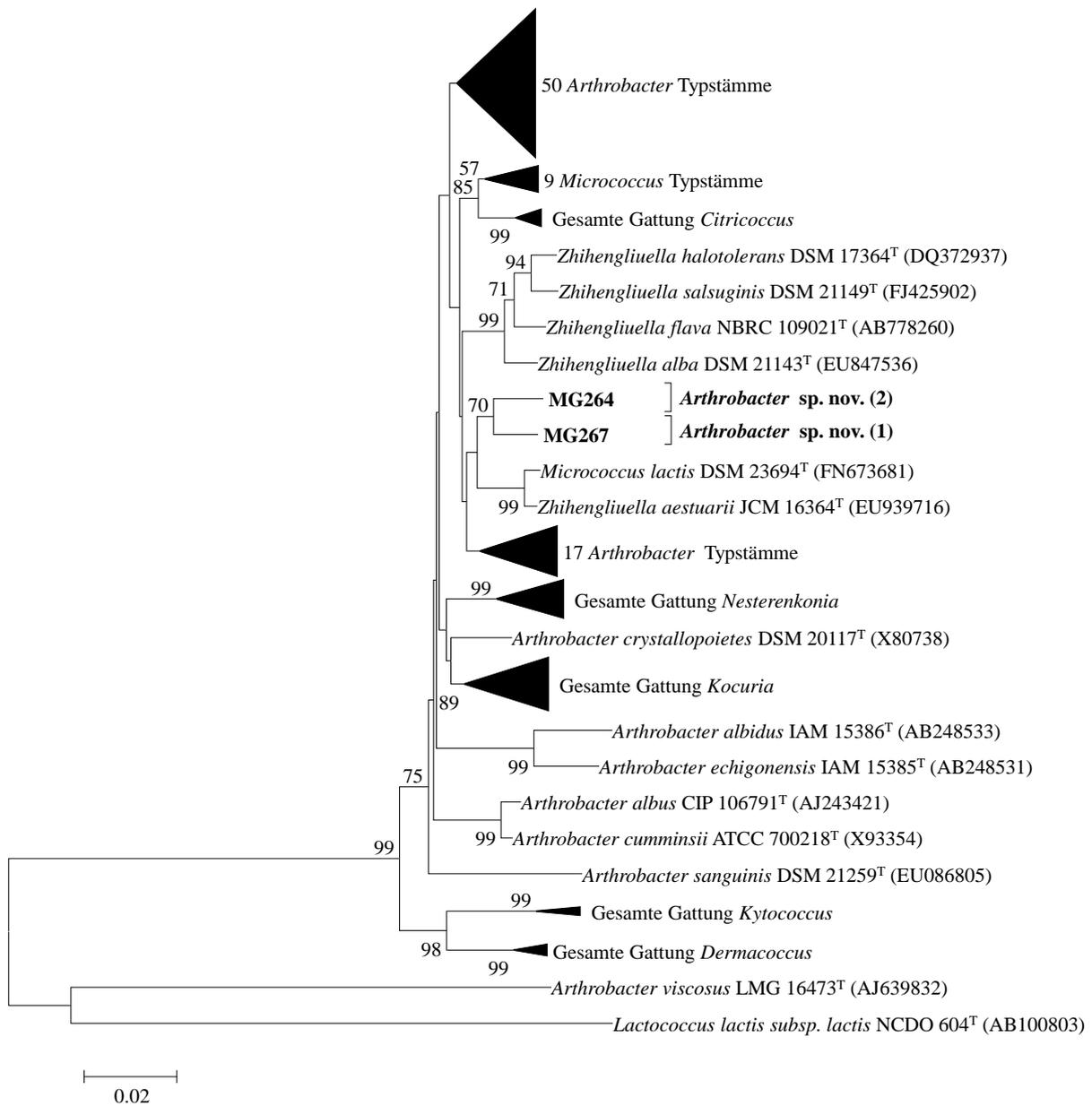


Abbildung 6-2: Phylogenetischer Neighbor-Joining-Baum, basierend auf partiellen 16S-rRNA-Sequenzen, der die phylogenetische Position der beiden potentiell neuen *Arthrobacter*-Arten zeigt. In die Berechnung flossen 1358 Nukleotidpositionen von insgesamt 136 partiellen 16S-rRNA-Sequenzen mit ein. Die Berechnung wurde 1000-mal wiederholt (bootstrap), Bootstrap-Werte über 50 % wurden an den jeweiligen Knotenpunkten angegeben. Als Outgroup diente die 16S-rRNA-Sequenz des Typstamms *Lactococcus lactis subsp. lactis* NCDO 604^T. Die Länge des Balkens entspricht 0,02 abweichenden Basen pro Nukleotidposition.

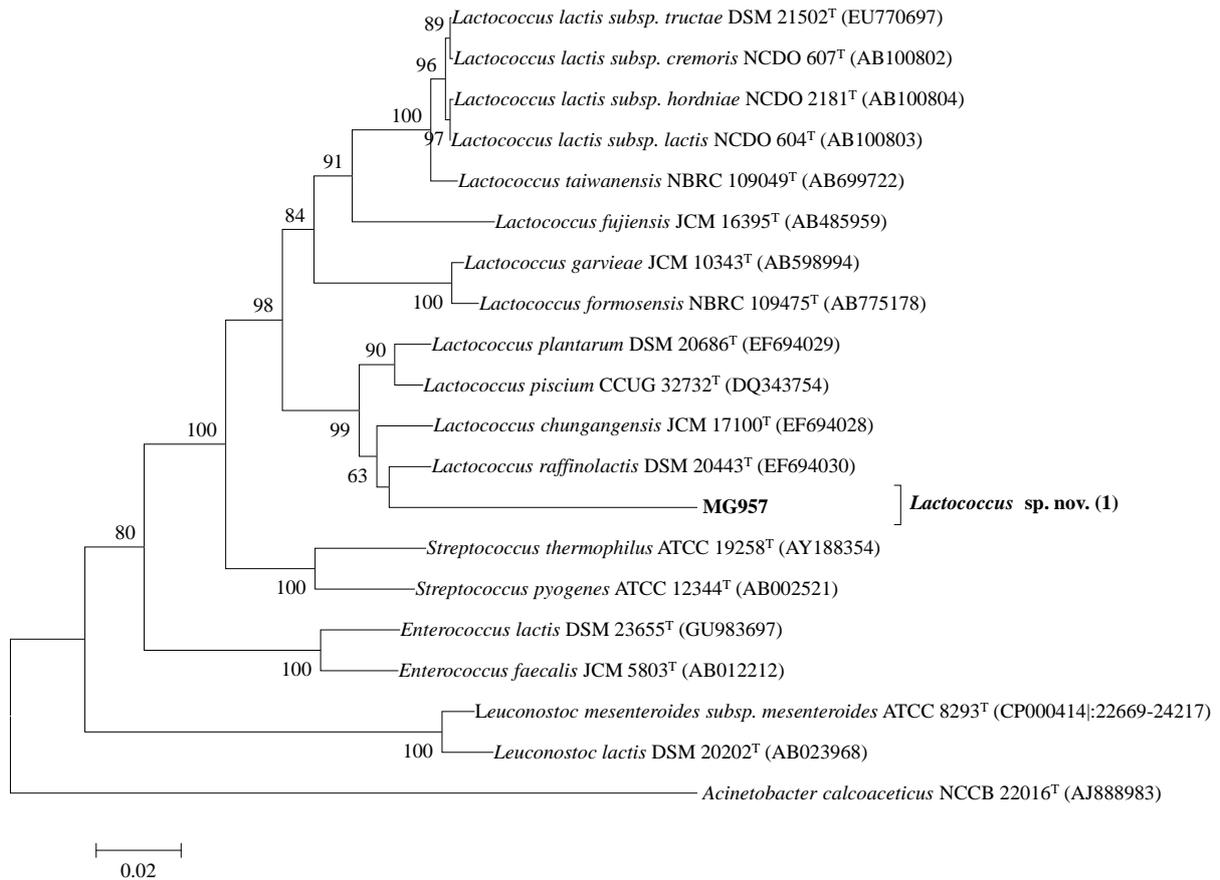


Abbildung 6-3: Phylogenetischer Neighbor-Joining-Baum, basierend auf partiellen 16S-rRNA-Sequenzen, der die phylogenetische Position der potentiell neuen *Lactococcus*-Art zeigt. In die Berechnung flossen 1346 Nukleotidpositionen von insgesamt 20 partiellen 16S-rRNA-Sequenzen mit ein. Die Berechnung wurde 1000-mal wiederholt (bootstrap), Bootstrap-Werte über 50 % wurden an den jeweiligen Knotenpunkten angegeben. Als Outgroup diente die 16S-rRNA-Sequenz des Typstamms *Acinetobacter calcoaceticus* NCCB 22016^T. Die Länge des Balkens entspricht 0,02 abweichenden Basen pro Nukleotidposition.

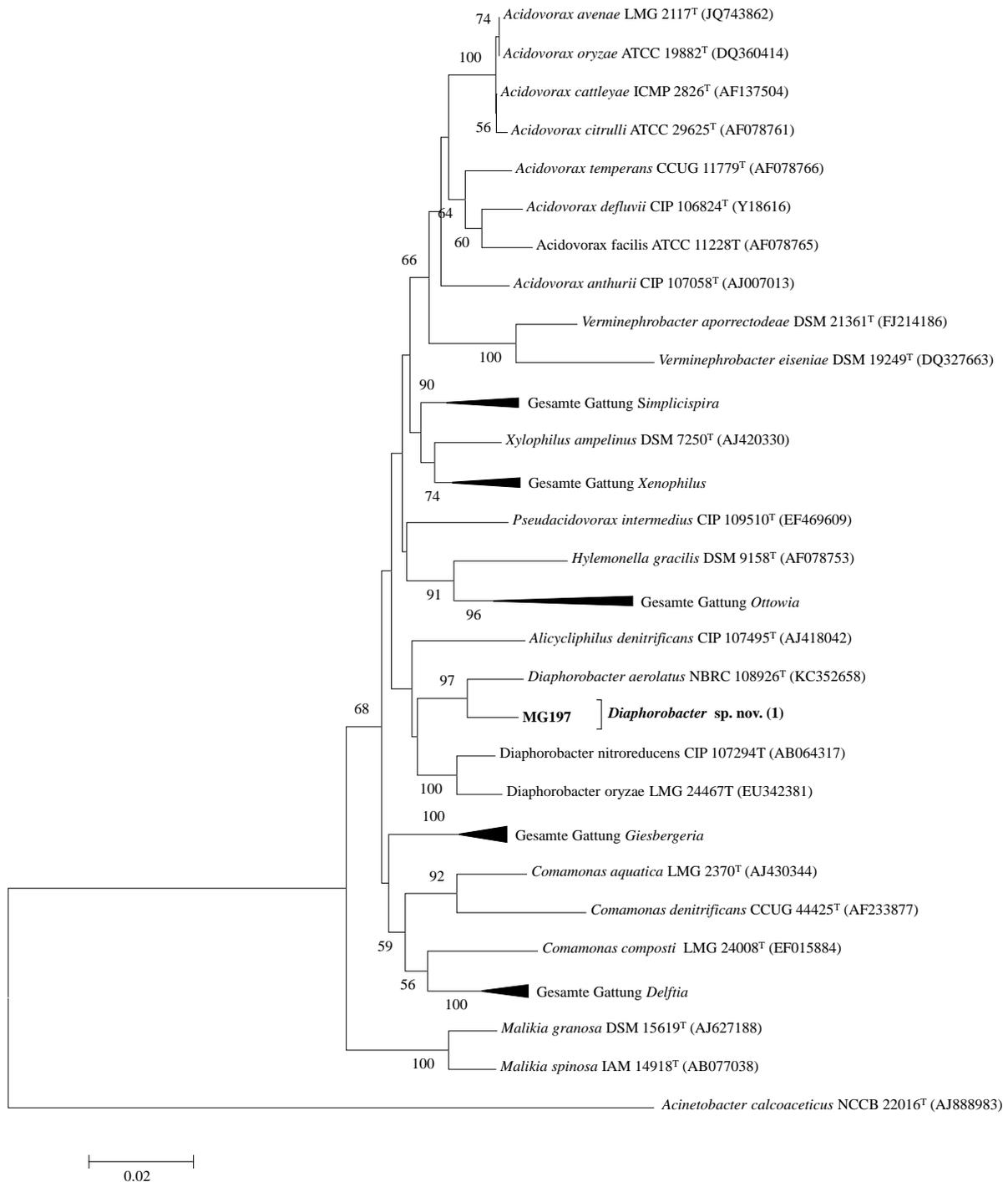


Abbildung 6-4: Phylogenetischer Neighbor-Joining-Baum, basierend auf partiellen 16S-rRNA-Sequenzen, der die phylogenetische Position der potentiell neuen *Diaphorobacter*-Art zeigt. In die Berechnung flossen 1395 Nukleotidpositionen von insgesamt 42 partiellen 16S-rRNA-Sequenzen mit ein. Die Berechnung wurde 1000-mal wiederholt (bootstrap), Bootstrap-Werte über 50 % wurden an den jeweiligen Knotenpunkten angegeben. Als Outgroup diente die 16S-rRNA-Sequenz des Typstamms *Acinetobacter calcoaceticus* NCCB 22016^T. Die Länge des Balkens entspricht 0,02 abweichenden Basen pro Nukleotidposition.

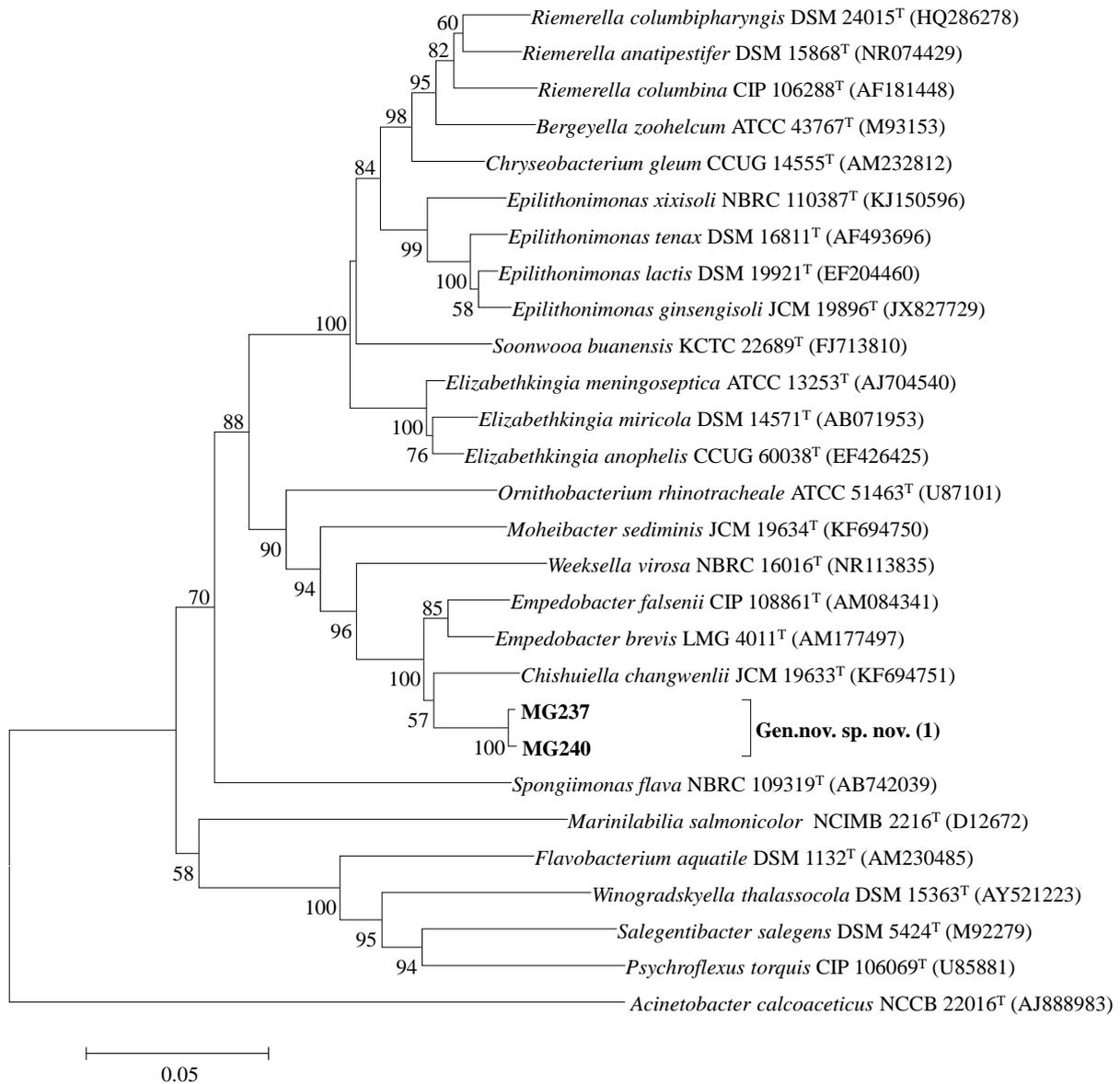


Abbildung 6-5: Phylogenetischer Neighbor-Joining-Baum, basierend auf partiellen 16S-rRNA-Sequenzen, der die phylogenetische Position der potentiell neuen Gattung neben den nah verwandten Gattungen *Empedobacter* und *Chishuiella* zeigt. In die Berechnung flossen 1281 Nukleotidpositionen von insgesamt 28 partiellen 16S-rRNA-Sequenzen mit ein. Die Berechnung wurde 1000-mal wiederholt (bootstrap), Bootstrap-Werte über 50 % wurden an den jeweiligen Knotenpunkten angegeben. Als Outgroup diente die 16S-rRNA-Sequenz des Typstamms *Acinetobacter calcoaceticus* NCCB 22016^T. Die Länge des Balkens entspricht 0,05 abweichenden Basen pro Nukleotidposition.

