



TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Lehrstuhl für Mikrobielle Ökologie

***Pseudomonas* spp. in deutscher Rohmilch –
Prävalenz und Ermittlung von Eintragsrouten**

Katharina Christine Hofmann

Vollständiger Abdruck der von der TUM School of Life Sciences der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. Rudi F. Vogel

Prüfer der Dissertation: 1. Prof. Dr. Siegfried Scherer

2. Prof. Dr. Ulrich Kulozik

Die Dissertation wurde am 28.06.2021 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die TUM School of Life Sciences am 06.08.2021 angenommen.

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die bei der TUM School of Life Science der TUM zur Promotionsprüfung vorgelegte Arbeit mit dem Titel:

***Pseudomonas* spp. in deutscher Rohmilch –
Prävalenz und Ermittlung von Eintragsrouten**

am Lehrstuhl für Mikrobielle Ökologie, ZIEL-Institute for Food & Health, unter der Anleitung und Betreuung durch Herrn Prof. Dr. Siegfried Scherer ohne sonstige Hilfe erstellt und bei der Abfassung nur die gemäß § 6 Ab. 6 und 7 Satz 2 angebotenen Hilfsmittel benutzt habe. Alle in der Dissertation berichteten Experimente wurden von mir selbst durchgeführt.

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

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

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

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

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

Ort, Datum

Katharina Hofmann

Zusammenfassung

Aufgrund der Produktion hitzeresistenter Peptidasen ist *Pseudomonas* verantwortlich für hohe Verluste der Milchindustrie. Insbesondere bei lang haltbaren Milchprodukten können die Enzyme zu sensorischen und visuellen Qualitätsverlusten bereits vor Erreichen des Mindesthaltbarkeitsdatums führen. Die Produktion der Peptidasen findet während der gekühlten Rohmilchlagerung statt. Diese führt zudem zu einem Wachstum der psychrotoleranten Gattung und gilt als wichtigster Faktor für hohe *Pseudomonas*-Keimzahlen. Allerdings indizieren hohe Belastungen unabhängig von der Stapeldauer weitere, Hof-spezifische Einflussfaktoren. Diese sollten neben möglichen Eintrittsrouten der Gattung in die Rohmilch im Rahmen der vorliegenden Arbeit identifiziert werden.

Von 444 Rohmilchproben aus den Hofstapeltanks von 122 deutschen Erzeugerbetrieben wurden die *Pseudomonas*- und Gesamtkeimzahlen bestimmt und mit 12 Hof-spezifischen Faktoren korreliert, die anhand eines Fragebogens ermittelt wurden. Die Rohmilchproben wiesen homogene Gesamtkeimzahlen mit einem Mittelwert von $\log 5,14 \text{ Zellen} \cdot \text{ml}^{-1}$ auf. Die durchschnittliche Belastung mit *Pseudomonas* betrug $\log 3,04 \text{ Zellen} \cdot \text{ml}^{-1}$, jedoch zeigte sich eine starke schiefe Verteilung. Während 45 % der Proben geringe Werte zwischen $\log 2$ und $\log 3 \text{ Zellen} \cdot \text{ml}^{-1}$ aufwiesen, wurden bei 20 % hohe Belastungen zwischen $\log 3,82$ und $\log 7,90 \text{ Zellen} \cdot \text{ml}^{-1}$ festgestellt. Signifikant höhere *Pseudomonas*-Keimzahlen konnten bei zweitägiger im Vergleich zur täglichen Abholung berechnet werden. Dennoch wiesen auch in letzterem Fall 10 % der Proben auffällig hohe Keimzahlen trotz der kurzen Lagerdauer auf. Weitere Faktoren mit signifikantem Einfluss waren Produktionsart, Tierhaltung, Milchkühlung und Jahreszeit der Probenahme. Insbesondere die ökologische Produktionsart und eine Tierhaltung, die Weidegang oder Auslauf ermöglichte, waren mit niedrigeren *Pseudomonas*-Konzentrationen assoziiert. Da diese Faktoren strukturellen Charakter aufweisen, konnten keine Handlungsempfehlungen zur kurzfristigen Senkung der *Pseudomonas*-Belastung in Rohmilch abgeleitet werden.

Die Ergebnisse der 16S rRNA Amplikonsequenzierung zeigten, dass die meisten Höfe eine stabile, von Gram-positiven Gattungen dominierte Mikrobiota aufwiesen. Demgegenüber standen Höfe mit starken Unterschieden zwischen der Zusammensetzung der Rohmilchproben und hohen Belastungen mit einzelnen Gattungen wie z.B. *Pseudomonas*. Diese Gattung wies einen durchschnittlichen Anteil von 5,5 % auf. Die Ergebnisse indizieren das Vorhandensein von Höfen, deren Management einen hohen Eintrag und Wachstum von *Pseudomonas* ermöglicht. Die Beprobung von acht Betrieben zur Identifikation möglicher Eintrittsrouten ergab individuelle, hof-spezifische Schwachstellen. Insbesondere Bereiche, die

schwer von der automatischen Reinigung erfasst werden, könnten potentielle Kontaminationsquellen darstellen und sollten manuell gesäubert werden. Die Keimzahlanalysen der Rohmilchproben von sieben kompletten Sammeltouren ergaben in vier Fällen einen deutlichen Anstieg der *Pseudomonas*-Belastung von über einer Log-Stufe. Die Erhöhungen in den Sammelwagenproben konnten hierbei aufgrund der Intensität in Kombination mit der kurzen Transportzeit nicht auf Wachstum zurückgeführt werden. Daher wird eine Intensivierung der Hygienepraktiken bei den Sammelwägen empfohlen. Während der gekühlten Lagerung der Rohmilch in der Molkerei kam es zu einer Verschiebung von Gram-positiven, Mesophilen wie *Clostridium* hin zu teilweise psychrotoleranten Gattungen wie *Lactococcus*.

Neben den Analysen der Einflussfaktoren auf die *Pseudomonas*-Keimzahl in Rohmilch wurden drei aus diesem Medium bzw. aus Milchhalbfabrikaten isolierte *Pseudomonas*-Spezies charakterisiert, die keiner bisher bekannten Art zugeordnet werden konnten. Diese Spezies konnten von nah verwandten Typstämmen anhand eines polyphasischen Ansatzes abgegrenzt und als *Pseudomonas saxonica* sp. nov., *Pseudomonas haemolytica* sp. nov. und *Pseudomonas cremoris* sp. nov. valide beschrieben werden. Aufgrund des enzymatischen Potentials wird eine Relevanz für die Milchindustrie vermutet.

Summary

Pseudomonas leads to high financial losses for the milk industry due to the production of heat-stable peptidases. Especially for milk products with extended shelf-life, these enzymes can induce sensoric or visual quality defects, even before reaching the expiry date. The production of peptidases occurs during the chilled raw milk storage, which favours growth of this psychrotolerant genus. Prolonged storage at cold temperatures is known to be the most important factor leading to high *Pseudomonas* loads. However, high loads independent from storage duration indicate other, farm-specific factors influencing the titer of pseudomonads. Those ought to be identified within the scope of this work, as well as possible entry-routes of this genus into the raw milk.

Pseudomonas- and whole cell counts were determined for 444 raw milk samples of the silo tanks of 122 German farms. These data were subsequently correlated with 12 farm-specific factors, which were obtained using a questionnaire. The raw milk samples showed a homogenous distribution of the whole cell counts, with a mean of $\log 5,14 \text{ cells*ml}^{-1}$. The average load of *Pseudomonas* was $\log 3,04 \text{ cells*ml}^{-1}$. However, this genus showed a strongly skewed distribution. While 45 % of the samples exhibited counts between $\log 2$ and $\log 3 \text{ cells*ml}^{-1}$, high loads between $\log 3,82$ and $\log 7,90 \text{ cells*ml}^{-1}$ were detected for 20 % of the samples. Significantly higher *Pseudomonas* counts were calculated for the collection interval of the raw milk of two days compared to daily collection. Nevertheless, 10 % of samples had conspicuous counts in the latter case despite the short storage duration. Further factors which showed significant differences are farm management, husbandry, cooling system of the milk and season of sampling. Especially organic farming and types of husbandries that included pasturage or an open-air area were associated with lower *Pseudomonas* concentrations. As these factors are of structural character, it was not possible to deduce short-term measures to lower the *Pseudomonas*-loads in raw milk.

The results of the 16S rRNA amplicon sequencing of the raw milk samples revealed a stable microbiota of the majority of farms, dominated by Gram-positive genera. In contrast, some farms revealed strong differences between the composition of their raw milk samples as well as single genera with high loads, like *Pseudomonas*. This genus exhibited a mean relative fraction of 5,5 %. These data indicate that the management of some farms favours the entry and growth of *Pseudomonas*. The inspection of eight farms for identification of possible entry routes resulted in individual, farm-specific flaws. In particular, areas that are hardly reached by the automatic cleaning system could pose potential sources for contamination and should be cleaned manually. Regarding the cell count analysis of seven complete collection tours, a

considerable increase of the *Pseudomonas* load over 1 log-step was found in four cases. Due to short transportation durations, this could not be due to cell growth in the collection trucks. Therefore, an intensification of cleaning practices of the trucks is recommended. During the chilled storage of raw milk in the dairy, a shift from gram-positive, mesophilic genera like *Clostridium* to partially psychrotolerant genera such as *Lactococcus* occurred.

Besides the analyses of factors influencing the *Pseudomonas* counts in raw milk, three *Pseudomonas*-species, which were isolated from this medium or from semi-finished milk products were characterized. They could not be assigned to a known species and could be distinguished from closely related type-strains by a polyphasic approach, leading to a valid description of *Pseudomonas saxonica* sp. nov., *Pseudomonas haemolytica* sp. nov. and *Pseudomonas cremoris* sp. nov.. Due to the peptidase production potential of these novel species, they are of potential relevance for the milk industry.

Inhaltsverzeichnis

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	I
ZUSAMMENFASSUNG	II
SUMMARY	IV
INHALTSVERZEICHNIS	VI
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	X
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	XII
TABELLENVERZEICHNIS	XIV
EINLEITUNG	1
1 CHARAKTERISTIKEN DER MILCHERZEUGUNG IN DEUTSCHLAND	1
1.1 GESCHICHTE DER MILCHERZEUGUNG	1
1.1.1 <i>Milchkonsum als evolutionärer Selektionsvorteil</i>	1
1.1.2 <i>Entstehung und Entwicklung von Molkereien</i>	1
1.1.3 <i>Stellenwert der modernen Milchindustrie in Deutschland</i>	1
1.2 ERZEUGERBETRIEBE	2
1.2.1 <i>Betriebsgrößen</i>	2
1.2.2 <i>Produktionsart und Tierhaltung</i>	2
1.2.3 <i>Melksysteme</i>	3
1.3 TRANSPORT UND LAGERUNG IM VERARBEITENDEN BETRIEB	5
2 DIE DIVERSITÄT DER ROHMILCHMIKROBIOTA	5
2.1 EINTRAGSQUELLEN VON MIKROORGANISMEN IN DIE ROHMILCH	5
2.2 ZUSAMMENSETZUNG DER ROHMILCHMIKROBIOTA	6
3 PSEUDOMONAS ALS VERDERBSERREGER FÜR ROHMILCH	7
3.1 DIE GATTUNG <i>PSEUDOMONAS</i>	7
3.2 PROTEOLYTISCHER VERDERB VON ROHMILCH DURCH DIE APRX-PEPTIDASE	8
3.3 EINFLÜSSE AUF DIE PROTEOLYTISCHE AKTIVITÄT	11
3.4 EINFLÜSSE AUF DIE <i>PSEUDOMONAS</i> -PRÄVALENZ IN ROHMILCH	12
4 TAXONOMISCHE EINORDNUNG NEUER BAKTERIENSPEZIES	13
4.1 GESCHICHTE DER TAXONOMIE	13
4.2 BEGRIFFSDEFINITIONEN	14
4.3 CHARAKTERISIERUNG NEUER ARTEN	14
5 ZIELSETZUNG	16

MATERIAL UND METHODEN	17
1 MEDIEN UND LÖSUNGEN	17
2 ANALYSE VON PSEUDOMONAS IN DEUTSCHER ROHMILCH	20
2.1 PROBENNAHME.....	20
2.1.1 Rohmilchproben aus Hofsammeltanks.....	20
2.1.2 Beprobung von Erzeugerbetrieben und Probenbearbeitung	20
2.1.3 Beprobung von Sammeltouren	21
2.2 ERFASSUNG HOFSEITIGER EINFLUSSFAKTOREN.....	23
2.3 ERMITTLUNG DER GESAMTKEIMZAHL DER ROHMILCHPROBEN	24
2.4 QUANTIFIZIERUNG VON PSEUDOMONAS IN DER ROHMILCH.....	24
2.4.1 Quantifizierung per klassischer Kultivierung.....	24
2.4.2 Molekulare Quantifizierung per gattungsspezifischer qPCR.....	25
2.4.3 Molekulare Quantifizierung anhand der Mikrobiomdaten	25
2.5 ISOLATION BAKTERIELLER DNA AUS ROHMILCH	26
2.6 16S rRNA AMPLICON SEQUENZIERUNG ZUR ANALYSE DES ROHMILCHMIKROBIOMS	27
2.6.1 Herstellung der Sequenzierbibliothek.....	27
2.6.2 Prozessierung und Downstream-Analyse der Sequenzierdaten.....	28
2.7 STATISTISCHE ANALYSEN	29
3 CHARAKTERISIERUNG NEUER PSEUDOMONAS-SPEZIES	30
3.1 VERWENDETE BAKTERIENSTÄMME	30
3.2 ALLGEMEINE MIKROBIOLOGISCHE ARBEITEN	31
3.2.1 Stammlagerung und Reaktivierung.....	31
3.2.2 Herstellung von Übernachtkulturen.....	31
3.2.3 Identifizierung bakterieller Isolate per Sanger-Sequenzierung	32
3.3 PHYLOGENETISCHE ANALYSEN	34
3.3.1 Einzelgenanalysen.....	34
3.3.2 Phylogenomische Analysen.....	35
3.4 MORPHOLOGISCHE CHARAKTERISIERUNG	39
3.4.1 Koloniemorphologie	40
3.4.2 Zellmorphologie	40
3.4.3 Motilität in semisolidem Medium	40
3.4.4 KOH-Test.....	40
3.5 PHYSIOLOGISCHE CHARAKTERISIERUNG	41
3.5.1 Wachstumsbedingungen	41
3.5.2 Anaerobes Wachstum und Analyse von Enzymen des aeroben Stoffwechsels...42	
3.5.3 Wachstum auf Spezialmedien.....	42
3.5.4 Pigmentproduktion.....	43

3.6	BIOCHEMISCHE CHARAKTERISIERUNG	43
3.6.1	<i>Hydrolyseassays</i>	43
3.6.2	<i>Nitratreduktion</i>	44
3.6.3	<i>Testsystem API 20 E</i>	44
3.6.4	<i>Säurebildung aus Kohlenhydraten</i>	45
3.7	CHEMOTAXONOMISCHE ANALYSEN	45
3.7.1	<i>Respiratorische Chinone</i>	46
3.7.2	<i>Polare Lipide</i>	46
3.7.3	<i>Zelluläre Fettsäuren</i>	46
3.8	HINTERLEGUNG IN ÖFFENTLICHEN STAMMSAMMLUNGEN	46
ERGEBNISSE		47
1 PRÄVALENZ VON PSEUDOMONAS UND DEREN EINFLUSSFAKTOREN IN ROHMILCH VON DEUTSCHEN ERZEUGERBETRIEBEN		47
1.1	QUANTIFIZIERUNG VON <i>PSEUDOMONAS</i> IN ROHMILCH	47
1.1.1	<i>Validierung des Pseudomonas-spezifischen qPCR Assays</i>	47
1.1.2	<i>Vergleich dreier Quantifizierungsmethoden für die Pseudomonas-Keimzahl in Rohmilch</i>	49
1.2	PRÄVALENZ VON <i>PSEUDOMONAS</i> IN FRISCHER ROHMILCH AUS HOFSAMMELTANKS	50
1.2.1	<i>Analyse absoluter Pseudomonas-Keimzahlen</i>	50
1.2.2	<i>Analyse des Milchmikrobioms per Hochdurchsatzsequenzierung</i>	52
1.3	ANALYSE HOFSEITIGER EINFLUSSFAKTOREN AUF DIE <i>PSEUDOMONAS</i> -KEIMZAHL	59
1.4	IDENTIFIKATION VON EINTRAGSROUTEN BEIM ERZEUGER	62
1.4.1	<i>Analyse der Pseudomonas-Keimzahlen der Stufenkontrollen</i>	62
1.4.2	<i>Analyse der Gesamtkeimzahlen der Stufenkontrollen</i>	64
1.4.3	<i>Ergebnisse der Luftkeimanalysen</i>	66
1.4.4	<i>Auffälligkeiten während der Probenahme</i>	67
1.5	ANALYSE DES EINFLUSSES VON LAGERUNG UND TRANSPORT AUF DIE <i>PSEUDOMONAS</i> -KEIMZAHL	68
1.5.1	<i>Veränderungen der absoluten Pseudomonas-Keimzahl</i>	68
1.5.2	<i>Veränderungen im Rohmilchmikrobiom</i>	71
2 CHARAKTERISIERUNG DREIER NEUER PSEUDOMONAS-SPEZIES		74
2.1	PHYLOGENETISCHE ANALYSEN	75
2.1.1	<i>Einzelgenanalysen auf Basis von 16S rRNA und rpoD</i>	75
2.1.2	<i>Multilocus Sequence Analyses (MLSA)</i>	79
2.1.3	<i>Kerngenom-Analysen</i>	83
2.1.4	<i>Analysen der Average Nucleotide Identity (ANI)</i>	85
2.2	MORPHOLOGISCHE CHARAKTERISIERUNG	88

2.2.1	Morphologie von <i>Pseudomonas saxonica</i> sp. nov.	88
2.2.2	Morphologie von <i>Pseudomonas haemolytica</i> sp. nov.	89
2.2.3	Morphologie von <i>Pseudomonas cremoris</i> sp. nov.	89
2.3	PHYSIOLOGISCHE UND BIOCHEMISCHE CHARAKTERISIERUNG	90
2.3.1	Charakterisierung und Abgrenzung von <i>Pseudomonas saxonica</i> sp. nov.	90
2.3.2	Charakterisierung und Abgrenzung von <i>Pseudomonas haemolytica</i> sp. nov.	92
2.3.3	Charakterisierung und Abgrenzung von <i>Pseudomonas cremoris</i> sp. nov.	95
2.4	CHEMOTAXONOMISCHE ANALYSEN	96
2.4.1	<i>Pseudomonas saxonica</i> sp. nov.	97
2.4.2	<i>Pseudomonas haemolytica</i> sp. nov.	98
2.4.3	<i>Pseudomonas cremoris</i> sp. nov.	99
DISKUSSION		101
1	PSEUDOMONAS IN ROHMILCH DEUTSCHER ERZEUGERBETRIEBE	101
1.1	VERGLEICH VERSCHIEDENER <i>PSEUDOMONAS</i> -SPEZIFISCHER QUANTIFIZIERUNGSMETHODEN	101
1.2	PRÄVALENZ VON <i>PSEUDOMONAS</i> IN ROHMILCH VON DEUTSCHEN ERZEUGERBETRIEBEN	104
1.3	EINFLUSSFAKTOREN AUF DIE <i>PSEUDOMONAS</i> -BELASTUNG DER ROHMILCH.....	106
1.4	HOF-SPEZIFISCHE SCHWACHSTELLEN ALS MÖGLICHE EINTRAGSQUELLEN DER PSEUDOMONADEN IN DIE ROHMILCH BEIM ERZEUGER.....	110
1.5	ROHMILCHTRANSPORT ALS POTENTIELLE QUELLE FÜR HOHE <i>PSEUDOMONAS</i> - KEIMZAHLEN	114
2	CHARAKTERISIERUNG NEUER <i>PSEUDOMONAS</i>-SPEZIES	118
2.1	<i>PSEUDOMONAS SAXONICA</i> SP. NOV.	118
2.2	<i>PSEUDOMONAS HAEMOLYTICA</i> SP. NOV.	120
2.3	<i>PSEUDOMONAS CREMORIS</i> SP. NOV.....	122
2.4	PHÄNOTYPISCHE CHARAKTERISIERUNGEN IN ZEITEN VON HOCHDURCHSATZSEQUENZIERUNG	124
SCHLUSSFOLGERUNG UND AUSBLICK.....		128
LITERATURVERZEICHNIS		130
ANHANG		146
DANKSAGUNG		154
LISTE DER VORVERÖFFENTLICHUNGEN		155
CURRICULUM VITAE.....		156

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Erläuterung
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
AFS	aktuelle Fragmentgröße
AMP1x	Agencourt AMPure XP Beads einfach konzentriert
AMP2x	Agencourt AMPure XP Beads doppelt konzentriert
ANI	<i>Average nucleotide identity</i>
BCCM/LMG	Belgian Coordinated Collection of Microorganismes/ Laboratorium voor Microbiologie, Universiteit Gent
BfR	Bundesamt für Risikobewertung
BiFS	<i>Bioanalyzer-inferred average insert size</i>
bp	Basenpaar
CFC	Cephalothin-Sodium Fusidate-Cetrimide
CIP	<i>Clean-in-Place</i>
Ct	<i>Threshold Cycle</i>
d	Tag
DDH	DNA-DNA-Hybridisierung
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DSMZ	Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
EDTA	Ethylendiammintetraessigsäure
EtOH	Ethanol
g	Gramm
g	Gravitationskonstante
GKZ	Gesamtkeimzahl
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
H ₂ S	Schwefelwasserstoff
HCl	Salzsäure
IBC	<i>individual bacterial count</i>
KA	Keine Angabe
kb	Kilobase
KbE	Koloniebildende Einheit
KOH	Kaliumhydroxid
l	Liter
log	Logarithmus
M	Molar
mg	Milligramm
min	Minuten
Mio.	Millionen
ml	Milliliter
MLSA	<i>Multilocus sequence analysis</i>

mm	Millimeter
Mrd.	Milliarden
MRI	Max-Rubner-Institut
Na	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natronlauge
nM	Nanomolar
nt	Nukleotid
NV	Nicht verfügbar
OD	Optische Dichte
OTU	<i>Operational Taxonomic Unit</i>
<i>P.</i>	<i>Pseudomonas</i>
pkat	Pikokatal
PCR	Polymerasekettenreaktion
pM	Pikomolar
qPCR	Quantitative Polymerasekettenreaktion
RB	Reaction Buffer
RDP	<i>Ribosomal Database Project</i>
RG	Reaktionsgefäß
rpm	Umdrehungen pro Minute
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
sp.	Spezies
sp. nov.	species novum
spp.	species pluralis
s. str.	sensu stricto
St	Stück
t	Tonne
TBE	TRIS-Borat-EDTA-Puffer
TSA	Trypticase Soja Agar
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TSB	Trypticase Soja Bouillon
TUM	Technische Universität München
UBCG	<i>Up-to-date bacterial core gene</i>
UHT	<i>Ultra high temperature</i>
V	Volt
v/v	Volumenprozent
zOTU	<i>zero-Radius Operational Taxonomic Unit</i>

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematischer Aufbau einer Melkanlage	3
Abbildung 2: Struktur der AprX Peptidase	9
Abbildung 3: Produktion hitzestabiler Enzyme während der Rohmilchlagerung	9
Abbildung 4: Visuelle Effekte des proteolytischen Verderbs von UHT-Milch	10
Abbildung 5: Aufbau der <i>aprX-lipA2</i> -Operontypen von <i>Pseudomonas</i>	11
Abbildung 6: Protokoll zur Isolation bakterieller DNA aus Rohmilch für Mikrobiomanalysen	27
Abbildung 7: Prinzip der biphasischen PCR zur Erstellung einer Sequenzierbibliothek für die 16S rRNA Amplikon Sequenzierung.....	28
Abbildung 8: Standardkurve zur molekularen Quantifizierung der <i>Pseudomonas</i> -Keimzahlen in Rohmilch	48
Abbildung 9: Validierung der <i>Pseudomonas</i> -Quantifizierung per qPCR.....	48
Abbildung 10: Vergleich dreier Methoden zur Quantifizierung von <i>Pseudomonas</i> in Rohmilch	50
Abbildung 11: <i>Pseudomonas</i> -Keimzahlen und Gesamtkeimzahlen in Rohmilch aus Hofsammeltanks.....	51
Abbildung 12: α -Diversität der Rohmilchproben aus den Hofsammeltanks	53
Abbildung 13: Relative <i>Pseudomonas</i> -Belastung der Rohmilchproben aus den Hofsammeltanks.....	54
Abbildung 14: Komposition der vier Rohmilchproben aus den Hofsammeltanks von sieben repräsentativen Erzeugerbetrieben.....	56
Abbildung 15: MetaNMDS Plot der mikrobiellen Profile der sieben repräsentativen Höfe für die drei hofspezifischen Mikrobiom-Muster.....	57
Abbildung 16: Korrelationen zwischen den zehn prävalentesten Gattungen in den 444 Rohmilchproben aus Hofsammeltanks	58
Abbildung 17: Einfluss der verschiedenen Abholungsintervalle der Rohmilch auf die <i>Pseudomonas</i> - und Gesamtkeimzahlen	59
Abbildung 18: Einfluss von Jahreszeit, Produktionsart, Tierhaltung und Milchkühlung auf die <i>Pseudomonas</i> - und Gesamtkeimzahl der Rohmilch	61
Abbildung 19: Heat-Map der <i>Pseudomonas</i> -Keimzahlen der Stufenkontrollen auf Erzeugerbetrieben.....	63
Abbildung 20: Heat-Map der Gesamtkeimzahlen der Stufenkontrollen auf Erzeugerbetrieben.....	65
Abbildung 21: <i>Pseudomonas</i> -Keimzahl und Gesamtkeimzahl der Stallluft von sechs Betrieben.....	66
Abbildung 22: <i>Pseudomonas</i> - und Gesamtkeimzahlen der Sammeltouren ohne Anstieg der <i>Pseudomonas</i> -Keimzahlen.....	69

Abbildung 23: <i>Pseudomonas</i> - und Gesamtkeimzahlen der Sammeltouren mit Anstieg der <i>Pseudomonas</i> -Keimzahl.....	71
Abbildung 24: Mikrobielle Zusammensetzung der Rohmilchproben von Sammeltour A und D	72
Abbildung 25: <i>Maximum-Likelihood</i> Phylogenie von <i>P. saxonica</i> sp. nov. basierend auf 16S rRNA	76
Abbildung 26: <i>Maximum-Likelihood</i> Phylogenie von <i>P. haemolytica</i> sp. nov. basierend auf 16S rRNA.....	77
Abbildung 27: <i>Maximum-Likelihood</i> Phylogenie von <i>P. cremoris</i> sp. nov. basierend auf 16S rRNA	78
Abbildung 28: <i>Maximum-Likelihood</i> Phylogenie von <i>P. saxonica</i> sp. nov. basierend auf MLSA	80
Abbildung 29: <i>Maximum-Likelihood</i> Phylogenie von <i>P. haemolytica</i> sp. nov. basierend auf MLSA	82
Abbildung 30: <i>Maximum Likelihood</i> Phylogenie von <i>P. cremoris</i> sp. nov. auf Basis des Kerngenoms.....	84
Abbildung 31: Heterogene Koloniemorphologie und Zellmorphologie von <i>P. saxonica</i> WS 5072 ^T	88
Abbildung 32: Kolonie- und Zellmorphologie von <i>P. haemolytica</i> WS 5063 ^T	89
Abbildung 33: Kolonie- und Zellmorphologie von <i>P. cremoris</i> WS 5106 ^T	89
Abbildung 34: Stammspezifische Produktion fluoreszierender Pigmente auf King B Agar bei <i>P. saxonica</i> sp. nov.	90
Abbildung 35: β -Hämolyse von <i>P. haemolytica</i> WS 5063T auf Blutagar nach Inkubation für 7 d bei 30 °C	93
Abbildung 36: Polare Lipide von <i>P. saxonica</i> WS 5072 ^T	98
Abbildung 37: Polare Lipide von <i>P. haemolytica</i> WS 5072 ^T	98
Abbildung 38: Polare Lipide von <i>P. cremoris</i> WS 5106 ^T	100

Abbildungen im Anhang

Abbildung A 1: <i>Pseudomonas</i> - und Gesamtkeimzahlen in Abhängigkeit hofspezifischer Faktoren ohne signifikanten Effekt auf die <i>Pseudomonas</i> -Keimzahl.....	150
Abbildung A 2: Wachstumskurven zur Ermittlung der optimalen Wachstumsbedingungen für <i>P. saxonica</i> sp. nov.	151
Abbildung A 3: Wachstumskurven zur Ermittlung der optimalen Wachstumsbedingungen für <i>P. haemolytica</i> sp. nov.	152
Abbildung A 4: Wachstumskurven zur Ermittlung der optimalen Wachstumsbedingungen für <i>P. haemolytica</i> sp. nov.	153

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Bestandteile der verwendeten Nährmedien und Lösungen	17
Tabelle 2: Charakteristika der beprobten Erzeugerbetriebe zur Identifikation möglicher Eintrittsrouten von <i>Pseudomonas</i>	20
Tabelle 3: Aufbau der sieben Sammeltouren (A-G) zur Analyse des Einflusses von Lagerung und Transport auf die <i>Pseudomonas</i> -Keimzahl	22
Tabelle 4: Erfasste hofseitige Parameter sowie deren Verteilung bei den 122 teilnehmenden Erzeugerbetrieben.....	23
Tabelle 5: Verwendete Einstellungen zur Prozessierung der Mikrobiomdaten mithilfe der IMNGS-Pipeline.....	28
Tabelle 6: Stammsammlungsnummern sowie Isolationsmedien der charakterisierten <i>Pseudomonas</i> -Isolate.....	30
Tabelle 7: Verwendete Referenztypstämme für die phänotypischen Analysen	31
Tabelle 8: Verwendete Primer zur Identifizierung bakterieller Isolate per Sanger-Sequenzierung	32
Tabelle 9: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes zur Amplifikation von Zielgenen per PCR	32
Tabelle 10: Reaktionsbedingungen der 16S rRNA und <i>rpoD</i> -PCR.....	33
Tabelle 11: GenBank-Zugangsnummern der veröffentlichten <i>rpoD</i> -Sequenzen.....	34
Tabelle 12: Verwendete Einstellungen des Covaris S220 AFA Ultrasonicators zur DNA-Fragmentierung genomischer DNA	35
Tabelle 13: Genbank-Zugangsnummern der veröffentlichten Genom-Assemblierungen.....	38
Tabelle 14: Auffälligkeiten während der Probenahme bei den Erzeugerbetrieben	67
Tabelle 15: Charakteristika der Genom Assemblierung und –annotation von <i>P. saxonica</i> sp. nov.	79
Tabelle 16: Charakteristika der Genom Assemblierung und –annotation von <i>P. haemolytica</i> sp. nov.	81
Tabelle 17: Charakteristika der Genom Assemblierung und –annotation von <i>P. cremoris</i> sp. nov.	83
Tabelle 18: ANIm Werte zwischen <i>P. saxonica</i> sp. nov. und den Referenztypstämmen der verwandten <i>Pseudomonas</i> Spezies.....	85
Tabelle 19: ANIm Werte zwischen <i>P. haemolytica</i> sp. nov. und den Referenztypstämmen der verwandten <i>Pseudomonas</i> Spezies	86
Tabelle 20: ANIm Werte zwischen <i>P. cremoris</i> sp. nov. und den Referenztypstämmen der verwandten <i>Pseudomonas</i> Spezies.....	87
Tabelle 21: Eigenschaften, die <i>P. saxonica</i> sp. nov. von den Typstämmen der am nächsten verwandten Spezies sowie der Typspezies <i>P. aeruginosa</i> unterscheiden	92
Tabelle 22: Eigenschaften, die <i>P. haemolytica</i> sp. nov. von den Typstämmen der am nächsten verwandten Spezies sowie der Typspezies <i>P. aeruginosa</i> unterscheiden	94

Tabelle 23: Eigenschaften, die *P. cremoris* sp. nov. von den Typstämmen der am nächsten verwandten Spezies sowie der Typspezies *P. aeruginosa* unterscheiden96

Tabelle 24: Zelluläre Fettsäurezusammensetzung [%] von *P. saxonica* sp. nov. WS 5072^T, den am nächsten verwandten Spezies sowie der Typspezies *P. aeruginosa*97

Tabelle 25: Zelluläre Fettsäurezusammensetzung [%] von *P. haemolytica* sp. nov. WS 5063^T, den am nächsten verwandten Spezies sowie der Typspezies *P. aeruginosa*99

Tabelle 26: Zelluläre Fettsäurezusammensetzung [%] von *P. cremoris* sp. nov. WS 5106^T, den am nächsten verwandten Spezies sowie der Typspezies *P. aeruginosa*100

Tabellen im Anhang

Tabelle A 1: Mikrobielle Zusammensetzung und Gesamtkeimzahlen der repräsentativen Höfe zur Analyse hofspezifischer Muster..... 146

Tabelle A 2: *Pseudomonas*- und Gesamtkeimzahlen der Rohmilchproben der Sammeltouren 147

Tabelle A 3: Relative Zusammensetzung der Rohmilchproben von Sammeltour A auf Gattungsebene..... 148

Tabelle A 4: Relative Zusammensetzung der Rohmilchproben von Sammeltour D auf Gattungsebene..... 149

Einleitung

1 Charakteristiken der Milcherzeugung in Deutschland

1.1 Geschichte der Milcherzeugung

1.1.1 *Milchkonsum als evolutionärer Selektionsvorteil*

Bereits in der Jungsteinzeit vor etwa 7000 Jahren, in der bäuerliche Gemeinschaften die Jäger- und Sammlerkultur ersetzten, wurden Milchprodukte konsumiert (Leonardi *et al.*, 2012). Dies wurde vor kurzem durch den Nachweis des Milchproteins β -Lactoglobulin in Zahnstein von Überresten jungsteinzeitlicher Menschen in Südengland bestätigt. Da die damalige Population jedoch laktoseintolerant war, wird angenommen, dass die Frischmilch zur Reduktion des Laktosegehaltes zu Käse oder Joghurt verarbeitet wurde. Die Laktase-Persistenz, die sich erst vor 4000 Jahren durchsetzte, ermöglichte letztendlich den Konsum von Frischmilch. Durch deren hohen Kalorien- und Nährstoffgehalt entstand damit ein Selektionsvorteil (Charlton *et al.*, 2019). Europa, Afrika und der mittlere Osten, welche heutzutage mit über 75 % den größten Anteil an Laktase-persistenten Personen weltweit aufweisen, sind dieselben Regionen, die mit einer langen Geschichte an Milchproduktion assoziiert sind. (Segurel & Bon, 2017). Die Laktase-Persistenz ist daher ein Paradebeispiel für die Gen-Kultur-Koevolution, einer Hypothese, bei der kulturelle Praktiken zu Änderungen im Genom führen (Leonardi *et al.*, 2012).

1.1.2 *Entstehung und Entwicklung von Molkereien*

Die ersten Molkerei-ähnlichen Strukturen waren in den mittelalterlichen Klöstern zu finden, die die Milch der umliegenden Bauern zu Käse und Butter verarbeiteten (Anderegg, 1894). Umfassende strukturelle und technologische Veränderungen ermöglichten Ende des 19. Jahrhunderts die Verarbeitung von größeren Milchmengen in den ersten Molkereien. Hierzu zählten u.a. Verfahren zur Haltbarmachung von Trinkmilch sowie die Entwicklung von Zentrifugen zur maschinellen Separation von Rahm und Magermilch (Börgermann, 2020). Auch bei den Melksystemen wurde das Handmelken, das noch bis in die 50er Jahre praktiziert wurde, von automatischen Melksystemen abgelöst. Das erste war hierbei die Eimermelkanlage, die nach Ansetzen der Zitzenbecher an das Euter die Milch durch Vakuum automatisch in einen Eimer melkt (Krömker, 2006).

1.1.3 *Stellenwert der modernen Milchindustrie in Deutschland*

Heute ist die Milcherzeugung einer der wichtigsten Produktionszweige der Landwirtschaft in Deutschland. Im Jahre 2020 wurden über 58.300 milcherzeugende Betriebe mit ca. vier

Millionen Milchkühen verzeichnet. In den 155 milchverarbeitenden Unternehmen sind mehr als 39.000 Beschäftigte angestellt. Mit einem Umsatz von 27 Mrd. € stellt diese die größte Lebensmittelbranche in Deutschland dar. Insgesamt wurden 33 Mio. Tonnen Rohmilch in 2019 produziert und etwa die Hälfte davon exportiert. Neben anderen europäischen Ländern zählt Asien zunehmend zu den wichtigsten Absatzmärkten deutscher Milchprodukte (Börgermann, 2020).

1.2 Erzeugerbetriebe

1.2.1 Betriebsgrößen

Die Strukturen deutscher Erzeugerbetriebe weisen mit weniger als 10 bis mehr als 1000 Kühen pro Betrieb große Unterschiede in der Betriebsgröße auf. Im Durchschnitt hatte ein Milchviehbetrieb 68 Kühe in 2020. Hierbei standen die traditionell eher kleinen Betriebe im westdeutschen Bundesgebiet mit 60 Kühen den größeren Betrieben des ostdeutschen Gebietes mit 197 Kühen gegenüber (Tergast & Hansen, 2020). Die meisten Tiere pro Erzeuger hatte Mecklenburg-Vorpommern mit 235, wohingegen Bayern mit durchschnittlich 42 Kühen die kleinsten Betriebe aufwies. Dennoch produzierte letzteres Bundesland 2019 deutschlandweit mit 8,3 Mio. t die größten Milchmengen, gefolgt von Niedersachsen mit 7,3 Mio. t. Seit dem Jahr 2000 sank die Zahl der Milchbetriebe in Deutschland kontinuierlich von 135.600 auf 58.400 in 2020 ab, wohingegen die durchschnittliche Zahl der Milchkühe pro Betrieb von 34 auf bereits erwähnte 68 anstieg (MIV, 2020).

1.2.2 Produktionsart und Tierhaltung

Trotz einer kontinuierlichen Steigerung der Produktion ökologischer Milchprodukte wurden nur 4 % des Milchviehs im Jahr 2016 unter ökologischen Bedingungen gehalten (Destatis, 2016). Auch der Anteil an ökologisch produzierter Milch liegt aktuell bei 3,7 %, wovon etwa die Hälfte aus Bayern stammt (MIV, 2020).

Im Jahr 2010 war mit 64 % die Anbindestallhaltung die dominierende Haltungsform. Jedoch wurden 72 % der Tiere in Laufställen gehalten. Da die Form der Anbindestallhaltung kontinuierlich abnimmt, wird davon ausgegangen, dass heutzutage weniger Betriebe mit dieser Haltungsform existieren. Weidegang wurde 2010 für 42 % des Milchviehs angeboten, wobei der Anteil bei kleineren Betrieben höher war. Insbesondere in den Bundesländern Saarland, Rheinland-Pfalz, Niedersachsen, Schleswig-Holstein und Nordrhein-Westfalen hatten über die Hälfte der Milchkühe Weidezugang im Sommer (Tergast & Hansen, 2020).

1.2.3 Melksysteme

Grundsätzlich existieren in Deutschland vier verschiedene Melksysteme: Eimermelkanlage, Rohrmelkanlage, verschiedene Varianten von manuellen Melkständen sowie der Melkroboter. Ein typischer Aufbau einer Melkanlage ist in Abbildung 1 sichtbar. Die Milch wird mithilfe von Vakuum, das mit einer Vakuumpumpe erzeugt wird, vom Melkzeug aus über die Milchleitung zum Milchabscheider transportiert. Dort wird die Luft von der Milch abgetrennt und letztere mithilfe der Milchpumpe in den Milchtank gepumpt (Krömker, 2006). Da keine relativen Anteile der einzelnen Melksysteme für ganz Deutschland zur Verfügung stehen, werden im Folgenden die Zahlen für Bayern aus Erhebungen von 2019 verwendet (Schäffler, 2019).

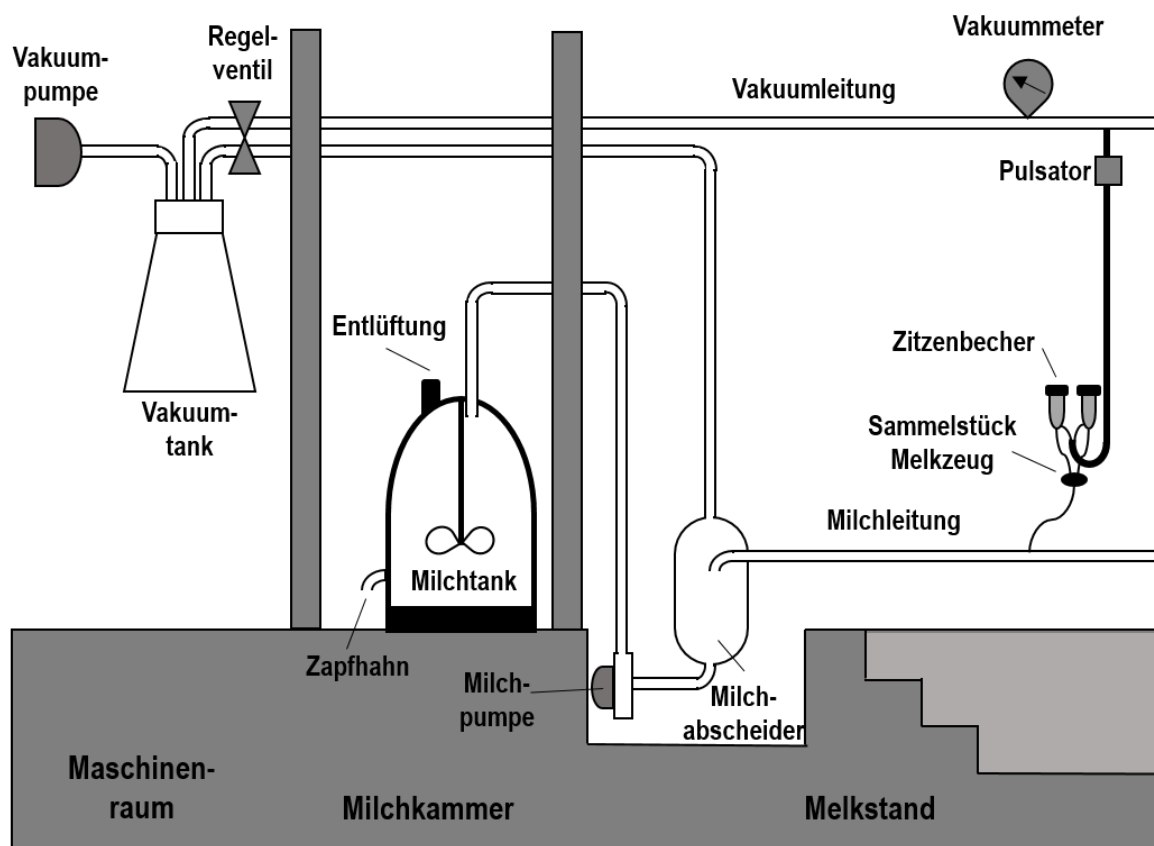


Abbildung 1: Schematischer Aufbau einer Melkanlage

Eine Melkanlage besteht im Wesentlichen aus einer milchführenden Leitung, bei der die Milch vom Melkzeug über den Milchabscheider zum Milchtank transportiert wird. Dies geschieht mithilfe von Vakuum, das mit einer Vakuumpumpe erzeugt wird. Im Milchabscheider erfolgt die Abtrennung der Luft von der Milch. *Modifiziert nach Krömker, 2006*

Eimermelkanlage

Die Eimer- oder Kannenmelkanlage ist der älteste Melksystemtyp. Hier wird die Milch direkt vom Melkgeschirr mithilfe von Vakuum in eine tragbare, geschlossene Kanne gepumpt,

welche gleichzeitig als Milchabscheider dient. Nach dem Melken muss die Milch manuell in den Milchtank gefüllt werden. Diese Technik wird bei Anbindeställen, jedoch aufgrund der hohen Arbeitsbelastung nur noch selten verwendet (Krömker, 2006). In Bayern nutzten 2,7 % der Betriebe dieses Melksystem in 2019 (Schäffler, 2019).

Rohrmelkanlage

Die Rohrmelk- oder Absauganlage, die in Bayern im Jahr 2008 mit 58 % noch am häufigsten vertreten war, machte 2019 nur noch einen Anteil von 37 % aus. Grund hierfür ist der Rückgang der Anbindestallhaltungen, da die Rohrmelkanlage nur in Kombination mit diesem Typ der Tierhaltung funktioniert (Krömker, 2006; Schäffler, 2019). Hier findet das Melken wie bei der Eimermelkanlage im Stall statt. Die milchführende Leitung sowie die Vakuumleitung befinden sich über den Kühen und die Milch wird über einen Milchabscheider in den Milchtank in der Milchammer transportiert. Durch die hochverlegte und sehr lange Leitung wird ein starkes Vakuum benötigt, welches belastend für den Euter ist. Vakuumschwankungen können u.a. zu einem erhöhten Kontaminationsrisiko der Milchdrüse führen (Krömker, 2006).

Manueller Melkstand

Der manuelle Melkstand hat sich durch die Laufstallhaltung etabliert. Hier findet das Melken nicht im Stall, sondern in einem separaten Melkraum statt, in den die Tiere zu den Melkzeiten kommen. Die räumliche Trennung zum Stall hat hygienische Vorteile. Weiterhin ist die Milchleitung tiefer als das Niveau der Kühe gelegt, was ein geringeres Vakuum benötigt (vgl. Abbildung 1). Vorteile für den Landwirt sind zudem kürzere Wege sowie das Entfallen des Arbeitens in gebückter Haltung, z.B. zum Anlegen des Melkzeugs (Krömker, 2006). In Bayern war der manuelle Melkstand 2016 mit 48,2 % der häufigste Melkanlagentyp. Hierbei kann durch die Anordnung der Kühe beim Melken in Fischgräten- (36,9 %), Tandem- (8,0 %), Side-by-Side-Melkstand (2,5 %) sowie dem Melkkarussell (0,8 %) unterschieden werden (Schäffler, 2019).

Melkroboter

Bereits in den 70er Jahren wurde aufgrund steigender Löhne an vollautomatischen Melksystemen gearbeitet, welche jedoch erst 1992 auf den Markt kamen. Seitdem erfahren die automatischen Melkverfahren, kurz Melkroboter, einen rasanten Anstieg (Krömker, 2006). Wiesen 2008 nur 1 % der bayerischen Betriebe einen Melkroboter auf, war dies 2019 schon für 12,2 % der Fall. Die beiden dominierenden Hersteller sind Lely und DeLaval (Schäffler, 2019). Neben dem vollautomatischen Ansetzen des Melkzeugs mithilfe von Laser oder Kamerasystemen beinhaltet ein Melkroboter eine elektronische Tiererkennung mit

Krafffutterausgabe (meist über ein Chip-Verfahren), die automatische Reinigung von Euter und Melksystem sowie Messungen von Abweichungen der Milch zur Erkennung nicht verkehrsfähiger Milch (Krömker, 2006). Hierzu wird die elektrische Leitfähigkeit gemessen sowie optional Zellzahlen, Farbänderungen oder Milchinhaltsstoffe. Da die visuelle Kontrolle der Eutergesundheit beim Melken durch den Landwirt entfällt, muss dies trotz der automatischen Messungen der Anlage regelmäßig durchgeführt werden (Jungbluth *et al.*, 2017). Zu den Vorteilen zählen neben der Arbeitersparnis und der höheren Flexibilität für die Landwirte eine Erhöhung der Melkfrequenz je individuellen Bedarf der Kuh und damit eine Steigerung der Milchleistung. Allerdings muss aufgrund möglicher Fehlermeldungen die kontinuierliche Erreichbarkeit des Erzeugers gewährleistet sein, da keine festen Melkzeiten existieren (Krömker, 2006).

1.3 Transport und Lagerung im verarbeitenden Betrieb

Je Molkerei wird die Rohmilch in unterschiedlichen Intervallen beim Erzeuger abgeholt. In der Regel erfolgt eine tägliche oder zweitägige Abholung, in manchen Fällen erst am dritten Tag. Je Abholungsintervall liegt die zulässige Lagerungstemperatur beim Erzeuger nach Verordnung (EG) Nr. 853/2004 bei 8 °C (tägliche Abholung) bzw. 6 °C (längere Abholungsintervalle). Beim Transport im Sammelwagen zur Molkerei darf die Temperatur der Rohmilch 10 °C nicht überschreiten (Märtlbauer & Becker, 2016). Da die Milch kalt in den Tank gepumpt wird, sind die meisten Tanks der Sammelwägen nicht aktiv gekühlt, sondern isoliert (Teh *et al.*, 2012). Die Reinigung der Sammelwägen erfolgt als *Clean-in-Place* (CIP) Reinigung spätestens alle 24 h, unabhängig von der Anzahl an Sammeltouren (Darchuk *et al.*, 2015b; Kuhn *et al.*, 2018). In der Molkerei kann sich eine weitere Lagerung der Rohmilch bei 6 °C für bis zu 36 h anschließen, bis die Milch durch Erhitzung weiter prozessiert wird (interne Kommunikation mit einem Molkereivertreter).

2 Die Diversität der Rohmilchmikrobiota

2.1 Eintragsquellen von Mikroorganismen in die Rohmilch

Milch gilt aufgrund ihres hohen Nährstoffgehaltes an Protein, Fett, Laktose und Mineralien, des neutralen pH-Wertes sowie der hohen Wasseraktivität als vorzügliches Wachstumsmedium für Mikroorganismen (Frank, 2007; Fricker *et al.*, 2011; Fusco *et al.*, 2020; Quigley *et al.*, 2013a). Die Milch gesunder Kühe wird traditionell als steril angesehen (Tolle, 1980). Allerdings wird in neueren Untersuchungen ein endogener Transportweg von Mikroorganismen über den Darm zum Euter der Kuh hypothesiert, welche dann in die Milch sekretiert werden. Diese

Annahme basiert auf Human- und Mausstudien sowie dem Nachweis homologer Stämme der Gattungen *Ruminococcus*, *Bifidobacterium* sowie der *Peptostreptococcaceae* Familie sowohl in Fäzes und Blut als auch in den Milchdrüsen. Der Transport geschieht vermutlich über Immunzellen im Blutstrom (Young *et al.*, 2015). Auch in einer anderen Studie konnten Mikroorganismen in Milch von Mastitis-freien Kühen nachgewiesen werden, die direkt mithilfe einer Kanüle aus dem Euter steril entnommen wurde (Metzger *et al.*, 2018). Der Hauptteil der Rohmilchmikrobiota stammt jedoch aus Kontaminationen, die während und nach dem Melken entstehen. Als wichtige Kontaminationsquellen gelten hierbei die Oberfläche des Kuheuters, Melkutensilien, Luft bzw. Staub, Wasser, Erde, Futter und Gras (Cousin, 1982; Murphy & Boor, 2000; Vacheyrou *et al.*, 2011; Verdier-Metz *et al.*, 2009). Die komplexe und variable Zusammensetzung der Mikrobiota wird durch eine Vielzahl an Faktoren beeinflusst, wie beispielsweise Tiergesundheit, Haltungsform, Hygienepraktiken, Tankgröße, Jahreszeit oder Laktationsphase (Carafa *et al.*, 2020; Doyle *et al.*, 2017a, 2017b; Fretin *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2018; Mallet *et al.*, 2012; McHugh *et al.*, 2020; Quigley *et al.*, 2013b; Verdier-Metz *et al.*, 2009). Im Falle einer Mastitis beispielsweise sind vermehrt die auslösenden bakteriellen Spezies wie *Streptococcus* spp., *Staphylococcus aureus*, andere Staphylococci, *Escherichia coli* oder *Bacillus* spp. vorhanden (Lima *et al.*, 2018). Auch die Biofilmbildung durch mangelnde Reinigung des Melksystems stellt eine potentielle Quelle für den verstärkten und kontinuierlichen Eintrag bestimmter Gram-negativer Gattungen oder Sporenbildner wie *Bacillus cereus* dar (Cherif-Antar *et al.*, 2016).

2.2 Zusammensetzung der Rohmilchmikrobiota

Als typische Vertreter der Rohmilchmikrobiota gelten benefizielle Mikroorganismen wie *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus* und *Corynebacterium*. Gram-positive Gattungen, die mit der Euterhaut assoziiert sind, wie *Bacillus*, *Turcibacter* und *Staphylococcus*, oder mit dem Darm, wie *Clostridium* und *Romboutsia*, werden ebenfalls häufig isoliert. Bei den Gram-Negativen dominieren *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Chryseobacterium* und *Acinetobacter*. Auch Enterobakterien wie *Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella* und *Salmonella* werden regelmäßig nachgewiesen (Parente *et al.*, 2020; Quigley *et al.*, 2011; Quigley *et al.*, 2013b; Samaržija *et al.*, 2012). Der Großteil der Rohmilchmikrobiota gilt als gesundheitlich unbedenklich, wohingegen wenige Arten ein Risiko darstellen können. Hierzu zählen unter anderem *Campylobacter jejuni*, *Listeria monocytogenes*, pathogene *Escherichia coli* oder *Salmonella* spp. (Champagne *et al.*, 1994; Lucey, 2015). Aus diesem Grund sollte Rohmilch, die direkt ab Hof verkauft wird, vor dem Verzehr nach § 17 Tierische Lebensmittel-Hygieneverordnung abgekocht werden (Tier-LMHV, 2021).

Während der gekühlten Lagerung der Rohmilch beim Erzeuger sowie im Stapeltank der Molkerei kommt es zu einer Selektion psychrotoleranter Mikroorganismen (De Jonghe *et al.*, 2011; Fricker *et al.*, 2011; Lafarge *et al.*, 2004; Rasolofo *et al.*, 2010). Als psychrotolerant bezeichnet man Arten, die bei Temperaturen unter 7 °C wachsen können, jedoch ein Temperaturoptimum zwischen 20 und 30 °C aufweisen (Vithanage *et al.*, 2016). Insgesamt entsteht dadurch eine Verschiebung der anfänglich von Gram-positiven Bakterien dominierten Mikrobiota hin zu Gram-negativen, die letztendlich häufig über 90 % betragen (Martins *et al.*, 2006). Auch reduziert sich die Artenvielfalt auf wenige dominante Gattungen wie *Pseudomonas*, *Lactococcus* oder *Acinetobacter* (von Neubeck *et al.*, 2015). Insbesondere die Dominanz von *Pseudomonas* wurde in mehreren Arbeiten festgestellt (De Jonghe *et al.*, 2011; Fricker *et al.*, 2011; Lafarge *et al.*, 2004; Marchand *et al.*, 2009a; Rasolofo *et al.*, 2010; Sørhaug & Stepaniak, 1997; Vithanage *et al.*, 2016; von Neubeck *et al.*, 2015).

3 *Pseudomonas* als Verderbserreger für Rohmilch

3.1 Die Gattung *Pseudomonas*

Pseudomonas spp. sind aerob, stäbchenförmig, polar begeißelt und psychrotolerant (Moore *et al.*, 2006). Sie stellen mit aktuell 245 valide beschriebenen Spezies die artenreichste Gattung unter den Gram-negativen Bakterien dar (Parte, 2014). Dank neuer Technologien wie dem Next Generation Sequencing (NGS) werden laufend neue Spezies entdeckt und beschrieben (Gomila *et al.*, 2015). Alleine 2020 wurden 30 Spezies (Parte, 2014) aus verschiedenen Habitaten wie Abwasser (Qin *et al.*, 2020), Pflanzen (Sawada *et al.*, 2020) oder tierischen Lebensmitteln wie Fleisch (Lick *et al.*, 2020a; Lick *et al.*, 2020b) und Rohmilch (Gieschler *et al.*, 2019; Hofmann *et al.*, 2020a, 2020b) charakterisiert, was die Variabilität und Anpassungsfähigkeit dieser Gattung verdeutlicht (Gomila *et al.*, 2015). Sie umfasst zudem phytopathogene Spezies wie *Pseudomonas syringae* (Moore *et al.*, 2006), sowie mit *Pseudomonas aeruginosa* auch eine potentiell humanpathogene Spezies, die multiresistent und verantwortlich für nosokomiale Infektionen ist (Dufour *et al.*, 2008; Poole, 2011).

Die Gattung wurde erstmals 1894 von dem deutschen Botaniker Walter Migula erwähnt (Migula, 1894). In den folgenden Jahrzehnten wurden viele neue Isolate anhand der phänotypischen Eigenschaften der Gattung *Pseudomonas* zugeordnet. Neuere, DNA-basierte Methoden erlaubten es Norberto L. Palleroni 1973, die Großgruppe der *Pseudomonas* sensu lato in fünf Gruppen basierend auf rRNA-DNA Hybridisierung einzuteilen. Die Gruppe 1 enthielt die uns heute bekannte *Pseudomonas* sensu stricto Gruppe, mit *Pseudomonas aeruginosa*, allen fluoreszierenden Spezies wie *Pseudomonas fluorescens* sowie weiteren, nicht-

fluoreszierenden Spezies wie *Pseudomonas stutzeri* (Palleroni, 2010). Die damalige *Pseudomonas* sensu lato Gruppe entspricht heute in etwa den *Proteobacteria*. Seitdem wurde die Taxonomie mehrmals revidiert. Aufgrund der engen Verwandtschaft dieser Gattung ist eine Differenzierung auf Basis der 16S rRNA nicht ausreichend. Modernere, genombasierte Methoden wie *Multilocus Sequence Analysis* (MLSA) oder *Average Nucleotide Identity* (ANI) vereinfachten die taxonomische Einordnung von *Pseudomonas* Spezies (Gomila *et al.*, 2015). Mittlerweile kann die Gattung *Pseudomonas* in 14 Hauptgruppen unterteilt werden. Die größte davon ist der *P. fluorescens*-Komplex, welcher weiter in neun Untergruppen separiert werden kann (*P. protegens*-, *P. chlororaphis*-, *P. corrugata*-, *P. koreensis*-, *P. jessenii*-, *P. mandelii*-, *P. fragi*-, *P. gessardii*- und *P. fluorescens*-Gruppe) (Garrido-Sanz *et al.*, 2016). Typische Vertreter aus Rohmilch sind der *P. fragi*- (z.B. *P. lundensis*), der *P. gessardii*- (z.B. *P. proteolytica*) sowie der *P. fluorescens*-Gruppe zugeordnet (z.B. *P. azotoformans*) (von Neubeck *et al.*, 2015).

3.2 Proteolytischer Verderb von Rohmilch durch die AprX Peptidase

Pseudomonas gilt als bekannter Verderbserreger von gekühlten Produkten wie Fleisch, Fisch, Fertigsalaten oder Rohmilch (Champagne *et al.*, 1994; Dogan & Boor, 2003; Moore *et al.*, 2006). Gründe hierfür sind die Eigenschaft der Psychrotoleranz, die Fähigkeit zur Biofilmbildung sowie die Sekretion von Exoenzymen wie Peptidasen, Lipasen und Lecithinasen (Dogan & Boor, 2003; Machado *et al.*, 2017). Das Ziel der Produktion dieser Enzyme, die auch von weiteren Gattungen wie beispielsweise *Acinetobacter* gebildet werden, ist der Abbau der Hauptbestandteile des umgebenden Mediums zum Zweck der Nährstoffverwertung (Machado *et al.*, 2017). Durch die Prädominanz von *Pseudomonas* in gelagerter Rohmilch sowie dessen vergleichsweise starke Peptidaseproduktion gilt dieser Keim als Hauptverursacher des enzymatischen Verderbs von Milchprodukten (Baur *et al.*, 2015a; von Neubeck *et al.*, 2015). Die für den Milchverderb relevante produzierte Peptidase ist die alkalische Metallopeptidase AprX, die zur Serralysin Familie gehört und durch das *aprX-lipA2*-Operon gebildet wird (Dufour *et al.*, 2008; Woods *et al.*, 2001). Sie hat eine Größe von 45-50 kDa (Marchand *et al.*, 2009b), weist die höchsten Aktivitäten bei 37-45 °C auf und ist funktionell bei leicht saurem bis alkalischem pH (Dufour *et al.*, 2008; Marchand *et al.*, 2009b; Martins *et al.*, 2015). Bereits 1995 konnte die Struktur der AprX Peptidase von *P. aeruginosa* aufgeklärt werden. Wichtig für die enzymatische Aktivität ist ein Zink-Ion im aktiven Zentrum. Fünf Calcium-Ionen sorgen hingegen für Stabilität (Abbildung 2) (Miyatake *et al.*, 1995). Ein hoher Gehalt an hydrophoben Aminosäuren sowie das Fehlen an Cysteinresten trägt zur hohen strukturellen Flexibilität des Proteins bei, was eine schnelle und akkurate Enzymrenaturierung nach Erhitzung ermöglicht (Barach & Adams, 1977; Dufour *et al.*, 2008).

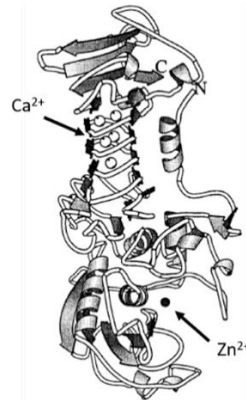


Abbildung 2: Struktur der AprX-Peptidase

Die AprX-Peptidase, die als erstes bei *Pseudomonas aeruginosa* gefunden wurde, weist ein Zink-Atom im katalytischen Zentrum sowie fünf Calcium-Ionen zur Stabilität auf (modifiziert nach Miyatake *et al.*, 1995).

Die Exoenzyme in der Rohmilch, insbesondere die AprX-Peptidase, zeichnen sich durch eine hohe Hitzeresistenz aus. AprX kann Ultrahocherhitzung (*ultra high temperature*, UHT) bei 110-160 °C mit Restaktivitäten von bis zu 90 % überstehen (Barach & Adams, 1977; Baur *et al.*, 2015b; Mu *et al.*, 2009; Volk *et al.*, 2019; Yuan *et al.*, 2018). Daher besteht insbesondere bei lang haltbaren Milchprodukten die Gefahr des proteolytischen Verderbs (Machado *et al.*, 2017). Im Gegensatz zu Frischmilchprodukten wie Joghurt, die rasch durch mikrobielle Prozesse wie Gasbildung durch heterofermentative Milchsäurebakterien verderben, werden bei der UHT-Behandlung alle Mikroorganismen abgetötet (Ledenbach & Marshall, 2009). Die hitzeresistenten Enzyme bleiben im Endprodukt aktiv und können bei der langen Lagerung zu unerwünschten Produktveränderungen führen (Baur *et al.*, 2015a). Abbildung 3 fasst die Produktion von hitzestabilen Enzymen durch die Rohmilchmikrobiota zusammen.

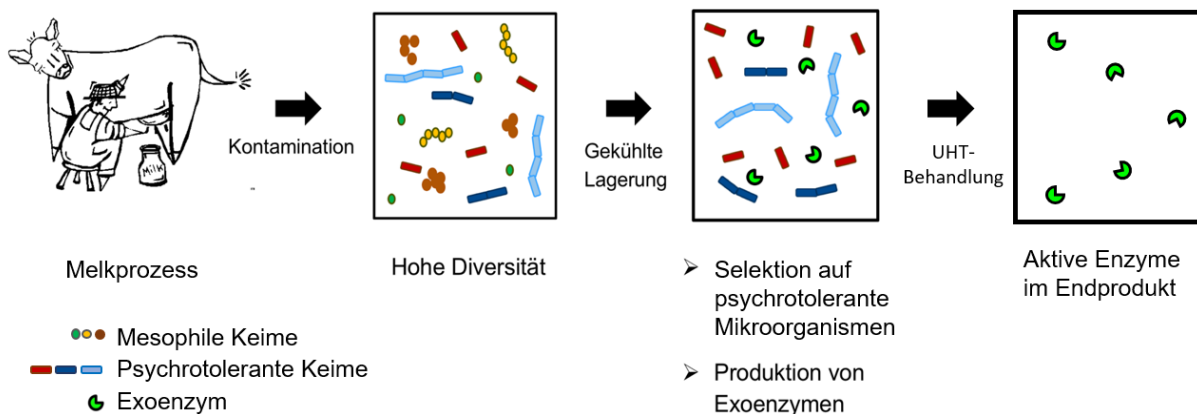


Abbildung 3: Produktion hitzestabiler Enzyme während der Rohmilchlagerung

Kontaminationen während der Milchproduktion führen zu einer anfänglich hohen Diversität an Mikroorganismen in der Rohmilch. Während der gekühlten Lagerung erfolgt eine Selektion auf psychrotolerante Arten. Einige davon produzieren Exoenzyme, welche aufgrund ihrer Hitzeresistenz die UHT-Behandlung überstehen und im Endprodukt aktiv bleiben.

Die AprX Peptidase führt in der Milch zur Hydrolyse des Caseins (Machado *et al.*, 2017). Die insgesamt vier Casein-Arten (α_{s1} -, α_{s2} -, β - und κ -Casein) liegen zusammen mit Calciumphosphat als micellarer Komplex vor. Das κ -Casein stabilisiert hierbei die Micelle, da es sich mit einem hydrophilen Molekülteil auf der Oberfläche befindet (Frister, 2007). Verschiedene *Pseudomonas*-Spezies hydrolisieren bevorzugt das β - oder das κ -Casein (Machado *et al.*, 2017). Zunächst werden dadurch kleine, säurelösliche Peptide abgespalten, die zu einem bitteren Fehl aroma führen. Bei fortschreitender Proteolyse werden die Micellen durch Hydrolyse der hydrophilen Komponenten des κ -Caseins destabilisiert und es kommt zur Partikelbildung, Aufrahmung des Milchfetts, Proteinsedimentation und schließlich zur Gelbildung der Milch, was diese ungenießbar macht (Stoeckel *et al.*, 2016). In Abbildung 4 sind die verschiedenen Schritte des proteolytischen Verderbs von UHT-Milch ersichtlich, die in einer Studie von Stoeckel *et al.* untersucht wurden. Hierzu wurde UHT-Milch mit *Pseudomonas weihenstephanensis* inokuliert und 4-5 Tage bei 6 °C gelagert. Diese beimpfte Milch wurde in verschiedenen Anteilen mit frischer Rohmilch gemischt, UHT behandelt und anschließend vier Monate bei 20 °C gelagert. Hierdurch wurden variierende Konzentrationen an *P. weihenstephanensis* und dessen produzierter Peptidase in Rohmilch vor UHT-Behandlung simuliert.



Abbildung 4: Visuelle Effekte des proteolytischen Verderbs von UHT-Milch

Effekte des proteolytischen Verderbs durch die AprX-Peptidase bei UHT-Milch, die vor der Erhitzung mit verschiedenen Konzentrationen an *P. weihenstephanensis* inkubiert (zunehmende Konzentration von links nach rechts) und danach 4 Monate bei 20 °C gelagert wurde. Die Pfeile markieren die Dicke der Rahmschicht. (Bild aus Stoeckel *et al.*, 2016)

In Abhängigkeit von der Lagertemperatur sowie der enzymatischen Aktivität kann der proteolytische Verderb bereits vor Erreichen des Mindesthaltbarkeitsdatums auftreten. Gelbildung wurde jedoch nicht vor vier Monaten sowie unter einer proteolytischen Aktivität von 0,16 Pikokatal pro ml (pkat/ml) beobachtet (Stoeckel *et al.*, 2016). Ein Katal entspricht der Enzymmenge, die notwendig ist, um unter Optimalbedingungen ein Mol Substrat pro Sekunde umzusetzen (Mohr & Schopfer, 1978). Zum Auftreten eines bitteren Fehl aromas in Milch sind bei einer Lagerungsdauer von vier Monaten allerdings bereits 0,03 pkat/ml ausreichend

(Stoeckel *et al.*, 2016). Dies führt zu hohen Verlusten für die Milchindustrie, die insbesondere durch den zunehmenden Export in Nicht-EU Länder auf möglichst lange Haltbarkeiten angewiesen sind.

3.3 Einflüsse auf die proteolytische Aktivität

Die Fähigkeit zur Produktion proteolytischer und lipolytischer Enzyme ist bei *Pseudomonas* Spezies-, teilweise sogar Stamm-spezifisch. Von Neubeck *et al.* (2015) konnten nachweisen, dass 85 % der isolierten Pseudomonaden aus 20 Rohmilchproben sowohl proteolytisch als auch lipolytisch waren. Reine lipolytische Aktivität wurde nur selten detektiert (von Neubeck *et al.*, 2015). Zudem unterscheiden sich die Spezies auch in der Stärke ihrer proteolytischen Aktivität, was mit Unterschieden im Aufbau des *aprX-lipA2*-Operons assoziiert ist (Maier *et al.*, 2020). Das Operon wurde erstmalig bei *P. fluorescens* durch Woods *et al.* (2001) beschrieben und besteht aus acht Genen. Diese codieren die AprX Peptidase (*aprX*), einen Peptidase-Inhibitor (*aprI*), ein Typ I Sekretionssystem (*aprDEF*), zwei putative Autotransporter-Homologe prtA und prtB (*prtAB*) sowie die LipA2-Lipase (vgl. Abbildung 5D) (Woods *et al.*, 2001). Bei anderen Spezies kann noch ein weiteres Lipase-Gen (*lipA1*) vorhanden sein. Zudem variiert die Anordnung der Lipase-Gene sowie von *prtA/B*. Das Cluster *aprX-aprI-aprD-aprE-aprF* ist jedoch bei allen Typen gleich. Abbildung 5 zeigt die Anordnung der verbreitetsten *aprX-lipA2*-Operonstrukturen mit den jeweiligen typischen Vertretern. Die stärksten proteolytischen Aktivitäten können für Typ D bei beispielsweise *P. proteolytica* nachgewiesen werden, die schwächsten unter anderem bei *P. fragi* (Maier *et al.*, 2020).

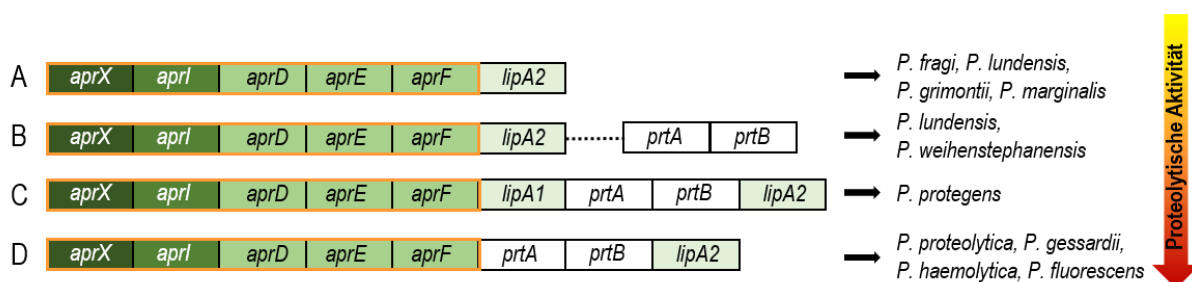


Abbildung 5: Aufbau der *aprX-lipA2*-Operontypen von *Pseudomonas*

Die vier Operontypen (A-D) unterscheiden sich durch Lage und Anwesenheit der Gene für die putativen Autotransporter-Homologe PrtAB sowie der Lipasen LipA1 und LipA2. Die konservierte Region ist orange markiert. Je Operontyp sind typische Vertreter gezeigt. Die Stärke der proteolytischen Aktivität nimmt zwischen Typ A und D zu (verdeutlicht durch den Pfeil). *aprX*, Peptidase; *aprI*, Proteaseinhibitor; *aprDEF*, Typ I Sekretionssystem; *lipA1*, Lipase A 1; *lipA2*, Lipase A 2; *prtAB*, putativer Autotransporter A/B

Neben der Operonstruktur ist die proteolytische Aktivität bzw. Peptidaseproduktion von diversen weiteren Faktoren abhängig. Eine wichtige davon ist die Temperatur, da

insbesondere bei kalten Temperaturen in Milch mehr AprX gebildet wird (Baur *et al.*, 2015a; von Neubeck *et al.*, 2015), was ein relevanter Aspekt bei kühl gelagerter Rohmilch ist. Zu den weiteren Einflussfaktoren gehören die Zusammensetzung des umgebenden Mediums (Nicodeme *et al.*, 2005), Eisengehalt (Maunsell *et al.*, 2006), Phasenvariation (Chabeaud *et al.*, 2001), RNA-Strukturen (McKellar & Cholette, 1987) sowie Quorum Sensing bzw. Zelldichte (Machado *et al.*, 2017; Sørhaug & Stepaniak, 1997). Letzteres ist insbesondere bei Biofilmen relevant, da es Hinweise gibt, dass *Pseudomonas* dort größere AprX-Mengen sekretiert als planktonische Zellen, was wiederum bedeutsam für die Milchindustrie ist (Teh *et al.*, 2012; Teh *et al.*, 2014). Weiterhin wird die Peptidaseproduktion durch das GacS/GacA-Zweikomponentensystem positiv reguliert (Cheng *et al.*, 2013), welches bekannt für die Expressionsregulation von Sekundärmetaboliten und Proteinsekretionssystemen in vielen bakteriellen Spezies ist (Machado *et al.*, 2017). Insgesamt sind die komplexen regulatorischen Prozesse der AprX-Produktion noch nicht vollständig verstanden und Teil der aktuellen Forschung. Aus diesem Grund konnte bisher kein Grenzwert für die *Pseudomonas*-Keimzahl zur Identifikation von Rohmilch festgelegt werden, die ein hohes Risiko für proteolytischen Verderb trägt. Vithanage *et al.* (2017) stellte eine erhöhte proteolytische Aktivität ab einer Keimzahl von $5 \cdot 10^4$ KbE \cdot ml $^{-1}$ an psychrotoleranten, proteolytischen Bakterien fest. Demgegenüber zeigten frühere Arbeiten, dass bedeutende Peptidase-Mengen erst ab Keimzahlen von 10^7 - 10^8 KbE \cdot ml $^{-1}$ gebildet werden (Guinot-Thomas *et al.*, 1995; McKellar, 1982). Da solche Belastungen der Rohmilch mit *Pseudomonas* in der Praxis selten vorkommen, die Problematik am enzymatischen Verderb jedoch trotzdem besteht, erscheint die Keimzahl von Vithanage *et al.* (2017) als realistischer.

3.4 Einflüsse auf die *Pseudomonas*-Prävalenz in Rohmilch

Als Hauptfaktor für hohe *Pseudomonas*-Keimzahlen in Rohmilch gilt eine lange Lagerdauer bei kühlen Temperaturen (De Jonghe *et al.*, 2011; Vithanage *et al.*, 2017). Allerdings wird zudem ein initialer Eintrag durch persistierende Stämme in den Melkanlagen hypothesiert, vermutlich aufgrund von Biofilmbildung (Nucera *et al.*, 2016). In vielen Studien konnten *Pseudomonaden* an verschiedenen Stellen bei Erzeugerbetrieben nachgewiesen werden (Capodifoglio *et al.*, 2016; Flach *et al.*, 2014; Leriche & Fayolle, 2012; Nucera *et al.*, 2016; Vidal *et al.*, 2017; Weber *et al.*, 2014). Erhöhte *Pseudomonas*-Keimzahlen in Rohmilch wurden assoziiert mit Kontaminationen im Trinkwasser (Leriche & Fayolle, 2012; Nucera *et al.*, 2016), Jahreszeit (Capodifoglio *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2018; Mallet *et al.*, 2012), Reinigungsmängeln (Leriche & Fayolle, 2012), Praktiken zur Euterhygiene (Doyle *et al.*, 2017b; Vidal *et al.*, 2017) sowie Art der Tierhaltung (Carafa *et al.*, 2020; Mallet *et al.*, 2012), jedoch häufig mit

widersprüchlichen Ergebnissen. Bei der Jahreszeit gibt es beispielsweise Studien aus China, Norwegen oder Australien, in denen höhere *Pseudomonas*-Keimzahlen in Monaten mit niedrigeren Temperaturen gemessen wurden (Li *et al.*, 2018; Porcellato *et al.*, 2018; Vithanage *et al.*, 2016). Dahingegen konnte in einer französischen Studie von Leriche & Fayolle (2012) kein Einfluss der Jahreszeit auf die *Pseudomonas*-Belastung festgestellt werden. Problematisch ist der Vergleich von Studien verschiedener Länder aufgrund von Unterschieden in Klima, Herdengrößen oder Hygienemanagement. In den USA beispielsweise sind Herdengrößen mit über 2000 Kühen üblich (Natzke, 2019). In den Niederlanden benutzen bereits über ein Viertel der Betriebe einen Melkroboter (ZuivelNL, 2019). Diese Bedingungen spiegeln nur schwer die deutschen Betriebsstrukturen wider, die in 1.2 erläutert wurden. Umfassende Analysen möglicher Einflüsse auf die *Pseudomonas*-Keimzahl deutscher Rohmilch sind bisher nicht erfolgt.