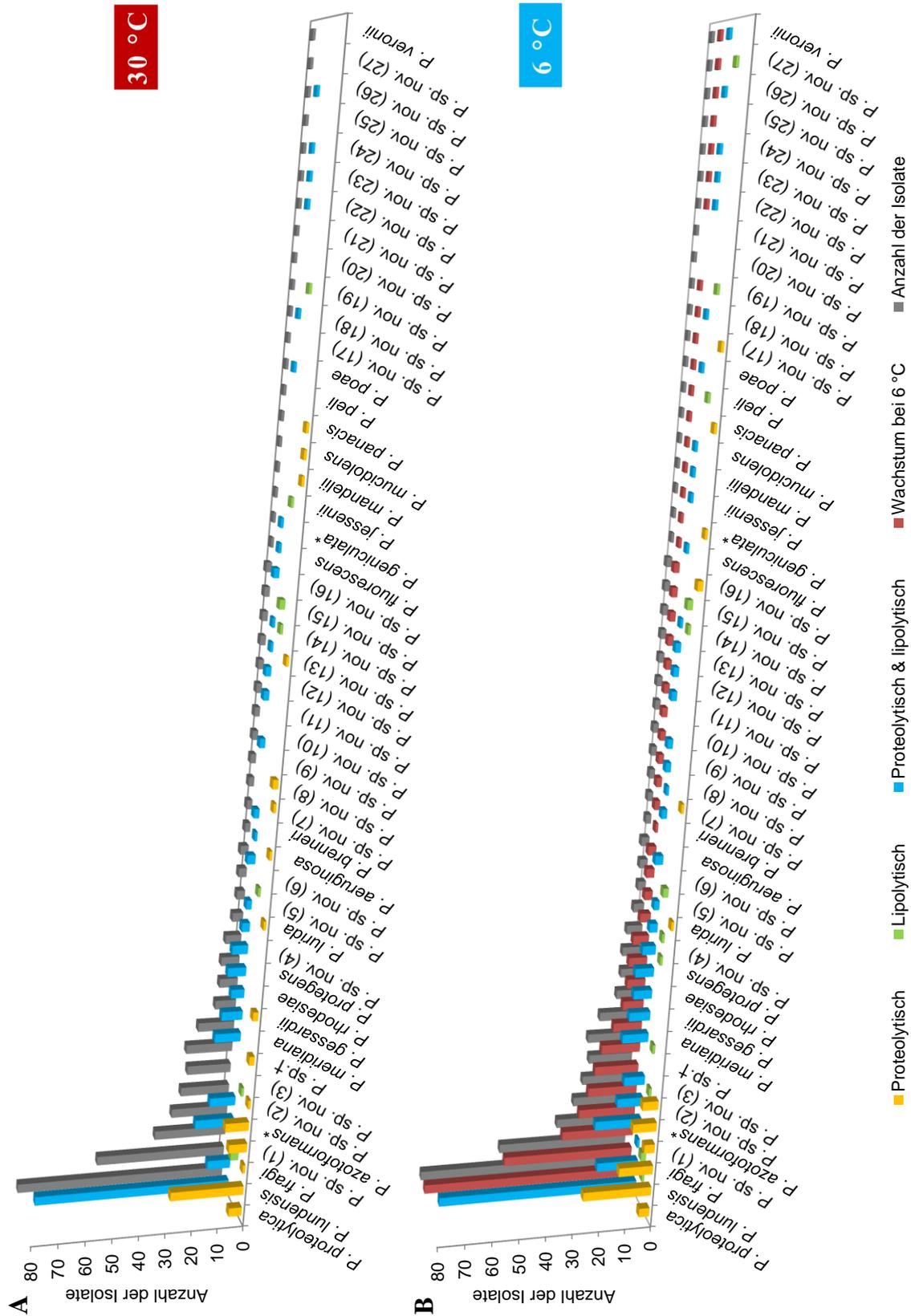


Abbildung 6-6: Proteolytische und lipolytische Aktivität der *Pseudomonas*-Arten aus Rohmilchen und Milchhalbfabrikaten. Aktivität bei 30 °C (A), Aktivität bei 6 °C (B). *P.* = *Pseudomonas*. * Alle Isolate dieser *Pseudomonas*-Art konnten nur mittels des 16S-rRNA-Gens identifiziert werden und sind eventuell verschiedenen Arten zuzuordnen; † Alle diese Isolate konnten nur mittels FTIR-Spektroskopie identifiziert werden und wurden keiner Art eindeutig zugeordnet.

LITERATURVERZEICHNIS

- Achouak, W., Sutra, L., Heulin, T., Meyer, J. M., Fromin, N., Degraeve, S., Christen, R. & Gardan, L. (2000).** *Pseudomonas brassicacearum* sp. nov. and *Pseudomonas thivervalensis* sp. nov., two root-associated bacteria isolated from *Brassica napus* and *Arabidopsis thaliana*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **50 Pt 1**, 9-18.
- Adav, S. S., Lee, D. J. & Lai, J. Y. (2009).** Proteolytic activity in stored aerobic granular sludge and structural integrity. *Bioresource Technology* **100**, 68-73.
- Adékambi, T., Drancourt, M. & Raoult, D. (2009).** The *rpoB* gene as a tool for clinical microbiologists. *Trends in Microbiology* **17**, 37-45.
- Adekambi, T., Shinnick, T. M., Raoult, D. & 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.
- Ahmed, E. H., Raghavendra, T. & Madamwar, D. (2010).** An alkaline lipase from organic solvent tolerant *Acinetobacter* sp. EH28: Application for ethyl caprylate synthesis. *Bioresource Technology* **101**, 3628-3634.
- Ahn, J. H., Pan, J. G. & Rhee, J. S. (1999).** Identification of the *tliDEF* ABC transporter specific for lipase in *Pseudomonas fluorescens* SIK W1. *Journal of Bacteriology* **181**, 1847-1852.
- Akatsuka, H., Kawai, E., Omori, K. & Shibatani, T. (1995).** The three genes *lipB*, *lipC*, and *lipD* involved in the extracellular secretion of the *Serratia marcescens* lipase which lacks an N-terminal signal peptide. *Journal of Bacteriology* **177**, 6381-6389.
- Alan, C. E. & Wayne, A. W. (2006).** *Statistical Analysis Quick Reference Guidebook: With SPSS Examples*: Sage Publications Pvt. Ltd.
- Albuquerque, T. A. & Zurek, L. (2014).** Temporal changes in the bacterial community of animal feces and their correlation with stable fly oviposition, larval development, and adult fitness. *Frontiers in Microbiology* **5**, 590.
- Allison, S. D., Lu, L., Kent, A. G. & Martiny, A. C. (2014).** Extracellular enzyme production and cheating in *Pseudomonas fluorescens* depend on diffusion rates. *Frontiers in Microbiology* **5**, 169.
- Altenburger, P., Kämpfer, P., Makristathis, A., Lubitz, W. & Busse, H. J. (1996).** Classification of bacteria isolated from a medieval wall painting. *Journal of Biotechnology* **47**, 39-52.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. & Lipman, D. J. (1990).** Basic Local Alignment Search Tool. *Journal of Molecular Biology* **215**, 403-410.
- Alves, A., Riesco, R., Correia, A. & Trujillo, M. E. (2015).** *Microbacterium proteolyticum* sp. nov. isolated from roots of *Halimione portulacoides*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **65**, 1794-1798.
- Amiali, N. M., Golding, G. R., Sedman, J., Simor, A. E. & Ismail, A. A. (2011).** Rapid identification of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by Fourier transform infrared spectroscopy. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* **70**, 157-166.
- Amoozgar, M. A., Shahinpei, A., Sepahy, A. A., Makhdoumi-Kakhki, A., Seyedmahdi, S. S., Schumann, P. & Ventosa, A. (2014).** *Pseudomonas salegens* sp. nov., a halophilic member of the genus *Pseudomonas* isolated from a wetland. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **64**, 3565-3570.
- Andersson, R. E., Hedlund, C. B. & Jonsson, U. (1979).** Thermal inactivation of a heat-resistant lipase produced by the psychotrophic bacterium *Pseudomonas fluorescens*. *Journal of Dairy Science* **62**, 361-367.
- Anzai, Y., Kudo, Y. & Oyaizu, H. (1997).** The phylogeny of the genera *Chryseomonas*, *Flavimonas*, and *Pseudomonas* supports synonymy of these three genera. *International Journal of Systematic Bacteriology* **47**, 249-251.
- Aoyama, S., Yoshida, N. & Inouye, S. (1988).** Cloning, sequencing and expression of the lipase gene from *Pseudomonas fragi* IFO-12049 in *E. coli*. *FEBS Letters* **242**, 36-40.

- Apte, M., Sambre, D., Gaikawad, S., Joshi, S., Bankar, A., Kumar, A. R. & Zinjarde, S. (2013).** Psychrotrophic yeast *Yarrowia lipolytica* NCYC 789 mediates the synthesis of antimicrobial silver nanoparticles via cell-associated melanin. *AMB Express* **3**, 32.
- Aravindan, R., Anbumathi, P. & Viruthagiri, T. (2007).** Lipase applications in food industry. *Indian Journal of Biotechnology* **6**, 141.
- Arnau, V. G., Sanchez, L. A. & Delgado, O. D. (2015).** *Pseudomonas yamanorum* sp. nov., a psychrotolerant bacterium isolated from a subantarctic environment. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **65**, 424-431.
- Arslan, S., Eyi, A. & Ozdemir, F. (2011).** Spoilage potentials and antimicrobial resistance of *Pseudomonas* spp. isolated from cheeses. *Journal of Dairy Science* **94**, 5851-5856.
- Ayora, S., Lindgren, P. E. & Gotz, F. (1994).** Biochemical properties of a novel metalloprotease from *Staphylococcus hyicus* subsp. *hyicus* involved in extracellular lipase processing. *Journal of Bacteriology* **176**, 3218-3223.
- Bachmann, H., Molenaar, D., Kleerebezem, M. & van Hylckama Vlieg, J. E. (2011).** High local substrate availability stabilizes a cooperative trait. *The ISME Journal* **5**, 929-932.
- Bachmann, H., Starrenburg, M. J., Molenaar, D., Kleerebezem, M. & van Hylckama Vlieg, J. E. (2012).** Microbial domestication signatures of *Lactococcus lactis* can be reproduced by experimental evolution. *Genome Research* **22**, 115-124.
- Baglinière, F., Matéos, A., Tanguy, G., Jardin, J., Briard-Bion, V., Rousseau, F., Robert, B., Beaucher, E., Gaillard, J. L. & other authors (2013).** Proteolysis of ultra high temperature-treated casein micelles by AprX enzyme from *Pseudomonas fluorescens* F induces their destabilisation. *International Dairy Journal* **31**, 55-61.
- Baker, G. C., Smith, J. J. & Cowan, D. A. (2003).** Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. *Journal of Microbiological Methods* **55**, 541-555.
- Balasubramanian, D., Schneper, L., Kumari, H. & Mathee, K. (2013).** A dynamic and intricate regulatory network determines *Pseudomonas aeruginosa* virulence. *Nucleic Acids Research* **41**, 1-20.
- Baldwin, A., Mahenthiralingam, E., Thickett, K. M., Honeybourne, D., Maiden, M. C., Govan, J. R., Speert, D. P., Lipuma, J. J., Vandamme, P. & other authors (2005).** Multilocus sequence typing scheme that provides both species and strain differentiation for the *Burkholderia cepacia* complex. *Journal of Clinical Microbiology* **43**, 4665-4673.
- Barach, J. T. & Adams, D. M. (1977).** Thermostability at ultrahigh temperatures of thermolysin and a protease from a psychrotrophic *Pseudomonas*. *Biochimica et Biophysica Acta* **485**, 417-423.
- Barach, J. T., Adams, D. M. & Speck, M. L. (1976).** Stabilization of a psychrotrophic *Pseudomonas* protease by calcium against thermal inactivation in milk at ultrahigh temperature. *Applied and Environmental Microbiology* **31**, 875-879.
- Baruzzi, F., Lagonigro, R., Quintieri, L., Morea, M. & Caputo, L. (2012).** Occurrence of non-lactic acid bacteria populations involved in protein hydrolysis of cold-stored high moisture Mozzarella cheese. *Food Microbiology* **30**, 37-44.
- Baur, C., Krewinkel, M., Kranz, B., von Neubeck, M., Wenning, M., Scherer, S., Stoeckel, M., Hinrichs, J., Stressler, T. & other authors (2015).** Quantification of the proteolytic and lipolytic activity of microorganisms isolated from raw milk. *International Dairy Journal* **49**, 23-29.
- Be'er, A., Smith, R. S., Zhang, H. P., Florin, E. L., Payne, S. M. & Swinney, H. L. (2009).** *Paenibacillus dendritiformis* bacterial colony growth depends on surfactant but not on bacterial motion. *Journal of Bacteriology* **191**, 5758-5764.
- Becker, K., Harmsen, D., Mellmann, A., Meier, C., Schumann, P., Peters, G. & von Eiff, C. (2004).** Development and evaluation of a quality-controlled ribosomal sequence database for 16S ribosomal DNA-based identification of *Staphylococcus* species. *Journal of Clinical Microbiology* **42**, 4988-4995.
- Behrendt, U., Schumann, P., Meyer, J. M. & Ulrich, A. (2009).** *Pseudomonas cedrina* subsp. *fulgida* subsp. nov., a fluorescent bacterium isolated from the phyllosphere of grasses; emended description of *Pseudomonas cedrina* and description of *Pseudomonas cedrina* subsp. *cedrina* subsp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **59**, 1331-1335.

- Behrendt, U., Ulrich, A. & Schumann, P. (2003).** Fluorescent pseudomonads associated with the phyllosphere of grasses; *Pseudomonas trivialis* sp. nov., *Pseudomonas poae* sp. nov. and *Pseudomonas congelans* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **53**, 1461-1469.
- Bennasar, A., Rossello-Mora, R., Lalucat, J. & Moore, E. R. (1996).** 16S rRNA gene sequence analysis relative to genomovars of *Pseudomonas stutzeri* and proposal of *Pseudomonas balearica* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* **46**, 200-205.
- Benson, D. A., Cavanaugh, M., Clark, K., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D. J., Ostell, J. & Sayers, E. W. (2013).** GenBank. *Nucleic Acids Research* **41**, D36-42.
- Berg, R. W. & Sandine, W. E. (1970).** Activation of bacterial spores. A review. *Journal of Milk and Food Technology* **33**, 435-441.
- Bertani, G. (1951).** Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **62**, 293-300.
- Bleves, S., Viarre, V., Salacha, R., Michel, G. P., Filloux, A. & Voulhoux, R. (2010).** Protein secretion systems in *Pseudomonas aeruginosa*: A wealth of pathogenic weapons. *International Journal of Medical Microbiology* **300**, 534-543.
- Bligh, E. G. & Dyer, W. J. (1959).** A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology* **37**, 911-917.
- Blumer, C., Heeb, S., Pessi, G. & Haas, D. (1999).** Global GacA-steered control of cyanide and exoprotease production in *Pseudomonas fluorescens* involves specific ribosome binding sites. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**, 14073-14078.
- Bochniarz, M. & Wawron, W. (2012).** Haemolytic and proteolytic activity of coagulase-negative staphylococci isolated from mastitis cows. *Polish Journal of Veterinary Sciences* **15**, 61-65.
- Borriss, R., Rueckert, C., Blom, J., Bezuidt, O., Reva, O. & Klenk, H. P. (2011).** Whole Genome Sequence Comparisons in Taxonomy. In *Methods in Microbiology*, pp. 409-436. Edited by R. Fred and O. Aharon: Academic Press.
- Børsting, M. W., Qvist, K. B., Brockmann, E., Vindeløv, J., Pedersen, T. L., Vogensen, F. K. & Ardö, Y. (2015).** Classification of *Lactococcus lactis* cell envelope proteinase based on gene sequencing, peptides formed after hydrolysis of milk, and computer modeling. *Journal of Dairy Science* **98**, 68-77.
- Bosch, A., Minan, A., Vescina, C., Degrossi, J., Gatti, B., Montanaro, P., Messina, M., Franco, M., Vay, C. & other authors (2008).** Fourier transform infrared spectroscopy for rapid identification of nonfermenting gram-negative bacteria isolated from sputum samples from cystic fibrosis patients. *Journal of Clinical Microbiology* **46**, 2535-2546.
- Bounphanmy, S., Thammathaworn, S., Thanee, N., Pirapathrungsuriya, K., Beardall, J., McNaughton, D. & Heraud, P. (2010).** Discrimination of cyanobacterial strains isolated from saline soils in Nakhon Ratchasima, Thailand using attenuated total reflectance FTIR spectroscopy. *Journal of Biophotonics* **3**, 534-541.
- Bouvet, P. J. M. & Grimont, P. A. D. (1986).** Taxonomy of the genus *Acinetobacter* with the recognition of *Acinetobacter baumannii* sp. nov., *Acinetobacter haemolyticus* sp. nov., *Acinetobacter johnsonii* sp. nov., and *Acinetobacter junii* sp. nov. and emended descriptions of *Acinetobacter calcoaceticus* and *Acinetobacter lwoffii*. *International Journal of Systematic Bacteriology* **36**, 228-240.
- Brencic, A. & Lory, S. (2009).** Determination of the regulon and identification of novel mRNA targets of *Pseudomonas aeruginosa* RsmA. *Molecular Microbiology* **72**, 612-632.
- Brencic, A., McFarland, K. A., McManus, H. R., Castang, S., Mogno, I., Dove, S. L. & Lory, S. (2009).** The GacS/GacA signal transduction system of *Pseudomonas aeruginosa* acts exclusively through its control over the transcription of the RsmY and RsmZ regulatory small RNAs. *Molecular Microbiology* **73**, 434-445.
- Brenner, D. J., Staley, J. T. & Krieg, N. R. (2005).** Classification of Prokaryotic Organisms and the Concept of Bacterial Speciation. In *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology: Volume Two: The Proteobacteria, Part A Introductory Essays*, pp. 27-32. Edited by D. J. Brenner, N. R. Krieg, J. T. Staley and G. M. Garrity. Boston, MA: Springer US.