4 Taxonomische Einordnung neuer Bakterienspezies

4.1 Geschichte der Taxonomie

Die Erfindung des Mikroskops durch Antoni van Leeuwenhoek im 17. Jahrhundert ermöglichte ihm wenig später die Entdeckung der Mikroorganismen. Diese wurden in den ersten Ansätzen der Klassifikation auf Basis von morphologischen Unterschieden in Gruppen eingeteilt (Porter, 1976; Zhu *et al.*, 2015). Erst mit der Züchtung von Reinkulturen Ende des 19. Jahrhunderts wurden Techniken zur physiologischen Charakterisierung entwickelt (Gevers *et al.*, 2006; Roselló-Móra & Amann, 2001). Nur wenig später legte Walter Migula die Grundsteine der Systematik und Taxonomie von Mikroorganismen (Migula, 1894, 1897). Mit „Bergey’s Manual of Determinative Bacteriology“ wurden 1923 Leitlinien zur Identifikation von Bakterien veröffentlicht (Bergey, 1923; Roselló-Móra & Amann, 2001). Im Jahre 1980 etablierte Victor B.D. Skerman mit der „Approved Lists of Bacterial Names“ ein bis heute international anerkanntes Verzeichnis, in dem alle valide beschriebenen Arten gelistet sind. Damit konnte ein Überblick über die bis dato beschriebenen Arten gewonnen werden und jene, die fälschlicherweise mehrfach charakterisiert wurden, identifiziert und revidiert werden (Skerman *et al.*, 1980; Sly, 1995). In den letzten 100 Jahren war die taxonomische Einordnung neuer Arten geprägt von dem Gegensatz aus Konservatismus und Fortschritt. Den modernsten Technologien wie der Genomsequenzierung stehen nach wie vor traditionelle Leitlinien und Standards zur Charakterisierung neuer Taxa gegenüber (Thompson *et al.*, 2015).

4.2 Begriffsdefinitionen

Die Begriffe „Systematik“ und „Taxonomie“ werden häufig synonym verwendet (Kämpfer & Glaeser, 2012). Systematik ist die Studie aller Arten der Diversität von Organismen, inklusive der Beziehungen zwischen ihnen (Simpson, 1961). Taxonomie hingegen ist lediglich ein Teilbereich der Systematik und unterteilt in drei Kategorien (Kämpfer & Glaeser, 2012). Die Klassifikation (i) ist die Einordnung von Gruppen an Organismen (Taxa) in ein hierarchisches System anhand biochemischer, physiologischer, genetischer und morphologischer Charakteristika (Gevers *et al.*, 2006). Mit zunehmender Ähnlichkeit werden Isolate in Domänen, Phylum, Klasse, Ordnung, Familie, Gattung oder Art eingeordnet (Tindall *et al.*, 2010). Mithilfe der Nomenklatur (ii) werden die Arten mit einer binominalen Bezeichnung benannt, bei der eine Spezies in ihrem Namen direkt einer Gattung zugeordnet wird (Tindall *et al.*, 2010). Die Benennung erfolgt hierbei nach den international anerkannten Regeln des „Bakteriologischen Codes“ (Lapage *et al.*, 1992) und hat ihre Ursprünge im binären System von Carl von Linné von 1753 zur Benennung von Pflanzen, welches im Werk „Species Plantarum“ niedergeschrieben wurde (Mackenbach, 2004). Der letzte Bereich der Taxonomie umfasst die Identifikation unbekannter Organismen (iii), indem diese anhand bestimmter Charakteristika zu den bestehenden Gruppen der Klassifikation (i) zugeordnet werden (Gevers *et al.*, 2006). Der Art- bzw. Speziesbegriff wird nach wie vor kontrovers diskutiert und wird am besten als monophyletische und genomisch kohärente Gruppe an Organismen beschrieben, die eine hohe Übereinstimmung in einer Vielzahl an Charakteristiken aufweisen, sich jedoch von anderen Spezies durch bestimmte Merkmale abgrenzen (Roselló-Móra & Amann, 2001; Stackebrandt, 2006).

4.3 Charakterisierung neuer Arten

Bei Vorliegen eines unbekanntes Isolates wird dieses anhand genetischer, chemotaxonomischer, physiologischer und/oder biochemischer Eigenschaften charakterisiert. Bei Übereinstimmung dieser Eigenschaften mit einer bereits bestehenden Gruppe kann das unbekanntes Isolat identifiziert und zu dieser klassifiziert werden. Ist dies nicht der Fall, kann das Isolat erst nach erfolgter Neubeschreibung gemäß den taxonomischen Vorschriften klassifiziert werden (Trüper & Schleifer, 2006). Hierfür existieren mittlerweile für einige Gattungen Richtlinien, jedoch keine allgemein gültige Definition (Logan *et al.*, 2009; Stackebrandt *et al.*, 2002; Tindall *et al.*, 2010). In den meisten Fällen liefert ein Abgleich der 16S rRNA Sequenz mit in öffentlichen Datenbanken wie EzTaxon hinterlegten Sequenzen valide beschriebener Arten erste Hinweise auf das Vorliegen einer potentiell neuen Art (Roselló-Móra & Amann, 2001; Tindall *et al.*, 2010). Liegen die Ähnlichkeiten zu den anderen

Arten unter 98,65 %, indiziert dies das Vorliegen einer neuen Spezies (M. Kim *et al.*, 2014). Allerdings ist für manche Gattungen die 16S rRNA Sequenz nicht ausreichend differenzierend genug, weshalb ggf. zusätzlich noch weitere Gene als phylogenetische Marker analysiert werden müssen, wie beispielsweise die *rpoD*-Sequenz bei *Pseudomonas* (Mulet *et al.*, 2009). Die 16S rRNA Phylogenie wird dennoch als wichtiger Bestandteil einer validen Neubeschreibung angesehen, da sie eine aktuelle und universelle Referenz bildet (Gevers *et al.*, 2006; Stackebrandt *et al.*, 2002).

Die weiterführenden Arbeiten basieren auf einem polyphasischen Ansatz, in dem die potentiell neue Art anhand von phänotypischen, chemotaxonomischen und phylogenetischen Merkmalen charakterisiert wird (Gevers *et al.*, 2006; Vandamme *et al.*, 1996). Hierbei ist es wichtig, die Typstämme der am nächsten verwandten Arten parallel zu analysieren, um unter gleichen Laborbedingungen die neue Spezies anhand der Ergebnisse abgrenzen zu können (Tindall *et al.*, 2010). Bei den phänotypischen Analysen werden morphologische Charakteristika wie Zellgröße, Koloniemorphologie oder Gramverhalten sowie physiologische Eigenschaften wie Wachstumsbedingungen oder die Verstoffwechslung bestimmter Zucker analysiert (Tindall *et al.*, 2010; Trüper & Schleifer, 2006). Die chemotaxonomische Charakterisierung umfasst unter anderem die Analyse der respiratorischen Chinone oder der Zusammensetzung des Peptidoglycans (Tindall *et al.*, 2010). Den phylogenetischen Analysen kommt aufgrund der modernen Methoden wie der Sequenzierung von kompletten Genomsequenzen immer mehr Bedeutung zu (Kämpfer & Glaeser, 2012). Chun *et al.* (2018) erarbeitete hierzu Richtlinien zur Verwendung genomischer Daten für die Taxonomie von Prokaryoten. Als Referenzstandard gilt nach wie vor die in den 1960er Jahren entwickelte DNA-DNA-Hybridisierung (DDH). Diese wurde aufgrund ihres hohen Arbeitsaufwandes und gewissen Schwächen mittlerweile durch andere Techniken ersetzt, deren Grenzwerte zur Artdifferenzierung jedoch stets auf jene der DDH bezogen wurden (Gevers *et al.*, 2006; Tindall *et al.*, 2010). Neben den bereits erwähnten Einzelgenanalysen zur primären Identifizierung des unbekanntes Isolates werden beispielsweise mehrere alignierte *Housekeeping*-Gene wie z.B. in der *Multilocus-Sequence-Analysis* (MLSA) oder der *Up-to-date bacterial core gene* (UBCG) Analyse verwendet, um eine höhere Auflösung zu erreichen (Mulet *et al.*, 2010; Na *et al.*, 2018). Zunehmend werden auch Analysen zum Gesamtgenomvergleich wie die *Average Nucleotide Identity* (ANI) zur Berechnung der durchschnittlichen Übereinstimmung der Nukleotide herangezogen. Ein ANI von 94-96 % entspricht hierbei der etablierten DDH zur Speziesabgrenzung von 70 % (Chun & Rainey, 2014).

5 Zielsetzung

Das Ziel der Arbeit war die umfassende Analyse der *Pseudomonas*-Belastung deutscher Rohmilch sowie den möglichen Einflussfaktoren auf das Wachstum in Rohmilch. Weiterhin sollten Eintrittsrouten dieser Spezies in die Rohmilch identifiziert werden. Aus den Erkenntnissen sollen Handlungsempfehlungen abgeleitet werden können, die zu einer Reduktion der *Pseudomonas*-Belastung in der Rohmilch und dadurch zu einer geringeren Produktion proteolytischer Enzyme führen sollen. Dadurch sollen Produkte mit erhöhter Stabilität gewährleistet werden, die der internationale Export fordert. Da die hitzetoleranten Peptidasen nicht nachträglich aus der Milch entfernt werden können, ist eine Reduktion nur durch die Verhinderung des Eintrages und des Wachstums von *Pseudomonas* möglich.

Für diese Analysen wurden von 444 Rohmilchproben aus den Hofsammeltanks von 122 Erzeugerbetrieben die *Pseudomonas*-Keimzahlen per qPCR sowie die Gesamtkeimzahlen per Durchflusszytometrie ermittelt. Weiterhin sollte die Rohmilchmikrobiota der Proben per 16S rRNA Amplikonsequenzierung analysiert werden. Durch die Korrelation der Ergebnisse mit hofspezifischen Parametern wie Melksystem oder Tierhaltung sowie durch Stufenkontrollen und der Analyse von Milchwagen-Sammeltouren sollten mögliche Einflussfaktoren auf die *Pseudomonas*-Keimzahl in Rohmilch identifiziert werden.

Der zweite Schwerpunkt der Arbeit lag auf der Untersuchung dreier unbekannter, Exoenzymproduzierender *Pseudomonas*-Spezies aus Rohmilch oder Milchprodukten. Anhand eines polyphasischen Ansatzes sollten die Isolate charakterisiert und differenzierende Merkmale zur Abgrenzung identifiziert werden, um die Isolate als neue Spezies valide zu beschreiben, auch im Hinblick auf ihre Relevanz für den proteolytischen Milchverderb.

Material und Methoden

1 Medien und Lösungen

Bei den in Tabelle 1 gelisteten Nährmedien und Lösungen wurden die angegebenen Komponenten, wenn nicht anders vermerkt, in destilliertem Wasser gelöst und bei 121 °C für 15 min autoklaviert.

Tabelle 1: Bestandteile der verwendeten Nährmedien und Lösungen

Caseinagar (Reddy <i>et al.</i> , 2007)	100 g/l	Magermilchpulver	<i>Komponente A</i>
	10 g/l	Phytone™ (Sojapepton)	
	6 g/l	Fleischextrakt	
	30 g/l	Agar-Agar	
			<i>A und B separat autoklavieren und 1:1 mischen</i>
		pH 7,0 ± 0,2	
Cetrimid-Agar	45,3 g/l	Fertigmedium (<i>Merck KGaA</i>)	
	10,0 ml/l	Glycerin pH 7,2 ± 0,2	
Cephalothin-Natrium Fusidat-Cetrimid (CFC) Agar	48,4 g/l	Fertigmedium (<i>Merck KGaA</i>)	
		pH 7,0 ± 0,2	
Glycerin-Medium	10 g/l	Natriumglutamat	
	16,0 g/l	Lactose	
	1,0 g/l	Ascorbinsäure	
	1,0 g/l	Agar-Agar	
	120 g/l	Glycerin	
King A Agar (King <i>et al.</i> , 1954)	20 g/l	Gelatine Pepton	
	2,3 g/l	MgCl ₂ (x 6 H ₂ O)	
	10 g/l	K ₂ SO ₄	
	10 g/l	Agar-Agar	
	10 ml/l	Glycerin pH 7,2 ± 0,2	
King B Agar (King <i>et al.</i> , 1954)	20 g/l	Caseinhydrolysat	
	1,5 g/l	K ₂ HPO ₄	
	3,07 g/l	MgSO ₄ (x 7 H ₂ O)	
	10 g/l	Agar-Agar	
	10 ml/l	Glycerin pH 7,2 ± 0,2	
Kohlenstoffquellen- Lösungen	25,6 mg/ml	1-o-Methyl-α-D-Glucopyranosid	
	26,4 mg/ml	α-D-(+)-Melibiose	
	26,4 mg/ml	α-D-Melezitose	
	10,0 mg/ml	β -D-Gentiobiose	
	2; 1 mg/ml	Aesculin; Eisencitrat	
	21,6 mg/ml	Arbutin	
	27,2 mg/ml	D-Adonit	
	21,6 mg/ml	D-Amygdalin	
	28,0 mg/ml	D-Arabinose	
	28,0 mg/ml	D-Arabit	
	26,4 mg/ml	D-Cellobiose	

25,6 mg/ml	D-Fucose
28,0 mg/ml	D-Fructose
28,0 mg/ml	D-Galactose
36,8 mg/ml	D-Gluconsäure-Kaliumsalz
31,2 mg/ml	D-Glucose
28,0 mg/ml	D-Lactose
28,0 mg/ml	D-Lyxose
28,0 mg/ml	D-Maltose
27,2 mg/ml	D-Mannit
28,0 mg/ml	D-Mannose
31,2 mg/ml	D-Raffinose
28,0 mg/ml	D-Ribose
20,8 mg/ml	D-Salicin
27,2 mg/ml	D-Sorbit
26,4 mg/ml	D-Sucrose
28,0 mg/ml	D-Tagatose
26,4 mg/ml	D-Trehalose
26,4 mg/ml	D-Turanose
28,0 mg/ml	D-Xylose
27,2 mg/ml	Dulcit
28,8 mg/ml	Erythrit
32,8 mg/ml	Glycerin
25,6 mg/ml	Glycogen
15,2 mg/ml	Harnstoff
25,6 mg/ml	Inulin
28,0 mg/ml	L-Arabinose
28,0 mg/ml	L-Arabit
25,6 mg/ml	L-Fucose
27,2 mg/ml	L-Rhamnose
28,0 mg/ml	L-Sorbose
28,0 mg/ml	L-Xylose
25,6 mg/ml	Methyl- α -D-Mannopyranosid
25,6 mg/ml	Methyl- β -D-Xylopyranosid
28,0 mg/ml	Myo-Inosit
25,6 mg/ml	N-Acetyl-D-Glucosamin
28,0 mg/ml	Xylit

Zucker getrennt in MilliQ-Wasser gelöst und sterilfiltriert

Motilitätsmedium	30 g/l	TSB Fertigmedium (<i>Merck KGaA</i>)
	3,0 g/l	Agar-Agar pH 7,3 \pm 0,2
NaCl-Bouillons	0,5-10 % NaCl	0-95 g/l NaCl 30 g/l TSB Fertigmedium (<i>Merck KGaA</i>) (enthält 5g/L NaCl)
	0 % NaCl	17 g/l Caseinhydrolysat 3 g/l Phytone™ (Sojapepton) 2,5 g/l D(+)-Glucose Monohydrat 2,5 g/l KH ₂ PO ₄
Na-EDTA (0.3 M)	112 g/l	EDTA-Dinatriumsalz (<i>Carl Roth GmbH & Co. KG</i>) pH 8,0 \pm 0,2
Nitratbouillon (Reddy <i>et al.</i> , 2007)	30 g/l	TSB Fertigmedium (<i>Merck KGaA</i>)
	1 g/l	KNO ₃
	1,7 g/l	Agar-Agar pH 7,0 \pm 0,2

pH-Bouillons (Xu <i>et al.</i> , 2005)	pH 4,0-5,5	0,1 M Zitronensäure 0,1 M Natriumcitrat
	pH 6,0-8,0	0,1 M KH_2PO_4 0,1 M NaOH
	pH 8,5-10	0,1 M NaHCO_3 0,1 M Na_2CO_3
<i>pH vor dem Autoklavieren grob einstellen (pH 4,0 – 10 in Schritten von 0,5), danach exakt einstellen und die Medien sterilfiltrieren (Porengröße 0,2 μm)</i>		
Ringer-Lösung (1/4 stark)	2 St/l	Ringer-Tabletten (Merck KGaA)
Stärke-Agar (Reddy <i>et al.</i> , 2007)	5 g/l 3 g/l 2 g/l 15 g/l	Phytone™ (Sojapepton) Fleischextrakt Lösliche Stärke Agar-Agar pH 7,5 ± 0,2
TBE-Puffer (0,5x)	5,4 g/l 2,75 g/l 0,185 g/l	TRIS Borsäure EDTA-Dinatriumsalz pH 8,0 ± 0,2
Tributyrynagar (Willis, 1960)	2,5 g/l 2,5 g/l 3,0 g/l 12 g/l 4 ml/l 10 ml/l	Fleischextrakt Caseinhydrolysat Hefeextrakt Agar-Agar TWEEN 80 Tributyryn pH 7,5 ± 0,2
Trypticase Soja Agar (TSA)	40 g/l	Fertigmedium (Oxoid GmbH) pH 7,3 ± 0,2
Trypticase Soja Bouillon (TSB)	30 g/l	Fertigmedium (Merck KGaA) pH 7,4 ± 0,2
R2A-Medium (Reasoner & Geldreich, 1985)	15,2 g/l	Fertigmedium (Merck KGaA) pH 7,2 ± 0,2

2 Analyse von *Pseudomonas* in deutscher Rohmilch

2.1 Probennahme

2.1.1 Rohmilchproben aus Hofsammlertanks

Zur Analyse der Prävalenz von *Pseudomonas* in deutscher Rohmilch sowie des Einflusses von hofseitigen Parametern wurden zwischen Juni 2019 und September 2020 444 Rohmilchproben aus den Hofsammlertanks von 122 Erzeugerbetrieben bezogen. Die Betriebe waren mit acht Molkereien aus verschiedenen Regionen Deutschlands assoziiert. Es wurden möglichst vier Rohmilchen aus vier verschiedenen Quartalen beprobt. Aufgrund der COVID-19 Pandemie sowie Verlusten von Proben bei der DNA-Extraktion lagen von 44 Betrieben letztendlich nur drei Proben vor. Es wurden in Absprache mit den Molkereivertretern jene Routineproben verwendet, die bei Milchabholung durch den Sammelwagen automatisch mit Azidiol (0,33 % v/v) konserviert wurden. Nach gekühltem Versand wurden diese bis zur weiteren Bearbeitung (s. Abschnitt 2.3 - 2.4) maximal drei Tage gekühlt gelagert.

2.1.2 Beprobung von Erzeugerbetrieben und Probenbearbeitung

Um mögliche Eintrittsrouten von *Pseudomonas* bei den Erzeugerbetrieben zu identifizieren, wurden auf Basis der Quartalsproben aus den Hofsammlertanks acht Höfe ausgewählt. Hof 1-4 hatten geringe durchschnittliche Belastungen der Quartalsproben der Hofsammlertanks mit *Pseudomonas* ($< 3,0 \cdot 10^2$ Koloniebildende Einheiten $\cdot\text{ml}^{-1}$ [KbE $\cdot\text{ml}^{-1}$]), wohingegen Hof 5-8 Werte über $1,0 \cdot 10^4$ KbE $\cdot\text{ml}^{-1}$ aufwiesen. Tabelle 2 zeigt die Charakteristika der jeweiligen Erzeugerbetriebe.

Tabelle 2: Charakteristika der beprobten Erzeugerbetriebe zur Identifikation möglicher Eintrittsrouten von *Pseudomonas*

	Hof- Nummer	$\bar{\emptyset}$ <i>Pseudomonas</i> - Keimzahl der Quartalsproben [KbE/ml]	Produktionsart	Melksystem
<i>Pseudomonas</i>- auffällige Höfe	Hof 1	$2,5 \cdot 10^6$	Konventionell	Rohrmelkanlage
	Hof 2	$1,0 \cdot 10^6$	Konventionell	Manueller Melkstand
	Hof 3	$1,2 \cdot 10^4$	Konventionell	Rohrmelkanlage
	Hof 4	$2,6 \cdot 10^4$	Ökologisch	Manueller Melkstand
<i>Pseudomonas</i>- unauffällige Höfe	Hof 5	$1,7 \cdot 10^2$	Konventionell	Rohrmelkanlage
	Hof 6	$2,6 \cdot 10^2$	Ökologisch	Manueller Melkstand
	Hof 7	$9,2 \cdot 10^1$	Konventionell	Melkroboter
	Hof 8	$7,3 \cdot 10^1$	Ökologisch	Manueller Melkstand

Auf jedem Hof wurde eine Rohmilchprobe aus dem Hofsammeltank genommen sowie Warm- und Kaltwasserproben auf den Spülsystemen für die Reinigung des Sammeltanks und des Melksystems. Zudem wurde eine Probe des Nachspülwassers im finalen Reinigungszyklus während der Spülung mit kaltem Wasser möglichst am Ende des Melksystems gezogen. Die Rohmilch- und Wasserproben wurden mit sterilen 50 ml Gefäßen genommen, von jeder Probe jeweils 30 ml in ein neues Gefäß überführt und mit Azidiol (0,33 % v/v) direkt im Anschluss der Probenahmen beim Erzeuger konserviert. Stallluftproben wurden in Nähe des Melkortes genommen. Im Falle von Melkstand und Melkroboter erfolgte dies neben dem Melkgeschirr, wohingegen die Luft von Rohmelkanlagen im Stall in Nähe des Viehs gezogen wurde. Hierzu wurden mithilfe des Luftkeimsammlers MAS-100 Eco® (Merck KGaA) 1, 5 und 10 l auf Trypticase Soja Agar (TSA) sowie 100 und 500 l auf Cephalothin-Natrium Fusidat-Cetrimid Agar (CFC) im Doppelansatz beprobt. Wo möglich wurde ein Milchfilter analysiert, der nach dem vorhergehenden Melkvorgang gekühlt in einer sauberen Plastiktüte aufbewahrt wurde. Von den weiteren Probenahmestellen wurden mit feuchten, sterilen Wattetupfern Wischproben genommen. Die Tupfer wurden in Röhren mit Ringer-Lösung (1/4 stark) aufbewahrt und vor weiterer Bearbeitung darin gevortext. Die Bearbeitung aller Proben erfolgte am nächsten Tag. Zu den Milchfiltern wurde 10 ml Ringer-Lösung hinzugegeben und diese Proben anschließend ausgedrückt und für ca. 3 h bei 6°C inkubiert. Von allen Proben wurden Verdünnungsreihen in Ringer-Lösung hergestellt und 100 µl von den Verdünnungsstufen 10^0 – 10^{-6} auf CFC bzw. TSA im Doppelansatz getropft. Die Agarplatten wurden bei 30 °C für drei (CFC) bzw. fünf Tage (TSA) inkubiert und die KbE/ml mithilfe des arithmetischen gewichteten Mittels berechnet. Bei den Tupferproben sowie bei den Milchfiltern wurden die Keimzahlen hierbei auf 1 ml Ringer-Lösung bezogen, in dem die Proben jeweils ausgeschüttelt bzw. ausgedrückt wurden. Im Falle der Proben des Luftkeimsammlers wurden die KbE pro 10 l Luft berechnet.

2.1.3 Beprobung von Sammeltouren

Für die Analyse des Einflusses von Lagerung und Transport auf die *Pseudomonas*-Keimzahlen wurden sieben Sammeltouren beprobt, die aus allen Erzeugerbetrieben der Tour, einer Probe aus dem Sammelwagentank sowie Rohmilch aus dem Stapeltank der Molkerei bestanden. Letztere Probe stand für drei der sieben Touren zur Verfügung. Die Sammelwagenproben wurden bei Ankunft an der Molkerei gezogen und jene des Stapeltanks kurz vor Ablassen der Rohmilch in die Produktion. Alle Proben wurden mit Azidiol (0,33 % v/v) konserviert. Neben der Transportdauer im Sammelwagen sowie der Lagerdauer im Stapeltank wurden die Umgebungstemperaturen registriert, wobei letzteres retrospektiv über <https://www.timeanddate.com> erfolgte. Tabelle 3 fasst den Aufbau und die Charakteristika der

sieben beprobten Sammeltouren zusammen. Die Probenbearbeitung erfolgte wie in Abschnitt 2.3 - 2.4 beschrieben.

Tabelle 3: Aufbau der sieben Sammeltouren (A-G) zur Analyse des Einflusses von Lagerung und Transport auf die *Pseudomonas*-Keimzahl

Bezeichnung Tour	Hofsammeltank-Proben	Sammelwagen-Proben (Transportzeit)	Stapeltank-Proben (Lagerzeit)	Umgebungstemperatur
A	Hof 1.1_A Hof 1.2_A Hof 1.3_A	Wagen 1_A (KA)	Tank A (36 h)	10 °C
	Hof 2.1_A Hof 2.2_A Hof 2.3_A	Wagen 2_A (KA)		
B	Hof 1_B Hof 2_B Hof 3_B Hof 4_B Hof 5_B Hof 6_B Hof 7_B Hof 8_B Hof 9_B Hof 10_B	Wagen B (9 h)	NV	23 °C
C	Hof C	Wagen C (KA)	Tank C (KA)	5°C
D	Hof 1.1_D Hof 1.2_D Hof 1.3_D Hof 1.4_D Hof 1.5_D Hof 1.6_D Hof 1.7_D Hof 1.8_D Hof 1.9_D Hof 1.10_D	Wagen 1_D (KA)	Tank D (36 h)	23 °C
	Hof 2.1_D Hof 2.2_D Hof 2.3_D Hof 2.4_D	Wagen 2_D (KA)		
E	Hof 1_E Hof 2_E Hof 3_E	Wagen E (3 h)	NV	27 °C
F	Hof 1_F Hof 2_F Hof 3_F Hof 4_F Hof 5_F Hof 6_F Hof 7_F Hof 8_F Hof 9_F Hof 10_F Hof 11_F	Wagen F (3,25 h)	NV	27 °C
G	Hof G	Wagen G (1,5 h)	NV	20 °C

KA = keine Angabe; NV = Probe nicht vorhanden

2.2 Erfassung hofseitiger Einflussfaktoren

Um erhöhte *Pseudomonas*-Keimzahlen in den Hofsammeltanks mit möglichen Einflussfaktoren zu korrelieren, wurden diese von den einzelnen Erzeugerhöfen mithilfe eines Fragebogens erfasst. Es wurden Faktoren ausgewählt, von denen ein relevanter Einfluss auf das Milchmikrobiom erwartet wurde. Tabelle 4 zeigt den Aufbau des Fragebogens sowie die Verteilung der jeweiligen Parameter bei den 122 teilnehmenden Erzeugerbetrieben.

Tabelle 4: Erfasste hofseitige Parameter sowie deren Verteilung bei den 122 teilnehmenden Erzeugerbetrieben

	Hofparameter / Einflussfaktor	Absolute Hof-Anzahl	Relative Hof-Anzahl [in %]	
1	Art des Betriebes	<u>Konventionell (K)</u>	<u>86</u>	<u>70,5</u>
		<u>Ökologisch (Ö)</u>	<u>36</u>	<u>29,5</u>
		Keine Angabe	-	-
2	Liefermenge pro Jahr [l]	30.000 – 100.000	12	9,8
		<u>100.000 – 1.000.000</u>	<u>75</u>	<u>61,5</u>
		1.000.000 – 8.730.000	35	28,7
		Im Durchschnitt: 976.705		
3	Intervall der Milchabholung	1-tägig	18	14,7
		<u>2-tägig</u>	<u>95</u>	<u>77,9</u>
		3-tägig	9	7,4
		Keine Angabe	-	-
4	Melksystem	Rohrmelkanlage (R)	16	13,1
		Kannenmelkanlage (KM)	2	1,6
		<u>Melkstand manuell (MM)</u>	<u>80</u>	<u>65,6</u>
		Melkstand Roboter (MR)	19	15,6
		Keine Angabe	5	4,1
5	Spülsystem Melkstand	Kaltwasser (K, ca. 40 °C per Hand)	9	7,4
		<u>Zirkulation Säure/Lauge (S/L, ca. 60 °C)</u>	<u>94</u>	<u>77,0</u>
		Heißwasser > 70 °C	11	9,0
		Keine Angabe	8	6,6
6	Milchstapelung	Wanne (W)	12	9,8
		<u>Tank (T)</u>	<u>107</u>	<u>87,7</u>
		Keine Angabe	3	2,5
7	Kühlung	Vorkühlung (V)	27	22,1
		<u>Im Tank (T)</u>	<u>84</u>	<u>68,9</u>
		Tauchkühlung (TK)	2	1,6
		Keine Angabe	9	7,4
8	Euterhygiene	<u>Trocken (T) (z.B. mit Holzwolle)</u>	<u>47</u>	<u>38,5</u>
		Einwegtücher (EW) (feucht)	20	16,4
		Waschbare Tücher (WT) (feucht)	16	13,1
		Automatisches Melksystem/Roboter (AMS)	19	15,6
		Keine Angabe	20	16,4
9	Gesamtkeimzahl Ø 12 Monate [Zellen/ml]	6.000 – 10.000	40	32,8
		<u>10.000-30.000</u>	<u>50</u>	<u>41,0</u>
		30.000-83.800	32	26,2
		Im Durchschnitt: 23.200		

10	Somatische Zellzahl Ø 12 Monate [Zellen/ml]	68.000 – 100.000	6	4,9
		<u>100.000 – 200.000</u>	<u>62</u>	<u>50,8</u>
		200.000 – 365.000	54	44,3
		Im Durchschnitt: 201.400	-	-
11	Tierhaltung	Stall anbinden (S)	10	8,2
		<u>Laufstall (L)</u>	<u>45</u>	<u>36,9</u>
		Stall + Weide (S+W)	3	2,5
		Laufstall + Weide (L+W)	31	25,4
		Laufstall + Auslauf (L+A)	10	8,2
		Keine Angaben	23	18,9
12	Wasserversorgung	Eigener Brunnen (B)	23	18,9
		<u>Kommunaler Wasserversorger (kW)</u>	<u>90</u>	<u>73,8</u>
		Keine Angaben	9	7,4

(Unterstrichen = häufigste Nennung)

2.3 Ermittlung der Gesamtkeimzahl der Rohmilchproben

Die Gesamtkeimzahlen der Rohmilchproben der Hofsammlertanks sowie der Sammeltouren wurden mithilfe des halbautomatischen Bactocount IBCm Durchflusszytometers (Bentley Instruments INC., Minnesota, USA) am Max-Rubner-Institut (MRI) in Kiel ermittelt. Hierzu wurden 1 ml Rohmilch mit 2 ml Inkubationsreagenz des IBCm Bacto Kit (Bentley Instruments INC., Minnesota, USA) in den auf 55 °C erwärmten Edelstahlgefäßen gemischt und nach den Herstellerangaben gemessen. Zur weiteren Analyse wurden die *individual bacterial count* (IBC) Werte verwendet. Im Gegensatz zu den zu koloniebildenden Einheiten (KbE) umgerechneten Werten sind in den IBC-Keimzahlen auch Spezies enthalten, die nicht unter Standardbedingungen kultivierbar sind.

2.4 Quantifizierung von *Pseudomonas* in der Rohmilch

Zur gattungsspezifischen Quantifizierung von *Pseudomonas* wurden in dieser Arbeit drei verschiedene Methoden verwendet und miteinander verglichen.

2.4.1 Quantifizierung per klassischer Kultivierung

Traditionell erfolgt die Ermittlung von *Pseudomonas*-Keimzahlen kulturell auf dem selektiven Cephalothin-Natrium Fusidat-Cetrimid (CFC) Agar. Hierzu wurde pro Rohmilchprobe eine Verdünnungsreihe in Ringer-Lösung (1/4 stark) hergestellt und von den Verdünnungsstufen 10^{-2} – 10^{-5} jeweils 100 µl im Doppelansatz auf CFC-Agar plattiert. Die Koloniebildenden Einheiten (KbE) wurden nach drei Tagen Inkubation bei 30 °C ausgezählt und die $\text{KbE} \cdot \text{ml}^{-1}$ mithilfe des arithmetischen gewichteten Mittels aus zwei Verdünnungsstufen mit je zwei Replikaten berechnet.

2.4.2 Molekulare Quantifizierung per gattungsspezifischer qPCR

Eine Möglichkeit der molekularen Quantifizierung der Pseudomonaden in den Rohmilchproben war ein spezies-spezifischer Multiplex-qPCR-Assay, der in früheren Arbeiten an unserem Lehrstuhl etabliert wurde (Maier *et al.*, 2021). Da die gesamte Gattung detektiert werden sollte, wurde nur die gattungsspezifische Sonde P6, die innerhalb des *rpoB* Gens bindet, im Singleplex verwendet. Jede Reaktion mit 10 µl Gesamtvolumen enthielt 2 µl der extrahierten bakteriellen DNA, 5 µl SsoAdvanced™ Universal Probes Supermix (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA), 150 nM Hydrolyse-Sonde P6 (5'-**CY5**-AGTTCGGTGGTCAGCGTTTCGG-**BHQ2**-3'), 400 nM des Forward-Primers Pr6_F (5'-CAGCCGYTGGGTGGTAA-3') und 200 nM des Reverse-Primers Pr6_R (5'-CCGTTACATCGTCCGA-3') des *rpoB*-spezifischen Primerpaares. Die Messungen wurden analog Maier *et al.* (2021) mit dem Real-Time PCR System CFX96/C1000 Touch™ (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA) und der CFX Maestro™ Software durchgeführt. Die absoluten Keimzahlen wurden aus den dadurch erhaltenen *Threshold-Cycle* (Ct)-Werten mithilfe einer Standardkurve berechnet. Diese wurde hergestellt, indem frische Rohmilch der Forschungsstation Veitshof (WZW, Freising) 1:10 mit einer Übernachtkultur von *Pseudomonas lundensis* DSM 6252^T analog 3.2.2 beimpft wurde, welche ca. eine Konzentration von 10⁸ KbE*ml⁻¹ aufwies. Die beimpfte Rohmilch wurde sieben Mal 1:10 mit unbeimpfter Rohmilch verdünnt und von jedem Verdünnungsschritt (10⁰-10⁻⁷) sowie von der unbeimpften Milch als Negativkontrolle die *Pseudomonas*-Keimzahlen auf CFC Agar analog 2.4.1 bestimmt. Parallel dazu wurde von jeder Verdünnungsstufe die bakterielle DNA, wie in 2.5 beschrieben, isoliert. Pro Verdünnungsstufe wurden sechs Aliquots à 30 ml für die DNA-Isolation verwendet und anschließend gepoolt, um eine ausreichende Menge der Standardkurve für die Messung aller Proben zu gewährleisten. Die Ct-Werte jeder Verdünnungsstufe wurden per qPCR-Assay ermittelt und den entsprechenden absoluten Keimzahlen gegenübergestellt. Mithilfe der Steigung (m) und des Achsenabschnitts (n) der dadurch ermittelten Geradengleichung ($f(x) = m * x + n$) konnte mit dem Ct-Wert unbekannter Proben die entsprechende plattierte Keimzahl auf CFC-Agar anhand folgender Formel ermittelt werden: $\log\text{Keimzahl} = \frac{n-Ct}{m}$. Die Standardkurve wurde bei jedem qPCR-Lauf parallel zu den unbekanntem Rohmilchproben gemessen, um Messschwankungen berücksichtigen zu können.

2.4.3 Molekulare Quantifizierung anhand der Mikrobiomdaten

Die Berechnung der *Pseudomonas*-Keimzahl auf Basis der Mikrobiomdaten erfolgte anhand der relativen Zusammensetzung der Milchproben auf Gattungsebene, die durch die Prozessierung der Mikrobiomdaten ermittelt wurde (s. 2.6). Hierzu wurde der relative Anteil an

Pseudomonas pro Probe mit der entsprechenden Gesamtkeimzahl multipliziert, die per Durchflusszytometrie analog 2.3 quantifiziert wurde.

2.5 Isolation bakterieller DNA aus Rohmilch

Die Isolation bakterieller DNA aus den Rohmilchproben der Hofsammeltanks sowie der Sammeltouren erfolgte anhand eines Protokolls, das in Vorarbeiten an unserem Lehrstuhl etabliert wurde (Siebert *et al.*, 2021). Die DNA der 134 Rohmilchproben von 44 norddeutschen Höfen wurden am MRI in Kiel isoliert und für die weitere Prozessierung gekühlt an unser Institut verschickt. Für die DNA-Isolation wurden 30 ml Rohmilch mit 1,8 ml 0,3 molarer EDTA-Dinatriumsalzlösung gemischt und die Zellen bei 13.000 g und 4°C für 20 min geerntet. Das EDTA führt zur Destabilisierung der Caseinmicellen, da es das enthaltene Calcium bindet. Nach der Zentrifugation wurde Fettschicht sowie Magermilch bis auf ca. 1 ml entfernt, das Zellpellet in der verbliebenen Flüssigkeit resuspendiert und in ein 2 ml Reaktionsgefäß (RG) transferiert. Nach einem zweiten Zentrifugationsschritt bei 16.000 g für 1 min bei Raumtemperatur (RT) wurde die Magermilch erneut auf ca. 100 µl reduziert, mit 880 µl Ringerlösung (1/4 stark) gemischt und das Pellet resuspendiert. Zur selektiven Lyse der somatischen Zellen der Kuh wurden die Proben mit 20 µl Proteinase K (20 µg/µl, AppliChem, Darmstadt) für 30 min bei 55 °C und 350 rpm inkubiert. Nach Zentrifugation für 5 min bei 5.000 g und RT wurde der komplette Überstand entfernt und das verbliebene Pellet in 80 µl PCR-Wasser (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) resuspendiert. Zum Abbau der somatischen DNA wurde die Lösung mit jeweils 10 µl DNase I und DNase I Puffer (ThermoFisher, Waltham, USA) gemischt und bei 37 °C für 20 min bei 350 rpm inkubiert. Schließlich erfolgte die Inaktivierung der DNase durch Erhitzung bei 85 °C für 10 min. Die Zellsuspensionen wurden bis zur weiteren Bearbeitung bei -20 °C gelagert.

Zur Isolation der bakteriellen DNA wurde das PowerFood Microbial DNA-Isolation Kit (Qiagen, Hilden, Germany) mit zusätzlichen enzymatischen Behandlungsschritten verwendet. Die Zellsuspension wurde mit 450 µl auf 55 °C erhitzter MBL Lösung, 1 µl Lysozym (25 µg/µl, Roth, Karlsruhe) und 100 U Mutanolysin (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) gemischt und für 30 min bei 37 °C und 350 rpm inkubiert. Daraufhin wurden 10 µl Proteinase K (12,5 µg/µl, AppliChem, Darmstadt) hinzugefügt und die Suspensionen erneut bei 55 °C und 350 rpm für 30 min inkubiert. Nach Destabilisierung der bakteriellen Zellwand durch Erhitzung bei 70 °C für 10 min wurde die Zellsuspension in RG mit *Silica-beads* überführt und mithilfe des FastPrep-24™ Instruments (MP Biomedicals, Santa Ana, USA) vier Mal bei 6,5 m/s für 30 s mechanisch lysiert. Die restliche DNA-Isolation erfolgte anhand der Herstellerangaben des Kits, mit der Ausnahme, dass die finale Elution in 2x24 µl auf 55 °C erwärmten PCR-Wasser erfolgte. Die

isolierte DNA wurde bis zur Erstellung der Sequenzierbibliothek bei -20 °C gelagert. Abbildung 6 fasst das Protokoll zur Isolation bakterieller DNA aus Rohmilch für die Mikrobiomanalyse zusammen.



Abbildung 6: Protokoll zur Isolation bakterieller DNA aus Rohmilch für Mikrobiomanalysen

Nach der Zellernte werden die somatischen Zellen selektiv aufgeschlossen und die DNA verdaut. Im Anschluss findet eine enzymatische Lyse der bakteriellen Zellen und die DNA-Isolation statt. Die 16S rRNA wird mithilfe einer biphasischen PCR amplifiziert und nach Erstellung der Sequenzierbibliothek sequenziert.

2.6 16S rRNA Amplicon Sequenzierung zur Analyse des Rohmilchmikrobioms

2.6.1 Herstellung der Sequenzierbibliothek

Die Sequenzierbibliothek für die 16S rRNA Amplicon Sequenzierung erfolgte analog Siebert *et al.* (2021) und basiert auf einer biphasischen PCR-Amplifikation (Berry *et al.*, 2011). Sie wurde zusammen mit der Sequenzierung an der Core Facility Microbiome des ZIEL-Institute for Food & Health der TUM durchgeführt. In beiden PCR-Schritten wurden pro Probe Quadruplikate verwendet. Hierbei erfolgte im ersten PCR-Schritt mit 20 Zyklen die Amplifikation der V3-V4 Region des 16S rRNA Gens der isolierten bakteriellen DNA mithilfe der Universalprimer 341F-ovh (5'-CCTACGGGNGGCWGCAG-3') und 785r-ovh (5'-GACTACHVGGGTATCTAATCC-3') (Klindworth *et al.*, 2013). Im zweiten PCR-Schritt mit 10 Zyklen wurden an den Überhang des Universalprimers ein Proben-spezifischer Barcode sowie ein Adapter zur Bindung der DNA an die Flusszelle des Sequenziergerätes amplifiziert (Abbildung 7). Nach Aufreinigung der PCR-Produkte mit 1.8x Agencourt AMPure XP Beads (Beckman Coulter, Inc., Brea, USA) wurden die DNA-Konzentrationen mithilfe des Qubit™ fluorometer 2.0 und dem dsDNA HS Assay Kit (ThermoFisher, Waltham, USA) gemessen und

auf 0,5 nM eingestellt. Die Sequenzierung der 16S rRNA Amplikons erfolgte *paired-end* (2x 300 bp) mit einem Illumina MiSeq System (Illumina, San Diego, USA), dem MiSeq Reagent v3 Kit und einer 15 % (v/v) PhiX Standardbibliothek analog der Herstellerangaben.

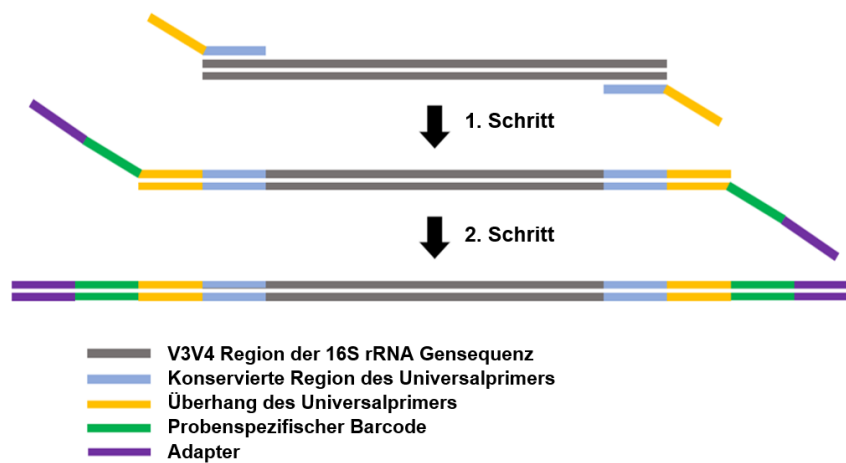


Abbildung 7: Prinzip der biphasischen PCR zur Erstellung einer Sequenzierbibliothek für die 16S rRNA Amplikon Sequenzierung

Im ersten Schritt der PCR wird die V3V4-Region der 16SrRNA (grau) mithilfe eines Universalprimers (blau) vervielfältigt. Im zweiten Schritt wird an den Überhang des Universalprimers (gelb) ein probenspezifischer Barcode (grün) sowie ein Adapter zur Bindung der DNA an die Flusszelle (Violett) angefügt.

2.6.2 Prozessierung und Downstream-Analyse der Sequenzierdaten

Die 3'-Enden der Rohsequenzen wurden auf 275 Nukleotide mithilfe von Trimmomatic (Bolger *et al.*, 2014) gekürzt (durchgeführt von Christopher Huptas, Lehrstuhl für Mikrobielle Ökologie, TUM). Anschließend fand die Prozessierung der Sequenzen mit der frei zugänglichen IMNGS-Pipeline V3.3 (Lagkouvardos *et al.*, 2016) statt, in der eine UPARSE-basierte (Edgar, 2013) *de novo operational taxonomic unit* (OTU) Auswahlstrategie implementiert ist. Tabelle 5 zeigt die verwendeten Einstellungen der IMNGS-Pipeline.

Tabelle 5: Verwendete Einstellungen zur Prozessierung der Mikrobiomdaten mithilfe der IMNGS-Pipeline

Bezeichnung der jeweiligen Einstellung	Wert
Number of allowed mismatches in the barcode	1
Min fastq quality score for trimming of unpaired reads	20
Min length for single reads or amplicons for paired overlapping sequences [nt]	300
Max length for single reads or amplicons for paired overlapping sequences [nt]	600
Max rate of expected errors in paired sequences	0.02
Length of trimming at the forward side of the seqs [nt]	10
Length of trimming at the reverse side of the seqs [nt]	10
Min relative abundance of OTU cutoff (0-1)	0.0025

In der *Pipeline* wurden die Sequenzen gegen die *Ribosomal Database Project* (RDP) Datenbank abgeglichen (RDP, Release 11) (Cole *et al.*, 2014) und chimäre Sequenzen mit UCHIME herausgefiltert (Edgar *et al.*, 2011). Clustering von *zero-Radius Operational Taxonomic Units* (zOTUs) wurde mit 99 %iger Sequenzidentität mit USEARCH (Version 11.0.667) durchgeführt (Edgar, 2010, 2018) und das Herausfiltern nicht-prokaryotischer zOTUs erfolgte mit SortMeRNA (Kopylova *et al.*, 2012). Anschließend wurden die Reads gegen die zOTU-Datenbank Silva Version 132 (<https://www.arb-silva.de/documentation/release-132/>) abgeglichen, um eine Tabelle mit den relativen Anteilen an zOTUs pro Probe zu erstellen.

Weiterführende Analysen der Mikrobiomaten erfolgten mit dem R-*Package* „Rhea“ (Lagkouravdos *et al.*, 2017) und Rv4.04. Hierzu wurden alle Proben mit einer *Read*-Zahl < 6,000 aussortiert und die restlichen Proben auf 10.000 *Reads* normalisiert. Zur Analyse der α -Diversität wurde die *Richness* des α -Diversitäts-Skripts der Rhea-*Pipeline* verwendet. Für die Diversität zwischen einzelnen Gruppen wurde die β -Diversität ermittelt, die auf generalisierten UniFrac Distanzen beruht. Um die relative Zusammensetzung der Proben auf Gattungsebene analysieren zu können, wurden mithilfe des *Taxonomic Binning* Skripts alle zOTUs, die zur gleichen Gattung gehörten, zusammengefasst.

2.7 Statistische Analysen

Die Datenauswertung sowie die statistischen Analysen erfolgte mit dem Programm Rv4.04. Die Skripte hierfür wurden von Tasia Buschhardt, Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR), Berlin zur Verfügung gestellt. Zur Analyse signifikanter Unterschiede bei den hofseitigen Parametern im Hinblick auf die *Pseudomonas*-Keimzahlen bzw. Gesamtkeimzahlen wurde ein Kruskal Wallis Test mit nachfolgendem Dunn's Test mit Bonferroni-Korrektur für Mehrfachvergleiche verwendet. Im Falle der Unterschiede zwischen den drei verschiedenen Methoden zur *Pseudomonas*-Quantifizierung wurde ein Wilcoxon-Test mit Bonferroni-Korrektur verwendet. Es wurde zwischen signifikanten ($p < 0.05$), hochsignifikanten ($p < 0.01$) und höchstsignifikanten ($p < 0.001$) Unterschieden differenziert. Die Effektstärke, die die Größe der Differenzen zwischen den Subgruppen beschreibt und damit den Einfluss einer Variable auf die Varianz der Zielgröße abschätzt, wurde anhand der Kruskal-Wallis Effektstärke ermittelt (Coe, 2002). Hierbei wird zwischen kleiner ($0,01 - < 0,06$), moderater ($0,06 - < 0,14$) und großer Effektstärke ($\geq 0,14$) unterschieden (Cohen, 1988). Zur Berechnung von Korrelationen zwischen zwei stetigen Variablen wurde die Spearman-Korrelation sowie die Kendall-Korrelation verwendet.

3 Charakterisierung neuer *Pseudomonas*-Spezies

3.1 Verwendete Bakterienstämme

Die zu charakterisierenden bakteriellen Isolate der drei neuen *Pseudomonas*-Spezies *Pseudomonas saxonica* sp. nov., *Pseudomonas haemolytica* sp. nov., und *Pseudomonas cremoris* sp. nov. wurden in Vorarbeiten am Institut für Mikrobielle Ökologie aus Rohmilch bzw. Milchhalbfabrikaten isoliert. Tabelle 6 zeigt einen Überblick über die Stammsammlungsnummern sowie die Herkunft der verwendeten Isolate. Hierbei handelt es sich bei der WS- sowie der G-Nummer um institutsinterne Stammsammlungen (Weihenstephaner Mikroorganismen-Sammlung, Lehrstuhl für Mikrobielle Ökologie, TUM), wohingegen die DSMZ- sowie die LMG-Nummern jene sind, die bei Hinterlegung der Isolate bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) bzw. bei der Belgian Coordinated Collections of Microorganisms/Laboratorium voor Microbiologie, Universiteit Gent (BCCM/LMG) vergeben wurden (s. 3.8.).

Tabelle 6: Stammsammlungsnummern sowie Isolationsmedien der charakterisierten *Pseudomonas*-Isolate

Finale Speziesbezeichnung	Ursprüngliche Speziesbezeichnung	WS-Nummer	G-Nummer	DSMZ-Nummer	LMG-Nummer	Isolationsmedium
<i>Pseudomonas saxonica</i> sp. nov.	<i>Pseudomonas</i> sp. nov. (5)	5072	9093	108989	31234	Magermilchkonzentrat
		5092	9112	108990	31235	Rohmilch
<i>Pseudomonas haemolytica</i> sp. nov.	<i>Pseudomonas</i> sp. nov. (11)	5063	9085	108987	31232	Rohmilch
		5067	9089	108988	31233	Magermilchkonzentrat
<i>Pseudomonas cremoris</i> sp. nov.	<i>Pseudomonas</i> sp. nov. (9)	5106	9123	111143	31863	Sahne
		5096	9115	111129	31864	Magermilchkonzentrat

Die Typstämme sind jeweils fett markiert

Zur phänotypischen Abgrenzung wurden auf Basis von phylogenetischen Analysen (s. 3.3) Referenzspezies ausgewählt, die mit den zu charakterisierenden Spezies möglichst nah verwandt waren. Die Typstämme dieser Spezies wurden in den phänotypischen Analysen parallel mit den zu charakterisierenden Spezies verwendet, um Unterschiede zu identifizieren. Zudem wurde stets *Pseudomonas aeruginosa* als Typspezies der Gattung mit verwendet (s. Tabelle 7).

Tabelle 7: Verwendete Referenztypstämme für die phänotypischen Analysen

Zu charakterisierende Spezies	Referenzstamm	Primärcharakterisierung	G-Nummer	Stamm-sammlungs-nummer
<i>P. saxonica</i> sp. nov.	<i>P. fragi</i>	(Eichholz, 1902)	1289	DSM 3456
	<i>P. weihenstephanensis</i>	(von Neubeck <i>et al.</i> , 2016)	8928	DSM 29166
	<i>P. deceptionensis</i>	(Carrion <i>et al.</i> , 2011)	8684	DSM 26521
	<i>P. psychrophila</i>	(Yumoto <i>et al.</i> , 2001)	8688	DSM 17535
	<i>P. taetrolens</i>	(Skerman <i>et al.</i> , 1980)	8690	DSM 21104
	<i>P. lundensis</i>	(Molin <i>et al.</i> , 1986)	8686	DSM 6252
	<i>P. versuta</i>	(See-Too <i>et al.</i> , 2017)	10911	LMG 29628
<i>P. haemolytica</i> sp. nov.	<i>P. aeruginosa</i>	(Skerman <i>et al.</i> , 1980)	1273	DSM 50071
	<i>P. synxantha</i>	(Skerman <i>et al.</i> , 1980)	8689	DSM 18928
	<i>P. libanensis</i>	(Daboussi <i>et al.</i> , 1999)	8685	DSM 17149
	<i>P. lactis</i>	(von Neubeck <i>et al.</i> , 2017)	9762	DSM 29167
	<i>P. paralactis</i>	(von Neubeck <i>et al.</i> , 2017)	8217	DSM 29164
	<i>P. canadensis</i>	(Tambong <i>et al.</i> , 2017)	10912	LMG 28499
	<i>P. poae</i>	(Behrendt <i>et al.</i> , 2003)	8687	DSM 14936
	<i>P. fluorescens</i>	(Migula, 1895)	1288	DSM 50090
<i>P. cremoris</i> sp. nov.	<i>P. aeruginosa</i>	(Skerman <i>et al.</i> , 1980)	1273	DSM 50071
	<i>P. canadensis</i>	(Tambong <i>et al.</i> , 2017)	10912	LMG 28499
	<i>P. simiae</i>	(Vela <i>et al.</i> , 2006)	11366	LMG28180
	<i>P. extremorientalis</i>	(Ivanova <i>et al.</i> , 2002)	11367	LMG 19695
	<i>P. lurida</i>	(Behrendt <i>et al.</i> , 2007)	11288	LMG 21995
	<i>P. costantinii</i>	(Munsch <i>et al.</i> , 2002)	11289	LMG 22119
	<i>P. azotoformans</i>	(Nonakaran <i>et al.</i> , 2015)	9798	DSM 18862
<i>P. aeruginosa</i>	(Skerman <i>et al.</i> , 1980)	1273	DSM 50071	

P. = *Pseudomonas*

3.2 Allgemeine mikrobiologische Arbeiten

3.2.1 Stammlagerung und Reaktivierung

Von den Isolaten der neubeschriebenen Spezies sowie von den für diese Arbeit von externen Stammsammlungen (DSMZ bzw. LMG) bestellten Typstämmen wurden Kryokulturen für die institutsinterne Stammsammlung hergestellt und im Duplikat bei -80 °C gelagert. Hierzu wurde eine dichte Suspension der Reinkultur in 1,5 ml Glycerinmedium eingerührt und vor dem Einfrieren bei 6 °C für 24 h inkubiert. Von allen in Tabelle 7 beschriebenen Stämmen wurde jeweils eine Kryokultur als Arbeitsstock analog hergestellt und bei -20 °C gelagert. Für die fortlaufenden Arbeiten wurden die Kulturen aus den Arbeitsstocks alle zwei Wochen frisch auf TSA ausgestrichen und zur metabolischen Reaktivierung zwei Mal passagiert.

3.2.2 Herstellung von Übernachtskulturen

Zur Herstellung von Übernachtskulturen wurde eine Kolonie der Reinkultur mit der Impföse in 5 ml TSB eingerührt und über Nacht bei 30 °C bei 150 rpm geschüttelt.

3.2.3 Identifizierung bakterieller Isolate per Sanger-Sequenzierung

DNA-Isolation

Zur Isolation von DNA aus bakteriellen Zellen wurde eine Impföse Zellmaterial eines Reinigungsausstriches in sterilem MilliQ Wasser suspendiert. Die Zellyse erfolgte mechanisch mit einer kleinen Menge Silica-Beads mit 0,1 mm Durchmesser (Carl Roth GmbH & Co. KG) im FastPrep-24TTM Instrument (MP Biomedicals, Santa Ana, USA) bei 2 x 45 s und 6,5 m/s mit anschließender Kühlung der Proben auf Eis. Diese wurden daraufhin bei 95 °C für 5 min erhitzt, um DNAsen zu inaktivieren. Nach einer Zentrifugation bei 13.000 g für 3 min bei RT wurden 80 µl zur weiteren Bearbeitung in ein neues RG überführt.

Amplifikation des Zielgens

Die Vervielfältigung des 16S oder *rpoD* Gens erfolgte mittels einer Polymerasekettenreaktion (PCR). Die verwendeten Primer (Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland) sind in Tabelle 8 gelistet, die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes in Tabelle 9 und die Reaktionsbedingungen in Tabelle 10.

Tabelle 8: Verwendete Primer zur Identifizierung bakterieller Isolate per Sanger-Sequenzierung

Zielgen	Primer	Sequenz [5' – 3']	Amplikonlänge [nt]
16S rRNA	16S_27 for ¹	AGAGTTTGATCCTGGCTCA	1465
	16S_1492 rev ¹	CGGCTACCTTGTTACGAC	
	16S_907 rev ²	CGTCAATTCMTTGGAGTTT	
<i>rpoD</i>	PsEG30 for ^{1,2}	ATYGAAATCGCCAARCG	750
	PsEG790 rev ¹	CGGTTGATKTCCTTGA	

¹ verwendeter Primer für PCR

² verwendeter Primer für Sanger-Sequenzierung

Tabelle 9: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes zur Amplifikation von Zielgenen per PCR

Reagenz	Konzentration	Eingesetztes Volumen [µl]
High Performance Buffer (Thermo Scientific)	10x	2,5
dNTP Mix (Thermo Scientific)	10 mM	0,5
MgCl ₂ (Thermo Scientific)	25 mM	1,5
Primer forward (Eurofins MWG)	10 µM	0,5
Primer reverse (Eurofins MWG)	10 µM	0,5
MilliQ-Wasser	-	19,875
Thermo Start Taq Polymerase (Thermo Scientific)	5 U/µl	0,15
Template-DNA	-	1,0

Tabelle 10: Reaktionsbedingungen der 16S rRNA und *rpoD*-PCR

Zyklusschritt	16S rRNA			<i>rpoD</i>		
	Temperatur [°C]	Zeit [s]	Zyklen	Temperatur [°C]	Zeit [s]	Zyklen
Initiale Denaturierung	95	30	1	95	30	1
Denaturierung	95	30	30	95	30	30
<i>Annealing</i>	52	30		48	30	
Elongation	68	50		68	60	
Finale Elongation	68	300		68	300	
Kühlung	16	∞	1	16	∞	1

Agarosegelelektrophorese

Zur Überprüfung des Ergebnisses der PCR wurde eine Agarosegelelektrophorese mit den PCR-Produkten durchgeführt. Hierfür wurden 30 ml eines 1 %igen Agarosegels (Carl Roth GmbH & Co KG), gelöst in 0,5x TBE, mit 1,5 µl 10x SafeRed™ (Applied Biological Materials Inc., Richmond, Kanada) gemischt. Nach Aushärtung des Gels wurden 5 µl Probe mit 1 µl DNA Gel Loading Dye (Thermo Scientific) versetzt und 30 min bei 110 V in 0,5x TBE-Puffer elektrophoretisch aufgetrennt. Die Banden wurden anschließend mithilfe von UV-Licht visualisiert (UVsolo Imaging System, Biometra GmbH) und die Amplikonlängen mit dem Längenstandard GeneRuler™ DNA Ladder (Thermo Scientific) überprüft.

Aufreinigung der PCR Produkte

Die Aufreinigung der PCR-Produkte erfolgte mithilfe des GenElute™ PCR Clean-Up Kits (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) analog Herstellerangaben, wobei alle Zentrifugationsschritte bei 13.000 g und RT durchgeführt wurden.

Sanger-Sequenzierung und Identifizierung

Die Sanger-Sequenzierungen der 16S rRNA und *rpoD* Amplikons erfolgte durch GATC Biotech AG (Köln, Deutschland). Hierfür wurden 20 µl des aufgereinigten PCR-Produktes sowie 10 µl Primer (10 µM, 16S: 16S_907 rev, *rpoD*: PsEG30 for, siehe Tabelle 8) verschickt. Die Identifizierung der Isolate wurde im Fall der 16S rRNA mittels EzTaxon (O. S. Kim *et al.*, 2012) und bei *rpoD* mittels BLAST-Algorithmus (Altschul *et al.*, 1990) gegen die GenBank Datenbank (Benson *et al.*, 2013) durchgeführt. Hierbei liegen die Grenzwerte für Speziesübereinstimmung für die 16S rRNA bei 98,65 % (O. S. Kim *et al.*, 2012) und im Fall der *rpoD*-Sequenz bei 98 % (Girard *et al.*, 2020).

3.3 Phylogenetische Analysen

3.3.1 Einzelgenanalysen

Basierend auf den Sequenzvergleichen mittels 16S rRNA und *rpoD* wurden jeweils die Typstämme der am nächsten verwandten Spezies für weiterführende phylogenetische Analysen ausgewählt. *Pseudomonas aeruginosa* wurde als Außengruppe genutzt, auf die der Baum gewurzelt wurde. Die Sequenzen wurden aus der öffentlich zugängigen GenBank-Datenbank bezogen (Benson *et al.*, 2013). Im Falle der 16S rRNA wurden für die zu charakterisierenden Spezies jene Sequenzen verwendet, die aus den *Draft*-Genomen extrahiert wurden (s. 3.3.2, Prozessierung der Genomsequenzen), wohingegen die *rpoD* Sequenzen der Sanger-Sequenzierung genutzt wurden. Von allen Spezies wurde für beide Gensequenzen jeweils ein Alignment mit den ausgewählten Typstämmen mit dem CLUSTAL_W alignment tool der MEGA 10.0.4 Software durchgeführt (Edgar, 2004). Dies wurde für die Berechnung der *Maximum-Likelihood* phylogetischen Bäume verwendet. Ebenfalls mit MEGA 10.0.4 berechnet, basieren diese Bäume auf dem *Tamura-Nei* Modell und dienen zur visuellen Darstellung der Verwandtschaftsverhältnisse zwischen verschiedenen Taxa.

Die Einzelgensequenzen der *rpoD*-Gene wurden in der öffentlich-zugänglichen GenBank Datenbank mit den Zugangsnummern hinterlegt, die in Tabelle 11 gelistet sind. Die 16S-Gensequenzen wurden im Rahmen der Genom-Assemblierungen veröffentlicht (s. 3.3.2, Prozessierung der Genomsequenzen).

Tabelle 11: GenBank-Zugangsnummern der veröffentlichten *rpoD*-Sequenzen

Spezies	DSM-Nummer	Zugangsnummer GenBank
<i>P. saxonica</i>	108989	MN068213
<i>P. saxonica</i>	108990	MN068214
<i>P. haemolytica</i>	108987	MN244567
<i>P. haemolytica</i>	108988	MN244568
<i>P. cremoris</i>	111143	MT274666
<i>P. cremoris</i>	111129	MT274667

3.3.2 Phylogenomische Analysen

Isolation und Sequenzierung genomischer DNA

DNA-Isolation

Zur Vorbereitung der Isolation genomischer DNA wurden die Stämme der drei zu charakterisierenden Spezies auf TSA bei 30 °C für 24 h inkubiert. Die DNA-Isolation erfolgte mit dem Qiagen QIAmp DNA mini Kit nach den Herstellerangaben für Gram-negative Bakterien von plattierten Kulturen.

Erstellung der Sequenzierbibliothek und Sequenzierung

Die Erstellung der Sequenzierbibliothek wurde mit dem TruSeq DNA PCR-Free Sample Preparation Kit mit dem optimierten Protokoll nach (Huptas *et al.*, 2016) durchgeführt. Ziel dieses Protokolls war die Isolation von ca. 900 bp langen DNA-Fragmenten für die DNA-Sequenzierung. Die isolierten DNA-Proben wurden zunächst mithilfe des Qubit™ fluorometer 2.0 und dem dsDNA HS Assay Kit (ThermoFisher, Waltham, USA) auf eine Konzentration von ca. 75 ng/µl eingestellt. Die DNA (52,5 µl) wurde daraufhin mit einem Covaris S220 AFA (Adaptive Focused Acoustics™) Ultrasonicator (Covaris, Woburn, Massachusetts, USA) fragmentiert. Die verwendeten Einstellungen hierfür sind in Tabelle 12 gelistet.

Tabelle 12: Verwendete Einstellungen des Covaris S220 AFA Ultrasonicators zur DNA-Fragmentierung genomischer DNA

Bezeichnung	Verwendete Einstellung
1. System	Covaris S220
2. Peak Incident Power (PIP)	175 Watt
3. Duty Factor	10 %
4. Cycles/Burst	200
5. Duration	25 sec
6. Temperature	6 °C

Die weiteren Bearbeitungsschritte wurden bei RT durchgeführt. Für die erste Größenselektion wurden 50 µl der fragmentierten DNA mit 50 µl Resuspension Buffer (RB) und 50 µl Agencourt AMPure XP magnetic beads (Beckman Coulter, Inc., Brea, USA) (AMP1x) gemischt. Durch dieses Verhältnis werden Fragmente > 1100 bp aus der Lösung entfernt. Nach Inkubation der Proben für 5 min wurden diese in einen Magnetständer überführt und der geklärte Überstand nach 2-3 min abgenommen und in ein neues RG überführt. Nach Zugabe von 88,2 µl RB und 49 µl 2-fach konzentrierten AMPure XP magnetic beads (AMP2x) wurden die Proben wie oben beschrieben inkubiert. Nach Abnahme des Überstandes wurde dieser jedoch verworfen und

mit den Pellets weitergearbeitet. Dieser Schritt dient der Entfernung zu kleiner DNA-Fragmente. Die Pellets wurden zwei Mal mit je 200 µl 80% (v/v) Ethanol (EtOH) gewaschen und danach 5 min bei geöffnetem Deckel getrocknet. Die RG wurden daraufhin aus dem Magnetständer genommen und die Pellets in 52 µl RB resuspendiert und 2 min inkubiert. Nach Transfer in den Magnetständer und Inkubation für 2-3 min wurden 50 µl des Überstandes in ein neues RG überführt.

Der nächste Schritt diente der Reparatur der Fragment-Enden der DNA, bei der *sticky ends* zu *blunt ends* modifiziert werden. Hierfür wurden zu den 50 µl Überstand aus der ersten Größenselektion 5 µl TruSeq End Repair Control sowie 20 µl TruSeq End Repair Mix 2 gemischt und für 35 min bei 30 °C und 600 rpm inkubiert.

Für die zweite Größenselektion wurden 70 µl der DNA-Lösungen nach der *End-Repair* mit 30 µl RB und 50 µl AMP1x gemischt und für 5 min inkubiert. Nach Inkubation der RG im Magnetständer für 2-3 min wurden 147 µl des Überstandes in ein neues RG transferiert und erneut mit 88,2 µl RB und 49 µl AMP2x gemischt. Nach analoger Inkubation wurde der Überstand verworfen und die Pellets wie bei der ersten Größenselektion mit EtOH gewaschen und getrocknet. Die Pellets wurden daraufhin in 19 µl RB resuspendiert, für 2 min inkubiert und erneut 2 min in den Magnetständer gestellt. 18 µl des klaren Überstandes wurden in ein neues RG transferiert.

Für den ersten Teil der Validierung der DNA-Bibliothek wurde die DNA-Konzentration der Proben mit dem Qubit™ fluorometer 2.0 und dem dsDNA HS Assay Kit (ThermoFisher, Waltham, USA) bestimmt. Zudem wurde 1 µl der DNA auf eine Konzentration von 0,3 ng/µl mit MilliQ-Wasser verdünnt. Hiervon wurde im Triplikat die Verteilung der Fragmentgrößen mit dem 2100 Bioanalyzer Instrument (Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornien, USA) und dem High Sensitivity DNA Chip analog der Herstellerangaben ermittelt. Nach Berechnung der durchschnittlichen Fragmentgröße (= *Bioanalyzer-inferred average insert size*, BiFS) wurde die tatsächliche Fragmentgröße (*actual fragment size*, AFS) anhand der Formel $AFS = 0,564 * BiFS + 258$ berechnet.

Im nachfolgenden Schritt wurden die DNA-Fragmente am 3'-Ende adenyliert und mit dem Sequenzierungsadapter ligiert. Hierfür wurden zu 15 µl Lösung nach der zweiten Größenselektion 1,25 µl A-tailing Control sowie 6,25 µl A-tailing Mix gemischt und für 35 min bei 37 °C inkubiert. Nach einer weiteren Inkubation bei 70 °C für 5 min wurden die Proben für 5 min auf Eis gestellt und mit je 1,25 µl Ligation Control, Ligation Mix 2 sowie eines entsprechenden DNA-Adapters gemischt. Die Proben wurden für 12 min bei 30 °C inkubiert und im Anschluss mit 2,5 µl Stop Ligation Buffer gemischt, um die Reaktion zu beenden.

Für die finale Aufreinigung der DNA-Fragmente nach der Adapterligation wurden 25 µl der Lösung mit 25 µl AMP1x gemischt und 5 min inkubiert. Nach weiterer Inkubation im Magnetständer für 2-3 min wurde der Überstand verworfen und die Pellets wie oben beschrieben zwei Mal mit EtOH gewaschen und getrocknet. Diese wurden daraufhin in 27 µl RB resuspendiert und 2 min inkubiert. Nach Abtrennung der Beads im Magnetständer für 2 min wurden 25 µl des Überstandes in ein neues RG transferiert, mit 25 µl AMP1x gemischt und für 5 min inkubiert. Nach Inkubation für 2-3 min auf dem Magnetständer wurde der Überstand verworfen und die Pellets erneut zwei Mal mit EtOH gewaschen und getrocknet. Daraufhin wurden sie in 15 µl RB resuspendiert, 2 min inkubiert und weitere 2 min auf dem Magnetständer separiert. 13 µl des Überstandes wurden schließlich in ein neues RG überführt.

Im zweiten Teil der Validierung der DNA-Bibliothek wurde die DNA-Konzentration der Proben in Triplikaten mit dem Qubit™ fluorometer 2.0 und dem dsDNA HS Assay Kit (ThermoFisher, Waltham, USA) gemessen und der Durchschnitt berechnet (conc). Die Konzentration in nM wurde mit der berechneten DNA-Fragmentlänge (AFS) aus dem ersten Validierungsschritt mit folgender Formel berechnet: $nM = conc * \frac{10^6}{AFS+120} * 650$.

Zur Normalisierung wurde die Konzentration aller Proben mit RB auf 1 nM eingestellt. Die Proben wurden anschließend mit jeweils 10 µl in ein neues RG gepoolt, wobei das Endvolumen mindestens 60 µl betragen sollte. Im Anschluss wurden 60 µl der gepoolten DNA mit 60 µl NaOH (0,1 N) gemischt, für 5 min bei RT und daraufhin für 5 min bei 95 °C inkubiert. Hierbei wird die doppelsträngige DNA zu Einzelsträngen denaturiert, die später an die Flusszelle hybridisieren können. Nach einer Inkubation für 10 min auf Eis wurde 60 µl gekühlte HCl (0,1 N) hinzugefügt und gemischt und die Proben weiterhin auf Eis gelagert. Nach Zugabe von 420 µl gekühltem RB ergab sich eine DNA-Konzentration von 100 pM. 350 µl des Pools wurden daraufhin mit 650 µl RB gemischt, um die Konzentration auf 35 pM zu verdünnen. 600 µl der Lösung wurden schließlich in die vorbereitete Illumina Sequenzierungskartusche pipettiert und die Sequenzierung auf der illumina® Plattform MiSeq™ (illumina Inc., San Diego, Kalifornien, USA) mit dem MiSeq Reagent Kits v3 (600-cycle) und einer read length von 2 x 300 Nukleotiden (paired end) durchgeführt.

Prozessierung der Genomsequenzen

Die Genomsequenzen wurden von Christopher Huptas, Lehrstuhl für Mikrobielle Ökologie, TUM, prozessiert. Die als FASTQ files vorliegenden Genomsequenzen wurden zunächst einer Qualitätskontrolle und einem Filterungsschritt unter Verwendung von FastQC (<https://omictools.com/fastqc-tool>) sowie dem NGS QC Toolkit (Patel & Jain, 2012)

unterzogen. Daraufhin wurden die Sequenzen mithilfe von SPAdes assembliert (Bankevich *et al.*, 2012). Die sogenannten „Draft-Genome“ lagen nicht als geschlossene Sequenzen vor, sondern bestanden aus mehreren *Contigs*. Die Sequenzen wurden hinsichtlich ihres GC-Gehaltes, der Anzahl an *Contigs*, N50-Wert und der Sequenziertiefe analysiert. Mithilfe von CheckM (Parks *et al.*, 2015) wurde die Vollständigkeit sowie der Anteil an Kontaminationen mit anderen Sequenzen ermittelt. Zudem wurde die Authentizität der Genome überprüft, indem die 16S rRNA und *rpoD* Sequenzen der Sanger-Sequenzierung des entsprechenden Isolats mit jenen des *Draft*-Genoms verglichen wurden. Die Annotation der *Draft*-Genome erfolgte mit Prokka (Seemann, 2014). Aus diesen Ergebnissen wurden die Anzahl kodierender Sequenzen, rRNA sowie tRNA Gene ermittelt. Aus den *Draft*-Genomen wurden zudem die vollständigen Sequenzen von 16S rRNA, *gyrB*, *rpoD* und *rpoB* für phylogenetische Analysen extrahiert. Alle neuen Genom-Assemblierungen wurden mit entsprechenden Zugangsnummern bei der frei-zugänglichen GenBank-Datenbank hinterlegt (s. Tabelle 13). Neben allen Isolaten der drei neuen Spezies wurden die Assemblierungen von elf weiteren Typstämmen hinterlegt, deren Genomsequenzen schon in Vorarbeiten an unserem Institut sequenziert wurden.

Tabelle 13: Genbank-Zugangsnummern der veröffentlichten Genom-Assemblierungen

Spezies	DSM-Nummer	Zugangsnummer GenBank
<i>P. saxonica</i>	108989	VFIO00000000
<i>P. saxonica</i>	108990	VFIP00000000
<i>P. haemolytica</i>	108987	VOIW00000000
<i>P. haemolytica</i>	108988	VOIX00000000
<i>P. cremoris</i>	111143	JAAXCY00000000
<i>P. cremoris</i>	111129	JAAXCZ00000000
<i>P. brenneri</i>	15294	VFIL00000000
<i>P. chlororaphis ssp. chlororaphis</i>	50083	VFIN00000000
<i>P. extremaustralis</i>	17835	VFET00000000
<i>P. fluorescens</i>	50090	VFEP00000000
<i>P. gessardii</i>	17152	VFEW00000000
<i>P. grimontii</i>	17515	VFES00000000
<i>P. mandelii</i>	17967	VFIM00000000
<i>P. marginalis</i>	13124	VFEQ00000000
<i>P. panacis</i>	18529	VFER00000000
<i>P. proteolytica</i>	15321	VFEV00000000
<i>P. rhodesiae</i>	14020	VFEU00000000

P. = *Pseudomonas*

Multilocus Sequence Analyses (MLSA)

Aufgrund der nahen Verwandtschaftsgrade zwischen *Pseudomonas*-Spezies wurde neben den Einzelgensequenzen noch Multilocus Sequence Analyses (MLSA) nach (Mulet *et al.*, 2010) durchgeführt. Diese beruhen auf den partiellen konkatenierten Sequenzen von 16S rRNA,

gyrB, *rpoD* und *rpoB*, und dienen der intensiveren Analyse der Verwandtschaftsverhältnisse der neuen *Pseudomonas*-Spezies. Die Sequenzen wurden aus den entsprechenden Draft-Genomen extrahiert und mit jenen der am nächsten verwandten Spezies aligniert (durchgeführt von Christopher Huptas, Lehrstuhl für Mikrobielle Ökologie, TUM). Analog zu den in 3.3.1 beschriebenen Einzelgenanalysen wurden für *P. saxonica* und *P. haemolytica* phylogenetische Bäume mit *P. aeruginosa* als Außengruppe berechnet. Als Referenzspezies wurden jene Typstämme gewählt, die in den Einzelgenanalysen die engste Verwandtschaft zu den neuen Spezies aufwiesen.

Kerngenom-Analysen

Für *P. cremoris* wurde für intensivere phylogenetische Charakterisierungen anstatt MLSA eine Kerngenom-Analyse von Christopher Huptas, Lehrstuhl für Mikrobielle Ökologie, TUM durchgeführt. Hierfür wurden ebenfalls Referenzspezies ausgewählt, die in den Einzelgenanalysen die engste Verwandtschaft zeigten. Als Außengruppe diente *Pseudomonas pertucinogena* DSM 18268^T (NZ_BMNN01). Die Stämme wiesen zusammen mit *P. cremoris* 2280 gemeinsame Gene auf, die als sog. Kerngenom extrahiert und mithilfe von Prokka (Seemann, 2014) annotiert wurden. Das Alignment der multiplen Sequenzen erfolgte mit PIRATE (Bayliss *et al.*, 2019) und die Berechnung der *Maximum-Likelihood* Phylogenie mit IQ-TREE2 (Minh *et al.*, 2020) in Kombination mit UFBoot2 (Hoang *et al.*, 2018). Der entsprechende Baum wurde mit iTOL visualisiert (Letunic & Bork, 2019).

Analyse der Average Nucleotide Identity (ANI)

Eine weitere Möglichkeit zur Speziesabgrenzung ist der paarweise Vergleich der durchschnittlichen Nukleotid-Übereinstimmung der Genomsequenzen zweier Spezies (= *Average Nucleotide Identity* = ANI). Hierzu wurde der ANIm, der auf dem MUMmer Algorithmus beruht, nach Richter & Roselló-Móra (2009) zwischen den am nächsten verwandten Spezies auf Basis der MLSA bzw. Kerngenom-Analysen und den neuen Spezies berechnet (durchgeführt von Christopher Huptas, Lehrstuhl für Mikrobielle Ökologie, TUM). Hierbei galt ein ANIm-Wert von 95-96 % als Grenzwert für die Speziesdefinition (Richter & Roselló-Móra, 2009).

3.4 Morphologische Charakterisierung

Die Versuche 3.4.3 - 3.4.4 zur morphologischen Charakterisierung wurden unabhängig in zwei biologischen Replikaten durchgeführt. Die Kultur des zweiten Replikats wurde neu aus dem Arbeitsstock ausgestrichen und vor den Versuchen zwei Mal passagiert. Parallel zu den

Isolaten der neuen Spezies wurden die zugehörigen Referenzspezies analysiert. Alle Kulturen waren zum Zeitpunkt der Analysen 48 h bei 30 °C auf TSB inkubiert.