- Buchl, N. R., Wenning, M., Seiler, H., Mietke-Hofmann, H. & Scherer, S. (2008).** Reliable identification of closely related *Issatchenkia* and *Pichia* species using artificial neural network analysis of Fourier-transform infrared spectra. *Yeast* **25**, 787-798.
- Buermans, H. P. J. & den Dunnen, J. T. (2014).** Next generation sequencing technology: Advances and applications. *Biochimica et Biophysica Acta* **1842**, 1932-1941.
- Burger, M., Woods, R. G., McCarthy, C. & Beacham, I. R. (2000).** Temperature regulation of protease in *Pseudomonas fluorescens* LS107d2 by an ECF sigma factor and a transmembrane activator. *Microbiology* **146 Pt 12**, 3149-3155.
- Burini, J. F., Gugi, B., Merieau, A. & Guespin-Michel, J. F. (1994).** Lipase and acidic phosphatase from the psychrotrophic bacterium *Pseudomonas fluorescens*: Two enzymes whose synthesis is regulated by the growth temperature. *FEMS Microbiology Letters* **122**, 13-18.
- Caldera, L., Franzetti, L., Van Coillie, E., De Vos, P., Stragier, P., De Block, J. & Heyndrickx, M. (2016).** Identification, enzymatic spoilage characterization and proteolytic activity quantification of *Pseudomonas* spp. isolated from different foods. *Food Microbiology* **54**, 142-153.
- Carrion, O., Minana-Galbis, D., Montes, M. J. & Mercade, E. (2011).** *Pseudomonas deceptionensis* sp. nov., a psychrotolerant bacterium from the Antarctic. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **61**, 2401-2405.
- Casaburi, A., Di Monaco, R., Cavella, S., Toldrá, F., Ercolini, D. & Villani, F. (2008).** Proteolytic and lipolytic starter cultures and their effect on traditional fermented sausages ripening and sensory traits. *Food Microbiology* **25**, 335-347.
- Celestino, E. L., Iyer, M. & Roginski, H. (1997).** Reconstituted UHT-treated milk: Effects of raw milk, powder quality and storage conditions of UHT milk on its physico-chemical attributes and flavour. *International Dairy Journal* **7**, 129-140.
- Cha, J. Y., Lee, D. G., Lee, J. S., Oh, J. I. & Baik, H. S. (2012).** GacA directly regulates expression of several virulence genes in *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* 11528. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **417**, 665-672.
- Chabeaud, P., de Groot, A., Bitter, W., Tommassen, J., Heulin, T. & Achouak, W. (2001).** Phase-variable expression of an operon encoding extracellular alkaline protease, a serine protease homolog, and lipase in *Pseudomonas brassicacearum*. *Journal of Bacteriology* **183**, 2117-2120.
- Chakravorty, S., Helb, D., Burday, M., Connell, N. & Alland, D. (2007).** A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria. *Journal of Microbiological Methods* **69**, 330-339.
- Champagne, C. P., Laing, R. R., Roy, D., Mafu, A. A. & Griffiths, M. W. (1994).** Psychrotrophs in dairy products: Their effects and their control. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **34**, 1-30.
- Chavan, R. S., Chavan, S. R., Khedkar, C. D. & Jana, A. H. (2011).** UHT Milk Processing and Effect of Plasmin Activity on Shelf Life: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* **10**, 251-268.
- Chaves-Lopez, C., De Angelis, M., Martuscelli, M., Serio, A., Paparella, A., Suzzi, G. (2006).** Characterization of the *Enterobacteriaceae* isolated from an artisanal Italian ewe's cheese (Pecorino Abruzzese). *Journal of Applied Microbiology* **101**, 353-360.
- Chen, L., Daniel, R. M. & Coolbear, T. (2003).** Detection and impact of protease and lipase activities in milk and milk powders. *International Dairy Journal* **13**, 255-275.
- Chen, S. J., Cheng, C. Y. & Chen, T. L. (1998).** Production of an alkaline lipase by *Acinetobacter radioresistens*. *Journal of Fermentation and Bioengineering* **86**, 308-312.
- Christen, G. L. & Marshall, R. T. (1984).** Selected properties of lipase and protease of *Pseudomonas fluorescens* 27 produced in four media. *Journal of Dairy Science* **67**, 1680-1687.
- Christensson, C., Pillidge, C. J., Ward, L. J. & O'Toole, P. W. (2001).** Nucleotide sequence and characterization of the cell envelope proteinase plasmid in *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* HP. *Journal of Applied Microbiology* **91**, 334-343.
- Chun, J., Lee, J. H., Jung, Y., Kim, M., Kim, S., Kim, B. K. & Lim, Y. W. (2007).** EzTaxon: A web-based tool for the identification of prokaryotes based on 16S ribosomal RNA gene

- sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **57**, 2259-2261.
- Chun, J. & Rainey, F. A. (2014)**. Integrating genomics into the taxonomy and systematics of the Bacteria and Archaea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **64**, 316-324.
- Claeys, W. L., Cardoen, S., Daube, G., De Block, J., Dewettinck, K., Dierick, K., De Zutter, L., Huyghebaert, A., Imberechts, H. & other authors (2013)**. Raw or heated cow milk consumption: Review of risks and benefits. *Food Control* **31**, 251-262.
- Coggan, K. A. & Wolfgang, M. C. (2012)**. Global regulatory pathways and cross-talk control pseudomonas aeruginosa environmental lifestyle and virulence phenotype. *Current Issues in Molecular Biology* **14**, 47-70.
- Collins, Y. F., McSweeney, P. L. H. & Wilkinson, M. G. (2003)**. Lipolysis and free fatty acid catabolism in cheese: A review of current knowledge. *International Dairy Journal* **13**, 841-866.
- Colwell, R. R. (1970)**. Polyphasic taxonomy of the genus vibrio: Numerical taxonomy of *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, and related *Vibrio* species. *Journal of Bacteriology* **104**, 410-433.
- Coorevits, A., De Jonghe, V., Vandroemme, J., Reekmans, R., Heyrman, J., Messens, W., De Vos, P. & 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.
- Coton, E., Desmonts, M. H., Leroy, S., Coton, M., Jamet, Christieans, S., Donnio, P. Y., Lebert, I. & Talon, R. (2010)**. Biodiversity of coagulase-negative Staphylococci in French cheeses, dry fermented sausages, processing environments and clinical samples. *International Journal of Food Microbiology* **137**, 221-229.
- Cousin, M. A. (1982)**. Presence and activity of psychrotrophic microorganisms in milk and dairy products: A review. *Journal of Food Protection* **45**, 35.
- Coutinho, C. P., Sa-Correia, I. & Lopes, J. A. (2009)**. Use of Fourier transform infrared spectroscopy and chemometrics to discriminate clinical isolates of bacteria of the *Burkholderia cepacia* complex from different species and ribopatterns. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **394**, 2161-2171.
- Dabboussi, F., Hamze, M., Elomari, M., Verhille, S., Baida, N., Izard, D. & Leclerc, H. (1999a)**. *Pseudomonas libanensis* sp. nov., a new species isolated from Lebanese spring waters. *International Journal of Systematic Bacteriology* **49 Pt 3**, 1091-1101.
- Dabboussi, F., Hamze, M., Elomari, M., Verhille, S., Baida, N., Izard, D. & Leclerc, H. (1999b)**. Taxonomic study of bacteria isolated from Lebanese spring waters: Proposal for *Pseudomonas cedrella* sp. nov. and *P. orientalis* sp. nov. *Research in Microbiology* **150**, 303-316.
- Dasen, A., Berthier, F., Grappin, R., Williams, A. G. & Banks, J. (2003)**. Genotypic and phenotypic characterization of the dynamics of the lactic acid bacterial population of adjunct-containing Cheddar cheese manufactured from raw and microfiltered pasteurised milk. *Journal of Applied Microbiology* **94**, 595-607.
- Datta, N. & Deeth, H. C. (2003)**. Diagnosing the cause of proteolysis in UHT milk. *LWT - Food Science and Technology* **36**, 173-182.
- De Hoog, G. S. (2004)**. Ribosomal gene phylogeny and species delimitation in *Geotrichum* and its teleomorphs. *Studies in Mycology* **50**, 489-515.
- De Jonghe, V., Coorevits, A., De Block, J., Van Coillie, E., Grijspeerdt, K., Herman, L., De Vos, P. & Heyndrickx, M. (2010)**. Toxinogenic and spoilage potential of aerobic spore-formers isolated from raw milk. *International Journal of Food Microbiology* **136**, 318-325.
- De Jonghe, V., Coorevits, A., Van Hoorde, K., Messens, W., Van Landschoot, A., De Vos, P. & Heyndrickx, M. (2011)**. Influence of storage conditions on the growth of *Pseudomonas* species in refrigerated raw milk. *Applied and Environmental Microbiology* **77**, 460-470.
- Decimo, M., Morandi, S., Silvetti, T. & Brasca, M. (2014)**. Characterization of gram-negative psychrotrophic bacteria isolated from Italian bulk tank milk. *Journal of Food Science* **79**, M2081-2090.

- Deeth, H. C. & Fitz-Gerald, C. H. (2006).** Lipolytic Enzymes and Hydrolytic Rancidity. In *Advanced Dairy Chemistry Volume 2 Lipids*, pp. 481-556. Edited by P. F. Fox and P. L. H. McSweeney: Springer US.
- Deive, F. J., Costas, M. & Longo, M. A. (2003).** Production of a thermostable extracellular lipase by *Kluyveromyces marxianus*. *Biotechnology Letters* **25**, 1403-1406.
- Delavenne, E., Mounier, J., Asmani, K., Jany, J. L., Barbier, G. & Le Blay, G. (2011).** Fungal diversity in cow, goat and ewe milk. *International Journal of Food Microbiology* **151**, 247-251.
- Delavenne, E., Mounier, J., Deniel, F., Barbier, G. & Le Blay, G. (2012).** Biodiversity of antifungal lactic acid bacteria isolated from raw milk samples from cow, ewe and goat over one-year period. *International Journal of Food Microbiology* **155**, 185-190.
- Delbes, C., Ali-Mandjee, L. & Montel, M. C. (2007).** Monitoring bacterial communities in raw milk and cheese by culture-dependent and -independent 16S rRNA gene-based analyses. *Applied and Environmental Microbiology* **73**, 1882-1891.
- Deloger, M., El Karoui, M. & Petit, M. A. (2009).** A genomic distance based on MUM indicates discontinuity between most bacterial species and genera. *Journal of Bacteriology* **191**, 91-99.
- Delorme, C., Bartholini, C., Bolotine, A., Ehrlich, S. D. & Renault, P. (2010).** Emergence of a cell wall protease in the *Streptococcus thermophilus* population. *Applied and Environmental Microbiology* **76**, 451-460.
- Delorme, S., Lemanceau, P., Christen, R., Corberand, T., Meyer, J. M. & Gardan, L. (2002).** *Pseudomonas lini* sp. nov., a novel species from bulk and rhizospheric soils. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **52**, 513-523.
- Dogan, B. & Boor, K. J. (2003).** Genetic diversity and spoilage potentials among *Pseudomonas* spp. isolated from fluid milk products and dairy processing plants. *Applied and Environmental Microbiology* **69**, 130-138.
- Drancourt, M. & Raoult, D. (2002).** *rpoB* gene sequence-based identification of *Staphylococcus* species. *Journal of Clinical Microbiology* **40**, 1333-1338.
- Dubuis, C. & Haas, D. (2007).** Cross-species GacA-controlled induction of antibiosis in pseudomonads. *Applied and Environmental Microbiology* **73**, 650-654.
- Duong, F., Bonnet, E., Geli, V., Lazdunski, A., Murgier, M. & Filloux, A. (2001).** The AprX protein of *Pseudomonas aeruginosa*: a new substrate for the Apr type I secretion system. *Gene* **262**, 147-153.
- Duong, F., Lazdunski, A., Cami, B. & Murgier, M. (1992).** Sequence of a cluster of genes controlling synthesis and secretion of alkaline protease in *Pseudomonas aeruginosa*: Relationships to other secretory pathways. *Gene* **121**, 47-54.
- Duong, F., Soscia, C., Lazdunski, A. & Murgier, M. (1994).** The *Pseudomonas fluorescens* lipase has a C-terminal secretion signal and is secreted by a three-component bacterial ABC-exporter system. *Molecular Microbiology* **11**, 1117-1126.
- Duss, O., Michel, E., Diarra dit Konte, N., Schubert, M. & Allain, F. H. (2014).** Molecular basis for the wide range of affinity found in Csr/Rsm protein-RNA recognition. *Nucleic Acids Research* **42**, 5332-5346.
- Edgar, R. C. (2004).** MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research* **32**, 1792-1797.
- Elomari, M., Coroler, L., Hoste, B., Gillis, M., Iazard, D. & Leclerc, H. (1996).** DNA relatedness among *Pseudomonas* strains isolated from natural mineral waters and proposal of *Pseudomonas veronii* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* **46**, 1138-1144.
- Eneroth, Å., Christiansson, A., Brendehaug, J. & 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.
- Ercolini, D., Russo, F., Blaiotta, G., Pepe, O., Mauriello, G. & Villani, F. (2007).** Simultaneous detection of *Pseudomonas fragi*, *P. lundensis*, and *P. putida* from meat by use of a multiplex PCR assay targeting the *carA* gene. *Applied and Environmental Microbiology* **73**, 2354-2359.
- Ercolini, D., Russo, F., Ferrocino, I. & Villani, F. (2009).** Molecular identification of mesophilic and psychrotrophic bacteria from raw cow's milk. *Food Microbiology* **26**, 228-231.