3.4.1 Koloniemorphologie

Die makroskopische Charakterisierung der Koloniemorphologie der neuen Spezies erfolgte visuell nach Inkubation bei 30 °C für 24 h auf TSA. Es wurde die Größe der Kolonien, Farbe, Form, Viskosität und Oberflächenbeschaffenheit beschrieben.

3.4.2 Zellmorphologie

Die mikroskopische Analyse der Zellmorphologie wurde ebenfalls nur für die Isolate der neuen Spezies durchgeführt. Hierfür wurde eine Kolonie einer 24 h alten Kultur auf TSA in 100 µl Ringer-Lösung (1/4 stark) eingerührt. Diese Bakteriensuspension wurde im Fluoreszenzmikroskop (BX51RTF, Olympus GmbH, Hamburg, Deutschland) mit 100-facher Vergrößerung visualisiert und bei Bedarf mit weiterer Ringer-Lösung (1/4 stark) verdünnt. Die durchschnittliche Länge und Breite der Zellen wurde an 100 Zellen der Typstämme der drei neuen Spezies vermessen. Die Motilität wurde ebenfalls visuell unter dem Mikroskop festgestellt. Des Weiteren wurde die Zellform beschrieben sowie auf Einschlüsse überprüft.

3.4.3 Motilität in semisolidem Medium

Als weitere makroskopische Möglichkeit zur Beurteilung der Motilität einer Spezies wurde semisoliden Motilitätsmedium mit einer Kolonie des zu untersuchenden Bakterienstammes mithilfe einer Impföse als Stichkanal beimpft und 7 Tage bei 30 °C inkubiert. Nach drei und sieben Tagen wurde visuell die Trübung des Agars bewertet. Als motil galten Stämme, die spätestens nach sieben Tagen in beiden Replikaten einen deutlichen trüben Hof um den Stichkanal aufwiesen. Als Positivkontrolle wurde *Bacillus cereus* DSM 31^T verwendet.

3.4.4 KOH-Test

Der KOH-Test diente als alternative Methode zur Gram-Färbung für die Ermittlung des Gram-Verhaltens (Ryu, 1940). Hierbei wurde mithilfe einer Impföse eine Kolonie des zu untersuchenden Bakterienstammes in 3%ige Kaliumhydroxid (KOH) Lösung eingerührt. Bei Gram-negativen Bakterien führte das KOH zu einer Zelllyse und die DNA wurde als fädiges Molekül sichtbar. Die Zellwand Gram-positiver Bakterien wurde aufgrund ihres stabileren Aufbaus nicht lysiert und es waren keine Fäden sichtbar.

3.5 Physiologische Charakterisierung

Alle Versuche zur physiologischen Charakterisierung wurden unabhängig in zwei biologischen Replikaten durchgeführt. Die Kultur des zweiten Replikats wurde neu aus dem Arbeitsstock ausgestrichen und vor den Versuchen zwei Mal passagiert. Parallel zu den Isolaten der neuen Spezies wurden die zugehörigen Referenzspezies analysiert, wenn nicht anders beschrieben. Alle Kulturen waren zum Zeitpunkt der Analysen 48 h bei 30 °C auf TSB inkubiert.

3.5.1 Wachstumsbedingungen

Wachstumsgrenzen

Zur Identifikation der tolerierten oberen und unteren Grenzwerte für pH, Salzkonzentration (NaCl) sowie Temperatur wurden von allen Spezies Übernachtskulturen analog 3.2.2 hergestellt und 1:1000 in 5 ml TSB im Falle der Temperaturgrenzen verdünnt. Die so inokulierten Medien wurden für 14 Tage bei 4 °C, 6 °C, 34 °C, 36 °C, 37 °C, 39 °C und 42 °C inkubiert und nach 3, 7 und 14 Tagen auf sichtbare Trübung untersucht. Als obere bzw. untere Temperaturgrenze für das Wachstum wurde jene Temperatur definiert, bei der noch eine sichtbare Trübung vorhanden war. Für die Identifikation der NaCl- bzw. pH-Grenzen fand die Verdünnung der Übernachtskultur in dem entsprechenden NaCl- bzw. pH-Medium statt. Für die NaCl-Grenzen wurde TSB mit 0 % und 4-8 % NaCl (in 1%-Schritten) verwendet und für die pH Grenzen TSB mit pH 4,5, 5,0 und 5,5 für die untere sowie pH 7,5, 8,0 und 8,5 für die obere Wachstumsgrenze. Die Medien wurden anschließend bei der ermittelten Optimaltemperatur der zu charakterisierenden Spezies inkubiert und analog ausgewertet.

Wachstumsoptima

Die Identifikation der optimalen Wachstumstemperatur, NaCl-Konzentration sowie des pHs wurden nur für die neu zu charakterisierenden Spezies mithilfe des Bioscreen C (Oy Growth Curves AB Ltd., Helsinki, Finnland) bestimmt. Dies ist ein photometrisches Mikrotiterplatten-Lesegerät, das per Absorptionsmessung Wachstumskurven generiert. Hierfür wurden die zu untersuchenden Isolate analog einer Übernachtskultur für 18 h inkubiert und im Falle des Temperaturoptimums 1:1000 in TSB verdünnt. Je 200 µl dieser Verdünnung wurden in fünf technischen Replikaten in die Vertiefungen der Mikrotiterplatten pipettiert und 48 h bei der zu analysierenden Temperatur (23 °C, 25 °C, 27 °C, 29 °C, 30 °C, 31 °C und 33 °C) und kontinuierlichem Schütteln inkubiert, wobei die optische Dichte (OD) bei 600 nm alle 20 min gemessen wurde. Als optimale Temperatur galt jene, bei der eine OD von 0,2 am schnellsten erreicht wurde. Messungen zum pH und NaCl-Optimum wurden analog durchgeführt. Jedoch wurden hierbei je 200 µl der entsprechenden pH (5,5 – 8,0 in 0,5-Schritten) bzw. NaCl-Medien

(0, 0,5, 1, 2 und 3 % NaCl) in fünf technischen Replikaten in den Mikrotiterplatten vorgelegt und darin 1:1000 mit der Übernachtskultur beimpft. Die Messungen fanden bei der ermittelten Optimaltemperatur der entsprechenden Spezies statt.

3.5.2 *Anaerobes Wachstum und Analyse von Enzymen des aeroben Stoffwechsels*

Anaerobes Wachstum

Die Fähigkeit zum Wachstum unter anaeroben Bedingungen wurde mithilfe von Anaerocult® A (Merck KGaA) analog der Herstellerangaben untersucht. Die Stämme wurden hierfür auf TSA überimpft, bei 30 °C in einem Anaerobtopf inkubiert und nach sieben Tagen auf Wachstum überprüft.

Oxidase-Test

Der Oxidase-Test dient dem Nachweis der Cytochrom-Oxidase C, welche als Elektronenträger in der aeroben Atmung fungiert (Steel, 1961) und zur Klassifikation von Bakterien genutzt wird. Hierfür wurde ein wenig Zellmaterial auf Bactident®-Streifen (Merck KGaA) verteilt. Bei Vorhandensein der Cytochrom-Oxidase wurde das N,N-Dimethyl-p-phenylendiammoniumdichlorid des Teststreifens in Indophenolblau oxidiert, was als blaue Färbung sichtbar war.

Katalase-Test

Ähnlich dem Oxidase-Test wird der Katalase-Test ebenfalls zur Klassifikation genutzt. Hierbei wurde auf eine kleine Menge Zellmaterial 3%iges Wasserstoffperoxid (H₂O₂) getropft. Bei Vorhandensein des Enzyms Katalase wurde das H₂O₂ zu Wasser und Sauerstoff umgesetzt, was anhand einer Bläschenbildung sichtbar war.

3.5.3 *Wachstum auf Spezialmedien*

Die Stämme wurden auf die Fähigkeit untersucht, auf den Spezialmedien R2A und Cetrimid-Agar zu wachsen. Beim R2A wird das Wachstum bei niedrigem Nährstoffgehalt geprüft, wohingegen die Selektivität des Cetrimid-Agars auf die hemmende Wirkung von Cetyltrimethylammoniumbromid beruht. Hierfür wurden sie auf den entsprechenden Medien ausgestrichen und bei Optimaltemperatur für sieben Tage inkubiert. Nach drei und sieben Tagen wurde das Wachstum überprüft.

3.5.4 Pigmentproduktion

Pyocyanin

Der Nachweis der Pyocyaninproduktion, sichtbar als blaue Färbung, erfolgte nach Inkubation der Stämme auf King A Agar für sieben Tage bei Optimaltemperatur. Als Positivkontrolle wurde *P. aeruginosa* (R12) verwendet und als Negativkontrolle *Escherichia coli* DSM 30083^T.

Fluorescein

Die Produktion des fluoreszierenden Pigments Fluorescein wurde nach Inkubation auf King B Agar für sieben Tage bei Optimaltemperatur unter UV-Licht kontrolliert (UVsolo Imaging System, Biometra GmbH). Die Kontrollstämme wurden analog der Pyocyanin-Analyse verwendet.

3.6 Biochemische Charakterisierung

Alle Versuche zur biochemischen Charakterisierung wurden unabhängig in zwei biologischen Replikaten durchgeführt. Die Kultur des zweiten Replikats wurde neu aus dem Arbeitsstock ausgestrichen und vor den Versuchen zwei Mal passagiert. Parallel zu den Isolaten der neuen Spezies wurden die zugehörigen Referenzspezies analysiert. Alle Kulturen waren zum Zeitpunkt der Analysen 48 h bei 30 °C auf TSB inkubiert, wenn nicht anders beschrieben.

3.6.1 Hydrolyseassays

Caseinhydrolyse

Zur Analyse der Hydrolyse von Casein wurden die Stämme auf Caseinagar ausgestrichen und bei Optimaltemperatur für sieben Tage sowie bei 4 °C für 10 Tage inkubiert. Bei erfolgter Caseinhydrolyse war ein Lysehof um die Kolonien sichtbar. Als Positivkontrolle wurde *Bacillus megaterium* DSM 32^T verwendet und als Negativkontrolle *Paenibacillus macerans* G8620.

Lipolyse

Die Fähigkeit zur Lipolyse wurde analog zur Caseinhydrolyse auf Tributyrinagar ebenfalls bei Optimaltemperatur sowie bei 4 °C durchgeführt. Als Positivkontrolle diente *Staphylococcus aureus* DSM 20231^T, als Negativkontrolle *P. aeruginosa* (R12).

Stärkehydrolyse

Die Hydrolyse von Stärke wurde nach Inkubation der Stämme auf Stärke-Agar bei Optimaltemperatur für sieben Tage analysiert. Hierfür wurden die Agarplatten mit je 1 ml

Lugolscher Lösung überschichtet. Bei Vorhandensein von intakter Stärke färbte sich der Agar nach kurzer Zeit dunkelblau bis schwarz, wohingegen nach erfolgter Stärkehydrolyse helle Lysehöfe um die Kolonien sichtbar waren. *Bacillus subtilis* DSM 10^T wurde als Positivkontrolle verwendet und *E. coli* DSM 30083^T als Negativkontrolle.

Hämolyse

Zur Differenzierung zwischen α -, β - und γ -Hämolyse wurde Columbia-Blutagar mit 5 % Schafsblut (Oxoid GmbH) verwendet, auf dem die Stämme für sieben Tage bei Optimaltemperatur inkubiert wurden. Bei positiver α -Hämolyse trat eine Grünfärbung des Agars durch eine Veränderung der Erythrozyten auf. Als Positivkontrolle diente hierfür *E. coli* DSM 30083^T. Bei positiver β -Hämolyse war ein klarer Lysehof um die Kolonien durch Lyse der Erythrozyten sichtbar (Positivkontrolle: *S. aureus* DSM 20231^T). Die γ -Hämolyse beschreibt keine Veränderungen des Agars, es ist lediglich Wachstum feststellbar (Positivkontrolle: *Staphylococcus epidermidis* DSM 20044^T).

3.6.2 Nitratreduktion

Die Fähigkeit, Nitrat zu Nitrit zu reduzieren und dies weiter zu denitrifizieren wurde mithilfe des Nitratagars festgestellt. Hierzu wurde eine Übernachtskultur in 5 ml dieses halbfesten Agars hergestellt und 24 h ohne Schütteln bei Optimaltemperatur inkubiert. Daraufhin wurde 1 ml der Übernachtskultur in ein neues RG überführt und analog API 20 NE (bioMérieux GmbH) mit jeweils einem Tropfen der Reagenzien Nit1 und Nit 2 versetzt. Eine Rotfärbung des Mediums wurde als positive Nitratreduktion gewertet. Bei den Proben mit negativer Nitratreduktion wurde die Denitrifikation mithilfe von Zinkpulver getestet. Bei positiver Denitrifikation blieben die Proben farblos, bei negativer entstand eine Rosafärbung. Als Positivkontrolle für die Nitratreduktion wurde *Proteus mirabilis* DSM 4479^T verwendet, für die Denitrifikation *P. aeruginosa* (R12) und als Negativkontrolle *Bacillus sphaericus* DSM 28^T.

3.6.3 Testsystem API 20 E

Das Testsystem API 20 E (bioMérieux GmbH) wurde zur parallelen Analyse der Enzymaktivitäten von β -Galactosidase, Urease, Gelatinase, Arginin-Dihydrolase, Lysin-Decarboxylase, Ornithin-Decarboxylase und Tryptophan-Desaminase verwendet. Weiterhin wurden die Ergebnisse der Voges-Proskauer Reaktion, der Bildung von H₂S und Indol sowie der Citratmetabolisierung verwendet. Vorbereitend dazu wurden die Stämme 24 h auf TSA bei 30 °C inkubiert. Je Stamm wurde eine Kolonie in 5 ml Ringer-Lösung (1/4 stark) eingerührt und die Bakteriensuspension analog Anleitung in die Becher bzw. Röhrchen gefüllt. Die erforderlichen Reaktionen wurden nach Herstellerangaben mit Paraffin überschichtet. Die

Teststreifen wurden schließlich in der mit 5 ml MilliQ-Wasser befeuchteten Inkubationswanne bei Optimaltemperatur für 48 h inkubiert, wobei die Reaktionen nach 24 und 48 h ausgewertet wurden. Die Auswertung der Reaktionen, bei denen eine Reagenzzugabe erforderlich war, erfolgte nach 48 h.

3.6.4 Säurebildung aus Kohlenhydraten

Mit den in Tabelle 1 gelisteten Lösungen der Kohlenstoffquellen wurde in Anlehnung an das API 50 Kit (bioMérieux GmbH) analysiert, aus welchen Zuckern als alleinige Kohlenstoffquelle Säure gebildet werden kann. Jeder Stamm wurde am Vortag auf TSA ausgestrichen und bei 30 °C für 24 h inkubiert. Pro Stamm wurde eine dichte Bakteriensuspension in 1,5 ml Ringer-Lösung (1/4 stark) hergestellt. Diese Suspension wurde tropfenweise in 2,5 ml Ringer-Lösung (1/4 stark) in einem Reagenzröhrchen gegeben, bis die Trübung dem McFarland Standard 2 entsprach. Die doppelte Tropfenanzahl der Bakteriensuspension wurde nachfolgend in 5 ml CHB/E-Medium (bioMérieux GmbH) gegeben und gut gemischt. Von jeder Zuckerlösung wurden 100 µl pro Stamm in eine 96-Well Mikrotiterplatte (µCLEAR®, Greiner Bio-One GmbH) vorgelegt. Zu jedem Well wurden 100 µl der entsprechenden Bakteriensuspension gemischt und die Platten mit luftdurchlässiger Breathe-Easy® Folie (Diversified Biotech) verschlossen. Die Mikrotiterplatten wurden anschließend für sieben Tage bei RT und 450 rpm inkubiert. Nach 1, 2, 5, 6 und 7 Tagen erfolgte jeweils zur Uhrzeit des Inkubationsstarts die Auswertung. Ein Farbumschlag des pH-Indikators des CHB/E Mediums von Lila zu Gelb trat im Falle einer Säurebildung aus dem jeweiligen Zucker ein.

3.7 Chemotaxonomische Analysen

Alle chemotaxonomischen Analysen wurden vom Identifizierungsservice der DSMZ (Braunschweig, Deutschland) durchgeführt. Für die Analysen der Respiratorischen Chinone sowie der polaren Lipide wurden 200 mg gefriergetrocknete Zellen der Typstämme der zu charakterisierenden drei neuen Spezies benötigt. Hierfür wurde pro Stamm eine Übernachtskultur analog 3.2.2 hergestellt und 24 h lang inkubiert. Von dieser wurden 4 ml genutzt, um 4 l TSB als Hauptkultur zu beimpfen. Diese wurde 24 h bei Optimaltemperatur und 150 rpm geschüttelt. Am Folgetag wurden die Zellen schrittweise in 200 ml Zentrifugationsbecher bei 10.000 rpm und 10 °C für 15 min geerntet und der Überstand verworfen. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt wurden die Pellets zum Waschen in Ringer-Lösung (1/4 stark) resuspendiert und dabei in zwei Zentrifugationsbecher vereint. Nach einem finalen Zentrifugationsschritt wurde der Überstand verworfen und die Zellpellets bei -80 °C eingefroren. Die eingefrorenen Zellpellets wurden schließlich lyophilisiert.

3.7.1 *Respiratorische Chinone*

Zur Analyse der respiratorischen Chinone wurden diese zunächst in aus dem gefriergetrockneten Zellmaterial mittels Hexan extrahiert und anschließend mittels einer Silica-basierten Festphasenextraktion aufgereinigt (Tindall, 1990a, 1990b). Nach Auftrennung der verschiedenen Chinonklassen mittels Dünnschichtchromatographie erfolgte die Identifikation anhand einer HPLC-Analyse.

3.7.2 *Polare Lipide*

Die Extraktion der polaren Lipide erfolgt ebenfalls aus dem gefriergetrockneten Zellmaterial anhand eines modifizierten Protokolls nach (Bligh & Dyer, 1959). Hierfür wurden die Zellen über Nacht mit einer Chloroform : Methanol : 0,3 % wässriger NaCl-Lösung (v/v/v) 1:2:0,8 behandelt. Die polaren Lipide wurden anschließend aus der Chloroformphase gewonnen. Die Identifizierung erfolgte nach Auftrennung in einer zweidimensionalen Dünnschichtchromatographie mithilfe von Molybdätdiphosphorsäure und Reagenzien zur Detektion spezifischer funktioneller Gruppen (Tindall *et al.*, 2007).

3.7.3 *Zelluläre Fettsäuren*

Die Analysen der zellulären Fettsäuren erfolgten parallel für die Typstämme der drei zu charakterisierenden Spezies und den entsprechenden Referenzspezies aus Aktivkulturen auf TSA. Hierfür wurden die Fettsäuren in Fettsäuremethylester nach einem modifizierten Protokoll nach Miller (1982) und Kuykendall *et al.* (1988) umgewandelt und gaschromatographisch aufgetrennt. Die Detektion erfolgte mithilfe des Microbial Identification System (MIS) (MIDI, Microbial ID, Newark, DE 19711 U.S.A.) und die Auswertung mit der MIS Standard Software (Kämpfer & Kroppenstedt, 1996).

3.8 Hinterlegung in öffentlichen Stammsammlungen

Im Zuge der validen Charakterisierung neuer Taxa müssen diese in zwei internationalen Stammsammlungen hinterlegt werden. Hierfür wurden für alle drei neuen Spezies sowohl die Typstämme als auch die zusätzlichen Stämme als Aktivkulturen auf TSA an die Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) sowie die Belgian Coordinated Collection of Microorganisms/Laboratorium voor Microbiologie, Universiteit Gent (BCCM/LMG) geschickt. Im Falle der DSMZ wurde nach eingehender Überprüfung der Stämme jeweils ein gefriergetrocknetes Aliquot zurückgesendet, dessen Identität mithilfe eines *rpoD*-Sequenzabgleiches analog 3.2.3 bestätigt wurde. Die Stammsammlungsnummern der DSMZ und LMG sind in Tabelle 6 gelistet.

Ergebnisse

1 Prävalenz von *Pseudomonas* und deren Einflussfaktoren in Rohmilch von deutschen Erzeugerbetrieben

1.1 Quantifizierung von *Pseudomonas* in Rohmilch

Um die *Pseudomonas*-Prävalenz in deutscher Rohmilch analysieren zu können, musste eine spezifische Quantifizierung dieser Gattung gewährleistet werden. Klassischerweise wird hierfür die Kultivierung auf dem selektiven CFC-Agar verwendet. Da dies relativ zeit- und materialaufwändig ist, wurde nach einer molekularen Alternative auf Basis der isolierten DNA aus Rohmilch gesucht, da diese zum Zweck der Analyse des Rohmilchmikrobioms für die Proben vorlag. Zum einen wurde ein *Pseudomonas*-spezifischer qPCR Assay angepasst und validiert, zum anderen wurde die *Pseudomonas*-Keimzahl pro Probe aus den Mikrobiomdaten mithilfe der per Durchflusszytometrie gemessenen Gesamtkeimzahlen berechnet.

1.1.1 Validierung des *Pseudomonas*-spezifischen qPCR Assays

Der in Vorarbeiten etablierte *Pseudomonas*-spezifische qPCR Assay nach Maier *et al.* (2021) ermöglicht eine sensitive und spezifische Detektion der Gattung. Da für die Mikrobiomanalysen jedoch ein größeres Ausgangsvolumen an Rohmilch (30 ml) im Vergleich zum Originalprotokoll des qPCR-Assays (7,2 ml) verwendet wurde, musste eine entsprechende Standardkurve zur absoluten Quantifizierung hergestellt und validiert werden. Hierzu wurde von einer mit *Pseudomonas* beimpften Rohmilch eine serielle Verdünnungsreihe hergestellt und parallel die Ct-Werte per qPCR sowie die kultivierten Keimzahlen auf CFC-Agar ermittelt. Bei unbekanntem Proben kann damit anhand des gemessenen Ct-Wertes die entsprechende kultivierte Keimzahl berechnet werden. Abbildung 8 zeigt die Standardkurve (blau) zusammen mit den ersten gemessenen 11 Rohmilchproben (orange). Anhand der Geradengleichung und des Ct-Wertes konnte die zugehörige absolute *Pseudomonas*-Keimzahl der unbekanntem Probe berechnet werden.

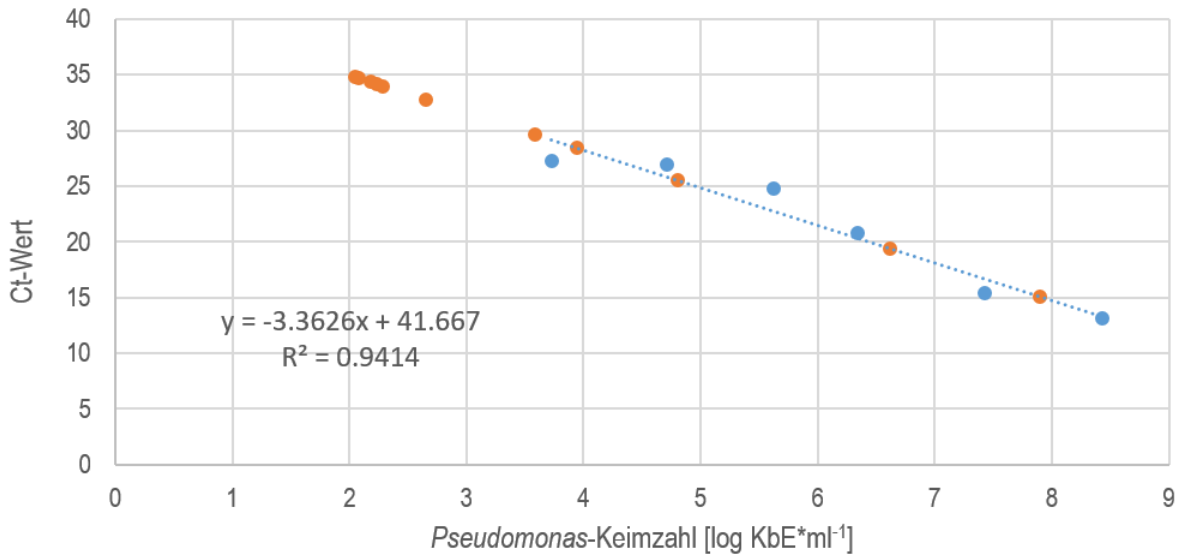


Abbildung 8: Standardkurve zur molekularen Quantifizierung der *Pseudomonas*-Keimzahlen in Rohmilch

Die Standardkurve (blau) besteht aus sechs seriellen Verdünnungsstufen von inokulierter Rohmilch mit *P. lundensis* DSM 6252^T. Anhand der Geradengleichung und des Ct-Wertes konnte die logarithmische *Pseudomonas*-Keimzahl der 11 unbekannt Proben (orange) berechnet werden.

Zur Validierung der Standardkurve wurden von den unbekannt Rohmilchproben parallel zur Quantifizierung per qPCR die entsprechenden *Pseudomonas*-Keimzahlen auf CFC-Agar ermittelt. Abbildung 9 zeigt den Vergleich der beiden Quantifizierungsmethoden anhand von 42 Rohmilchproben.

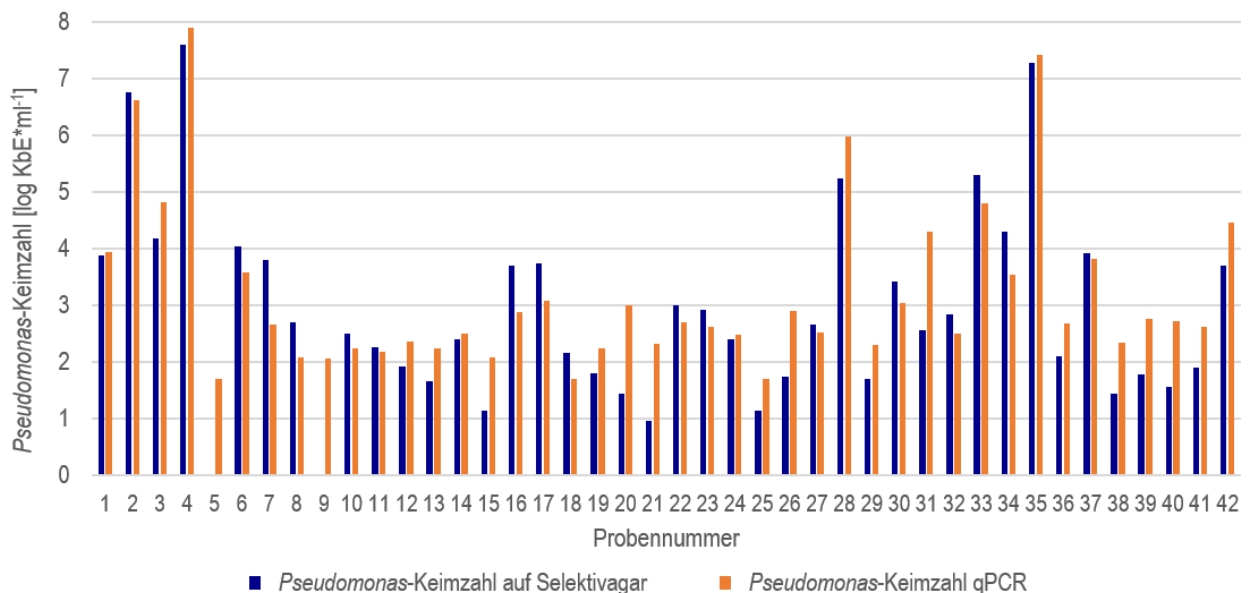


Abbildung 9: Validierung der *Pseudomonas*-Quantifizierung per qPCR

Zur Validierung des qPCR-Assays wurden parallel zu den per qPCR ermittelten logarithmischen Keimzahlen (orange) jene durch Plattierung auf CFC-Agar (blau) von 42 Rohmilchproben ermittelt.

Insbesondere bei Werten über $\log 3 \text{ KbE} \cdot \text{ml}^{-1}$ zeigte sich eine hohe Übereinstimmung der beiden Quantifizierungsmethoden. Dies entsprach dem Bereich, über den sich die Standardkurve erstreckt, da aufgrund der initialen Belastung der Rohmilch, die für die Standardkurve verwendet wurde, die höchste Verdünnung eine *Pseudomonas*-Belastung von $\log 3,7 \text{ KbE} \cdot \text{ml}^{-1}$ aufwies (vgl. Abbildung 8). Werte darunter wurden durch Extrapolation der Standardkurve berechnet. Dennoch konnte der direkte Vergleich mit den entsprechenden per Kultivierung ermittelten Keimzahlen auch für diesen Bereich eine akzeptable Quantifizierung zeigen. Als unteres Detektionslimit wurde die maximal durchgeführte Zykluszahl ($C_t = 35$) festgelegt, was einer *Pseudomonas*-Keimzahl von $\log 1,7 \text{ KbE} \cdot \text{ml}^{-1}$ entsprach. Dies deckte sich mit der empfohlenen unteren Detektionsgrenze des CFC-Agars von $\log 2$ nach (VDLUFA, 2002). Bei Vernachlässigung von Werten unter $\log 2 \text{ KbE} \cdot \text{ml}^{-1}$ konnte die größte Differenz bei Probe 31 mit $\log 1,7 \text{ KbE} \cdot \text{ml}^{-1}$ festgestellt werden. Da in dieser Arbeit keine exakte Quantifikation der *Pseudomonas*-Keimzahlen angestrebt war, sondern insbesondere eine Identifikation hochbelasteter Rohmilchproben bzw. Erzeugerbetriebe, wurde die Quantifizierung per qPCR als eine zeit- und materialschonende Alternative zur klassischen Kultivierung auf Selektivagar bewertet und für die weiteren Analysen verwendet.

1.1.2 Vergleich dreier Quantifizierungsmethoden für die *Pseudomonas*-Keimzahl in Rohmilch

Neben der Kultivierung auf CFC-Agar sowie der Quantifizierung per qPCR wurden die *Pseudomonas*-Keimzahlen aus den Mikrobiomdaten berechnet. Hierzu wurde der relative *Pseudomonas*-Anteil pro Probe, der mithilfe des *Taxonomic-Binning* Skripts der *Rhea-Pipeline* berechnet wurde, mit der entsprechenden per Durchflusszytometrie bestimmten Gesamtkeimzahl der Probe multipliziert. Abbildung 10 zeigt eine Gegenüberstellung der *Pseudomonas*-Keimzahlen von 42 Rohmilchproben, die mit den drei verschiedenen Methoden quantifiziert wurden. Da die anhand der Mikrobiomdaten berechneten Keimzahlen nicht als $\text{KbE} \cdot \text{ml}^{-1}$ wiedergegeben werden können, wird im Folgenden die Einheit $\text{Zellen} \cdot \text{ml}^{-1}$ für alle Quantifizierungsmethoden verwendet.

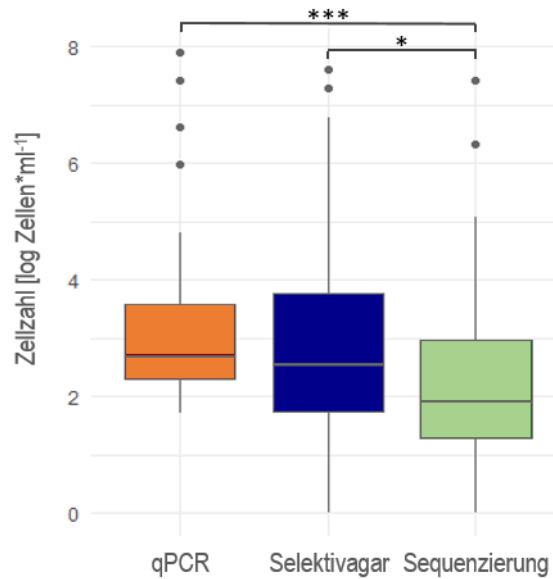


Abbildung 10: Vergleich dreier Methoden zur Quantifizierung von *Pseudomonas* in Rohmilch

Die logarithmische *Pseudomonas*-Keimzahlen von 42 Rohmilchproben wurden zum Methodenvergleich mittels qPCR (orange), Kultivierung auf Selektivagar (blau) und Berechnung aus den Mikrobiomdaten der Hochdurchsatzsequenzierung (grün) ermittelt. Signifikante Unterschiede wurden mit dem Wilcoxon Test mit Bonferroni Korrektur berechnet und sind mit Sternen markiert. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$

Der Vergleich der drei Methoden zeigte, dass die *Pseudomonas*-Keimzahlen, die anhand der Mikrobiomdaten berechnet wurden, signifikant niedriger als die per qPCR oder Selektivagar ermittelten Werte waren. Dies spiegelt sich in dem geringeren Mittelwert (Sequenzierung: $\log 3,0$ Zellen* ml^{-1} , qPCR und Selektivagar: $\log 3,4$ Zellen* ml^{-1}) und Median wider (Sequenzierung: $\log 2,8$ Zellen* ml^{-1} , qPCR: $\log 2,9$ Zellen* ml^{-1} , Selektivagar: $\log 3,1$ Zellen* ml^{-1}). Im Gegensatz dazu ist eine gute Übereinstimmung dieser Parameter für die Quantifizierung per qPCR und Selektivagar sichtbar. Aus diesem Grund, sowie den oben genannten Vorteilen einer molekularen Quantifizierung, wurden die *Pseudomonas*-Keimzahlen in Rohmilch in dieser Arbeit routinemäßig per gattungsspezifischem qPCR-Assay ermittelt.

1.2 Prävalenz von *Pseudomonas* in frischer Rohmilch aus Hofsammlertanks

1.2.1 Analyse absoluter *Pseudomonas*-Keimzahlen

Zur Analyse der Belastung deutscher Rohmilch mit *Pseudomonas* wurden die 444 Rohmilchproben aus den Hofsammlertanks von 122 Erzeugerbetrieben hinsichtlich der *Pseudomonas*-Keimzahlen, die per qPCR ermittelt wurden, sowie der per Durchflusszytometrie quantifizierten Gesamtkeimzahlen untersucht (Abbildung 11). Da die Gesamtkeimzahlen als Zellen* ml^{-1} berechnet werden, wird im Folgenden zum Zweck der Vereinheitlichung diese Einheit auch für die *Pseudomonas*-Keimzahlen verwendet.

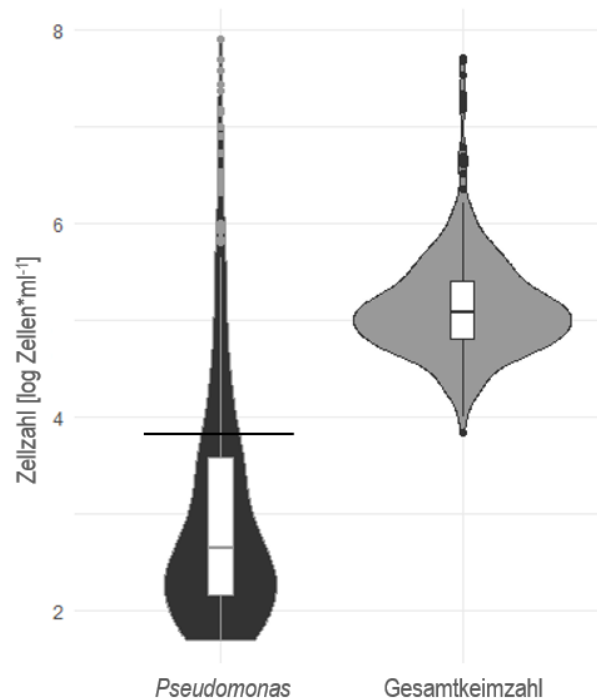


Abbildung 11: *Pseudomonas*-Keimzahlen und Gesamtkeimzahlen in Rohmilch aus Hofsammeltanks

Von 444 Rohmilchproben aus den Hofsammeltanks von 122 Erzeugerbetrieben wurden die logarithmischen *Pseudomonas*-Keimzahlen per qPCR (dunkel) sowie die Gesamtkeimzahlen per Durchflusszytometrie (hell) ermittelt. Die horizontale Linie markiert mit dem 80. Perzentil der *Pseudomonas*-Keimzahlen ($\log 3,82 \text{ Zellen} \cdot \text{ml}^{-1}$) den Grenzwert für *Pseudomonas*-auffällige Milchproben.

Die Gesamtkeimzahlen der Rohmilchproben zeigten eine homogene Verteilung, mit einem Mittelwert von $\log 5,14 \text{ Zellen} \cdot \text{ml}^{-1}$ und einem Median von $\log 5,07 \text{ Zellen} \cdot \text{ml}^{-1}$. Die am geringsten belastete Probe hatte eine Gesamtkeimzahl von $\log 3,85 \text{ Zellen} \cdot \text{ml}^{-1}$ und der am höchsten gemessene Wert lag bei $\log 7,71 \text{ Zellen} \cdot \text{ml}^{-1}$. Im Gegensatz zu den Gesamtkeimzahlen hatte die *Pseudomonas*-Keimzahl eine stark schiefe Verteilung. Dies zeigte sich auch in den größeren Unterschieden zwischen Mittelwert ($\log 3,04 \text{ Zellen} \cdot \text{ml}^{-1}$) und Median ($\log 2,64 \text{ Zellen} \cdot \text{ml}^{-1}$). Ein Großteil der Proben (45 %) hatte Werte zwischen $\log 2$ und $\log 3 \text{ Zellen} \cdot \text{ml}^{-1}$. Allerdings wiesen manche Proben Werte bis zu $\log 7,90 \text{ Zellen} \cdot \text{ml}^{-1}$ auf. Das 80. Perzentil lag bei $\log 3,82 \text{ Zellen} \cdot \text{ml}^{-1}$ und wurde als unterer Grenzwert für *Pseudomonas*-auffällige Proben definiert. Die Tatsache, dass einige Proben höhere *Pseudomonas*- als Gesamtkeimzahlen aufwiesen, lässt sich auf Differenzen zwischen den Detektionsmethoden zurückführen, da die *Pseudomonas*-Keimzahlen per qPCR, die Gesamtkeimzahlen jedoch per Durchflusszytometrie ermittelt wurden. Letztendlich konnte gezeigt werden, dass ein Großteil der Rohmilchproben nur gering mit *Pseudomonas* belastet war, jedoch einige Proben sehr hohe Keimzahlen dieser Gattung aufwiesen.