- Euzeby, J. P. (1997).** List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature: A folder available on the Internet. *International Journal of Systematic Bacteriology* **47**, 590-592.
- Fadda, M. E., Viale, S., Deplano, M., Pisano, M. B. & Cosentino, S. (2010).** Characterization of yeast population and molecular fingerprinting of *Candida zeylanoides* isolated from goat's milk collected in Sardinia. *International Journal of Food Microbiology* **136**, 376-380.
- Farrell, A. M., Foster, T. J. & Holland, K. T. (1993).** Molecular analysis and expression of the lipase of *Staphylococcus epidermidis*. *Journal of General Microbiology* **139**, 267-277.
- Fernandez-Espla, M. D., Garault, P., Monnet, V. & Rul, F. (2000).** *Streptococcus thermophilus* cell wall-anchored proteinase: Release, purification, and biochemical and genetic characterization. *Applied and Environmental Microbiology* **66**, 4772-4778.
- Filloux, A., Murgier, M., Wretling, B. & Lazdunski, A. (1987).** Characterization of two *Pseudomonas aeruginosa* mutants with defective secretion of extracellular proteins and comparison with other mutants. *FEMS Microbiology Letters* **40**, 159-163.
- Fleet, G. H. (1990).** Yeasts in dairy products. *The Journal of Applied Bacteriology* **68**, 199-211.
- Flores, M. V., Cuellas, A. & Voget, C. E. (1999).** The proteolytic system of the yeast *Kluyveromyces lactis*. *Yeast* **15**, 1437-1448.
- Foukis, A., Stergiou, P. Y., Theodorou, L. G., Papagianni, M. & Papamichael, E. M. (2012).** Purification, kinetic characterization and properties of a novel thermo-tolerant extracellular protease from *Kluyveromyces marxianus* IFO 0288 with potential biotechnological interest. *Bioresource Technology* **123**, 214-220.
- Foulquie Moreno, M. R., Sarantinopoulos, P., Tsakalidou, E. & De Vuyst, L. (2006).** The role and application of enterococci in food and health. *International Journal of Food Microbiology* **106**, 1-24.
- Fournier, P. E. & Raoult, D. (2009).** Current knowledge on phylogeny and taxonomy of *Rickettsia* spp. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1166**, 1-11.
- Fox, G. E., Wisotzkey, J. D. & Jurtschuk, P., Jr. (1992).** How close is close: 16S rRNA sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity. *International Journal of Systematic Bacteriology* **42**, 166-170.
- Franciosi, E., Settanni, L., Cavazza, A. & Poznanski, E. (2009).** Biodiversity and technological potential of wild lactic acid bacteria from raw cows' milk. *International Dairy Journal* **19**, 3-11.
- Frangipani, E., Visaggio, D., Heeb, S., Kaever, V., Camara, M., Visca, P. & Imperi, F. (2013).** The Gac/Rsm and cyclic-di-GMP signalling networks coordinately regulate iron uptake in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environmental Microbiology*.
- Franzetti, L. & Scarpellini, M. (2007).** Characterisation of *Pseudomonas* spp. isolated from foods. *Annals of Microbiology* **57**, 39-47.
- Freney, J., Kloos, W. E., Hajek, V., Webster, J. A., Bes, M., Brun, Y. & Vernozy-Rozand, C. (1999).** Recommended minimal standards for description of new staphylococcal species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **49**, 489-502.
- Fricker, M., Skånseng, B., Rudi, K., Stessl, B. & 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**, Supplement 1, S24-S30.
- Fromm, H. I. & Boor, K. J. (2004).** Characterization of pasteurized fluid milk shelf-life attributes. *Journal of Food Science* **69**, M207-M214.
- Galia, W., Perrin, C., Genay, M. & Dary, A. (2009).** Variability and molecular typing of *Streptococcus thermophilus* strains displaying different proteolytic and acidifying properties. *International Dairy Journal* **19**, 89-95.
- Gardan, L., Bella, P., Meyer, J. M., Christen, R., Rott, P., Achouak, W. & Samson, R. (2002).** *Pseudomonas salomonii* sp. nov., pathogenic on garlic, and *Pseudomonas palleroniana* sp. nov., isolated from rice. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **52**, 2065-2074.
- Gargouri, A., Hamed, H. & Elfeki, A. (2013).** Analysis of raw milk quality at reception and during cold storage: Combined effects of somatic cell counts and psychrotrophic bacteria on lipolysis. *Journal of Food Science* **78**, M1405-1411.

- Gevers, D., Cohan, F. M., Lawrence, J. G., Spratt, B. G., Coenye, T., Feil, E. J., Stackebrandt, E., Van de Peer, Y., Vandamme, P. & other authors (2005). Opinion: Re-evaluating prokaryotic species. *Nature reviews Microbiology* **3**, 733-739.
- Ghosh, S. & Setlow, P. (2009). Isolation and characterization of superdormant spores of *Bacillus* species. *Journal of Bacteriology* **191**, 1787-1797.
- Ghyselinck, J., Coorevits, A., Van Landschoot, A., Samyn, E., Heylen, K. & De Vos, P. (2013). An *rpoD* gene sequence based evaluation of cultured *Pseudomonas* diversity on different growth media. *Microbiology* **159**, 2097-2108.
- Glück, C., Rentschler, E., Krewinkel, M., Merz, M., von Neubeck, M., Wenning, M., Scherer, S., Stoeckel, M., Hinrichs, J. & other authors (2016). Thermostability of peptidases secreted by microorganisms associated with raw milk. *International Dairy Journal* **56**, 186-197.
- Gomila, M., Pena, A., Mulet, M., Lalucat, J. & Garcia-Valdes, E. (2015). Phylogenomics and systematics in *Pseudomonas*. *Frontiers in Microbiology* **6**, 214.
- Goodman, A. L., Merighi, M., Hyodo, M., Ventre, I., Filloux, A. & Lory, S. (2009). Direct interaction between sensor kinase proteins mediates acute and chronic disease phenotypes in a bacterial pathogen. *Genes and Development* **23**, 249-259.
- Goris, J., Konstantinidis, K. T., Klappenbach, J. A., Coenye, T., Vandamme, P. & Tiedje, J. M. (2007). DNA-DNA hybridization values and their relationship to whole-genome sequence similarities. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **57**, 81-91.
- Graham, P. H., Sadowsky, M. J., Keyser, H. H., Barnet, Y. M., Bradley, R. S., Cooper, J. E., De Ley, D. J., Jarvis, B. D. W., Roslycky, E. B. & other authors (1991). Proposed minimal standards for the description of new genera and species of root- and stem-nodulating bacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **41**, 582-587.
- Griffiths, M. W. & Tellez, A. M. (2013). *Lactobacillus helveticus*: The proteolytic system. *Frontiers in Microbiology* **4**, 30.
- Gügi, B., Orange, N., Helliö, F., Burini, J. F., Guillou, C., Leriche, F. & Guespin-Michel, J. F. (1991). Effect of growth temperature on several exported enzyme activities in the psychrotrophic bacterium *Pseudomonas fluorescens*. *Journal of Bacteriology* **173**, 3814-3820.
- Gunduz, G. T. & Tuncel, G. (2006). Biofilm formation in an ice cream plant. *Antonie Van Leeuwenhoek* **89**, 329-336.
- Gupta, R., Kumari, A., Syal, P. & Singh, Y. (2015). Molecular and functional diversity of yeast and fungal lipases: Their role in biotechnology and cellular physiology. *Progress in Lipid Research* **57**, 40-54.
- Guzzo, J., Duong, F., Wandersman, C., Murgier, M. & Lazdunski, A. (1991a). The secretion genes of *Pseudomonas aeruginosa* alkaline protease are functionally related to those of *Erwinia chrysanthemi* proteases and *Escherichia coli* alpha-haemolysin. *Molecular Microbiology* **5**, 447-453.
- Guzzo, J., Murgier, M., Filloux, A. & Lazdunski, A. (1990). Cloning of the *Pseudomonas aeruginosa* alkaline protease gene and secretion of the protease into the medium by *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **172**, 942-948.
- Guzzo, J., Pages, J. M., Duong, F., Lazdunski, A. & Murgier, M. (1991b). *Pseudomonas aeruginosa* alkaline protease: Evidence for secretion genes and study of secretion mechanism. *Journal of Bacteriology* **173**, 5290-5297.
- Hall, B. G. (2013). Building phylogenetic trees from molecular data with MEGA. *Molecular Biology and Evolution* **30**, 1229-1235.
- Hall, L. M., Duguid, S., Wallace, I. S. & Murray, A. G. (2015). Estimating the prevalence of *Renibacterium salmoninarum*-infected salmonid production sites. *Journal of Fish Diseases* **38**, 231-235.
- Hameed, A., Shahina, M., Lin, S. Y., Liu, Y. C. & Young, C. C. (2014). *Pseudomonas hussainii* sp. nov., isolated from droppings of a seashore bird, and emended descriptions of *Pseudomonas pohangensis*, *Pseudomonas benzenivorans* and *Pseudomonas segetis*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **64**, 2330-2337.
- Hantsis-Zacharov, E. & Halpern, M. (2007). Culturable psychrotrophic bacterial communities in raw milk and their proteolytic and lipolytic traits. *Applied and Environmental Microbiology* **73**, 7162-7168.

- Heeb, S., Blumer, C. & Haas, D. (2002). Regulatory RNA as mediator in GacA/RsmA-dependent global control of exoproduct formation in *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Journal of Bacteriology* **184**, 1046-1056.
- Heeb, S. & Haas, D. (2001). Regulatory roles of the GacS/GacA two-component system in plant-associated and other gram-negative bacteria. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **14**, 1351-1363.
- Hellio, F. C., Orange, N. & Guespin-Michel, J. F. (1993). Growth temperature controls the production of a single extracellular protease by *Pseudomonas fluorescens* MF0, in the presence of various inducers. *Research in Microbiology* **144**, 617-625.
- Helm, D., Labischinski, H. & Naumann, D. (1991a). Elaboration of a procedure for identification of bacteria using Fourier-transform IR spectral libraries: A stepwise correlation approach. *Journal of Microbiological Methods* **14**, 127-142.
- Helm, D., Labischinski, H., Schallehn, G. & Naumann, D. (1991b). Classification and identification of bacteria by Fourier-transform infrared spectroscopy. *Journal of General Microbiology* **137**, 69-79.
- Henz, S. R., Huson, D. H., Auch, A. F., Nieselt-Struwe, K. & Schuster, S. C. (2005). Whole-genome prokaryotic phylogeny. *Bioinformatics* **21**, 2329-2335.
- Hořtacká, A. (2000). Lipase activity of *Acinetobacter baumannii* after treatment with meropenem. *Arzneimittelforschung* **50**, 1134-1137.
- Huertas-Rosales, Ó., Ramos-González, M. I. & Espinosa-Urgel, M. (2016). Self-Regulation and Interplay of Rsm Family Proteins Modulate the Lifestyle of *Pseudomonas putida*. *Applied and Environmental Microbiology* **82**, 5673-5686.
- Hugenholtz, J., Splint, R., Konings, W. N. & Veldkamp, H. (1987). Selection of protease-positive and protease-negative variants of *Streptococcus cremoris*. *Applied and Environmental Microbiology* **53**, 309-314.
- Hugh, R. & Leifson, E. (1953). The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various gram negative bacteria. *Journal of Bacteriology* **66**, 24-26.
- Hugh, R. & Leifson, E. (1964). The proposed neotype strains of *Pseudomonas aeruginosa* (Schroeter 1872) Migula 1900. *International Bulletin of Bacteriological Nomenclature and Taxonomy* **14**, 69-84.
- Humair, B., Gonzalez, N., Mossialos, D., Reimann, C. & Haas, D. (2009). Temperature-responsive sensing regulates biocontrol factor expression in *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *The ISME Journal* **3**, 955-965.
- Humair, B., Wackwitz, B. & Haas, D. (2010). GacA-controlled activation of promoters for small RNA genes in *Pseudomonas fluorescens*. *Applied and Environmental Microbiology* **76**, 1497-1506.
- Huptas, C., Scherer, S. & Wenning, M. (2016). Optimized Illumina PCR-free library preparation for bacterial whole genome sequencing and analysis of factors influencing de novo assembly. *BMC Research Notes* **9**, 269.
- Hwang, C. Y., Zhang, G. I., Kang, S. H., Kim, H. J. & Cho, B. C. (2009). *Pseudomonas pelagia* sp. nov., isolated from a culture of the Antarctic green alga *Pyramimonas gelidicola*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **59**, 3019-3024.
- Hyatt, D., Chen, G. L., Locascio, P. F., Land, M. L., Larimer, F. W. & Hauser, L. J. (2010). Prodigal: Prokaryotic gene recognition and translation initiation site identification. *BMC Bioinformatics* **11**, 119.
- Iacumin, L., Cocolin, L., Cantoni, C. & Comi, G. (2007). Preliminary analysis of the lipase gene (*gehM*) expression of *Staphylococcus xylosus* in vitro and during fermentation of naturally fermented sausages (in situ). *Journal of Food Protection* **70**, 2665-2669.
- Iacumin, L., Comi, G., Cantoni, C. & Cocolin, L. (2006). Molecular and technological characterization of *Staphylococcus xylosus* isolated from naturally fermented Italian sausages by RAPD, Rep-PCR and Sau-PCR analysis. *Meat Science* **74**, 281-288.
- Ivanova, E. P., Gorshkova, N. M., Sawabe, T., Hayashi, K., Kalinovskaya, N. I., Lysenko, A. M., Zhukova, N. V., Nicolau, D. V., Kuznetsova, T. A. & other authors (2002). *Pseudomonas*

- extremorientalis* sp. nov., isolated from a drinking water reservoir. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **52**, 2113-2120.
- Jaeger, K. E., Ransac, S., Dijkstra, B. W., Colson, C., van Heuvel, M. & Misset, O. (1994).** Bacterial lipases. *FEMS Microbiology Reviews* **15**, 29-63.
- Jagtap, S., Gore, S., Yavankar, S., Pardesi, K. & Chopade, B. (2010).** Optimization of medium for lipase production by *Acinetobacter haemolyticus* from healthy human skin. *Indian Journal of Experimental Biology* **48**, 936-941.
- Janda, J. M. & Abbott, S. L. (2007).** 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: Pluses, perils, and pitfalls. *Journal of Clinical Microbiology* **45**, 2761-2764.
- Jimenez, P. N., Koch, G., Thompson, J. A., Xavier, K. B., Cool, R. H. & Quax, W. J. (2012).** The multiple signaling systems regulating virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **76**, 46-65.
- Johnson, J. L. & Ordal, E. J. (1968).** Deoxyribonucleic acid homology in bacterial taxonomy: Effect of incubation temperature on reaction specificity. *Journal of Bacteriology* **95**, 893-900.
- Jones, B. V., Sun, F. & Marchesi, J. R. (2007).** Using skimmed milk agar to functionally screen a gut metagenomic library for proteases may lead to false positives. *Letters in Applied Microbiology* **45**, 418-420.
- Joseph, B., Shrivastava, N. & Ramteke, P. W. (2012).** Extracellular cold-active lipase of *Microbacterium luteolum* isolated from Gangotri glacier, western Himalaya: Isolation, partial purification and characterization. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology* **10**, 137-144.
- Juhas, M., Eberl, L. & Tummeler, B. (2005).** Quorum sensing: The power of cooperation in the world of *Pseudomonas*. *Environmental Microbiology* **7**, 459-471.
- Juillard, V., Laan, H., Kunji, E. R., Jeronimus-Stratingh, C. M., Bruins, A. P. & Konings, W. N. (1995).** The extracellular PI-type proteinase of *Lactococcus lactis* hydrolyzes beta-casein into more than one hundred different oligopeptides. *Journal of Bacteriology* **177**, 3472-3478.
- Kabisch, J., Honing, C., Bohnlein, C., Pichner, R., Gareis, M. & Wenning, M. (2013).** *Kazachstania psychrophila* sp. nov., a novel psychrophilic yeast isolated from vacuum-packed beef. *Antonie Van Leeuwenhoek* **104**, 925-931.
- Kämpfer, P. & Glaeser, S. P. (2012).** Prokaryotic taxonomy in the sequencing era - the polyphasic approach revisited. *Environmental Microbiology* **14**, 291-317.
- Kämpfer, P., Huber, B., Busse, H. J., Scholz, H. C., Tomaso, H., Hotzel, H. & Melzer, F. (2011).** *Ochrobactrum pecoris* sp. nov., isolated from farm animals. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **61**, 2278-2283.
- Kämpfer, P. & Kroppenstedt, R. M. (1996).** Numerical analysis of fatty acid patterns of coryneform bacteria and related taxa. *Canadian Journal of Microbiology* **42**, 989-1005.
- Kanayama, Y. & Sakai, Y. (2005).** Purification and properties of a new type of protease produced by *Microbacterium liquefaciens*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **69**, 916-921.
- Kang, Y. S., Jung, J., Jeon, C. O. & Park, W. (2011).** *Acinetobacter oleivorans* sp. nov. is capable of adhering to and growing on diesel-oil. *Journal of Microbiology* **49**, 29-34.
- Kasana, R. C. (2010).** Proteases from psychrotrophs: An overview. *Critical Reviews in Microbiology* **36**, 134-145.
- Katz, M., Medina, R., Gonzalez, S. & Oliver, G. (2002).** Esterolytic and lipolytic activities of lactic acid bacteria isolated from ewe's milk and cheese. *Journal of Food Protection* **65**, 1997-2001.
- Kawai, E., Akatsuka, H., Idei, A., Shibatani, T. & Omori, K. (1998).** *Serratia marcescens* S-layer protein is secreted extracellularly via an ATP-binding cassette exporter, the Lip system. *Molecular Microbiology* **27**, 941-952.
- Kawai, E., Idei, A., Kumura, H., Shimazaki, K., Akatsuka, H. & Omori, K. (1999).** The ABC-exporter genes involved in the lipase secretion are clustered with the genes for lipase, alkaline protease, and serine protease homologues in *Pseudomonas fluorescens* no. 33. *Biochimica et Biophysica Acta* **1446**, 377-382.
- Kay, E., Dubuis, C. & Haas, D. (2005).** Three small RNAs jointly ensure secondary metabolism and biocontrol in *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 17136-17141.

- Keynan, A., Evanchik, Z., Halvorson, H. O. & Hastings, J. W. (1964).** Activation of Bacterial Endospores. *Journal of Bacteriology* **88**, 313-318.
- KGaA, M. (2005).** *Merck Microbiology Manual 12th Edition*. 12 edn.
- Khoramnia, A., Ebrahimpour, A., Beh, B. K. & Lai, O. M. (2011).** Production of a solvent, detergent, and thermotolerant lipase by a newly isolated *Acinetobacter* sp. in submerged and solid-state fermentations. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* **2011**, 702179.
- Kim, D., Baik, K. S., Kim, M. S., Park, S. C., Kim, S. S., Rhee, M. S., Kwak, Y. S. & Seong, C. N. (2008a).** *Acinetobacter soli* sp. nov., isolated from forest soil. *Journal of Microbiology* **46**, 396-401.
- Kim, M., Oh, H. S., Park, S. C. & 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. & other authors (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.
- Kim, S. H., Park, I. H., Lee, S. C., Lee, Y. S., Zhou, Y., Kim, C. M., Ahn, S. C. & Choi, Y. L. (2008b).** Discovery of three novel lipase (*lipA1*, *lipA2*, and *lipA3*) and lipase-specific chaperone (*lipB*) genes present in *Acinetobacter* sp. DY129. *Applied Microbiology and Biotechnology* **77**, 1041-1051.
- King, E. O., Ward, M. K. & Raney, D. E. (1954).** Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine* **44**, 301-307.
- Kloos, W. E., Schleifer, K. H. & Smith, R. F. (1976).** Characterization of *Staphylococcus sciuri* sp.nov. and its subspecies. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **26**, 22-37.
- Kok, R. G., Nudel, C. B., Gonzalez, R. H., Nugteren-Roodzant, I. M. & Hellingwerf, K. J. (1996).** Physiological factors affecting production of extracellular lipase (LipA) in *Acinetobacter calcoaceticus* BD413: Fatty acid repression of *lipA* expression and degradation of LipA. *Journal of Bacteriology* **178**, 6025-6035.
- Kok, R. G., van Thor, J. J., Nugteren-Roodzant, I. M., Brouwer, M. B., Egmond, M. R., Nudel, C. B., Vosman, B. & Hellingwerf, K. J. (1995).** Characterization of the extracellular lipase, LipA, of *Acinetobacter calcoaceticus* BD413 and sequence analysis of the cloned structural gene. *Molecular Microbiology* **15**, 803-818.
- Koka, R. & Weimer, B. C. (2000).** Isolation and characterization of a protease from *Pseudomonas fluorescens* RO98. *The Journal of Applied Bacteriology* **89**, 280-288.
- Konstantinidis, K. T., Ramette, A. & Tiedje, J. M. (2006).** The bacterial species definition in the genomic era. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B, Biological Sciences* **361**, 1929-1940.
- Konstantinidis, K. T. & Tiedje, J. M. (2005a).** Genomic insights that advance the species definition for prokaryotes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 2567-2572.
- Konstantinidis, K. T. & Tiedje, J. M. (2005b).** Towards a genome-based taxonomy for prokaryotes. *Journal of Bacteriology* **187**, 6258-6264.
- Kontkanen, H., Tenkanen, M., Fagerström, R. & Reinikainen, T. (2004).** Characterisation of steryl esterase activities in commercial lipase preparations. *Journal of Biotechnology* **108**, 51-59.
- Kordel, M., Hofmann, B., Schomburg, D. & Schmid, R. D. (1991).** Extracellular lipase of *Pseudomonas* sp. strain ATCC 21808: Purification, characterization, crystallization, and preliminary X-ray diffraction data. *Journal of Bacteriology* **173**, 4836-4841.
- Kraft, A. A. & Ayres, J. C. (1966).** Competitive growth of microorganisms and fluorescence development on inoculated chicken. *Journal of Food Science* **31**, 111-117.
- Krawczyk, A. O., de Jong, A., Omony, J., Holsappel, S., Wells-Bennik, M. H., Kuipers, O. P. & Eijlander, R. T. (2017).** Spore heat activation requirements and germination responses correlate with sequences of germinant receptors and with the presence of a specific

- spoVA*(2mob) operon in foodborne strains of *Bacillus subtilis*. *Applied and Environmental Microbiology* **83**.
- Krizova, L., Maixnerova, M., Sedo, O. & Nemeč, A. (2015a)**. *Acinetobacter albensis* sp. nov., isolated from natural soil and water ecosystems. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*.
- Krizova, L., McGinnis, J., Maixnerova, M., Nemeč, M., Poirel, L., Mingle, L., Sedo, O., Wolfgang, W. & Nemeč, A. (2015b)**. *Acinetobacter variabilis* sp. nov. (formerly DNA group 15 sensu Tjernberg & Ursing), isolated from humans and animals. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **65**, 857-863.
- Kuhm, A. E., Suter, D., Felleisen, R. & Rau, J. (2009)**. Identification of *Yersinia enterocolitica* at the species and subspecies levels by Fourier-transform infrared spectroscopy. *Applied and Environmental Microbiology* **75**, 5809-5813.
- Kümmerle, M., Scherer, S. & Seiler, H. (1998)**. Rapid and reliable identification of food-borne yeasts by Fourier-transform infrared spectroscopy. *Applied and Environmental Microbiology* **64**, 2207-2214.
- Kunji, E. R., Mierau, I., Hagting, A., Poolman, B. & Konings, W. N. (1996)**. The proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* **70**, 187-221.
- Kurtzman, C. P. & Robnett, C. J. (1998)**. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie Van Leeuwenhoek* **73**, 331-371.
- Kuykendall, L. D., Roy, M. A., O'Neill, J. J. & Devine, T. E. (1998)**. Fatty acids, antibiotic resistance, and deoxyribonucleic acid homology groups of *Bradorhizobium japonicum*. *International Journal of Systematic Bacteriology* **38**, 358-361.
- Lafarge, V., Ogier, J. C., Girard, V., Maladen, V., Leveau, J. Y., Gruss, A. & Delacroix-Buchet, A. (2004)**. Raw cow milk bacterial population shifts attributable to refrigeration. *Applied and Environmental Microbiology* **70**, 5644-5650.
- Lalaouna, D., Fochesato, S., Sanchez, L., Schmitt-Kopplin, P., Haas, D., Heulin, T. & Achouak, W. (2012)**. Phenotypic switching in *Pseudomonas brassicacearum* involves GacS- and GacA-dependent Rsm small RNAs. *Applied and Environmental Microbiology* **78**, 1658-1665.
- Landeta, G., Curiel, J. A., Carrascosa, A. V., Munoz, R. & de las Rivas, B. (2013)**. Characterization of coagulase-negative staphylococci isolated from Spanish dry cured meat products. *Meat Science* **93**, 387-396.
- Lapage, S. P., Sneath, P. H. A., Lessel, E. F., Skerman, V. B. D., Seeliger, H. P. R., Clark, W. A. & editors. (1992)**. *International Code of Nomenclature of Bacteria: Bacteriological Code, 1990 Revision*. Washington DC: ASM Press.
- Lapouge, K., Perozzo, R., Iwaszkiewicz, J., Bertelli, C., Zoete, V., Michielin, O., Scapozza, L. & Haas, D. (2013)**. RNA pentaloop structures as effective targets of regulators belonging to the RsmA/CsrA protein family. *RNA Biology* **10**.
- Lapouge, K., Schubert, M., Allain, F. H. & Haas, D. (2008)**. Gac/Rsm signal transduction pathway of gamma-proteobacteria: From RNA recognition to regulation of social behaviour. *Molecular Microbiology* **67**, 241-253.
- Lapouge, K., Sineva, E., Lindell, M., Starke, K., Baker, C. S., Babitzke, P. & Haas, D. (2007)**. Mechanism of *hcnA* mRNA recognition in the Gac/Rsm signal transduction pathway of *Pseudomonas fluorescens*. *Molecular Microbiology* **66**, 341-356.
- Le Loir, Y., Baron, F. & Gautier, M. (2003)**. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. *Genetics and Molecular Research* **2**, 63-76.
- Lechner, S., Mayr, R., Francis, K. P., Pruss, B. M., Kaplan, T., Wiessner-Gunkel, E., Stewart, G. S. & Scherer, S. (1998)**. *Bacillus weihenstephanensis* sp. nov. is a new psychrotolerant species of the *Bacillus cereus* group. *International Journal of Systematic Bacteriology* **48 Pt 4**, 1373-1382.
- Ledenbach, L. H. & Marshall, R. T. (2010)**. Microbiological spoilage of dairy products. In *Compendium of the Microbiological Spoilage of Foods and Beverages*, pp. 41-67. Edited by W. H. Sperber and M. P. Doyle: Springer New York.
- Lee, H. J. & Lee, S. S. (2010)**. *Acinetobacter kyonggiensis* sp. nov., a beta-glucosidase-producing bacterium, isolated from sewage treatment plant. *Journal of Microbiology* **48**, 754-759.

- Li, S. C., Wu, J. Y., Chen, C. Y. & Chen, T. L. (2000).** Semicontinuous production of lipase by *Acinetobacter radioresistens* in presence of nonwoven fabric. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **87**, 73-80.
- Liao, C. H. & McCallus, D. E. (1998).** Biochemical and genetic characterization of an extracellular protease from *Pseudomonas fluorescens* CY091. *Applied and Environmental Microbiology* **64**, 914-921.
- Linhartova, I., Bumba, L., Masin, J., Basler, M., Osicka, R., Kamanova, J., Prochazkova, K., Adkins, I., Hejnova-Holubova, J. & other authors (2010).** RTX proteins: A highly diverse family secreted by a common mechanism. *FEMS Microbiology Reviews* **34**, 1076-1112.
- Liu, M., Bayjanov, J. R., Renckens, B., Nauta, A. & Siezen, R. J. (2010).** The proteolytic system of lactic acid bacteria revisited: A genomic comparison. *BMC Genomics* **11**, 36.
- Logan, N. A., Berge, O., Bishop, A. H., Busse, H.-J., De Vos, P., Fritze, D., Heyndrickx, M., Kämpfer, P., Rabinovitch, L. & other authors (2009).** Proposed minimal standards for describing new taxa of aerobic, endospore-forming bacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **59**, 2114-2121.
- Loper, J. E., Hassan, K. A., Mavrodi, D. V., Davis, E. W., 2nd, Lim, C. K., Shaffer, B. T., Elbourne, L. D., Stockwell, V. O., Hartney, S. L. & other authors (2012).** Comparative genomics of plant-associated *Pseudomonas* spp.: Insights into diversity and inheritance of traits involved in multitrophic interactions. *PLoS Genetics* **8**, e1002784.
- Lopes, M. d. F. S., Leitao, A. L., Marques, J. J., Carrondo, M. J. & Crespo, M. T. (1999).** Processing of extracellular lipase of *Lactobacillus plantarum*: Involvement of a metalloprotease. *FEMS Microbiology Letters* **176**, 483-487.
- Lopez, J. R., Dieguez, A. L., Doce, A., De la Roca, E., De la Herran, R., Navas, J. I., Toranzo, A. E. & Romalde, J. L. (2012).** *Pseudomonas baetica* sp. nov., a fish pathogen isolated from wedge sole, *Dicologlossa cuneata* (Moreau). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **62**, 874-882.
- Lu, J., Wu, X., Jiang, Y., Cai, X., Huang, L., Yang, Y., Wang, H., Zeng, A. & Li, A. (2014).** An extremophile *Microbacterium* strain and its protease production under alkaline conditions. *Journal of Basic Microbiology* **54**, 378-385.
- Ludwig, W., Strunk, O., Klugbauer, S., Klugbauer, N., Weizenegger, M., Neumaier, J., Bachleitner, M. & Schleifer, K. H. (1998).** Bacterial phylogeny based on comparative sequence analysis. *Electrophoresis* **19**, 554-568.
- Luu, S., Cruz-Mora, J., Setlow, B., Feeherry, F. E., Doona, C. J. & Setlow, P. (2015).** The effects of heat activation on *Bacillus* spore germination, with nutrients or under high pressure, with or without various germination proteins. *Applied and Environmental Microbiology* **81**, 2927-2938.
- Lynch, K. M., Lucid, A., Arendt, E. K., Sleator, R. D., Lucey, B. & Coffey, A. (2015).** Genomics of *Weissella cibaria* with an examination of its metabolic traits. *Microbiology* **161**, 914-930.
- Lysenko, O. (1961).** *Pseudomonas* - an attempt at a general classification. *Journal of General Microbiology* **25**, 379-408.
- Ma, Q., Zhai, Y., Schneider, J. C., Ramseier, T. M. & Saier Jr, M. H. (2003).** Protein secretion systems of *Pseudomonas aeruginosa* and *P. fluorescens*. *Biochimica et Biophysica Acta* **1611**, 223-233.
- Machado, S. G., Baglinière, F., Marchand, S., Van Coillie, E., Vanetti, M. C. D., De Block, J. & Heyndrickx, M. (2017).** The biodiversity of the microbiota producing heat-resistant enzymes responsible for spoilage in processed bovine milk and dairy products. *Frontiers in Microbiology* **8**.
- Maiden, M. C., Bygraves, J. A., Feil, E., Morelli, G., Russell, J. E., Urwin, R., Zhang, Q., Zhou, J., Zurth, K. & other authors (1998).** Multilocus sequence typing: A portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 3140-3145.
- Makhzoum, A., Owusu-Apenten, R. K. & Knapp, J. S. (1996).** Purification and properties of lipase from *Pseudomonas fluorescens* strain 2D. *International Dairy Journal* **6**, 459-472.

- Mallet, A., Guéguen, M., Kauffmann, F., Chesneau, C., Sesboué, A. & Desmaures, N. (2012). Quantitative and qualitative microbial analysis of raw milk reveals substantial diversity influenced by herd management practices. *International Dairy Journal* **27**, 13-21.
- Manaia, C. M. & Moore, E. R. (2002). *Pseudomonas thermotolerans* sp. nov., a thermotolerant species of the genus *Pseudomonas sensu stricto*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **52**, 2203-2209.
- Mann, H. B. & Whitney, D. R. (1947). On a test of whether one of two random variables is stochastically larger than the other. *The Annals of Mathematical Statistics* **18**, 50-60.
- Marchand, S., De Block, J., De Jonghe, V., Coorevits, A., Heyndrickx, M. & Herman, L. (2012). Biofilm formation in milk production and processing environments; influence on milk quality and safety. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* **11**, 133-147.
- Marchand, S., Heylen, K., Messens, W., Coudijzer, K., De Vos, P., Dewettinck, K., Herman, L., De Block, J. & Heyndrickx, M. (2009a). Seasonal influence on heat-resistant proteolytic capacity of *Pseudomonas lundensis* and *Pseudomonas fragi*, predominant milk spoilers isolated from Belgian raw milk samples. *Environmental Microbiology* **11**, 467-482.
- Marchand, S., Vandriesche, G., Coorevits, A., Coudijzer, K., De Jonghe, V., Dewettinck, K., De Vos, P., Devreese, B., Heyndrickx, M. & other authors (2009b). Heterogeneity of heat-resistant proteases from milk *Pseudomonas* species. *International Journal of Food Microbiology* **133**, 68-77.
- Margesin, R. & Schinner, F. (1992). Production and properties of an extracellular metalloprotease from a psychrophilic *Pseudomonas fluorescens*. *Journal of Biotechnology* **24**, 207-210.
- Martins, M. L., Pinto, C. L., Rocha, R. B., de Araujo, E. F. & Vanetti, M. C. (2006). Genetic diversity of gram-negative, proteolytic, psychrotrophic bacteria isolated from refrigerated raw milk. *International Journal of Food Microbiology* **111**, 144-148.
- Masoud, W., Vogensen, F. K., Lillevang, S., Abu Al-Soud, W., Sorensen, S. J. & 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. *International Journal of Food Microbiology* **153**, 192-202.
- Matamoros, S., Pilet, M. F., Gigout, F., Prevost, H. & Leroi, F. (2009). Selection and evaluation of seafood-borne psychrotrophic lactic acid bacteria as inhibitors of pathogenic and spoilage bacteria. *Food Microbiology* **26**, 638-644.
- Matéos, A., Guyard-Nicodème, M., Baglinière, F., Jardin, J., Gaucheron, F., Dary, A., Humbert, G. & Gaillard, J. L. (2015). Proteolysis of milk proteins by AprX, an extracellular protease identified in *Pseudomonas* LBSA1 isolated from bulk raw milk, and implications for the stability of UHT milk. *International Dairy Journal* **49**, 78-88.
- Matthews, A., Grimaldi, A., Walker, M., Bartowsky, E., Grbin, P. & Jiranek, V. (2004). Lactic acid bacteria as a potential source of enzymes for use in vinification. *Applied and Environmental Microbiology* **70**, 5715-5731.
- Matthijs, S., Coorevits, A., Gebrekidan, T. T., Tricot, C., Wauven, C. V., Pirnay, J. P., De Vos, P. & Cornelis, P. (2012). Evaluation of *oprI* and *oprL* genes as molecular markers for the genus *Pseudomonas* and their use in studying the biodiversity of a small Belgian river. *Research in Microbiology*.
- Maunsell, B., Adams, C. & O'Gara, F. (2006). Complex regulation of AprA metalloprotease in *Pseudomonas fluorescens* M114: Evidence for the involvement of iron, the ECF sigma factor, PbrA and pseudobactin M114 siderophore. *Microbiology* **152**, 29-42.
- Mauriello, G., Casaburi, A., Blaiotta, G. & Villani, F. (2004). Isolation and technological properties of coagulase negative staphylococci from fermented sausages of Southern Italy. *Meat Science* **67**, 149-158.
- Mayerhofer, H. J., Marshall, R. T., White, C. H. & Lu, M. (1973). Characterization of a heat-stable protease of *Pseudomonas fluorescens* P26. *Applied Microbiology* **25**, 44-48.
- McAuley, C. M., Gobius, K. S., Britz, M. L. & Craven, H. M. (2012). Heat resistance of thermotolerant enterococci isolated from milk. *International Journal of Food Microbiology* **154**, 162-168.