Für weitere Analysen wurden die Rohmilchproben dem jeweiligen Erzeuger zugeordnet. Bei 55,7 % der Erzeuger (n = 68) lagen alle Quartalsproben unter dem Grenzwert für *Pseudomonas*-auffällige Rohmilch von $\log 3,82 \text{ Zellen} \cdot \text{ml}^{-1}$. 24,6 % der Erzeuger (n = 30) wiesen eine Probe über dem Grenzwert auf, 11,5 % (n = 14) zwei und 8,2 % (n = 10) hatten drei auffällige Rohmilchproben. Für letzteren Fall lagen jedoch bei sechs der zehn Höfe nur drei Quartalsproben vor, für die anderen vier Höfe die vollständigen vier Proben. In keinem Fall wiesen vier Quartalsproben Werte über der auffälligen Belastung mit *Pseudomonas* auf.

1.2.2 Analyse des Milchkrobioms per Hochdurchsatzsequenzierung

Neben den absoluten Keimzahlen zur Analyse der *Pseudomonas*-Belastung in deutscher Rohmilch wurde das Milchkrobiom der Rohmilchproben per Hochdurchsatzsequenzierung generiert und analysiert. Nach Herausfiltern von Proben mit zu geringer *Read*-Zahl konnten die Daten von 425 Rohmilchproben analysiert werden.

Diversität der Rohmilchproben

Die Untersuchung zur Diversität der Rohmilchproben erfolgte mit der α -Diversität, welche die Anzahl an zOTUs pro Probe als sog. *Richness* misst. Die 425 sequenzierten Rohmilchproben wiesen variable α -Diversitäten zwischen 50 und 1128 zOTUs auf. Der Mittelwert lag bei 562 und der Median bei 576 zOTUs (Abbildung 12A). Zur weiteren Analyse wurde die α -Diversität separat für die verschiedenen Hofparameter betrachtet (Abbildung 12B-H). Beim Abholungsintervall war ein signifikanter Anstieg der Diversität bei zunehmender Lagerdauer sichtbar (Abbildung 12B). Weiterhin wiesen die süddeutschen Betriebe diversere Rohmilchen im Vergleich zu den in Norddeutschland bezogenen Proben auf (Abbildung 12C). Zudem war die Rohmilch von Laufstallbetrieben mit einer niedrigeren α -Diversität im Vergleich zur Kombination mit Weidegang oder Auslauf assoziiert. Letzteres wies zudem signifikante Unterschiede zur Anbindestallhaltung und deren Kombination mit Weide auf (Abbildung 12D). Bei der Produktionsart konnte für die Rohmilch von ökologischen Höfen eine signifikant höhere α -Diversität berechnet werden als bei Milch konventioneller Höfe (Abbildung 12E). Auch konnten Unterschiede zwischen dem manuellen Melkstand und dem Melkroboter bzw. der Rohmelkanlage gefunden werden (Abbildung 12F). Bei der Milchkühlung war die Durchlaufkühlung mit einer signifikant niedrigeren Diversität assoziiert als die reine Tankkühlung (Abbildung 12G) und bei der Euterhygiene war dies der Fall bei der Reinigung durch die Bürste des Melkroboters im Vergleich zu trockenen Methoden bzw. waschbaren Tüchern (Abbildung 12H).

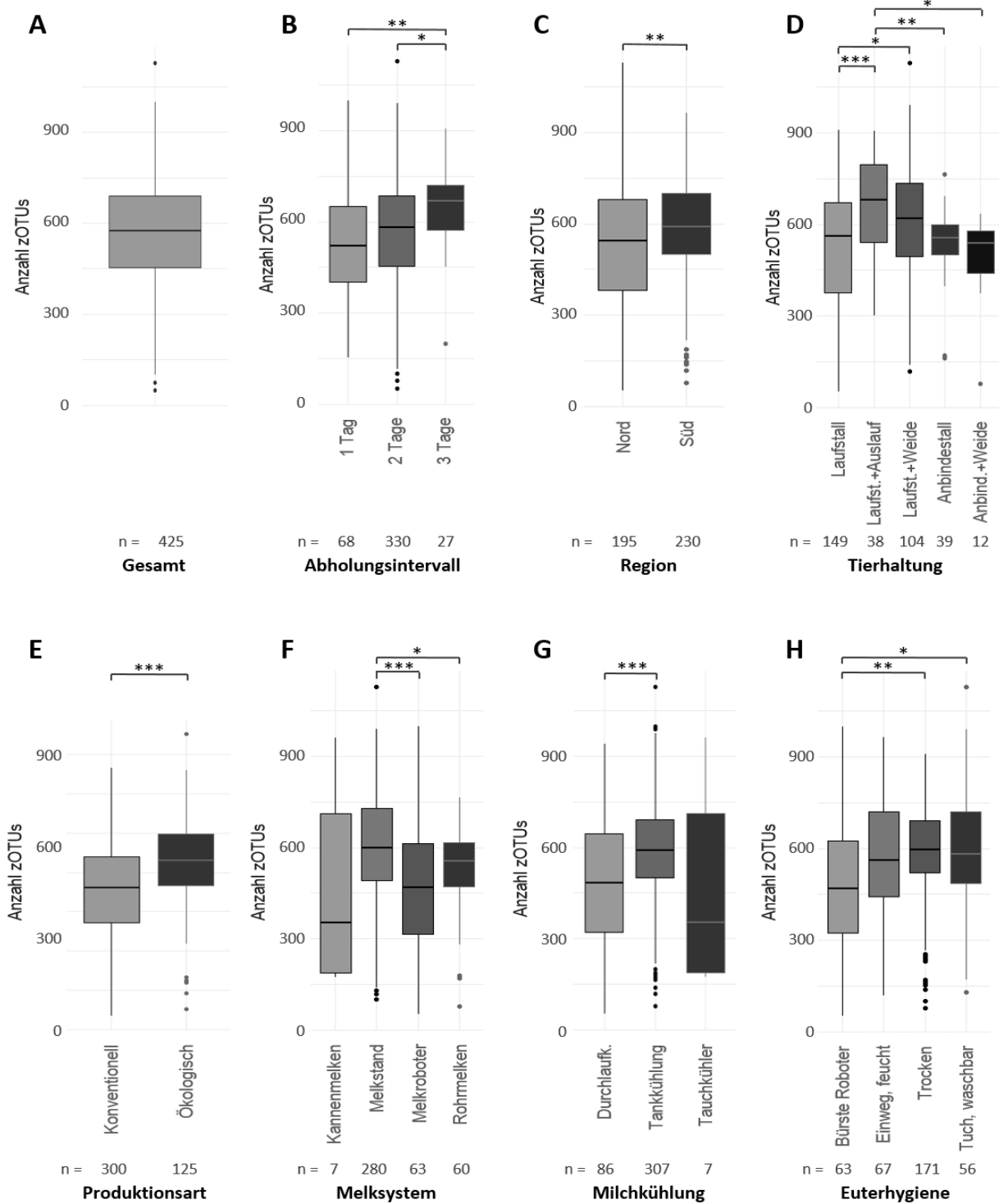


Abbildung 12: α -Diversität der Rohmilchproben aus den Hofsammlertanks

Die α -Diversität wurde aus den Mikrobiomdaten der 16S rRNA Amplikon Sequenzierung ermittelt und ist anhand der *Richness* mit den absoluten zOTUs für die gesamten Mikrobiomdaten (A) sowie differenziert nach einzelnen hofspezifischen Faktoren (B-H) dargestellt. Nur die Faktoren mit signifikanten Unterschieden sind gezeigt. Diese wurden mit dem Kruskal Wallis Test mit nachfolgendem paarweisen Dunn's Test mit Bonferroni-Korrektur für multiple Vergleiche berechnet und sind mit Sternen markiert. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$

Bis auf die Faktoren Produktionsart und Tierhaltung, die eine moderate Effektstärke und damit nennenswerte Differenzen zwischen den Subgruppen zeigten, war jene der anderen Faktoren klein. Keine signifikanten Unterschiede wurden für die Art der Milchstapelung, die Jahreszeit, die Reinigungsmethode des Melksystems sowie die Wasserversorgung gefunden (Daten sind nicht gezeigt).

Relative *Pseudomonas*-Belastung

Für die Analyse der relativen Belastung der Rohmilchproben mit *Pseudomonas* wurden die Daten des *Taxonomic-Binning* Skripts der *Rhea-Pipeline* herangezogen. Parallel zu den absoluten *Pseudomonas*-Keimzahlen (Abbildung 11) wies der Großteil der Proben nur eine sehr geringe relative Belastung mit dieser Gattung auf (Abbildung 13). Jedoch wurden bei 50 Proben (11,8 %) relative Anteile über 10 % gefunden. Bei 16 Rohmilchproben (3,8 %) betrug der Anteil dieser Gattung am Rohmilchmikrobiom über 50 % bis hin zu 95,9 %. Die durchschnittliche Belastung lag bei 5,5 %.

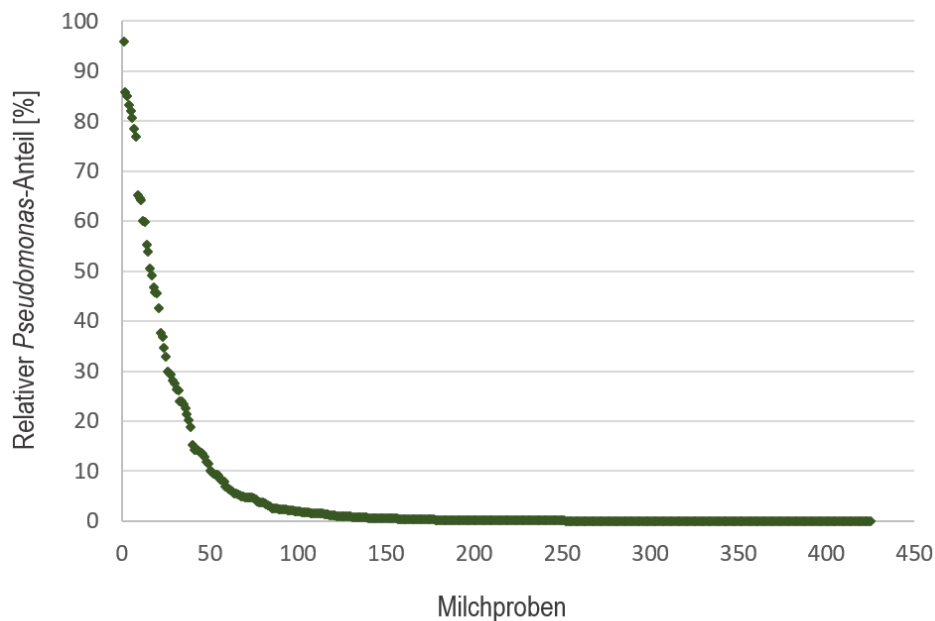


Abbildung 13: Relative *Pseudomonas*-Belastung der Rohmilchproben aus den Hofsammlertanks
Die 425 per 16S rRNA Amplikonsequenzierung analysierten Rohmilchproben aus den Hofsammlertanks von 122 Erzeugerbetrieben wurden anhand ihrer relativen *Pseudomonas*-Belastung [%] sortiert.

Analyse hofspezifischer Milchmikrobiota

In weitergehenden Analysen wurden die Rohmilchproben nach Erzeugerbetrieben gruppiert und die relative Zusammensetzung pro Hof verglichen. Analog zu den absoluten

Pseudomonas-Keimzahlen wies der Großteil der Höfe geringe *Pseudomonas*-Belastungen in allen drei bzw. vier Quartalsproben auf. Bei 24 der 122 Höfe wies eine Rohmilchprobe nennenswerte *Pseudomonas*-Belastungen > 5 % auf, bei 14 Höfen war dies bei zweien und bei fünf Höfen bei dreien der Fall. Bei Betrachtung des gesamten Mikrobioms konnte ein großer Teil der Erzeugerbetriebe in drei exemplarische Kategorien der mikrobiellen Zusammensetzung eingeteilt werden. Abbildung 14 zeigt sieben repräsentative Höfe dieser drei Profile. Viele der Höfe wiesen geringe Unterschiede zwischen den zugehörigen Quartalsproben auf (Profil 1). Die meisten Höfe dieser Kategorie waren zudem durch eine vergleichbare Gattungsverteilung charakterisiert (s. Abbildung 14 A-C). Diese war dominiert von *Corynebacterium* (durchschnittlicher Anteil bei den repräsentativen Höfen 228, 259 und 260 von 16 %), gefolgt von *Streptococcus* (11 %), *Romboutsia* (10 %), *Clostridium* Cluster XI (7 %) und *Aerococcus* (6 %). Im Gegensatz dazu wiesen die mikrobiellen Zusammensetzungen der Höfe von Profil 2 und 3 starke Unterschiede zwischen den Quartalsproben auf. Zudem hatten einzelne Gattungen sehr hohe Anteile am Gesamtmikrobiom. Profil 3 (repräsentiert durch Hof 109 und Hof 27) unterschied sich von Profil 2 (repräsentiert durch Hof 237 und Hof 247) durch die teilweise hohen Anteile an *Pseudomonas*. Bei den Höfen von Profil 2 wurden relative Anteile für einzelne Gattungen > 30 % für *Streptococcus* (44 % und 62 % für Hof 247 a und Hof 247 b), *Lactococcus* (40 % für Hof 237 a) und *Acinetobacter* (31 % für Hof 237 b) gefunden. Bei Profil 3 war dies lediglich bei *Streptococcus* (66 % bzw. 51 % für Hof 109 a und Hof 27 b) und *Pseudomonas* (33 % bzw. 47 % für Hof 109 b und Hof 109 d) der Fall. Eine detaillierte Auflistung der relativen Anteile pro Gattung ist in Tabelle A 1 verzeichnet. Letztendlich stehen diese Daten jedoch nur für drei auffällige Kategorien des Datensatzes und bilden nicht die gesamte Diversität aller Erzeugerbetriebe ab.

Zur Analyse der β -Diversität zwischen den mikrobiellen Zusammensetzungen der einzelnen Höfe wurde ein MetaNMDS-Plot mithilfe des β -Diversitätsskripts erstellt (Abbildung 15). Bei den Höfen von Muster 1 (Hof 228, Hof 259 und Hof 260) lagen die einzelnen Quartalsproben eng beieinander. Zudem war die Distanz zwischen den Höfen relativ klein. Im Gegensatz dazu wiesen insbesondere die Höfe von Muster 3 (Hof 109 und 27) eine große Variation und starke Überlappungen mit den Rohmilchproben anderer Höfe auf. Dies spiegelt die große Varianz zwischen den einzelnen Quartalsproben wider. Der p-Wert der MetaNMDS Analyse von 0,001 verweist auf signifikante Unterschiede zwischen den mikrobiellen Profilen einzelner Höfe hin.

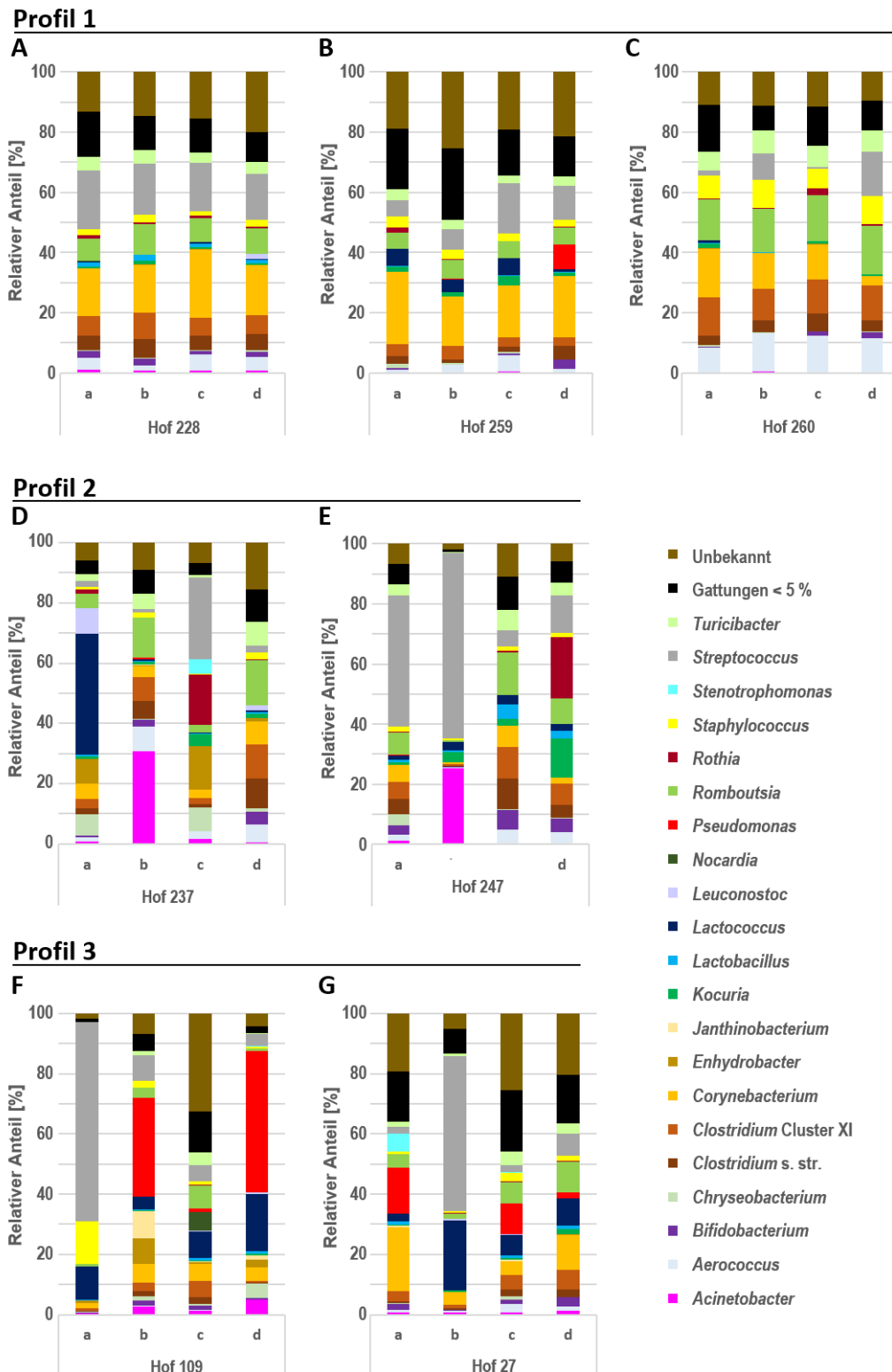


Abbildung 14: Komposition der vier Rohmilchproben aus den Hofsaammeltanks von sieben repräsentativen Erzeugerbetrieben

Die per 16S rRNA Amplikonsequenzierung ermittelten relativen Zusammensetzungen der vier Quartalsproben (a-d) aus den Hofsaammeltanks von sieben repräsentativen Höfen (A-G) wurden mithilfe des *Taxonomic Binning* Skripts der *Rhea-Pipeline* berechnet. Die Zusammensetzung ist anhand der relativen Abundanz auf Gattungsebene in % dargestellt. Die Höfe sind anhand ihrer mikrobiellen Profile (1-3) gruppiert.

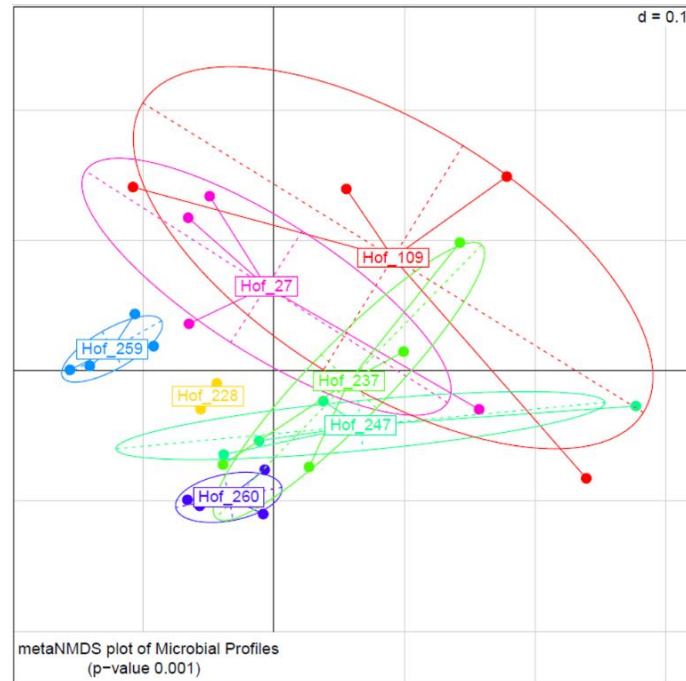


Abbildung 15: MetaMDS Plot der mikrobiellen Profile der sieben repräsentativen Höfe für die drei hofspezifischen Mikrobiom-Muster

Die β -Diversitätsanalyse basiert auf generalisierten UniFrac Distanzen der mikrobiellen Profile auf Gattungsebene und umfasst je vier Quartalsproben von sieben Erzeugerbetrieben. Der p-Wert von 0,001 indiziert signifikante Unterschiede zwischen den mikrobiellen Profilen der Höfe.

Im Abschluss der Charakterisierung hofspezifischer mikrobieller Muster wurde die Gesamtkeimzahl der Rohmilchproben analysiert (Tabelle A 1). Die Höfe von Muster 1 hatten eine mittlere Gesamtkeimzahl von $\log 5,0 \text{ Zellen} \cdot \text{ml}^{-1}$, welche leicht niedriger als der Mittelwert aller analysierten Rohmilchproben mit $\log 5,1 \text{ Zellen} \cdot \text{ml}^{-1}$ war. Die Mittelwerte von Muster 2 und 3 lagen mit $\log 5,3$ bzw. $\log 5,5 \text{ Zellen} \cdot \text{ml}^{-1}$ darüber.

Zusammenfassend deuten diese Daten darauf hin, dass viele Höfe ein Management betrieben, das zu einem stabilen, vergleichbaren Rohmilchmikrobiom führte, welches insbesondere von Gram-positiven Gattungen wie *Corynebacterium* dominiert wurde. Demgegenüber standen Höfe, deren Rohmilchmikrobiom stark variierte und durch unbekannte Gegebenheiten sensibel für Kontaminationen oder das Wachstum bestimmter Spezies wie *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Acinetobacter* oder *Pseudomonas* war, die die Rohmilch sporadisch dominierten. Zudem wiesen sie höhere durchschnittliche Gesamtkeimzahlen auf.

Korrelationen zwischen *Pseudomonas* und anderen Gattungen

Als abschließende Untersuchung des Rohmilchmikrobioms wurden Korrelationen zwischen *Pseudomonas* und anderen Gattungen berechnet, was auf positive oder negative Interaktionen hinweisen könnte. Hierzu wurden die relativen Anteile der einzelnen Gattungen

verwendet und die Korrelation nach Spearman berechnet. Abbildung 16 zeigt die Korrelationen zwischen den zehn prävalentesten Gattungen der 444 Rohmilchproben.

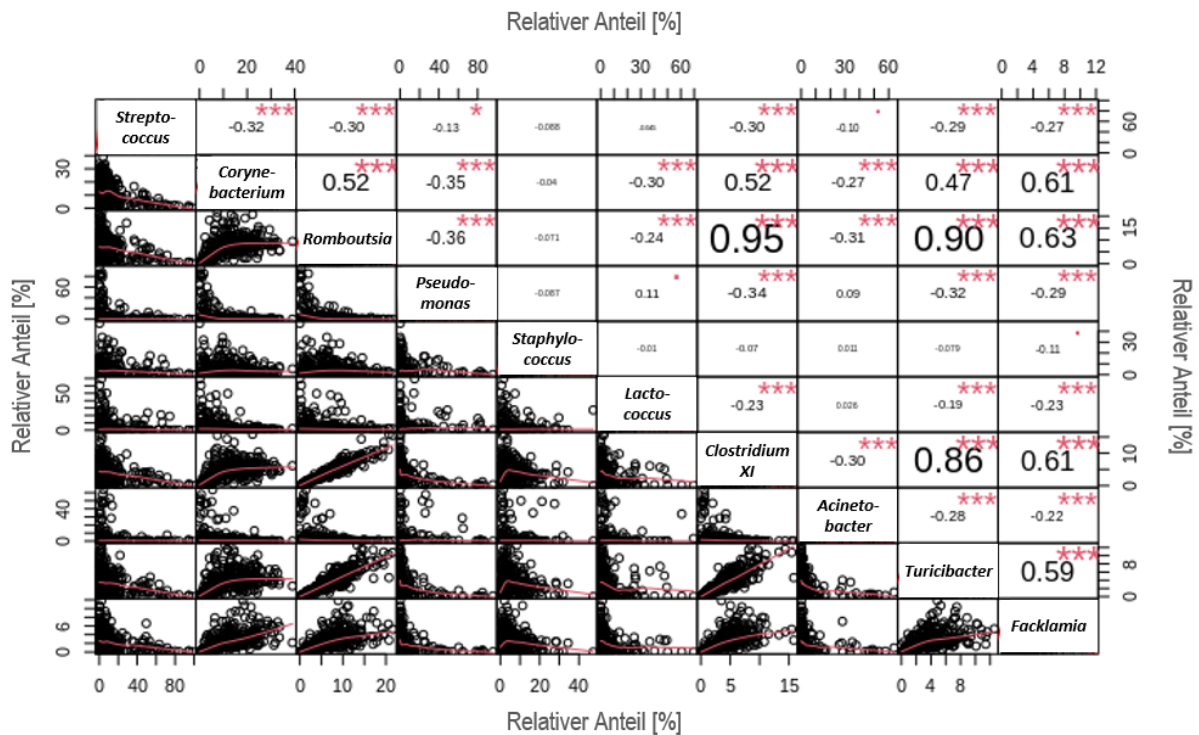


Abbildung 16: Korrelationen zwischen den zehn prävalentesten Gattungen in den 444 Rohmilchproben aus Hofsammlertanks

Die Korrelationen zwischen den relativen Anteilen [%] der verschiedenen Gattungen wurden nach Spearman berechnet. Signifikante Unterschiede sind mit roten Sternen markiert (*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$). Die Zahlen im rechten Teil der Grafik entsprechen dem Korrelationskoeffizienten ρ zwischen dem entsprechenden Gattungspaar. Im linken Teil der Grafik sind die Korrelationsplots des jeweiligen Paares gezeigt (*Datenanalyse und Abbildung von Tasja Buschhardt, BfR, Berlin*).

Insgesamt konnten keine relevanten Korrelationen ($\rho > 0,5$) zwischen *Pseudomonas* und anderen Gattungen festgestellt werden. Allerdings ergaben die Analysen signifikante negative Assoziationen mit *Romboutsia* ($\rho = -0,36$), *Corynebacterium* ($\rho = -0,35$), *Clostridium* Cluster XI ($\rho = -0,34$), *Turicibacter* ($\rho = -0,32$) und *Facklamia* ($\rho = -0,34$). Positive Korrelationen für andere Gattungspaare mit $\rho > 0,5$ ergaben sich für *Corynebacterium* mit *Romboutsia* ($\rho = 0,52$), *Clostridium* Cluster XI ($\rho = 0,52$) und *Facklamia* ($\rho = 0,61$), im Fall von *Romboutsia* zusätzlich mit *Clostridium* Cluster XI ($\rho = 0,95$), *Turicibacter* ($\rho = 0,90$) und *Facklamia* ($\rho = 0,63$), bei *Clostridium* Cluster XI zusätzlich mit *Turicibacter* ($\rho = 0,81$) und *Facklamia* ($\rho = 0,61$) und letztendlich noch zwischen *Turicibacter* und *Facklamia* ($\rho = 0,59$). Negative Korrelationen $< \rho = 0,5$ wurden nicht gefunden. Zusammenfassend war eine Gruppe an Gram-positiven Gattungen vorhanden, die untereinander positiv korreliert waren, jedoch teilweise eine negative Assoziation zu *Pseudomonas* aufwiesen.

1.3 Analyse hofseitiger Einflussfaktoren auf die *Pseudomonas*-Keimzahl

Frühere Untersuchungen unseres Instituts konnten zeigen, dass Rohmilch unabhängig von der Lagerdauer hohe *Pseudomonas*-Keimzahlen aufweisen kann (unpublizierte Daten). Dies und die in 1.1 und 1.2 gezeigten Ergebnisse indiziert das Vorhandensein von Höfen, welche wiederholt hohe *Pseudomonas*-Belastungen aufweisen. Zur Analyse potentieller hofseitiger Einflussfaktoren auf die *Pseudomonas*-Belastung von Rohmilch wurden die per qPCR ermittelten *Pseudomonas*-Keimzahlen sowie die per Durchflusszytometrie gemessenen Gesamtkeimzahlen in Abhängigkeit von den per Fragebogen ermittelten hofspezifischen Charakteristika betrachtet. Zunächst wurde der Einfluss der Lagerdauer am Hof in Form der unterschiedlichen Abholungsintervalle (1, 2 und 3 Tage) analysiert (Abbildung 17).

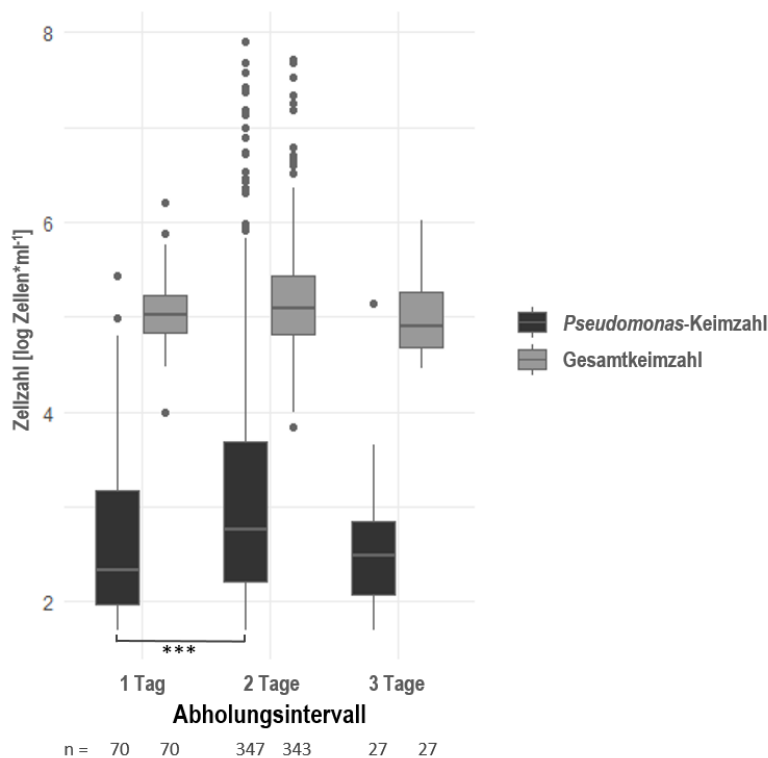


Abbildung 17: Einfluss der verschiedenen Abholungsintervalle der Rohmilch auf die *Pseudomonas*- und Gesamtkeimzahlen

Pseudomonas-Keimzahlen (dunkelgrau) und Gesamtkeimzahlen (hellgrau) in Abhängigkeit der Abholungsintervalle der Rohmilch beim Erzeuger (1, 2 und 3 Tage). Signifikante Unterschiede wurden per Kruskal-Wallis Test mit nachfolgendem Dunn's Test mit Bonferroni-Korrektur für multiple Vergleiche berechnet und sind mit Sternen markiert. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$

Bei *Pseudomonas* konnten signifikant niedrigere Keimzahlen bei täglicher im Vergleich zur zweitägigen Abholung festgestellt werden. Die dreitägige Abholung wies keine signifikanten Unterschiede auf. Jedoch war die Probengröße mit 27 Rohmilchproben im Vergleich zu den anderen Abholungsintervallen (70 für tägliche und 347 für zweitägige Abholung) relativ klein.

Bei der Gesamtkeimzahl konnten keine signifikanten Differenzen festgestellt werden. Dies deutet darauf hin, dass die Lagerung bei kalten Temperaturen ein exklusiver Einflussfaktor auf *Pseudomonas* als kältetolerante Gattung ist. Trotz der kurzen Lagerdauer am Hof von einem Tag wiesen sieben der 70 Rohmilchproben *Pseudomonas*-Keimzahlen über dem Grenzwert von $\log 3,82 \text{ Zellen} \cdot \text{ml}^{-1}$ für *Pseudomonas*-auffällige Proben auf. Insgesamt unterstützen die Daten die Hypothese, dass eine verlängerte Lagerung der Rohmilch zu einer höheren *Pseudomonas*-Belastung führt, es jedoch andere Faktoren geben muss, die in hohen initialen Kontaminationen resultieren können.

Als unabhängiger Faktor vom Erzeugerbetrieb wurde der jahreszeitliche Effekt analysiert. Hier konnten signifikant niedrigere *Pseudomonas*-Keimzahlen im Sommer im Vergleich zu den Rohmilchproben aus dem Frühjahr festgestellt werden. Für den restlichen Jahresverlauf war ein Trend von steigenden *Pseudomonas*-Keimzahlen sichtbar, wobei die Werte im Winter stark streuten. Die Gesamtkeimzahlen zeigten einen kontinuierlichen Anstieg von Frühling zu Winter, wobei signifikante Unterschiede zwischen den Frühjahrs- und Sommerproben im Vergleich zum Winter berechnet wurden (Abbildung 18A). Bei der Produktionsart konnten signifikant niedrigere Werte sowohl bei *Pseudomonas* als auch bei der Gesamtkeimzahl bei den ökologischen Proben im Vergleich zu den konventionell produzierten festgestellt werden (Abbildung 18B). Bei der Tierhaltung hatten die Milchproben von Betrieben mit reiner Laufstallhaltung signifikant höhere *Pseudomonas*-Belastungen im Vergleich zur Kombination mit Auslauf oder Weidegang sowie zur Anbindestallhaltung in Kombination mit Weidegang. Die Ergebnisse der Gesamtkeimzahlen waren vergleichbar, wenn auch mit leicht unterschiedlichem Verhalten der Signifikanzen (Abbildung 18C). Die Art der Tierhaltung war der einzige Faktor, der eine moderate Effektstärke zeigte, sowohl bei *Pseudomonas* als auch bei der Gesamtkeimzahl, wohingegen die anderen Faktoren lediglich geringe Effektstärken aufwiesen. Abschließend konnten signifikante Differenzen bei den Pseudomonaden für die Art der Milchkühlung gefunden werden. Hier wies die reine Tankkühlung geringere Werte auf als die Vorkühlung im Durchlaufkühler oder die Kühlung per Tauchkühler. Für die Gesamtkeimzahlen wurden keine signifikanten Unterschiede festgestellt (Abbildung 18D).

Zu den Faktoren ohne signifikanten Einfluss auf die *Pseudomonas*-Keimzahlen zählten die Art des Melksystems, die Reinigungsmethode für das Melksystem, die Art der Milchstapelung, die Euterhygiene, die Wasserversorgung sowie der Vergleich zwischen Nord- und Süddeutschland. Die Daten sind in Abbildung A 1 einsehbar. Zudem wurde eine Korrelation zur Liefermenge pro Jahr berechnet, was ebenfalls keinen signifikanten Zusammenhang zeigte, lediglich einen positiven Trend (Daten nicht gezeigt).

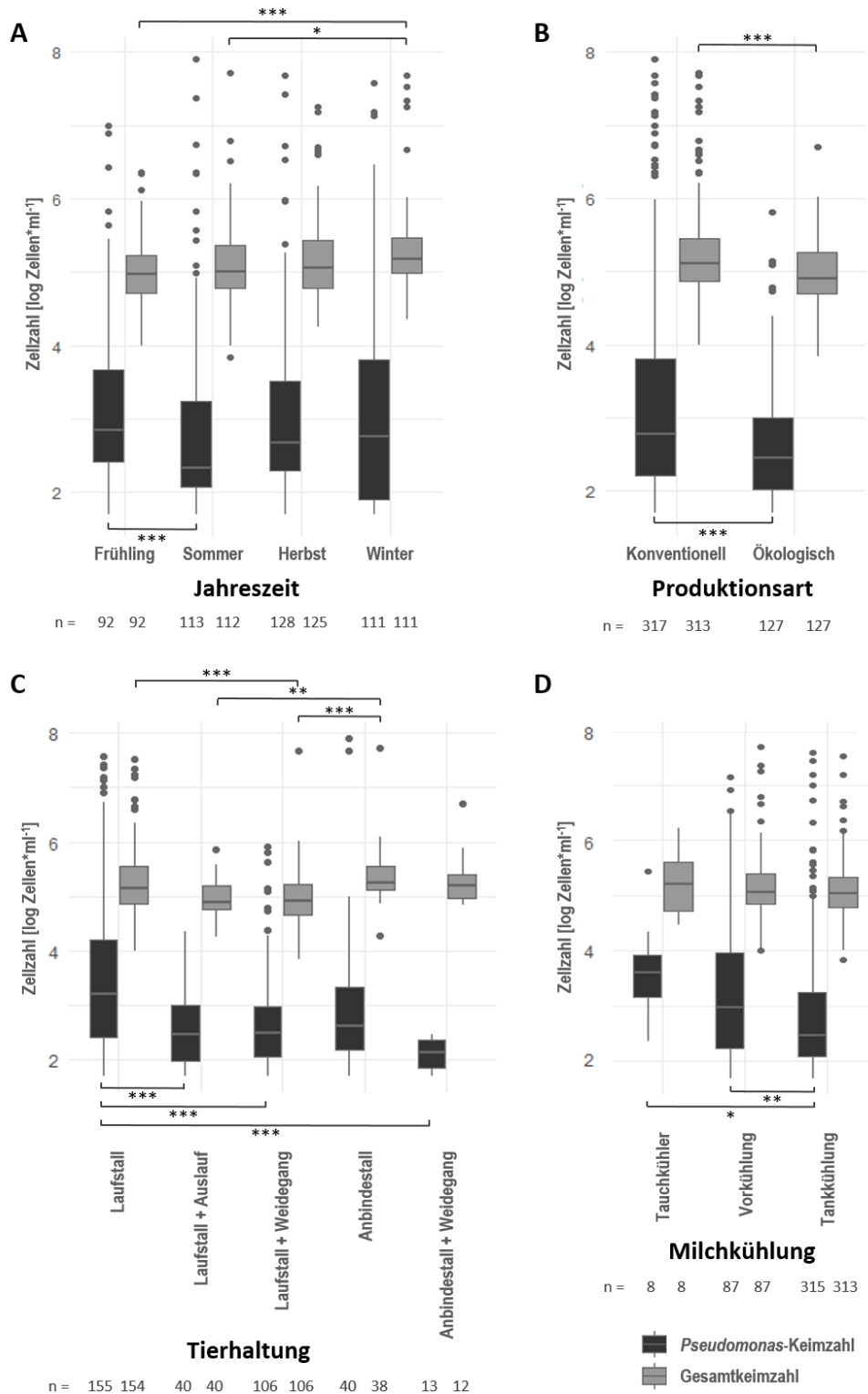


Abbildung 18: Einfluss von Jahreszeit, Produktionsart, Tierhaltung und Milchkühlung auf die *Pseudomonas*- und Gesamtkeimzahl der Rohmilch

Pseudomonas-Keimzahlen (dunkelgrau) und Gesamtkeimzahlen (hellgrau) in Abhängigkeit der Faktoren mit signifikantem Effekt auf die *Pseudomonas*-Keimzahl (A, Jahreszeit; B, Produktionsart; C, Tierhaltung; D, Milchkühlung). Signifikante Unterschiede wurden per Kruskal-Wallis Test mit nachfolgendem Dunn's Test mit Bonferroni-Korrektur für multiple Vergleiche berechnet und sind mit Sternen markiert. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$

Zusammenfassend zeigen die Analysen, dass es neben der Lagerdauer Faktoren gibt, die exklusiv die *Pseudomonas*-Keimzahl beeinflussen (Jahreszeit und Milchkühlung) sowie jene, die einen umfassenden Einfluss auf das Milchmikrobiom haben (Produktionsart und Tierhaltung).