- McCarthy, C. N., Woods, R. G. & Beacham, I. R. (2004).** Regulation of the *aprX-lipA* operon of *Pseudomonas fluorescens* B52: Differential regulation of the proximal and distal genes, encoding protease and lipase, by *ompR-envZ*. *FEMS Microbiology Letters* **241**, 243-248.
- McKay, L. L. & Baldwin, K. A. (1975).** Plasmid distribution and evidence for a proteinase plasmid in *Streptococcus lactis* C2-1. *Applied Microbiology* **29**, 546-548.
- McKellar, R. C. (1982).** Factors influencing the production of extracellular proteinase by *Pseudomonas fluorescens*. *The Journal of Applied Bacteriology* **53**, 305-316.
- McKellar, R. C. & Cholette, H. (1984).** Synthesis of extracellular proteinase by *Pseudomonas fluorescens* under conditions of limiting carbon, nitrogen, and phosphate. *Applied and Environmental Microbiology* **47**, 1224-1227.
- McKellar, R. C. & Cholette, H. (1986).** Possible role of calcium in the formation of active extracellular proteinase by *Pseudomonas fluorescens*. *The Journal of Applied Bacteriology* **60**, 37-44.
- McKellar, R. C., Shamsuzzaman, K., San Jose, C. & Cholette, H. (1987).** Influence of iron(III) and pyoverdine on extracellular proteinase and lipase production by *Pseudomonas fluorescens* B52. *Archives of Microbiology* **147**, 225-230.
- Medina, R. B., Katz, M. B., Gonzalez, S. & Oliver, G. (2004).** Determination of esterolytic and lipolytic activities of lactic acid bacteria. *Methods in Molecular Biology* **268**, 465-470.
- Mellmann, A., Becker, K., von Eiff, C., Keckevoet, U., Schumann, P. & Harmsen, D. (2006).** Sequencing and staphylococci identification. *Emerging Infectious Diseases* **12**, 333-336.
- Menendez, E., Ramirez-Bahena, M. H., Fabryova, A., Igual, J. M., Benada, O., Mateos, P. F., Peix, A., Kolarik, M. & Garcia-Fraile, P. (2015).** *Pseudomonas coleopterorum* sp. nov., a cellulase-producing bacterium isolated from the bark beetle *Hylesinus fraxini*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **65**, 2852-2858.
- Metwalli, A. A. M., de Jongh, H. H. J. & van Boekel, M. A. J. S. (1998).** Heat inactivation of bovine plasmin. *International Dairy Journal* **8**, 47-56.
- Meyers, S. A., Cuppett, S. L. & Hutkins, R. W. (1996).** Lipase production by lactic acid bacteria and activity on butter oil. *Food Microbiology* **13**, 383-389.
- Michael, M., Phebus, R. K., Thippareddi, H., Subbiah, J., Birla, S. L. & Schmidt, K. A. (2014).** Validation of radio-frequency dielectric heating system for destruction of *Cronobacter sakazakii* and *Salmonella* species in nonfat dry milk. *Journal of Dairy Science* **97**, 7316-7324.
- Mignard, S. & Flandrois, J. P. (2006).** 16S rRNA sequencing in routine bacterial identification: A 30-month experiment. *Journal of Microbiological Methods* **67**, 574-581.
- Migula, W. (1897).** *System der Bakterien: Handbuch der Morphologie, Entwicklungsgeschichte und Systematik der Bakterien*. Jena, Germany: Verlag von Gustav Fischer.
- Migula, W. (1900).** *System der Bakterien: Handbuch der Morphologie, Entwicklungsgeschichte und Systematik der Bakterien*. Jena, Germany: Verlag von Gustav Fischer.
- Mikkelsen, H., Sivaneson, M. & Filloux, A. (2011).** Key two-component regulatory systems that control biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environmental Microbiology* **13**, 1666-1681.
- 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.
- Miyakawa, H., Kobayashi, S., Shimamura, S. & Tomita, M. (1992).** Purification and characterization of an aminopeptidase from *Lactobacillus helveticus* LHE-511. *Journal of Dairy Science* **75**, 27-35.
- Molin, G., Ternström, A. & Ursing, J. (1986).** Notes: *Pseudomonas lundensis*, a new bacterial species isolated from meat. *International Journal of Systematic Bacteriology* **36**, 339-342.
- Moll, S., Schneider, D. J., Stodghill, P., Myers, C. R., Cartinhour, S. W. & Filiatrault, M. J. (2010).** Construction of an *rsmX* co-variance model and identification of five *rsmX* non-coding RNAs in *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. *RNA Biology* **7**, 508-516.
- Mollet, C., Drancourt, M. & Raoult, D. (1997).** *rpoB* sequence analysis as a novel basis for bacterial identification. *Molecular Microbiology* **26**, 1005-1011.
- Moore, D. S., McCabe, G. P. & Craig, B. A. (2009).** *Introduction to the practice of statistics*. 6 edn. New York: W.H. Freeman.

- Moore, E. R. B., Mau, M., Arnscheidt, A., Böttger, E. C., Hutson, R. A., Collins, M. D., Van De Peer, Y., De Wachter, R. & Timmis, K. N. (1996). The determination and comparison of the 16S rRNA gene sequences of species of the genus *Pseudomonas* (*sensu stricto*) and estimation of the natural intrageneric relationships. *Systematic and Applied Microbiology* **19**, 478-492.
- Moore, E. R. B., Tindall, B. J., Martins Dos Santos, V. A. P., Pieper, D. H., Ramos, J. L. & Palleroni, N. J. (2006). Nonmedical: *Pseudomonas*. In *The Prokaryotes Third Edition A Handbook on the Biology of Bacteria: Volume 6: Proteobacteria: Gamma Subclass*, pp. 646-703. Edited by M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer and E. Stackebrandt: Springer New York.
- Morales, P., Fernandez-Garcia, E. & Nunez, M. (2003). Caseinolysis in cheese by Enterobacteriaceae strains of dairy origin. *Letters in Applied Microbiology* **37**, 410-414.
- Morandi, S., Brasca, M., Andrighetto, C., Lombardi, A. & Lodi, R. (2006). Technological and molecular characterisation of enterococci isolated from North–West Italian dairy products. *International Dairy Journal* **16**, 867-875.
- Morel, G., Sterck, L., Swennen, D., Marcet-Houben, M., Onesime, D., Levasseur, A., Jacques, N., Mallet, S., Couloux, A. & other authors (2015). Differential gene retention as an evolutionary mechanism to generate biodiversity and adaptation in yeasts. *Scientific Reports* **5**, 11571.
- Morris, E. R., Hall, G., Li, C., Heeb, S., Kulkarni, R. V., Lovelock, L., Silistre, H., Messina, M., Camara, M. & other authors (2013). Structural rearrangement in an RsmA/CsrA ortholog of *Pseudomonas aeruginosa* creates a dimeric RNA-binding protein, RsmN. *Structure* **21**, 1659-1671.
- Morris, L. S., Evans, J. & Marchesi, J. R. (2012). A robust plate assay for detection of extracellular microbial protease activity in metagenomic screens and pure cultures. *Journal of Microbiological Methods* **91**, 144-146.
- Mulet, M., Bennasar, A., Lalucat, J. & Garcia-Valdes, E. (2009). An *rpoD*-based PCR procedure for the identification of *Pseudomonas* species and for their detection in environmental samples. *Molecular and Cellular Probes* **23**, 140-147.
- Mulet, M., David, Z., Nogales, B., Bosch, R., Lalucat, J. & Garcia-Valdes, E. (2011). *Pseudomonas* diversity in crude-oil-contaminated intertidal sand samples obtained after the Prestige oil spill. *Applied and Environmental Microbiology* **77**, 1076-1085.
- Mulet, M., Lalucat, J. & Garcia-Valdes, E. (2010). DNA sequence-based analysis of the *Pseudomonas* species. *Environmental Microbiology* **12**, 1513-1530.
- Munsch-Alatossava, P. & Alatossava, T. (2006). Phenotypic characterization of raw milk-associated psychrotrophic bacteria. *Microbiological Research* **161**, 334-346.
- Munsch, P., Alatossava, T., Marttinen, N., Meyer, J. M., Christen, R. & Gardan, L. (2002). *Pseudomonas costantinii* sp. nov., another causal agent of brown blotch disease, isolated from cultivated mushroom sporophores in Finland. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **52**, 1973-1983.
- Naumann, A. (2009). A novel procedure for strain classification of fungal mycelium by cluster and artificial neural network analysis of Fourier transform infrared (FTIR) spectra. *The Analyst* **134**, 1215-1223.
- Naumann, D., Helm, D. & Labischinski, H. (1991). Microbiological characterizations by FT-IR spectroscopy. *Nature* **351**, 81-82.
- Nemec, A., Musilek, M., Sedo, O., De Baere, T., Maixnerova, M., van der Reijden, T. J., Zdrahal, Z., Vanechoutte, M. & Dijkshoorn, L. (2010). *Acinetobacter bereziniae* sp. nov. and *Acinetobacter guillouiae* sp. nov., to accommodate *Acinetobacter* genomic species 10 and 11, respectively. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **60**, 896-903.
- Nemec, A., Radolfova-Krizova, L., Maixnerova, M., Vrestiakova, E., Jezek, P. & Sedo, O. (2016). Taxonomy of haemolytic and/or proteolytic strains of the genus *Acinetobacter* with the proposals of *Acinetobacter courvalinii* sp. nov. (genomic species 14 *sensu* Bouvet & Jeanjean), *Acinetobacter dispersus* sp. nov. (genomic species 17), *Acinetobacter modestus* sp. nov., *Acinetobacter proteolyticus* sp. nov. and *Acinetobacter vivianii* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*.

- Nicolaisen, M. H., Worm, J., Jorgensen, N. O., Middelboe, M. & Nybroe, O. (2012).** Proteinase production in *Pseudomonas fluorescens* ON2 is affected by carbon sources and allows surface-attached but not planktonic cells to utilize protein for growth in lake water. *FEMS Microbiology Ecology*.
- Nielsen, S. S. (2002).** Plasmin system and microbial proteases in milk: Characteristics, roles, and relationship. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50**, 6628-6634.
- Nieminen, T. T., Vihavainen, E., Paloranta, A., Lehto, J., Paulin, L., Auvinen, P., Solismaa, M. & Bjorkroth, K. J. (2011).** Characterization of psychrotrophic bacterial communities in modified atmosphere-packed meat with terminal restriction fragment length polymorphism. *International Journal of Food Microbiology* **144**, 360-366.
- Nishimori, E., Kita-Tsukamoto, K. & Wakabayashi, H. (2000).** *Pseudomonas plecoglossicida* sp. nov., the causative agent of bacterial haemorrhagic ascites of ayu, *Plecoglossus altivelis*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **50 Pt 1**, 83-89.
- Noreau, J. & Drapeau, G. R. (1979).** Isolation and properties of the protease from the wild-type and mutant strains of *Pseudomonas fragi*. *Journal of Bacteriology* **140**, 911-916.
- Nörnberg, M. F. B. L., Friedrich, R. S. C., Weiss, R. D. N., Tondo, E. C. & Brandelli, A. (2010).** Proteolytic activity among psychrotrophic bacteria isolated from refrigerated raw milk. *International Journal of Dairy Technology* **63**, 41-46.
- Nychas, G. J., Dourou, D., Skandamis, P., Koutsoumanis, K., Baranyi, J. & Sofos, J. (2009).** Effect of microbial cell-free meat extract on the growth of spoilage bacteria. *The Journal of Applied Bacteriology* **107**, 1819-1829.
- O'Donnell, K. (1993).** *Fusarium* and its near relatives. In *The fungal holomorph: Mitotic, meiotic and pleomorphic speciation in fungal systematics.*, pp. 225-233. Edited by D. R. Reynolds and J. W. Taylor. Wallingford, United Kingdom: CAB International.
- Oberreuter, H., Seiler, H. & 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.
- Ogrydziak, D. M. (1993).** Yeast extracellular proteases. *Critical Reviews in Biotechnology* **13**, 1-55.
- Oliszewski, R., Medina, R. B., Gonzalez, S. N. & Perez Chaia, A. B. (2007).** Esterase activities of indigenous lactic acid bacteria from Argentinean goats' milk and cheeses. *Food Chemistry* **101**, 1446-1450.
- Oterholm, A., Ordal, Z. J. & Witter, L. D. (1970).** Purification and properties of a glycerol ester hydrolase (lipase) from *Propionibacterium shermanii*. *Applied Microbiology* **20**, 16-22.
- Pandey, A., Benjamin, S., Soccol, C. R., Nigam, P., Krieger, N. & Soccol, V. T. (1999).** The realm of microbial lipases in biotechnology. *Biotechnology and Applied Biochemistry* **29**, 119-131.
- Park, I. H., Kim, S. H., Lee, Y. S., Lee, S. C., Zhou, Y., Kim, C. M., Ahn, S. C. & Choi, Y. L. (2009).** Gene cloning, purification, and characterization of a cold-adapted lipase produced by *Acinetobacter baumannii* BD5. *Journal of Microbiology and Biotechnology* **19**, 128-135.
- Parker, C. T., Tindall, B. J. & Garrity, G. M. (2015).** International Code of Nomenclature of Prokaryotes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*.
- Parte, A. C. (2014).** LPSN - list of prokaryotic names with standing in nomenclature. *Nucleic Acids Research* **42**, D613-616.
- Pascual, J., Garcia-Lopez, M., Bills, G. F. & Genilloud, O. (2015).** *Pseudomonas granadensis* sp. nov., a new bacterial species isolated from the Tejada, Almirajara and Alhama Natural Park, Granada, Spain. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **65**, 625-632.
- Pascual, J., Lucena, T., Ruvira, M. A., Giordano, A., Gambacorta, A., Garay, E., Arahal, D. R., Pujalte, M. J. & Macian, M. C. (2012).** *Pseudomonas litoralis* sp. nov., isolated from Mediterranean seawater. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **62**, 438-444.
- Patel, T. R., Jackman, D. M. & Bartlett, F. M. (1983).** Heat-stable protease from *Pseudomonas fluorescens* T16: Purification by affinity column chromatography and characterization. *Applied and Environmental Microbiology* **46**, 333-337.