Ein Vergleich der absoluten *Pseudomonas*-Keimzahlen mit der α -Diversität in Abhängigkeit von den hofspezifischen Einflussfaktoren zeigt häufig ein gegenläufiges Verhalten. Im Fall der Produktionsart waren die ökologisch erzeugten Rohmilchproben mit signifikant niedrigeren *Pseudomonas*-Belastungen assoziiert (Abbildung 18B), jedoch war die α -Diversität signifikant höher (Abbildung 12E). Bei der Tierhaltung wies die reine Laufstallhaltung höhere Keimzahlen auf im Vergleich zur Kombination mit Auslauf oder Weide (Abbildung 18C), was gleichzeitig jedoch mit einer signifikant geringeren α -Diversität verbunden war (Abbildung 12D). Auch bei der Art der Milchkühlung ist dieser gegenläufige Trend sichtbar (Abbildung 12D und Abbildung 12G). Eine signifikante negative Korrelation zwischen den Faktoren *Pseudomonas*-Keimzahl und α -Diversität konnte nicht errechnet werden (Daten nicht gezeigt). Dennoch weisen die Ergebnisse darauf hin, dass höhere *Pseudomonas*-Keimzahlen mit niedrigerer mikrobieller Diversität assoziiert sind.

1.4 Identifikation von Eintragsrouten beim Erzeuger

Zur Identifikation möglicher Eintrittsstellen von *Pseudomonas* beim Erzeuger wurden anhand der Quartalsproben vier Betriebe ausgewählt, die eine durchschnittliche *Pseudomonas*-Belastung $> \log 4$ Zellen*ml⁻¹ aufwiesen. Diese Höfe werden im Nachfolgenden als „*Pseudomonas*-auffällige“ Höfe bezeichnet. Als „*Pseudomonas*-unauffällige“ Höfe wurden vier Erzeugerbetriebe beprobt, deren durchschnittliche Belastung $< \log 2,5$ Zellen*ml⁻¹ war. Durch einen Vergleich der beiden Kategorien sollten mögliche Eintrittsrouten von *Pseudomonas* in Rohmilch identifiziert werden. Aufgrund der individuellen Bauweisen der Melksysteme standen einige Probenahmestellen nicht bei allen Betrieben zur Verfügung.

1.4.1 Analyse der *Pseudomonas*-Keimzahlen der Stufenkontrollen

Die *Pseudomonas*-Keimzahlen der Probenahmestellen auf den acht Erzeugerbetrieben wurden durch Kultivierung auf CFC-Agar ermittelt. Abbildung 19 zeigt die logarithmische *Pseudomonas*-Belastung als Heat-Map, wobei Keimzahlen $< \log 2$ KbE*ml⁻¹ in Grün, zwischen $\log 2$ und $\log 4$ KbE*ml⁻¹ in Gelb und $> \log 4$ KbE*ml⁻¹ in Rot dargestellt sind. Letzteres wurde anhand des Grenzwertes für belastete Rohmilch der Quartalsproben von $\log 3,82$ KbE*ml⁻¹ festgelegt. Die Probenahmestellen sind zudem in die Bereiche Rohmilchtank, Melkanlage, Melkzeug und Wasserproben gegliedert.

Bereich	Probenbeschreibung	<i>Pseudomonas</i> -auffällig				<i>Pseudomonas</i> -unauffällig			
		Hof 1	Hof 2	Hof 3	Hof 4	Hof 5	Hof 6	Hof 7	Hof 8
	Rohmilch	<1,00	2,86	3,26	3,30	2,89	2,52	1,18	2,52
Rohmilch-tank	Zapfhahn	6,18	4,63	2,94	7,70	3,00	5,60	2,30	<1,00
	Deckel Zapfhahn	NV	NV	5,21	NV	NV	NV	6,85	4,14
	Innenseite Tank	NV	NV	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00
	Tankdeckel	<1,00	5,74	1,56	<1,00	3,10	4,97	1,00	2,75
	Gummidichtung Tankdeckel	1,48	5,70	NV	3,39	3,55	2,95	3,54	3,28
	Öffnung Entlüftung	4,68	NV	2,83	NV	<1,00	<1,00	2,18	NV
	Entlüftungsdeckel	NV	5,97	<1,00	<1,00	4,34	<1,00	<1,00	NV
Melkanlage	Rohr Milchzufuhr	<1,00	4,79	2,32	3,89	3,78	1,78	<1,00	2,49
	Halterung Rohr Milchzufuhr	5,00	4,26	4,71	4,81	5,70	1,95	NV	5,48
	Milchabscheider	3,36	<1,00	4,96	3,89	3,60	1,30	NV	<1,00
	Zulauf Milchabscheider	NV	<1,00	NV	4,62	NV	3,17	<1,00	<1,00
	Milchfilter nach Melken	5,72	2,30	6,35	NV	5,54	5,17	2,78	5,19
	Halterung Milchfilter	1,00	NV	5,47	2,92	2,87	1,30	<1,00	2,28
Melkzeug	Sammelstück	NV	NV	2,36	4,16	<1,00	2,08	NV	1,30
	Dichtung Sammelstück	5,48	5,93	5,15	4,02	NV	4,44	NV	4,79
	Zitzenbecher	<1,00	1,86	2,53	3,79	4,74	0,05	<1,00	NV
	Halterung Zitzenbecher	2,00	1,86	6,70	4,00	5,00	3,25	<1,00	4,17
Wasser-proben	Kaltwasser Melksystemreinigung	2,00	NV	<1,00	<1,00	2,13	<1,00	<1,00	<1,00
	Warmwasser Melksystemreinigung	<1,00	NV	NV	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00
	Kaltwasser Tankreinigung	<1,00	<1,00	NV	NV	<1,00	NV	NV	<1,00
	Warmwasser Tankreinigung	<1,00	<1,00	NV	NV	1,00	NV	NV	<1,00
	Wasser Nachspülung	<1,00	<1,00	2,72	3,22	NV	<1,00	NV	<1,00

Abbildung 19: Heat-Map der *Pseudomonas*-Keimzahlen der Stufenkontrollen auf Erzeugerbetrieben

Die *Pseudomonas*-Keimzahlen [$\log \text{KbE} \cdot \text{ml}^{-1}$] der einzelnen Probenahmestellen beim Erzeuger (Hof 1-8) sind nach *Pseudomonas*-auffälligen (Hof 1-4) und unauffälligen Betrieben (Hof 5-8) sowie nach den Bereichen der Probenahmestelle (Rohmilchtank, Melkanlage, Melkzeug und Wasserproben) aufgeteilt. Die Farbkodierung zeigt die Belastung der Proben mit *Pseudomonas* an (grün, $< \log 2$; gelb, $\log 2 - \log 4$; rot, $> \log 4 \text{ KbE} \cdot \text{ml}^{-1}$). NV, Probe nicht verfügbar; $< 1,00$, nicht detektierbar

Insgesamt konnten auch bei den *Pseudomonas*-unauffälligen Höfen Stellen mit hoher *Pseudomonas*-Last festgestellt werden. Die Probenahmestellen „Deckel Zapfhahn“, „Halterung Rohr Milchzufuhr“, „Milchfilter nach Melken“, „Dichtung Sammelstück Melkzeug“ und „Halterung Zitzenbecher“ wiesen bei mindestens zwei der vier unauffälligen Höfe Belastungen über $\log 4 \text{ KbE} \cdot \text{ml}^{-1}$ auf. Bei den *Pseudomonas*-auffälligen Höfen waren jedoch insbesondere im Bereich der Melkanlage und des Melkzeugs häufiger belastete Stellen zu finden. Hier waren „Zapfhahn“, „Halterung Rohr Milchzufuhr“, „Milchfilter nach Melken“, und „Dichtung Sammelstück Melkzeug“ mindestens in zwei Fällen stark belastet. Interessanterweise wiesen die Rohmilchproben der *Pseudomonas*-auffälligen Höfe ähnlich niedrige *Pseudomonas*-Keimzahlen wie jene der unauffälligen Höfe auf. Lediglich bei Hof 3

und 4 waren diese mit $> \log 3 \text{ KbE} \cdot \text{ml}^{-1}$ leicht erhöht. Allerdings konnte nicht gewährleistet werden, dass die Rohmilch zum Zeitpunkt der Abholung durch den Sammelwagen beprobt wurde, weshalb die Stapeldauer am Hof unterschiedlich war und nicht jenen der Quartalsproben entsprach. *Pseudomonas*-Konzentrationen $> \log 6 \text{ KbE} \cdot \text{ml}^{-1}$ wurden in fünf Fällen gefunden, wobei vier davon bei den *Pseudomonas*-auffälligen Höfen auftraten. Diese waren der Zapfhahn von Hof 4 mit $\log 7,70 \text{ KbE} \cdot \text{ml}^{-1}$, gefolgt von dem Deckel des Zapfhahns des unauffälligen Hofes 7 ($\log 6,85 \text{ KbE} \cdot \text{ml}^{-1}$), der Halterung der Zitzenbecher von Hof 3 ($6,70 \text{ KbE} \cdot \text{ml}^{-1}$), der Milchfilter nach dem Melken von Hof 3 ($\log 6,35 \text{ KbE} \cdot \text{ml}^{-1}$) sowie dem Zapfhahn von Hof 1 ($\log 6,18 \text{ KbE} \cdot \text{ml}^{-1}$). Die Wasserproben waren grundsätzlich gering mit *Pseudomonas* belastet. Lediglich die Kaltwasserprobe für die Reinigung des Melksystems wies bei Hof 1 und 5 mit $\log 2,00$ bzw. $\log 2,13 \text{ KbE} \cdot \text{ml}^{-1}$ geringe Keimzahlen auf. Das Nachspülwasser war nur bei den *Pseudomonas*-auffälligen Höfen 3 und 4 mit $\log 2,72$ bzw. $\log 3,22 \text{ KbE} \cdot \text{ml}^{-1}$ deutlich belastet. Neben den Wasserproben war die einzige Probenahmestelle, die bei allen Höfen ohne Nachweis von *Pseudomonas* war, die Innenseite des Rohmilchtanks.

Bei separater Betrachtung der einzelnen Höfe war auffällig, dass jeder Hof sein eigenes Muster an belasteten Probenahmestellen aufwies. Bei den *Pseudomonas*-auffälligen Höfen waren beispielsweise Hof 1 und 2 über alle drei Bereiche von Rohmilchtank, Melksystem und Melkanlage relativ gleichmäßig belastet, wohingegen sich die Stellen mit hohen Keimzahlen bei Hof 3 und 4 im Bereich Melkanlage und Melkzeug konzentrierten.

Zusammenfassend waren die mit *Pseudomonas*-belasteten Probenahmestellen spezifisch je Erzeuger und insbesondere in den Bereichen Melkanlage und Melkzeug bei den *Pseudomonas*-auffälligen Höfen stärker mit dieser Gattung kontaminiert. Zudem fielen häufig Bereiche auf, die schlecht von der automatischen Reinigung erfasst wurden, wie beispielsweise die Dichtung des Sammelstücks des Melkzeugs. Ein Eintrag über Wasser scheint aufgrund der geringen Belastungen als unwahrscheinlich.

1.4.2 Analyse der Gesamtkeimzahlen der Stufenkontrollen

Analog zu den *Pseudomonas*-Keimzahlen wurden die Gesamtkeimzahlen per Kultivierung auf TSA analysiert. Abbildung 20 zeigt die Heat-Map der Probenahmestellen für die logarithmischen Gesamtkeimzahlen. Werte $< \log 3 \text{ KbE} \cdot \text{ml}^{-1}$ sind hierbei in Grün, zwischen $\log 3$ und $\log 5 \text{ KbE} \cdot \text{ml}^{-1}$ in Gelb und $> \log 5 \text{ KbE} \cdot \text{ml}^{-1}$ in Rot markiert. Letzteres wurde anhand des Grenzwertes von $\log 5 \text{ KbE} \cdot \text{ml}^{-1}$ für die Keimbelastung von Rohmilch der Klasse 1 laut Milchgüteverordnung § 3 definiert (MilchGüV, 1980).

Bereich	Probenbeschreibung	<i>Pseudomonas</i> -auffällig				<i>Pseudomonas</i> -unauffällig			
		Hof 1	Hof 2	Hof 3	Hof 4	Hof 5	Hof 6	Hof 7	Hof 8
Rohmilch-tank	Rohmilch	3,90	4,20	5,05	5,47	5,15	4,13	4,59	5,14
	Zapfhahn	7,56	7,00	6,30	7,78	5,29	6,78	3,86	4,26
	Deckel Zapfhahn	NV	NV	6,52	NV	NV	NV	7,70	5,26
	Innenseite Tank	NV	NV	3,74	3,04	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00
	Tankdeckel	2,42	8,41	5,88	4,97	5,04	6,88	3,57	4,14
	Gummidichtung Tankdeckel	3,61	7,30	NV	6,53	5,15	6,93	6,81	7,12
	Öffnung Entlüftung	4,93	NV	5,67	NV	6,90	3,21	5,87	NV
	Entlüftungsdeckel	NV	NV	3,71	3,18	4,60	<1,00	3,18	NV
Melkanlage	Rohr Milchzufuhr	3,10	7,30	5,34	6,06	5,59	5,14	3,86	3,37
	Halterung für Rohr Milchzufuhr	6,70	7,79	7,00	6,32	8,75	3,91	NV	8,32
	Milchabscheider	7,00	4,63	6,58	3,97	5,05	3,74	NV	<1,00
	Zulauf Milchabscheider	NV	4,84	8,34	6,19	NV	4,21	3,50	2,00
	Milchfilter nach Melken	7,30	4,56	7,43	NV	4,81	6,87	6,15	7,87
	Halterung Milchfilter	4,82	NV	6,16	5,50	4,60	2,48	3,93	5,16
Melkzeug	Sammelstück	NV	NV	4,82	5,90	4,45	3,67	NV	2,60
	Dichtung Sammelstück	7,30	7,72	7,00	7,92	NV	7,26	NV	8,41
	Zitzenbecher	2,30	3,41	5,38	6,77	6,15	3,58	3,44	NV
	Halterung Zitzenbecher	4,23	3,87	7,71	6,37	7,00	7,18	3,48	6,40
Wasser-proben	Kaltwasser	4,14	NV	1,90	1,86	4,23	3,02	<1,00	3,82
	Melksystemreinigung	5,29	NV	NV	1,00	2,34	2,11	<1,00	2,48
	Warmwasser	3,15	<1,00	NV	NV	1,85	NV	NV	2,10
	Melksystemreinigung	2,71	<1,00	NV	NV	1,78	NV	NV	3,42
	Kaltwasser Tankreinigung	1,66	<1,00	4,78	4,84	NV	3,70	NV	1,85
	Warmwasser Tankreinigung	1,66	<1,00	4,78	4,84	NV	3,70	NV	1,85

Abbildung 20: Heat-Map der Gesamtkeimzahlen der Stufenkontrollen auf Erzeugerbetrieben

Die Gesamtkeimzahlen [$\log \text{KbE} \cdot \text{ml}^{-1}$] der einzelnen Probenahmestellen beim Erzeuger (Hof 1-8) sind nach *Pseudomonas*-auffälligen (Hof 1-4) und unauffälligen Betrieben (Hof 5-8) sowie nach den Bereichen der Probenahmestelle (Rohmilchtank, Melkanlage, Melkzeug und Wasserproben) aufgeteilt. Die Farbkodierung zeigt die Keimbelastung der Proben an (grün, $< \log 3$; gelb, $\log 3 - \log 5$; rot, $> \log 5 \text{ KbE} \cdot \text{ml}^{-1}$). NV, Probe nicht verfügbar; $<1,00$, nicht detektierbar

Insgesamt zeigen die Gesamtkeimzahlen ein homogeneres Bild zwischen den *Pseudomonas*-auffälligen und –unauffälligen Höfen. Insbesondere im Bereich des Rohmilchtanks gab es keine sichtbaren Unterschiede. Hier zeigten alle Höfe eine relativ starke Belastung. Im Bereich Melkanlage und Melkzeug hingegen waren die *Pseudomonas*-auffälligen Höfe etwas stärker belastet. Die höchsten Keimbelastungen wurden mit über $\log 8,00 \text{ KbE} \cdot \text{ml}^{-1}$ bei der Halterung des Rohrs für die Milchzufuhr von Hof 5 und Hof 8 ($\log 8,75$ bzw. $\log 8,32 \text{ KbE} \cdot \text{ml}^{-1}$), der Dichtung des Sammelstücks des Melkzeugs bei Hof 8 ($\log 8,41 \text{ KbE} \cdot \text{ml}^{-1}$), dem Tankdeckel von Hof 2 ($\log 8,41 \text{ KbE} \cdot \text{ml}^{-1}$) sowie dem Zulauf des Milchabscheiders von Hof 3 ($\log 8,34 \text{ KbE} \cdot \text{ml}^{-1}$) gefunden. Die Rohmilch war bei den *Pseudomonas*-auffälligen und –unauffälligen Höfen ähnlich belastet, mit Werten zwischen $\log 3,90 \text{ KbE} \cdot \text{ml}^{-1}$ (Hof 1) und $\log 5,47 \text{ KbE} \cdot \text{ml}^{-1}$ (Hof 4). Analog zu den *Pseudomonas*-Keimzahlen war der Zapfhahn insbesondere bei den *Pseudomonas*-auffälligen Höfen mit bis zu $\log 7,78 \text{ KbE} \cdot \text{ml}^{-1}$ stark belastet und die Innenseite des Tanks zumindest bei den *Pseudomonas*-unauffälligen Höfen ohne nachweisbare

Keimbelastung. Bei den Wasserproben war vor allem das Kaltwasser für die Melksystemreinigung häufig verunreinigt. Im Fall von Hof 1 war zudem das zugehörige Warmwasser mit $\log 5,29 \text{ KbE} \cdot \text{ml}^{-1}$ stark belastet, sowie das Kaltwasser der Tankreinigung mit $\log 3,15 \text{ KbE} \cdot \text{ml}^{-1}$. Beim Nachspülwasser konnten zusätzlich zu jenem von Hof 3 und 4, in dem bereits *Pseudomonas* nachweisbar war, auch bei Hof 6 Keime nachgewiesen werden.

1.4.3 Ergebnisse der Luftkeimanalysen

Zur Bewertung eines möglichen Eintrages von *Pseudomonas* in die Rohmilch über die Stallluft wurde diese in der Nähe des Melkzeugs mithilfe eines Luftkeimsammlers auf den Höfen 3-8 beprobt. Abbildung 21 zeigt die ermittelten *Pseudomonas*- und Gesamtkeimzahlen pro 10 l Luft.

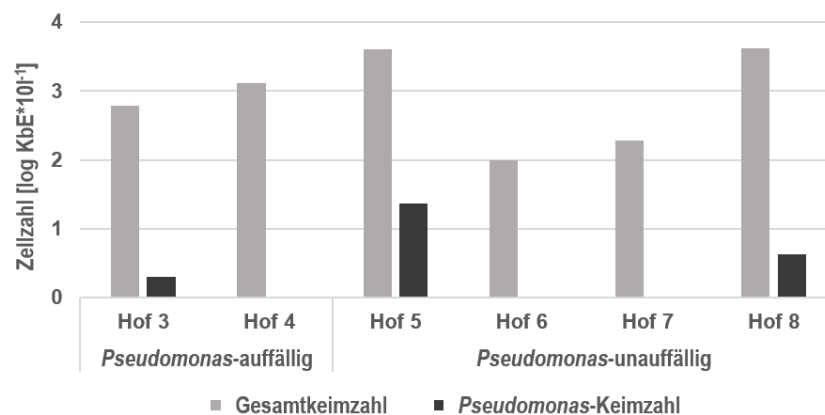


Abbildung 21: *Pseudomonas*-Keimzahl und Gesamtkeimzahl der Stallluft von sechs Betrieben
Die *Pseudomonas*-Keimzahl (dunkelgrau) und die Gesamtkeimzahl (hellgrau) pro 10 l Stallluft wurde bei den Erzeugerbetrieben Hof 3-8 in der Nähe des Melkzeugs mithilfe eines Luftkeimsammlers beprobt.

Lediglich drei Höfe (Hof 3, Hof 5 und Hof 8) wiesen geringe *Pseudomonas*-Konzentrationen von maximal $\log 1,4 \text{ KbE} \cdot 10 \text{ l}^{-1}$ bei Hof 5 auf. Es war kein Unterschied zwischen den *Pseudomonas*-auffälligen und -unauffälligen Höfen feststellbar. Bei der Gesamtkeimzahl schwankten die Werte zwischen $\log 2,0 \text{ KbE} \cdot 10 \text{ l}^{-1}$ (Hof 6) und $\log 3,6 \text{ KbE} \cdot 10 \text{ l}^{-1}$ (Hof 5 und Hof 8). Aufgrund der unterschiedlichen Bauweisen der Melksysteme wurde die Luft bei den Höfen mit Rohrmelkanlagen im Stall in unmittelbarer Nähe zum Vieh beprobt. Bei den Melkständen fand die Probenahme hingegen in dem separaten Raum statt. Aus diesem Grund wurden Unterschiede in den Luftkeimzahlen zwischen den Melksystemen analysiert, da in der Stallluft höhere Keimzahlen erwartet wurden. Bei Hof 5 wurden bei einer Rohrmelkanlage die höchsten gemessenen *Pseudomonas*- und Gesamtkeimzahlen festgestellt. Hof 8, der einen manuellen Melkstand verwendete, zeigte ähnlich hohe Keimzahlen, weshalb kein Zusammenhang mit dem Ort der Probenahme gefunden werden konnte. Letztendlich wird auf Basis dieser Daten ein Eintrag von *Pseudomonas* über die Luft als vernachlässigbar angesehen.

1.4.4 Auffälligkeiten während der Probenahme

Zur genaueren Einschätzung möglicher Einflussfaktoren auf die Kontaminationswege beim Erzeuger wurden Auffälligkeiten während der Probenahme bzw. Gegebenheiten bei den Betrieben notiert, die Einfluss auf die Keimzahlen in der Rohmilch haben könnten. Diese sind in Tabelle 14 gelistet.

Tabelle 14: Auffälligkeiten während der Probenahme bei den Erzeugerbetrieben

Kategorie	Hofnummer	Auffälligkeiten
<i>Pseudomonas</i>-auffällige Höfe	Hof 1	<ul style="list-style-type: none"> - Zu geringe Reinigungstemperatur am Ende des Melksystems (34 °C), vermutlich durch defekten Temperaturfühler der Reinigungsanlage - Verwendetes Reinigungsmittel mit Überschreiten des Mindesthaltbarkeitsdatums - Kein Austausch der Schwämme zur Reinigung des Rohres der Rohrmelkanlage - Reinigung des Tanks mit kaltem Wasser von Hand - Milchreste durch Spritzer auf der Innenseite des Tankdeckels
	Hof 2	<ul style="list-style-type: none"> - Keine Verwendung alkalischer Reinigungsmittel zur Tankreinigung - Zu geringe Reinigungstemperatur am Ende des Melksystems (25 °C), vermutlich durch Restwasser in der Anlage oder defekten Temperaturfühler der Reinigungsanlage - Starker Biofilm auf der Innenseite des Tankdeckels, da nicht von der automatischen Reinigung erfasst
	Hof 3	<ul style="list-style-type: none"> - Milchreste am Ausgabebahn aufgrund mangelnder Reinigung nach manueller Milchentnahme - Starke Verschmutzungen in Teilen der Leitungen, v.a. in zugänglichem Dreiwegehahn, der nicht von der automatischen Reinigung erfasst wird - Zitzenbecher werden zum Trocknen nicht aus den Halterungen genommen - Fehlende manuelle Reinigung des Sammelstücks des Melkzeugs
	Hof 4	<ul style="list-style-type: none"> - Stehendes Wasser in der Anlage, da keine Entwässerung des Standrohres nach der Reinigung - Laut Landwirt Probleme mit zu hohen Keimzahlen seit Wechsel auf chlorfreies Reinigungsmittel vor drei Jahren - Verlängerungsleitung von Tank zu Hoftor mit Milchresten; wird nicht durch automatische Reinigung erfasst und nicht aktiv gekühlt - Zitzenbecher werden zum Trocknen nicht aus den Halterungen genommen - Fehlende manuelle Reinigung des Sammelstücks des Melkzeugs
<i>Pseudomonas</i>-unauffällige Höfe	Hof 5	<ul style="list-style-type: none"> - Milchreste am Ausgabebahn da mangelnde Reinigung nach manueller Milchentnahme - Zitzenbecher werden zum Trocknen nicht aus den Halterungen genommen, Halterungen stark verschmutzt - Fehlende manuelle Reinigung des Sammelstücks des Melkzeugs - Starke Verkrustungen in Zulaufleitung des Milchabscheiders - „Blinde“ Ansatzstelle in Rohrmelkleitung mit starken Verkrustungen - Stehendes Wasser in der Halterung für das Rohr für die Milchzufuhr in den Tank; wird nicht entwässert
	Hof 6	<ul style="list-style-type: none"> - Sehr sauber, keine sichtbaren Milchreste oder Verschmutzungen - Fehlende manuelle Reinigung des Sammelstücks des Melkzeugs
	Hof 7	<ul style="list-style-type: none"> - Sehr saubere und moderne Melkroboteranlage - Leichte Verschmutzungen an Gummidichtungen von Zapfhahn und Tankdeckel
	Hof 8	<ul style="list-style-type: none"> - Da Reinigungswasser durch Solaranlage geheizt wird erfolgt z.T. Melksystemreinigung erst einige Stunden nach dem Melken; bis dahin nur Vorspülung zur Entfernung von Milchresten - Zitzenbecher zum Trocknen oft nicht aus den Halterungen genommen - Fehlende manuelle Reinigung des Sammelstücks des Melkzeugs - Verschmutzungen an Halterung des Rohres für die Milchzufuhr in den Tank

Besonders bei den *Pseudomonas*-auffälligen Höfen wurde notiert, dass die Höfe eine zu geringe Reinigungstemperatur ($< 40\text{ °C}$) verwendet haben oder falsches bzw. abgelaufenes Reinigungsmittel. Zudem waren Stellen, die nicht von der automatischen Reinigung erfasst werden, wie beispielsweise der Tankdeckel oder die Dichtung des Sammelstücks des Melkzeugs, oftmals mit einem sichtbaren Biofilm oder Milchresten verschmutzt. Außerdem wurden die Zitzenbecher teilweise nicht aus den Halterungen zum Trocknen genommen oder es war stehendes Wasser in den Leitungen vorhanden, was zu einem Wachstum von Mikroorganismen führen kann. Viele Höfe boten die Abgabe von Rohmilch an Privatpersonen an, jedoch wurde hierbei der Zapfhahn nach der Milchentnahme häufig nicht mit Wasser gespült. Insgesamt unterstrichen diese Informationen die Hypothese, dass jeder Hof individuelle Schwachstellen im Hygienemanagement hat, die zu einem erhöhten Eintrag von *Pseudomonas* führen können. Die *Pseudomonas*-unauffälligen Höfe, insbesondere Hof 6 und Hof 7, wiesen jedoch im Vergleich zu den *Pseudomonas*-auffälligen Höfen weniger Hygienemängel auf.

1.5 Analyse des Einflusses von Lagerung und Transport auf die *Pseudomonas*-Keimzahl

1.5.1 Veränderungen der absoluten *Pseudomonas*-Keimzahl

Zur Analyse des Einflusses des Transports der Rohmilch zur Molkerei und der Lagerung im Rohmilchstapeltank auf die *Pseudomonas*-Keimzahlen wurden insgesamt sieben Sammeltouren unterschiedlicher Größe beprobt. Die genaue Zusammensetzung der Sammeltouren ist in Tabelle 3 einsehbar. Die Touren bestanden aus Rohmilch der Hofsammlertanks aller Erzeugerbetriebe, die im Rahmen dieser Tour abgeholt wurde, einer bis zwei Sammelwagenproben (in letzterem Fall bestehend aus Zugmaschine und Hänger) sowie einer Probe des Rohmilchstapeltanks der Molkerei. Letzterer konnte nur bei drei Touren (A, C und D) beprobt werden. Von allen Proben wurde die *Pseudomonas*-Keimzahl per qPCR sowie die Gesamtkeimzahl per Durchflusszytometrie ermittelt. Die Keimzahlen pro Probe sind in Tabelle A 2 gelistet.

Insgesamt konnte bei drei der sieben Touren keine Veränderung der *Pseudomonas*-Keimzahl während Lagerung und Transport festgestellt werden (Abbildung 22). Tour A bestand aus sechs Höfen, von denen je drei in einem Sammelwagentank transportiert wurden (Hof 1.1_A – Hof 1.3_A in Wagen 1_A, Hof 2.1_A – Hof 2-3_A in Wagen 2_A). Die *Pseudomonas*-Keimzahlen der Sammelwagenproben lagen mit $\log 1,75$ bzw. $\log 2,05$ Zellen* ml^{-1} jeweils zwischen den Werten der zugehörigen Hofproben ($\log 1,65$ – $\log 2,10$ Zellen* ml^{-1} bzw. $\log 1,70$ – $\log 2,32$ Zellen* ml^{-1}). Der Rohmilchstapeltank (Tank A), in dem die Milch 36 h gelagert wurde,

wies mit $\log 1,83 \text{ Zellen} \cdot \text{ml}^{-1}$ ebenfalls eine *Pseudomonas*-Belastung zwischen jener der beiden Sammelwagenproben auf. Ein ähnliches Bild ergab sich bei Tour B, bei der Wagen B ebenfalls eine *Pseudomonas*-Keimzahl zwischen jener der 10 Hofproben, trotz einer relativ langen Transportzeit von 9 h, aufwies. Bei Tour C konnte nur ein leichter Anstieg bei *Pseudomonas* von 0,5 log-Stufen von Hof C ($\log 1,7 \text{ Zellen} \cdot \text{ml}^{-1}$) über Wagen C ($\log 2,01 \text{ Zellen} \cdot \text{ml}^{-1}$) zu Tank C ($\log 2,19 \text{ Zellen} \cdot \text{ml}^{-1}$) festgestellt werden.

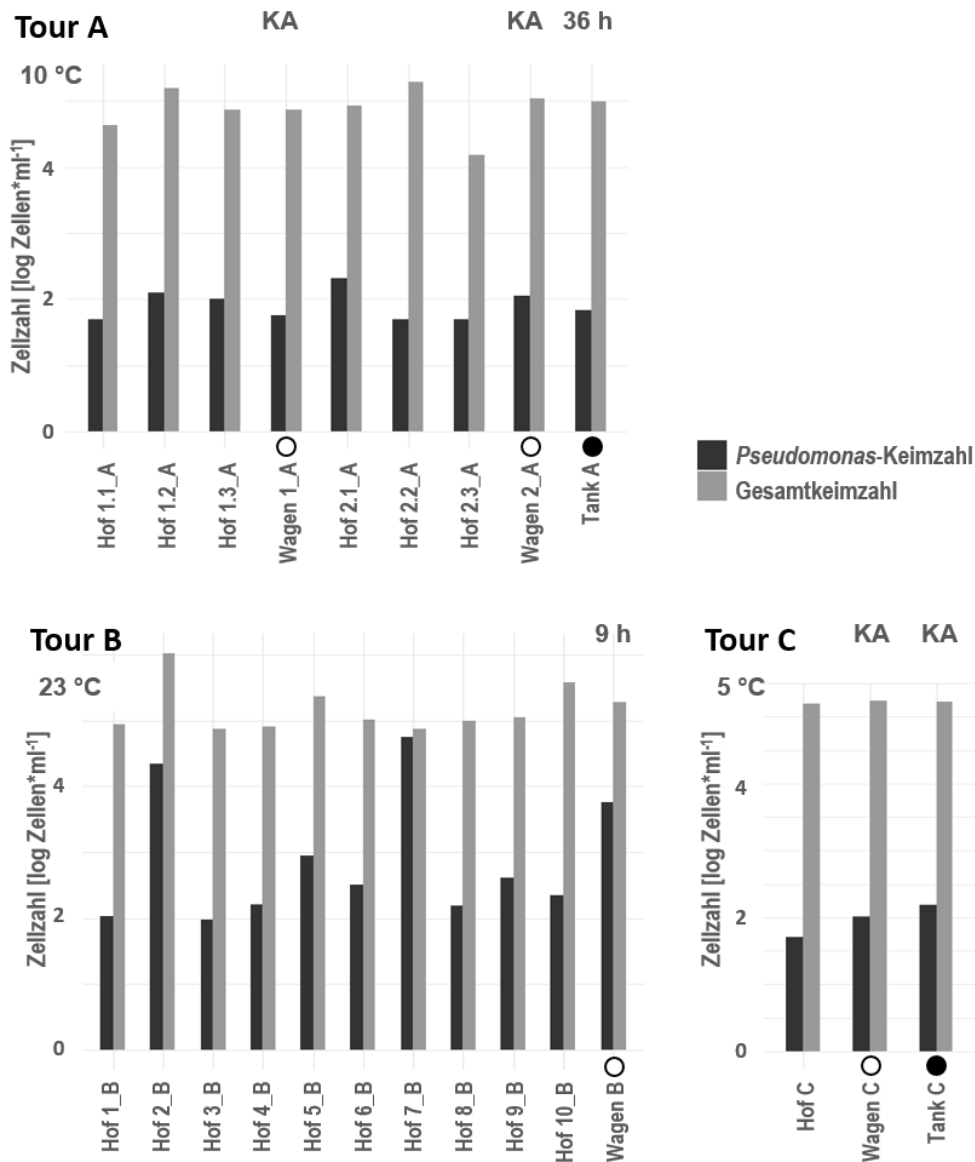


Abbildung 22: *Pseudomonas*- und Gesamtkeimzahlen der Sammeltouren ohne Anstieg der *Pseudomonas*-Keimzahlen

Die Rohmilch der drei Sammeltouren ohne Veränderung der *Pseudomonas*-Keimzahlen (Tour A-C) wurde hinsichtlich der logarithmischen *Pseudomonas* (dunkelgrau) sowie Gesamtkeimzahl (hellgrau) analysiert [$\log \text{Zellen} \cdot \text{ml}^{-1}$]. Je Tour wurden alle Höfe, die Sammelwägen (Kreis) und wenn möglich der Rohmilchstapeltank der Molkerei (schwarzer Punkt) beprobt. Die Außentemperaturen am Probenahmetag sind unter der Tourbezeichnung notiert und die Transport- bzw. Lagerdauer über den jeweiligen Säulen der Sammelwägen bzw. Rohmilchstapeltanks. KA, keine Angabe

Bei den restlichen Touren D-G konnte ein deutlicher Anstieg der *Pseudomonas*-Keimzahlen festgestellt werden (Abbildung 23). Tour D zeigte einen vergleichbaren Aufbau zu Tour A, mit zwei Sammelwägen und einer Lagerdauer von 36 h im Rohmilchstapeltank. Im Gegensatz zu Tour A konnte jedoch im Rohmilchstapeltank D mit $\log 3,27$ Zellen* ml^{-1} ein Anstieg der *Pseudomonas*-Keimzahl im Vergleich zu den Sammelwagenproben ($\log 2,29$ bzw. $\log 1,70$ Zellen* ml^{-1}) festgestellt werden. Diese wiederum zeigten Werte, die zwischen jenen der einzelnen Höfe lagen. Bei Tour E hatte die Sammelwagenprobe mit $\log 5,18$ Zellen* ml^{-1} stark erhöhte *Pseudomonas*-Keimzahlen im Vergleich zu den Hofproben, die Werte zwischen $\log 2,00$ und $2,91$ Zellen* ml^{-1} aufwiesen, obwohl die Transportzeit mit 3 h vergleichsweise kurz war. Dies war auch bei Tour F der Fall, bestehend aus 11 Hofproben und einer Sammelwagenprobe. Wagen F wies nach einer Lagerung von 3,25 h einen Anstieg von ca. 2 Log-Stufen im Vergleich zu den Hofproben auf. Bei der letzten analysierten Tour G, die nur aus einer Hofprobe sowie der zugehörigen Sammelwagenprobe bestand, betrug die Differenz nach einer Transportzeit von 1,5 h eine Log-Stufe.

Bei Analyse der Gesamtkeimzahlen wurde ein deutlicher Anstieg (> 1 log-Stufe) nur bei den Sammelwägen von zwei der sieben Touren (Tour E und F, s. Abbildung 23) festgestellt. Bei den Stapeltankproben wies lediglich Tank D einen leichten Anstieg von 0,4 log-Stufen im Vergleich zu den beiden Sammelwägen auf. Insgesamt waren die Gesamtkeimzahlen der Sammeltourenproben homogener und weniger stark beeinflusst von dem Transport im Sammelwagen und der Lagerung im Stapeltank als die *Pseudomonas*-Keimzahlen.

Als möglicher Einflussfaktor auf die Keimzahlen in der Rohmilch wurden die Außentemperaturen am Tag der Probennahme in Betracht gezogen, die insbesondere die Keimzahlen im Sammelwagen beeinflussen könnten, da dieser nicht aktiv gekühlt ist. Insgesamt waren die Temperaturen der Touren ohne Anstieg der Keimzahlen (Tour A-C) mit 10 °C, 23 °C und 5 °C geringer als bei den Touren mit Anstieg der *Pseudomonas*-Belastung (Tour D-G, zwischen 20 und 27 °C). Insbesondere Tour E und F wiesen mit der wärmsten Außentemperatur von 27 °C trotz kurzer Transportzeiten starke Anstiege in der *Pseudomonas*-Keimzahl auf. Dies waren zudem die einzigen Touren, bei denen zusätzlich Anstiege in der Gesamtkeimzahl festgestellt wurden.