- Pegoraro, N., Calado, R., Duarte, L. N., Manco, S. C., Fernandes, F. J., Polonia, A. R., Cleary, D. F. & Gomes, N. C. (2015).** Molecular analysis of skin bacterial assemblages from codfish and pollock after dry-salted fish production. *Journal of Food Protection* **78**, 983-989.
- Peix, A., Ramirez-Bahena, M. H. & Velazquez, E. (2009).** Historical evolution and current status of the taxonomy of genus *Pseudomonas*. *Infection, Genetics and Evolution* **9**, 1132-1147.
- Perez, T., Balcazar, J. L., Peix, A., Valverde, A., Velazquez, E., de Blas, I. & Ruiz-Zarzuela, I. (2011).** *Lactococcus lactis* subsp. *tructae* subsp. nov. isolated from the intestinal mucus of brown trout (*Salmo trutta*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **61**, 1894-1898.
- Pothakos, V., Samapundo, S. & Devlieghere, F. (2012).** Total mesophilic counts underestimate in many cases the contamination levels of psychrotrophic lactic acid bacteria (LAB) in chilled-stored food products at the end of their shelf-life. *Food Microbiology* **32**, 437-443.
- Pothakos, V., Taminiau, B., Huys, G., Nezer, C., Daube, G. & Devlieghere, F. (2014).** Psychrotrophic lactic acid bacteria associated with production batch recalls and sporadic cases of early spoilage in Belgium between 2010 and 2014. *International Journal of Food Microbiology* **191C**, 157-163.
- Powers, E. M. (1995).** Efficacy of the Ryu nonstaining KOH technique for rapidly determining gram reactions of food-borne and waterborne bacteria and yeasts. *Applied and Environmental Microbiology* **61**, 3756-3758.
- Purcell, M. K., McKibben, C. L., Pearman-Gillman, S., Elliott, D. G. & Winton, J. R. (2015).** Effects of temperature on *Renibacterium salmoninarum* infection and transmission potential in Chinook salmon, *Oncorhynchus tshawytscha* (Walbaum). *Journal of Fish Diseases*.
- Quigley, L., McCarthy, R., O'Sullivan, O., Beresford, T. P., Fitzgerald, G. F., Ross, R. P., Stanton, C. & Cotter, P. D. (2013a).** The microbial content of raw and pasteurized cow's milk as determined by molecular approaches. *Journal of Dairy Science* **96**, 4928-4937.
- Quigley, L., O'Sullivan, O., Beresford, T. P., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F. & Cotter, P. D. (2011).** Molecular approaches to analysing the microbial composition of raw milk and raw milk cheese. *International Journal of Food Microbiology* **150**, 81-94.
- Quigley, L., O'Sullivan, O., Beresford, T. P., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F. & Cotter, P. D. (2012).** High-throughput sequencing for detection of subpopulations of bacteria not previously associated with artisanal cheeses. *Applied and Environmental Microbiology* **78**, 5717-5723.
- Quigley, L., O'Sullivan, O., Stanton, C., Beresford, T. P., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F. & Cotter, P. D. (2013b).** The complex microbiota of raw milk. *FEMS Microbiology Reviews* **37**, 664-698.
- Raats, D., Offek, M., Minz, D. & Halpern, M. (2011).** Molecular analysis of bacterial communities in raw cow milk and the impact of refrigeration on its structure and dynamics. *Food Microbiology* **28**, 465-471.
- Rajic-Savic, N., Katic, V., Velebit, B. & Colovic, S. (2015).** Characteristics of enterotoxigenic coagulase positive staphylococci isolated from bovine milk in cases of subclinical mastitis. *Procedia Food Science* **5**, 250-253.
- Ramakrishnan, V., Balakrishnan, B., Rai, A. K., Narayan, B. & Halami, P. M. (2012).** Concomitant production of lipase, protease and enterocin by *Enterococcus faecium* NCIM5363 and *Enterococcus durans* NCIM5427 isolated from fish processing waste. *International Aquatic Research* **4**, 1-14.
- Ramirez-Bahena, M. H., Cuesta, M. J., Tejedor, C., Igual, J. M., Fernandez-Pascual, M. & Peix, A. (2015).** *Pseudomonas endophytica* sp. nov., isolated from stem tissue of *Solanum tuberosum* L. in Spain. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*.
- Ramos, E., Ramirez-Bahena, M. H., Valverde, A., Velazquez, E., Zuniga, D., Velezmoro, C. & Peix, A. (2013).** *Pseudomonas punonensis* sp. nov., isolated from straw. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **63**, 1834-1839.
- Rasolof, E. A., St-Gelais, D., LaPointe, G. & Roy, D. (2010).** Molecular analysis of bacterial population structure and dynamics during cold storage of untreated and treated milk. *International Journal of Food Microbiology* **138**, 108-118.
- Rebuffo, C. A., Schmitt, J., Wenning, M., von Stetten, F. & Scherer, S. (2006).** Reliable and rapid identification of *Listeria monocytogenes* and *Listeria* species by artificial neural network-

- based Fourier transform infrared spectroscopy. *Applied and Environmental Microbiology* **72**, 994-1000.
- Reimmann, C., Beyeler, M., Latifi, A., Winteler, H., Foglino, M., Lazdunski, A. & Haas, D. (1997).** The global activator GacA of *Pseudomonas aeruginosa* PAO positively controls the production of the autoinducer *N*-butyryl-homoserine lactone and the formation of the virulence factors pyocyanin, cyanide, and lipase. *Molecular Microbiology* **24**, 309-319.
- Reimmann, C., Valverde, C., Kay, E. & Haas, D. (2005).** Posttranscriptional repression of GacS/GacA-controlled genes by the RNA-binding protein RsmE acting together with RsmA in the biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Journal of Bacteriology* **187**, 276-285.
- Rice, P., Longden, I. & Bleasby, A. (2000).** EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite. *Trends in Genetics* **16**, 276-277.
- Richter, M. & Rossello-Mora, R. (2009).** Shifting the genomic gold standard for the prokaryotic species definition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 19126-19131.
- Romanenko, L. A., Tanaka, N. & Svetashev, V. I. (2013).** *Devosia submarina* sp. nov., isolated from deep-sea surface sediments. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **63**, 3079-3085.
- Roostita, R. & Fleet, G. H. (1996).** The occurrence and growth of yeasts in Camembert and blue-veined cheeses. *International Journal of Food Microbiology* **28**, 393-404.
- Rosselló-Mora, R. (2006).** DNA-DNA reassociation methods applied to microbial taxonomy and their critical evaluation. In *Molecular Identification, Systematics, and Population Structure of Prokaryotes*, pp. 23-50. Edited by E. Stackebrandt. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Rossello-Mora, R. & Amann, R. (2001).** The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiology Reviews* **25**, 39-67.
- Rowe, M. & Donaghy, J. (2011).** Microbiological aspects of dairy ingredients. In *Dairy Ingredients for Food Processing*, pp. 59-101: Wiley-Blackwell.
- Ryu, E. (1940).** A simple method of differentiation between gram-positive and gram-negative organisms without staining. *Kitasato Archives of Experimental Medicine* **17**, 58-63.
- Saint Denis, T., Humbert, G. & Gaillard, J. L. (2001).** Heat inactivation of native plasmin, plasminogen and plasminogen activators in bovine milk: A revisited study. *Lait* **81**, 715-729.
- Sanchez, D., Matthijs, S., Gomila, M., Tricot, C., Mulet, M., Garcia-Valdes, E. & Lalucat, J. (2014a).** *rpoD* gene pyrosequencing for the assessment of *Pseudomonas* diversity in a water sample from the Woluwe River. *Applied and Environmental Microbiology* **80**, 4738-4744.
- Sanchez, D., Mulet, M., Rodriguez, A. C., David, Z., Lalucat, J. & Garcia-Valdes, E. (2014b).** *Pseudomonas aestusnigri* sp. nov., isolated from crude oil-contaminated intertidal sand samples after the Prestige oil spill. *Systematic and Applied Microbiology* **37**, 89-94.
- Savijoki, K., Ingmer, H. & Varmanen, P. (2006).** Proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology* **71**, 394-406.
- Savitzky, A. & Golay, M. J. E. (1964).** Smoothing and differentiation of data by simplified least squares procedures. *Analytical Chemistry* **36**, 1627-1639.
- Sayers, E. W., Barrett, T., Benson, D. A., Bryant, S. H., Canese, K., Chetvernin, V., Church, D. M., DiCuccio, M., Edgar, R. & other authors (2009).** Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Research* **37**, D5-15.
- Schmidt, V. S., Kaufmann, V., Kulozik, U., Scherer, S. & Wenning, M. (2012a).** Microbial biodiversity, quality and shelf life of microfiltered and pasteurized extended shelf life (ESL) milk from Germany, Austria and Switzerland. *International Journal of Food Microbiology* **154**, 1-9.
- Schmidt, V. S., Wenning, M. & Scherer, S. (2012b).** *Sphingobacterium lactis* sp. nov. and *Sphingobacterium alimentarium* sp. nov., isolated from raw milk and a dairy environment. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **62**, 1506-1511.
- Schroeter, J. (1872).** Über einige durch Bakterien gebildete Pigmente. In *Beiträge zur Biologie der Pflanzen*, pp. 109-126. Edited by F.Cohn. Breslau: J. U. Kern's Verlag (Max Müller).

- Schubert, M., Lapouge, K., Duss, O., Oberstrass, F. C., Jelesarov, I., Haas, D. & Allain, F. H. (2007).** Molecular basis of messenger RNA recognition by the specific bacterial repressing clamp RsmA/CsrA. *Nature Structural and Molecular Biology* **14**, 807-813.
- Schumann, P., Kämpfer, P., Busse, H. J., Evtushenko, L. I. & Prokaryotes, f. t. s. o. t. o. t. s. M. o. t. I. C. o. S. o. (2009).** Proposed minimal standards for describing new genera and species of the suborder Micrococccineae. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **59**, 1823-1849.
- Scotta, C., Mulet, M., Sanchez, D., Gomila, M., Ramirez, A., Bennasar, A., Garcia-Valdes, E., Holmes, B. & Lalucat, J. (2012).** Identification and genomovar assignation of clinical strains of *Pseudomonas stutzeri*. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* **31**, 2133-2139.
- Selin, C., Fernando, W. G. & de Kievit, T. (2012).** The PhzI/PhzR quorum-sensing system is required for pyrrolnitrin and phenazine production, and exhibits cross-regulation with RpoS in *Pseudomonas chlororaphis* PA23. *Microbiology* **158**, 896-907.
- Seong, W. J., Kim, J. H. & Kwon, H. J. (2013).** Comparison of complete *rpoB* gene sequence typing and multi-locus sequence typing for phylogenetic analysis of *Staphylococcus aureus*. *The Journal of General and Applied Microbiology* **59**, 335-343.
- Serrano, W., Amann, R., Rossello-Mora, R. & Fischer, U. (2010).** Evaluation of the use of multilocus sequence analysis (MLSA) to resolve taxonomic conflicts within the genus *Marichromatium*. *Systematic and Applied Microbiology* **33**, 116-121.
- Shabtai, Y. & Gutnick, D. L. (1985).** Exocellular esterase and emulsan release from the cell surface of *Acinetobacter calcoaceticus*. *Journal of Bacteriology* **161**, 1176-1181.
- Shaked, T., Hantsis-Zacharov, E. & Halpern, M. (2010).** *Epilithonimonas lactis* sp. nov., isolated from raw cow's milk. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **60**, 675-679.
- Shamsuzzaman, K. & McKellar, R. C. (1987).** Peptidases from two strains of *Pseudomonas fluorescens*: Partial purification, properties and action on milk. *The Journal of Dairy Research* **54**, 283-293.
- Shankar, J., Walker, R. G., Ward, D. & Horsburgh, M. J. (2012).** The *Enterococcus faecalis* exoproteome: Identification and temporal regulation by Fsr. *PLoS One* **7**, e33450.
- Shapiro, S. S. & Wilk, M. B. (1965).** An analysis of variance test for normality (complete samples). *Biometrika* **52**, 591-611.
- Siddiqui, I. A., Haas, D. & Heeb, S. (2005).** Extracellular protease of *Pseudomonas fluorescens* CHA0, a biocontrol factor with activity against the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *Applied and Environmental Microbiology* **71**, 5646-5649.
- Skerman, V. B. D., McGowan, V. & Sneath, P. H. A. (1980).** Approved lists of bacterial names. *International Journal of Systematic Bacteriology* **30**, 225-420.
- Snellman, E. A. & Colwell, R. R. (2004).** *Acinetobacter* lipases: Molecular biology, biochemical properties and biotechnological potential. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* **31**, 391-400.
- Snellman, E. A. & Colwell, R. R. (2008).** Transesterification activity of a novel lipase from *Acinetobacter venetianus* RAG-1. *Antonie Van Leeuwenhoek* **94**, 621-625.
- Snellman, E. A., Sullivan, E. R. & Colwell, R. R. (2002).** Purification and properties of the extracellular lipase, LipA, of *Acinetobacter* sp. RAG-1. *European Journal of Biochemistry* **269**, 5771-5779.
- Sørensen, B. B. & Samuelsen, H. (1996).** The combined effects of environmental conditions on lipolysis of pork fat by lipases of the meat starter culture organisms *Staphylococcus xylosus* and *Debaryomyces hansenii*. *International Journal of Food Microbiology* **32**, 59-71.
- Sørhaug, T. & Stepaniak, L. (1997).** Psychrotrophs and their enzymes in milk and dairy products: Quality aspects. *Trends in Food Science and Technology* **8**, 35-41.
- Sproer, C., Mendrock, U., Swiderski, J., Lang, E. & Stackebrandt, E. (1999).** The phylogenetic position of *Serratia*, *Buttiauxella* and some other genera of the family Enterobacteriaceae. *International Journal of Systematic Bacteriology* **49 Pt 4**, 1433-1438.
- Stackebrandt, E. (2006).** Defining Taxonomic Ranks. In *The Prokaryotes Third Edition A Handbook on the Biology of Bacteria: Volume 1: Symbiotic associations, Biotechnology, Applied*

- Microbiology, pp. 29-57. Edited by M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer and E. Stackebrandt. New York, NY: Springer New York.
- Stackebrandt, E., Frederiksen, W., Garrity, G. M., Grimont, P. A., Kämpfer, P., Maiden, M. C., Nesme, X., Rossello-Mora, R., Swings, J. & other authors (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.
- Stanier, R. Y., Palleroni, N. J. & Doudoroff, M. (1966).** The aerobic pseudomonads: A taxonomic study. *Journal of General Microbiology* **43**, 159-271.
- Stepaniak, L. (2011).** Psychrotrophic Bacteria | Other Psychrotrophs. In *Encyclopedia of Dairy Sciences (Second Edition)*, pp. 384-389. Edited by J. W. Fuquay. San Diego: Academic Press.
- Stepanovic, S., Vukovic, D., Trajkovic, V., Samardzic, T., Cupic, M. & Svabic-Vlahovic, M. (2001).** Possible virulence factors of *Staphylococcus sciuri*. *FEMS Microbiology Letters* **199**, 47-53.
- Student (1908).** The probable error of a mean. *Biometrika* **6**, 1-25.
- Supre, K., De Vlieghe, S., Cleenwerck, I., Engelbeen, K., Van Trappen, S., Piepers, S., Sampimon, O. C., Zadoks, R. N., De Vos, P. & other authors (2010).** *Staphylococcus devriesei* sp. nov., isolated from teat apices and milk of dairy cows. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **60**, 2739-2744.
- Suzuki, T., Nakayama, T., Kurihara, T., Nishino, T. & Esaki, N. (2001).** Cold-active lipolytic activity of psychrotrophic *Acinetobacter* sp. strain no. 6. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **92**, 144-148.
- Takeuchi, K., Kiefer, P., Reimmann, C., Keel, C., Dubuis, C., Rolli, J., Vorholt, J. A. & Haas, D. (2009).** Small RNA-dependent expression of secondary metabolism is controlled by Krebs Cycle function in *Pseudomonas fluorescens*. *The Journal of Biological Chemistry* **284**, 34976-34985.
- Takeuchi, K., Tsuchiya, W., Noda, N., Suzuki, R., Yamazaki, T. & Haas, D. (2014).** Lon protease negatively affects GacA protein stability and expression of the Gac/Rsm signal transduction pathway in *Pseudomonas protegens*. *Environmental Microbiology*.
- Takeuchi, K., Yamada, K. & Haas, D. (2012).** ppGpp controlled by the Gac/Rsm regulatory pathway sustains biocontrol activity in *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **25**, 1440-1449.
- Tamime, A. Y. (2009).** *Milk processing and quality management*: John Wiley & Sons.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. & Kumar, S. (2011).** MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution* **28**, 2731-2739.
- Tao, Y., Zhou, Y., He, X., Hu, X. & Li, D. (2014).** *Pseudomonas chengduensis* sp. nov., isolated from landfill leachate. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **64**, 95-100.
- Taponen, S., Supré, K., Piessens, V., Van Coillie, E., De Vlieghe, S. & Koort, J. M. K. (2012).** *Staphylococcus agnetis* sp. nov., a coagulase-variable species from bovine subclinical and mild clinical mastitis. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **62**, 61-65.
- Tatusova, T., Ciufu, S., Fedorov, B., O'Neill, K. & Tolstoy, I. (2014).** RefSeq microbial genomes database: New representation and annotation strategy. *Nucleic Acids Research* **42**, D553-559.
- Teh, K. H., Flint, S., Palmer, J., Lindsay, D., Andrewes, P. & Bremer, P. (2011).** Thermo-resistant enzyme-producing bacteria isolated from the internal surfaces of raw milk tankers. *International Dairy Journal* **21**, 742-747.
- Ternström, A., Lindberg, A. M. & Molin, G. (1993).** Classification of the spoilage flora of raw and pasteurized bovine milk, with special reference to *Pseudomonas* and *Bacillus*. *The Journal of Applied Bacteriology* **75**, 25-34.
- Teuber, M. & Geis, A. (2006).** The Genus *Lactococcus*. In *The Prokaryotes Third Edition A Handbook on the Biology of Bacteria: Volume 4: Bacteria: Firmicutes, Cyanobacteria*, pp. 205-228. Edited by M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer and E. Stackebrandt: Springer US.

- Thompson, C. C., Chimetto, L., Edwards, R. A., Swings, J., Stackebrandt, E. & Thompson, F. L. (2013).** Microbial genomic taxonomy. *BMC Genomics* **14**, 1-8.
- Thys, R. C., Lucas, F. S., Riffel, A., Heeb, P. & Brandelli, A. (2004).** Characterization of a protease of a feather-degrading *Microbacterium* species. *Letters in Applied Microbiology* **39**, 181-186.
- Tindall, B. J. (1990a).** A comparative study of the lipid composition of *Halobacterium saccharovororum* from various sources. *Systematic and Applied Microbiology* **13**, 128-130.
- Tindall, B. J. (1990b).** Lipid composition of *Halobacterium lacusprofundi*. *FEMS Microbiology Letters* **66**, 199-202.
- Tindall, B. J., Brambilla, E., Steffen, M., Neumann, R., Pukall, R., Kroppenstedt, R. M. & Stackebrandt, E. (2000).** Cultivable microbial biodiversity: gnawing at the Gordian knot. *Environmental Microbiology* **2**, 310-318.
- Tindall, B. J., Rossello-Mora, R., Busse, H. J., Ludwig, W. & 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. M. & Krieg, N. R. (2007).** Phenotypic characterization and the principles of comparative systematics. In *Methods for General and Molecular Microbiology*, pp. 330-393. Edited by T. J. B. C. A. Reddy, J. A. Breznak, G. Marzluf, T. M. Schmidt & L. R. Snyder. Washington DC: American Society for Microbiology.
- Tomassen, J., Filloux, A., Bally, M., Murgier, M. & Lazdunski, A. (1992).** Protein secretion in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiology Letters* **103**, 73-90.
- Toro, M., Ramirez-Bahena, M. H., Cuesta, M. J., Velazquez, E. & Peix, A. (2013).** *Pseudomonas guariconensis* sp. nov., isolated from rhizospheric soil in Guarico state, Venezuela. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*.
- Touchon, M., Cury, J., Yoon, E. J., Krizova, L., Cerqueira, G. C., Murphy, C., Feldgarden, M., Wortman, J., Clermont, D. & other authors (2014).** The genomic diversification of the whole *Acinetobacter* genus: Origins, mechanisms, and consequences. *Genome Biology and Evolution* **6**, 2866-2882.
- Tripathi, R., Singh, J., Bharti, R. K. & Thakur, I. S. (2014).** Isolation, purification and characterization of lipase from *Microbacterium* sp. and its application in biodiesel production. *Energy Procedia* **54**, 518-529.
- Trüper, H. G. & Schleifer, K. H. (2006).** Prokaryote Characterization and Identification. In *The Prokaryotes Third Edition A Handbook on the Biology of Bacteria: Volume 1: Symbiotic associations, Biotechnology, Applied Microbiology*, pp. 58-79. Edited by M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer and E. Stackebrandt. New York, NY: Springer New York.
- Tryfinopoulou, P., Tsakalidou, E. & Nychas, G.-J. E. (2002).** Characterization of *Pseudomonas* spp. associated with spoilage of gilt-head sea bream stored under various conditions. *Applied and Environmental Microbiology* **68**, 65-72.
- Tsakalidou, E., Manolopoulou, E., Kabaraki, E., Zoidou, E., Pot, B., Kersters, K. & Kalantzopoulos, G. (1994).** The combined use of whole-cell protein extracts for the identification (SDS-PAGE) and enzyme activity screening of lactic acid bacteria isolated from traditional Greek dairy products. *Systematic and Applied Microbiology* **17**, 444-458.
- Uchino, M., Shida, O., Uchimura, T. & Komagata, K. (2001).** Recharacterization of *Pseudomonas fulva* Iizuka and Komagata 1963, and proposals of *Pseudomonas parafulva* sp. nov. and *Pseudomonas cremoricolorata* sp. nov. *The Journal of General and Applied Microbiology* **47**, 247-261.
- Ustariz, F., Laca, A., Garcia, L. A. & Diaz, M. (2007).** Mixed cultures of *Serratia marcescens* and *Kluyveromyces fragilis* for simultaneous protease production and COD removal of whey. *The Journal of Applied Bacteriology* **103**, 864-870.
- Uttatree, S., Winayanuwattikun, P. & Charoenpanich, J. (2010).** Isolation and characterization of a novel thermophilic-organic solvent stable lipase from *Acinetobacter baylyi*. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **162**, 1362-1376.
- Vacheyrou, M., Normand, A. C., Guyot, P., Cassagne, C., Piarroux, R. & Bouton, Y. (2011).** Cultivable microbial communities in raw cow milk and potential transfers from stables of sixteen French farms. *International Journal of Food Microbiology* **146**, 253-262.

- Vakhlu, J. & Kour, A. (2006). Yeast lipases: Enzyme purification, biochemical properties and gene cloning. *Electronic Journal of Biotechnology* **9**.
- Vallet-Gely, I., Novikov, A., Augusto, L., Liehl, P., Bolbach, G., Pechy-Tarr, M., Cosson, P., Keel, C., Caroff, M. & other authors (2010). Association of hemolytic activity of *Pseudomonas entomophila*, a versatile soil bacterium, with cyclic lipopeptide production. *Applied and Environmental Microbiology* **76**, 910-921.
- Valverde, C., Heeb, S., Keel, C. & Haas, D. (2003). RsmY, a small regulatory RNA, is required in concert with RsmZ for GacA-dependent expression of biocontrol traits in *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Molecular Microbiology* **50**, 1361-1379.
- Van de Peer, Y., Chapelle, S. & De Wachter, R. (1996). A quantitative map of nucleotide substitution rates in bacterial rRNA. *Nucleic Acids Research* **24**, 3381-3391.
- van den Broek, D., Chin-A-Woeng, T. F. C., Eijkemans, K., Mulders, I. H. M., Bloemberg, G. V. & Lugtenberg, B. J. J. (2003). Biocontrol traits of *Pseudomonas* spp. are regulated by phase variation. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **16**, 1003-1012.
- van den Broek, D., Chin, A. W. T. F., Bloemberg, G. V. & Lugtenberg, B. J. (2005). Molecular nature of spontaneous modifications in *gacS* which cause colony phase variation in *Pseudomonas* sp. strain PCL1171. *Journal of Bacteriology* **187**, 593-600.
- van Dijk, E. L., Auger, H., Jaszczyszyn, Y. & Thermes, C. (2014). Ten years of next-generation sequencing technology. *Trends in Genetics* **30**, 418-426.
- Van Tassell, J. A., Martin, N. H., Murphy, S. C., Wiedmann, M., Boor, K. J. & Ivy, R. A. (2012). Evaluation of various selective media for the detection of *Pseudomonas* species in pasteurized milk. *Journal of Dairy Science* **95**, 1568-1574.
- Vandamme, P., Pot, B., Gillis, M., de Vos, P., Kersters, K. & Swings, J. (1996). Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiological Reviews* **60**, 407-438.
- Vanparys, B., Heylen, K., Lebbe, L. & De Vos, P. (2006). *Pseudomonas peli* sp. nov. and *Pseudomonas borborensis* sp. nov., isolated from a nitrifying inoculum. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **56**, 1875-1881.
- Varghese, N. J., Mukherjee, S., Ivanova, N., Konstantinidis, K. T., Mavrommatis, K., Kyrpides, N. C. & Pati, A. (2015). Microbial species delineation using whole genome sequences. *Nucleic Acids Research*.
- Vaz-Moreira, I., Novo, A., Hantsis-Zacharov, E., Lopes, A. R., Gomila, M., Nunes, O. C., Manaia, C. M. & Halpern, M. (2011). *Acinetobacter rudis* sp. nov., isolated from raw milk and raw wastewater. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **61**, 2837-2843.
- Verdier-Metz, I., Gagne, G., Bornes, S., Monsallier, F., Veisseire, P., Delbes-Paus, C. & Montel, M. C. (2012). Cow teat skin, a potential source of diverse microbial populations for cheese production. *Applied and Environmental Microbiology* **78**, 326-333.
- Verdier-Metz, I., Michel, V., Delbes, C. & Montel, M. C. (2009). Do milking practices influence the bacterial diversity of raw milk? *Food Microbiology* **26**, 305-310.
- Verhille, S., Baida, N., Dabboussi, F., Hamze, M., Izard, D. & Leclerc, H. (1999a). *Pseudomonas gessardii* sp. nov. and *Pseudomonas migulae* sp. nov., two new species isolated from natural mineral waters. *International Journal of Systematic Bacteriology* **49 Pt 4**, 1559-1572.
- Verhille, S., Baida, N., Dabboussi, F., Izard, D. & Leclerc, H. (1999b). Taxonomic study of bacteria isolated from natural mineral waters: Proposal of *Pseudomonas jessenii* sp. nov. and *Pseudomonas mandelii* sp. nov. *Systematic and Applied Microbiology* **22**, 45-58.
- Verraes, C., Vlaemyneck, G., Van Weyenberg, S., De Zutter, L., Daube, G., Sindic, M., Uyttendaele, M. & Herman, L. (2015). A review of the microbiological hazards of dairy products made from raw milk. *International Dairy Journal* **50**, 32-44.
- Vithanage, N. R., Dissanayake, M., Bolge, G., Palombo, E. A., Yeager, T. R. & 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.
- Wang, D., Lee, S. H., Seeve, C., Yu, J. M., Pierson, L. S., 3rd & Pierson, E. A. (2013). Roles of the Gac-Rsm pathway in the regulation of phenazine biosynthesis in *Pseudomonas chlororaphis* 30-84. *MicrobiologyOpen*.

- Wang, H., Zhang, J., Wang, X., Qi, W. & Dai, Y. (2012). Genome shuffling improves production of the low-temperature alkalophilic lipase by *Acinetobacter johnsonii*. *Biotechnology Letters* **34**, 145-151.
- Wayne, L. G., Brenner, D. J., Colwell, R. R., Grimont, P. A. D., Kandler, O., Krichevsky, M. I., Moore, L. H., Moore, W. E. C., Murray, R. G. E. & other authors (1987). Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **37**, 463-464.
- Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A. & Lane, D. J. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology* **173**, 697-703.
- Wenning, M., Breitenwieser, F., Konrad, R., Huber, I., Busch, U. & 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. & Scherer, S. (2013). Identification of microorganisms by FTIR spectroscopy: Perspectives and limitations of the method. *Applied Microbiology and Biotechnology* **97**, 7111-7120.
- Wenning, M., Scherer, S. & Naumann, D. (2008). Infrared spectroscopy in the identification of microorganism. In *Vibrational Spectroscopy for Medical Diagnosis*, pp. 71–96. Edited by M. Diem, Griffiths, P.R., Chalmers, J.M: John Wiley & Sons Ltd.
- Wessels, D., Jooste, P. J. & Mostert, J. F. (1989). Psychrotrophic, proteolytic and lipolytic properties of Enterobacteriaceae isolated from milk and dairy products. *International Journal of Food Microbiology* **9**, 79-83.
- Wiertz, R., Schulz, S. C., Muller, U., Kämpfer, P. & Lipski, A. (2013). *Corynebacterium frankenforstense* sp. nov. and *Corynebacterium lactis* sp. nov., isolated from raw cow milk. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **63**, 4495-4501.
- Wilkinson, M. G. & Kilcawley, K. N. (2005). Mechanisms of incorporation and release of enzymes into cheese during ripening. *International Dairy Journal* **15**, 817-830.
- Winder, C. L., Carr, E., Goodacre, R. & Seviour, R. (2004). The rapid identification of *Acinetobacter* species using Fourier transform infrared spectroscopy. *The Journal of Applied Bacteriology* **96**, 328-339.
- Winslow, C. E., Broadhurst, J., Buchanan, R. E., Krumwiede, C., Rogers, L. A. & Smith, G. H. (1917). The families and genera of the bacteria: Preliminary report of the committee of the society of American bacteriologists on characterization and classification of bacterial types. *Journal of Bacteriology* **2**, 505-566.
- Woese, C. R., Kandler, O. & Wheelis, M. L. (1990). Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **87**, 4576-4579.
- Wohlfarth, S., Hoesche, C., Strunk, C. & Winkler, U. K. (1992). Molecular genetics of the extracellular lipase of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Journal of General Microbiology* **138**, 1325-1335.
- Wolfgang, W. J., Coorevits, A., Cole, J. A., De Vos, P., Dickinson, M. C., Hannett, G. E., Jose, R., Nazarian, E. J., Schumann, P. & other authors (2012). *Sporosarcina newyorkensis* sp. nov. from clinical specimens and raw cow's milk. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **62**, 322-329.
- Woods, R. G., Burger, M., Beven, C. A. & Beacham, I. R. (2001). The *aprX-lipA* operon of *Pseudomonas fluorescens* B52: A molecular analysis of metalloprotease and lipase production. *Microbiology* **147**, 345-354.
- Wretling, B. & Pavlovskis, O. R. (1984). Genetic mapping and characterization of *Pseudomonas aeruginosa* mutants defective in the formation of extracellular proteins. *Journal of Bacteriology* **158**, 801-808.
- Xie, F., Ma, H., Quan, S., Liu, D., Chen, G., Chao, Y. & Qian, S. (2014). *Pseudomonas kunmingensis* sp. nov., an exopolysaccharide-producing bacterium isolated from a phosphate mine. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **64**, 559-564.
- Xu, P., Li, W. J., Tang, S. K., Zhang, Y. Q., Chen, G. Z., Chen, H. H., Xu, L. H. & 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.
- Yamamoto, S., Kasai, H., Arnold, D. L., Jackson, R. W., Vivian, A. & Harayama, S. (2000).** Phylogeny of the genus *Pseudomonas*: Intrageneric structure reconstructed from the nucleotide sequences of *gyrB* and *rpoD* genes. *Microbiology* **146**, 2385-2394.
- Yarza, P., Richter, M., Peplies, J., Euzéby, J., Amann, R., Schleifer, K. H., Ludwig, W., Glöckner, F. O. & 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.
- Yu, L., Lai, Q., Yi, Z., Zhang, L., Huang, Y., Gu, L. & Tang, X. (2013).** *Microbacterium sediminis* sp. nov., a psychrotolerant, thermotolerant, halotolerant and alkalitolerant actinomycete isolated from deep-sea sediment. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **63**, 25-30.
- Yumoto, I., Kusano, T., Shingyo, T., Nodasaka, Y., Matsuyama, H. & Okuyama, H. (2001).** Assignment of *Pseudomonas* sp. strain E-3 to *Pseudomonas psychrophila* sp. nov., a new facultatively psychrophilic bacterium. *Extremophiles* **5**, 343-349.
- Zhang, L., Pan, Y., Wang, K., Zhang, X., Zhang, C., Zhang, S., Fu, X. & Jiang, J. (2015).** *Pseudomonas zhaodongensis* sp. nov., a novel bacterium isolated from saline and alkaline soils in Zhaodong, China. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*.
- Zhang, Y., Ren, H. & Zhang, G. (2014).** *Microbacterium hydrothermale* sp. nov., an actinobacterium isolated from hydrothermal sediment. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **64**, 3508-3512.
- Zheng, X., Chu, X., Zhang, W., Wu, N. & Fan, Y. (2011).** A novel cold-adapted lipase from *Acinetobacter* sp. XMZ-26: Gene cloning and characterisation. *Applied Microbiology and Biotechnology* **90**, 971-980.
- Zuber, S., Carruthers, F., Keel, C., Mattart, A., Blumer, C., Pessi, G., Gigot-Bonnefoy, C., Schnider-Keel, U., Heeb, S. & other authors (2003).** GacS sensor domains pertinent to the regulation of exoproduct formation and to the biocontrol potential of *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **16**, 634-644.

DANKSAGUNG

Mein ausdrücklicher Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Siegfried Scherer für die Bereitstellung des überaus interessanten und vielseitigen Themas, für die Möglichkeit, diese Arbeit an seinem Lehrstuhl anzufertigen, und für das in mich gesetzte Vertrauen. Danke, dass Sie mir ermöglicht haben, neben Ihnen zu wachsen.

Für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Rudi F. Vogel.

Besonders bedanke ich mich bei Frau Dr. Mareike Wenning für die außerordentlich kompetente und freundschaftliche Betreuung. Vielen Dank für die vielen Ideen, die konstruktiven Anregungen und Diskussionen. Danke für deine sehr angenehme Synergie des Förderns und Forderns, danke für die tolle Zeit in deinem Team und danke für all deine guten Ratschläge und Tipps.

Ein großes Dankeschön auch an die guten Seelen des Labors Lisa Rieder, Sonja Dandl und Petra Hartberger, für ihre zuverlässige technische und fachliche Unterstützung.

Vielen herzlichen Dank auch an alle meine ehemaligen Kollegen, ganz besonders an meine ehemaligen Bürokollegen Lena Staib, Etienne Doll und Christopher Huptas. Die Doktorandenzeit hat bekanntlich Höhen und Tiefen, aber mit euch hat es mir immer sehr viel Spaß gemacht, und ich denke sehr gerne an die Zeit zurück, da aus Kollegen Freunde wurden.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinen lieben Eltern. Danke, dass ihr immer für mich da wart, mich unterstützt habt und mir so vieles ermöglicht habt.

Zum Schluss bedanke ich mich aus tiefstem Herzen bei meiner wunderbaren Frau Julija. Danke, dass du mir in all den Jahren des Studiums, meiner Doktorandenzeit und in der Zeit zum Verfassen dieser Arbeit immer wieder neuen Mut gegeben hast. Du hast mir den Rücken frei gehalten und hast nie aufgehört an mich zu glauben. Ohne dich hätte ich es nicht so weit gebracht.