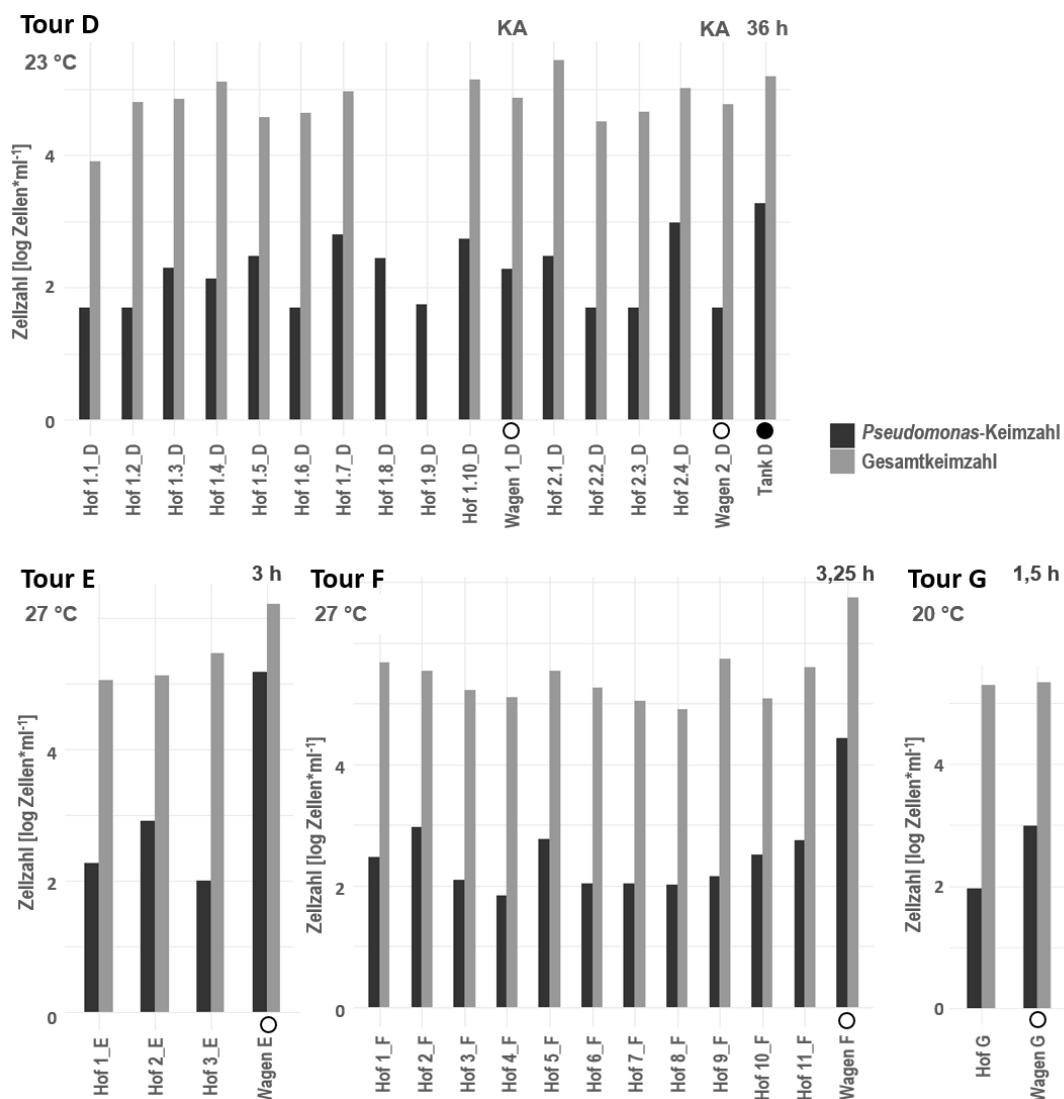


Abbildung 23: Pseudomonas- und Gesamtkeimzahlen der Sammeltouren mit Anstieg der Pseudomonas-Keimzahl

Die Rohmilch der vier Sammeltouren mit Anstieg der *Pseudomonas*-Keimzahlen (Tour D-G) wurde hinsichtlich der *Pseudomonas*-Keimzahl (dunkelgrau) sowie der Gesamtkeimzahl (hellgrau) analysiert [log Zellen*ml⁻¹]. Je Tour wurden alle Höfe, die Sammelwägen (Kreis) und wenn möglich der Rohmilchstapeltank der Molkerei (schwarzer Punkt) analysiert. Bei Hof 1.8_D und Hof 1.9_D waren keine Gesamtkeimzahlen wegen eines Gerätedefekts verfügbar. Die Außentemperaturen am Probenahmetag sind unter der Tourbezeichnung notiert und die Transport- bzw. Lagerdauer über den jeweiligen Säulen der Sammelwägen bzw. Rohmilchstapeltanks. KA, keine Angabe

1.5.2 Veränderungen im Rohmilchmikrobiom

Zur Analyse der Veränderungen des Rohmilchmikrobioms während dem Transport und der gekühlten Lagerung in der Molkerei bis zur Prozessierung wurde die relative Zusammensetzung der Rohmilchproben von Tour A und D per 16S rRNA Amplikonsequenzierung ermittelt (Abbildung 24). Die genauen relativen Anteile pro Gattung und Probe sind in Tabelle A 3 und Tabelle A 4 gelistet.

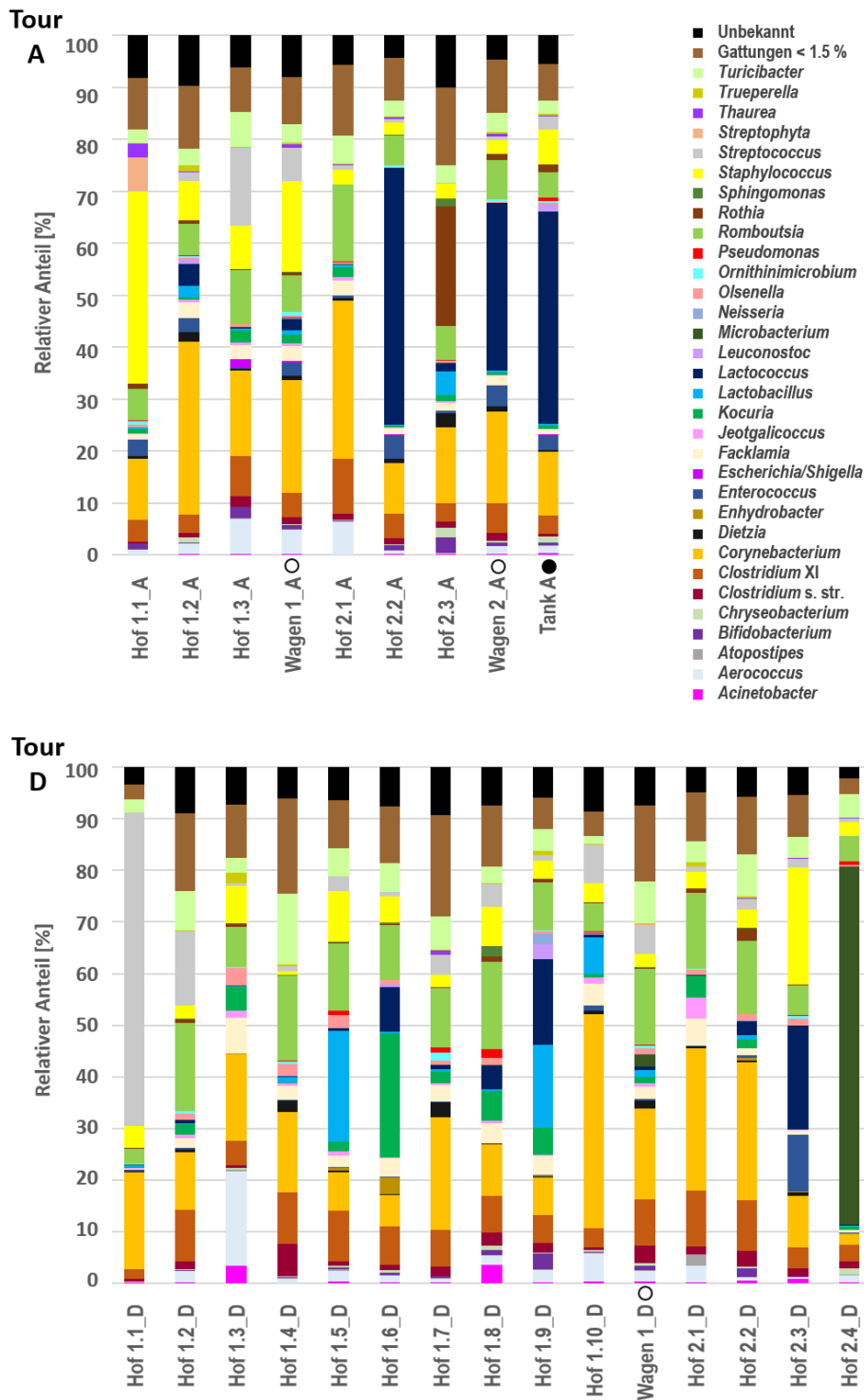


Abbildung 24: Mikrobielle Zusammensetzung der Rohmilchproben von Sammeltour A und D
 Die bakterielle Komposition von Tour A und D, bestehend aus den Höfen der Tour, jeweils zwei Sammelwagenproben (Kreis) und dem Rohmilchstapeltank (schwarzer Punkt), wurde per 16S rRNA Amplikonsequenzierung ermittelt. Die Zusammensetzung ist als relative Abundanz auf Gattungsebene in % angegeben. Genera mit einem relativen Anteil < 1,5 % in allen Proben sind als „Gattungen < 1,5 %“ zusammengefasst und zOTUs, die keiner Gattung zugeordnet werden konnten, als „Unbekannt“. Die Sammelwägen enthielten ausschließlich die Rohmilch der jeweils links angeordneten Höfe und die Stapeltankproben nur jene der beiden Sammelwägen.

Insgesamt konnte in den Rohmilchproben beider Touren ein ähnliches Muster in der mikrobiellen Zusammensetzung festgestellt werden. Neben Proben, die ein sehr vergleichbares Mikrobiom zeigten, wie beispielsweise Hof 1.2_A, Hof 1.3_A, Wagen 1_A, Hof 2.1_D oder Hof 2.2_D, fielen jedoch Proben auf, die durch eine einzelne Gattung dominiert wurden, wie Hof 2.2_A, Wagen 2_A und Tank A durch *Lactococcus* oder Hof 2.4_D und Wagen 2_D durch *Microbacterium*.

Bei Tour A konnte kein Anstieg der *Pseudomonas*-Keimzahl festgestellt werden. Hier besteht das Kernmikrobiom, welches durch Gattungen definiert wurde, die in allen Proben > 1,5 % vorhanden waren, aus *Clostridium* Cluster XI (zwischen 3,4 und 10,6 %), *Corynebacterium* (9,7 – 33,3 %), *Romboutsia* (4,8 – 14,8 %), *Staphylococcus* (2,3 – 36,9 %) und *Turicibacter* (2,5 – 6,6 %). Gattungen, die in Tour A in einzelnen Proben > 30 % am Mikrobiom betrogen, waren *Corynebacterium* bei Hof 1.2_A (33,3 %) und Hof 2.1_A (30,5 %), *Lactococcus* (Hof 2.2_A: 49,4 %, Wagen 2_A: 32,2 %, Tank A: 40,8 %) und *Staphylococcus* (Hof 1.1_A: 36,9 %). Bei dem Vergleich der Zusammensetzung der Rohmilchmikrobiota zwischen Sammelwägen und Höfen wurde, ähnlich zu den absoluten Keimzahlen, analysiert, ob die relativen Anteile bei den Sammelwägen zwischen jenen der zugehörigen Hofproben lagen. Dies war bei Tour A für alle Gattungen der Fall, was darauf schließen lässt, dass der Transport zu keinen bedeutenden Veränderungen im Milchmikrobiom führte. Beim Vergleich der Probe Tank A mit den beiden Sammelwagenproben Wagen 1_A und Wagen 1_B zeigten sich jedoch größere Unterschiede. Höhere relative Anteile im Sammeltank wurden für *Lactococcus* (40,8 % in Tank A vs. 2,3 und 32,2 % in Wagen 1_A und Wagen 1_B) und *Rothia* (1,5 % vs. <1,5 % in beiden Wägen) gefunden. Niedrigere Werte traten bei *Clostridium* Cluster XI (3,4 % vs. 4,8 und 5,7 %), *Corynebacterium* (12,2 % vs. 21,6 und 17,7 %), *Romboutsia* (4,8 % vs. 7,0 und 7,6 %) sowie *Turicibacter* (2,5 % vs. 3,5 und 3,8 %) auf. *Pseudomonas* wies in allen Proben von Tour A Werte < 1,5 % auf.

Bei der Tankprobe von Tour B wurde ein Anstieg der *Pseudomonas*-Keimzahlen von ca. einer Log-Stufe nachgewiesen. Bei dieser Tour gehörten *Clostridium* Cluster XI (1,8 – 10,8 %), *Corynebacterium* (1,9 – 41,6 %) und *Romboutsia* (2,6 – 17,1 %) zum Kernmikrobiom. Im Fall von *Staphylococcus* und *Turicibacter* wies lediglich jeweils eine Probe Anteile < 1,5 % auf, wohingegen jene der anderen Proben zwischen 2,4 und 32,4 % bzw. 1,6 und 13,7 % schwankten. Gattungen mit relativen Anteilen > 30 % in einzelnen Proben waren bei Tour D *Microbacterium* (Hof 2.4_D: 69,5 %, Wagen 2_D: 48,3 %), *Streptococcus* (Hof 1.1_D: 60,9 %), *Corynebacterium* (Hof 1.10_D: 41,6 %) und *Staphylococcus* (Tank D: 32,4 %). Bei Vergleich der mikrobiellen Zusammensetzung der Sammelwagenproben mit den jeweiligen Hofproben

lagen die relativen Gattungen pro Sammelwagen wieder jeweils zwischen denen der Hofproben. Als einzige Ausnahme wurde *Microbacterium* gefunden, welches < 1,5 % bei den Proben Hof 2.1_D – Hof 2.4_D betrug, in Wagen 2_D jedoch 2,4 % ausmachte. Bei Vergleich der Stapeltankprobe mit den beiden Sammelwägen wurden auch bei dieser Tour größere Unterschiede gefunden. Höhere Anteile im Sammeltank lagen bei *Enterococcus* (7,3 % in Tank D vs. < 1,5 % in Wagen 1_D und 4,2 % in Wagen 2_D), *Lactococcus* (16,1 % vs. < 1,5 und 2,9 %), *Leuconostoc* (6,6 % vs. < 1,5 % in beiden Sammelwägen), *Staphylococcus* (32,4 % vs. 2,6 % und 4,7 %) sowie *Pseudomonas* vor (3,4 % vs. < 1,5 % in beiden Sammelwägen). Niedrigere Anteile wurden bei *Clostridium* Cluster XI (1,8 % vs. 9,1 und 5,0 %), *Corynebacterium* (4,1 % vs. 17,6 und 7,8 %), *Romboutsia* (2,6 % vs. 14,8 und 6,5 %) und *Turicibacter* (< 1,5 % vs. 8,1 und 4,1 %) gefunden. Neben der Stapeltankprobe wies lediglich Hof 1.8_D mit 1,7 % relative *Pseudomonas*-Anteile > 1,5 % auf.

Bei Vergleich der Mikrobiomdaten beider Touren konnten einige Parallelen gefunden werden. Das Kernmikrobiom war mit *Clostridium* Cluster XI, *Corynebacterium*, *Romboutsia*, *Staphylococcus* und *Turicibacter* gleich. Auch machten *Corynebacterium* und *Staphylococcus* häufig jeweils > 30 % des Mikrobioms einzelner Proben aus. Bei Analyse der Veränderungen durch Lagerung und Transport wurde bei beiden Touren festgestellt, dass die Sammelwagenproben eine gute Repräsentation der jeweiligen Hofproben waren. Die Tankproben wiesen jedoch Unterschiede zu den Sammelwagenproben auf. Diese Veränderungen waren bei beiden Touren vergleichbar. Geringere Anteile wurden bei *Clostridium* Cluster XI, *Corynebacterium*, *Romboutsia* und *Turicibacter* gefunden. Interessanterweise sind dies größtenteils die Gattungen des Kernmikrobioms. Höhere Anteile in beiden Stapeltankproben wurden lediglich für *Lactococcus* gefunden.

2 Charakterisierung dreier neuer *Pseudomonas*-Spezies

Die Gattung *Pseudomonas* ist eine sehr diverse phylogenetische Gruppe, die häufig in Rohmilch vorkommt. Viele Stämme, die in Vorarbeiten an unserem Institut aus Rohmilch oder Milchhalbfabrikaten isoliert wurden, konnten keiner bisher beschriebenen Spezies zugeordnet werden. Im Folgenden werden die Ergebnisse der Charakterisierung zur validen Neubeschreibung der drei *Pseudomonas*-Spezies *Pseudomonas saxonica* sp. nov, bestehend aus dem Typstamm WS 5072^T und dem zusätzlichen Stamm WS 5092, *Pseudomonas haemolytica* mit WS 5063^T und WS 5067 sowie *Pseudomonas cremoris* mit WS 5106^T und WS 5096 dargestellt. Die Daten wurden in Hofmann *et al.* (2020b), Hofmann *et al.* (2020a) bzw. Hofmann *et al.* (2021) publiziert. Die Charakterisierungen basierten auf einem

polyphasischen Ansatz, bei dem die neuen Spezies anhand von phylogenetischen, chemotaxonomischen, physiologischen und biochemischen Merkmalen beschrieben und von den am nächsten verwandten Spezies abgegrenzt wurden.

2.1 Phylogenetische Analysen

2.1.1 Einzelgenanalysen auf Basis von 16S rRNA und rpoD

Pseudomonas saxonica sp. nov.

Für eine erste Spezies-Identifizierung der Stämme WS 5072^T und WS 5092 wurden die *rpoD*-Sequenzen per Sanger-Sequenzierung ermittelt und mithilfe der GenBank Datenbank analysiert. WS 5072^T und WS 5092 zeigten hierbei eine Sequenzübereinstimmung von 99,56 %, was die Zugehörigkeit zur gleichen Spezies indizierte. Die am nächsten verwandten Spezies auf Basis des *rpoD*-Gens waren *Pseudomonas fragi* DSM 3456^T, *Pseudomonas weihenstephanensis* DSM 29166^T, *Pseudomonas deceptionensis* DSM 26521^T, *Pseudomonas psychrophila* DSM 17535^T, *Pseudomonas versuta* LMG 29628^T, *Pseudomonas taetrolens* DSM 21104^T und *Pseudomonas lundensis* DSM 6252^T mit Sequenzübereinstimmungen zwischen 93 und 90 %. Da diese Werte deutlich unter dem Grenzwert von 98 % zur Speziesabgrenzung lagen, wurde das Vorhandensein einer neuen Spezies angenommen.

Zur Analyse der 16S rRNA Phylogenie wurden die aus den Genomen extrahierten 16S rRNA Sequenzen der neuen Spezies verwendet. Hier zeigte ebenfalls die sehr hohe Sequenzübereinstimmung von 99,93 % zwischen WS 5072^T und WS 5092 die Zugehörigkeit zur gleichen Spezies an. Ähnlichkeiten zu verwandten Typstämmen mit über 99 % wurden für *P. weihenstephanensis* DSM 29166^T, *P. deceptionensis* DSM 26521^T, *P. versuta* LMG 29628^T, *P. fragi* DSM 3456^T, *P. psychrophila* DSM 17535^T, *P. taetrolens* DSM 21104^T und *P. lundensis* DSM 6252^T gefunden. Auf Basis der Ergebnisse dieses Sequenzvergleiches wurde mit den am nächsten verwandten Spezies ein *Maximum-Likelihood* phylogenetischer Baum mit dem *Tamura-Nei* Modell berechnet, der in Abbildung 25 gezeigt ist. *P. saxonica* sp. nov. bildete anhand der 16S rRNA Phylogenie ein Cluster zusammen mit *P. fragi* DSM 3456^T und *P. deceptionensis* LMG 25555^T.

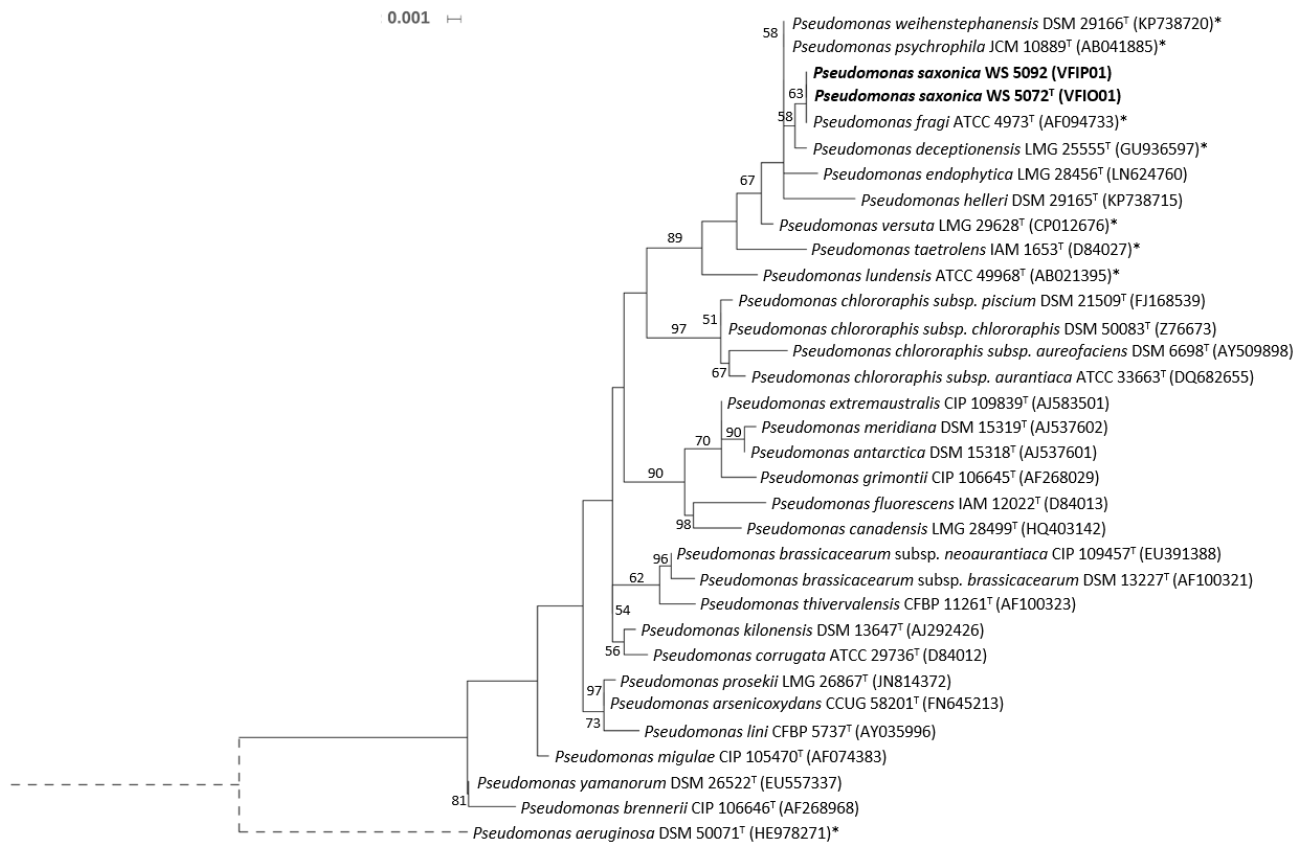


Abbildung 25: Maximum-Likelihood Phylogenie von *P. saxonica* sp. nov. basierend auf 16S rRNA

Der phylogenetische Baum zeigt WS 5072^T und WS 5092 mit deren am nächsten verwandten Spezies auf Basis fast-vollständiger 16S rRNA Gensequenzen (1224 Nukleotidpositionen im finalen Datenset). *Bootstrap*-Werte > 50 % basierend auf 1000 Wiederholungen sind an den Knotenpunkten notiert. *Pseudomonas aeruginosa* DSM 50071^T wurde als Außengruppe verwendet (gestrichelte Linie, um Faktor zwei verkürzt). Genomidentifizierungsnummern sind in Klammern angegeben. Die in den phylogenetischen Analysen verwendeten Referenzspezies sind mit einem Stern gekennzeichnet. Die Stämme der neuen Spezies sind fett markiert. Der eingezeichnete Balken entspricht 0,001 Substitutionen pro Nukleotidposition. (Hofmann *et al.*, 2020b)

Pseudomonas haemolytica sp. nov.

Analog zu *P. saxonica* sp. nov. wurde bei *P. haemolytica* sp. nov. die initiale Speziesidentität anhand des *rpoD*-Gens festgestellt. Auch hier wurde wegen der hohen Ähnlichkeit von 99,56 % die Zugehörigkeit zur gleichen Spezies bei WS 5063^T und WS 5067 angenommen. Die am nächsten verwandten Typstämme waren in diesem Fall *Pseudomonas libanensis* DSM 17149^T, *Pseudomonas synxantha* DSM 18928^T, *Pseudomonas grimontii* DSM 17515^T, *Pseudomonas antarctica* DSM 15318^T, *Pseudomonas marginalis* DSM 13124^T, *Pseudomonas fluorescens* DSM 50090^T und *Pseudomonas paralactis* DSM 29164^T mit Sequenzübereinstimmungen zwischen 95 und 93 %. Daher konnten auch in diesem Fall die neuen Stämme keiner bisher beschriebenen Spezies zugeordnet werden.

Bei Analyse des 16S rRNA Gens wiesen WS 5063^T und WS 5067 eine Sequenzübereinstimmung von 99,93 % auf. Werte über 99 % wurden für die Typstämme *P. fluorescens* DSM 50090^T, *Pseudomonas canadensis* LMG 28499^T, *Pseudomonas poae* DSM 14936^T, *Pseudomonas extremaustralis* DSM 17835^T, *Pseudomonas brenneri* DSM 15294^T sowie *P. grimontii* DSM 17515^T gefunden. Auf Basis dieser Sequenzanalysen wurden die Typstämme für die 16S rRNA Phylogenie ausgewählt, die in Abbildung 26 dargestellt ist. *P. haemolytica* sp. nov. bildete einen separaten Ast neben *P. fluorescens* DSM 50090^T, *P. canadensis* LMG 28499^T und *Pseudomonas salomonii* CFBP 2022^T.

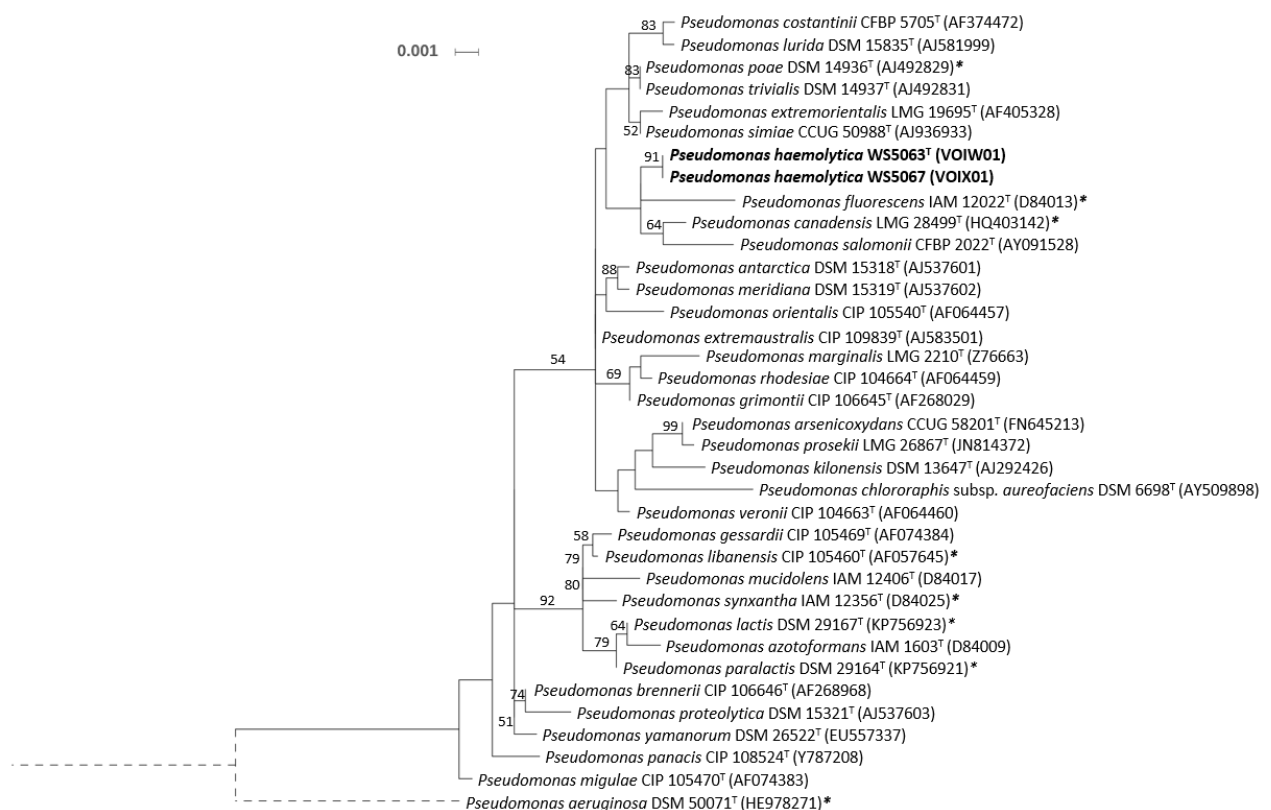


Abbildung 26: Maximum-Likelihood Phylogenie von *P. haemolytica* sp. nov. basierend auf 16S rRNA

Der phylogenetische Baum zeigt WS 5063^T und WS 5067 mit deren am nächsten verwandten Spezies auf Basis fast-vollständiger 16S rRNA Gensequenzen (1319 Nukleotidpositionen im finalen Datenset). *Bootstrap*-Werte > 50 % basierend auf 1000 Wiederholungen sind an den Knotenpunkten notiert. *Pseudomonas aeruginosa* DSM 50071^T wurde als Außengruppe verwendet (gestrichelte Linie, um Faktor zwei verkürzt). Genomidentifizierungsnummern sind in Klammern angegeben. Die in den phylogenetischen Analysen verwendeten Referenzspezies sind mit einem Stern gekennzeichnet. Die Stämme der neuen Spezies sind fett markiert. Der eingezeichnete Balken entspricht 0,001 Substitutionen pro Nukleotidposition. (Hofmann *et al.*, 2020a)

Pseudomonas cremoris sp. nov.

Die Stämme WS 5106^T und WS 5096 von *P. cremoris* sp. nov. zeigten bei der *rpoD*-Phylogenie eine vollständige Sequenzhomologie. Der am nächsten verwandte Typstamm war *P. grimontii*

DSM 17515^T mit 95.6 % Übereinstimmung, gefolgt von *P. marginalis* DSM 13124^T (95.3 %), *Pseudomonas panacis* DSM 18529^T (94.7 %), *Pseudomonas lurida* DSM 15835^T (93.1 %), *Pseudomonas veronii* DSM 11331^T (93.1 %) und *Pseudomonas trivialis* DSM 14937^T (93.0 %). Auch hier indizierten die Differenzen zu den anderen Typstämmen das Vorhandensein einer neuen Spezies.

Bei der 16S rRNA Sequenzanalyse waren die Sequenzen von WS 5106^T und WS 5096 ebenfalls identisch. Werte über 99 % zu anderen Typstämmen wurden für *P. poae* DSM 14936^T, *P. trivialis*, DSM 14937^T, *P. lurida* DSM 15835^T, *Pseudomonas simiae* DSM 18861^T, *Pseudomonas costantinii* DSM 16734^T, *Pseudomonas extremorientalis* DSM 15824^T, *P. antarctica* DSM 15318^T, *Pseudomonas meridiana* DSM 15319^T, *P. extremaustralis* DSM 17835^T, *P. veronii* DSM 11331^T, *P. canadensis* LMG 28499^T und *Pseudomonas palleroniana* DSM 16825^T gefunden. Der *Maximum-Likelihood* phylogenetische Baum auf Basis der 16S rRNA für *P. cremoris* sp. nov. ist in Abbildung 27 gezeigt. *P. cremoris* sp. nov. war in einem Cluster zusammen mit *P. lurida* DSM 15835^T und *P. costantinii* DSM 16734^T lokalisiert.

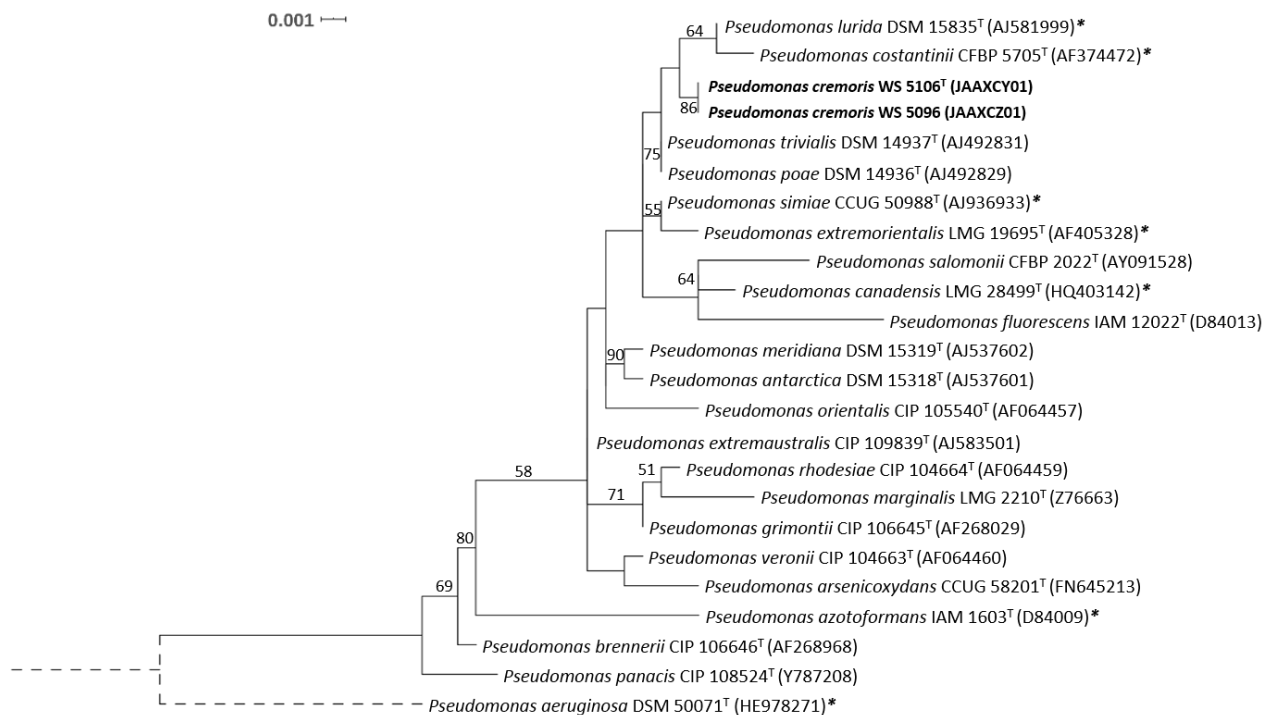


Abbildung 27: Maximum-Likelihood Phylogenie von *P. cremoris* sp. nov. basierend auf 16S rRNA

Der phylogenetische Baum zeigt WS 5106^T und WS 5096 mit deren am nächsten verwandten Spezies auf Basis fast-vollständiger 16S rRNA Gensequenzen (1323 Nukleotidpositionen im finalen Datenset). *Bootstrap*-Werte > 50 % basierend auf 1000 Wiederholungen sind an den Knotenpunkten notiert. *Pseudomonas pertucinogena* NBRC 14163^T wurde als Außengruppe verwendet (gestrichelte Linie, um Faktor zehn verkürzt). Genomidentifizierungsnummern sind in Klammern angegeben. Die in den phylogenetischen Analysen verwendeten Referenzspezies sind mit einem Stern gekennzeichnet. Die Stämme der neuen Spezies sind fett markiert. Der eingezeichnete Balken entspricht 0,001 Substitutionen pro Nukleotidposition.

2.1.2 Multilocus Sequence Analyses (MLSA)

Da *Pseudomonas* aufgrund der engen Speziesverwandtschaft auf Basis von Einzelgenen schwer einzuordnen ist, wurden für *P. saxonica* sp. nov. und *P. haemolytica* sp. nov. *Multilocus Sequence Analyses* (MLSA) nach Mulet *et al.* (2010) durchgeführt. Diese basieren auf den konkatenierten partiellen Sequenzen von 16S rRNA, *gyrB*, *rpoD* und *rpoB* und ermöglichen dadurch eine höhere phylogenetische Auflösung. Die Gensequenzen wurden aus den *Draft*-Genomen isoliert, welche zunächst anhand der minimalen Standards für die Verwendung von Genomdaten für Taxonomie nach Chun *et al.* (2018) charakterisiert wurden.

Pseudomonas saxonica sp. nov.

Die Assemblierungen der Genomsequenzen von WS 5072^T und WS 5092 waren nach Parks *et al.* (2015) und Chain *et al.* (2009) *nearly complete high quality* mit geringen Leveln an geschätzten Kontaminationen. Weitere Charakteristika der Genom Assemblierungen und -annotationen sind in Tabelle 15 gelistet.

Tabelle 15: Charakteristika der Genom Assemblierung und –annotation von *P. saxonica* sp. nov.

Charakteristikum	WS 5072 ^T	WS5092
Genom Assemblierung:		
Größe des Assemblies [Mb]	5,3	5,2
G+C Gehalt [%]	56,29	56,05
Anzahl an Contigs	41	145
Durchschnittliche Contig-Größe [kb]	129	36
N10 [kb]	1548	183
N50 [kb]	551	89
N90 [kb]	137	25
Sequenziertiefe [-fach]	59,3	101,6
Geschätzte Vollständigkeit [%]	100	100
Geschätzte Kontaminationen [%]	0.18	0,13
Genomannotation:		
Gene (kodierend)	4687	4586
rRNAs (5S, 16S, 23S)	4; 1; 1	5; 1; 1
tRNAs	63	64
Pseudogene	124	161

nach Hofmann *et al.* (2020b)

Zur Analyse der MLSA-Phylogenie wurden die verwendeten Referenztypstämme anhand der Ergebnisse der *rpoD* und 16S rRNA Analysen ausgewählt. Abbildung 28 zeigt den *Maximum-Likelihood* phylogenetischen Baum auf Basis des *Tamura-Nei* Models. WS 5072^T und WS 5063 zeigten einen deutlich abgegrenzten Ast, welcher durch hohe *Bootstrap*-Werte gestützt war. Die neue Spezies lag in einem Cluster zusammen mit *P. weihenstephanensis* DSM

29166^T, *P. fragi* DSM 3456^T, *P. deceptionensis* DSM 26521^T und *P. psychrophila* DSM 17535^T und somit in der *P. fragi*-Gruppe innerhalb des *P. fluorescens* Komplexes (Garrido-Sanz *et al.*, 2016). Diese Ergebnisse unterstützten die Annahme des Vorliegens einer neuen Spezies.

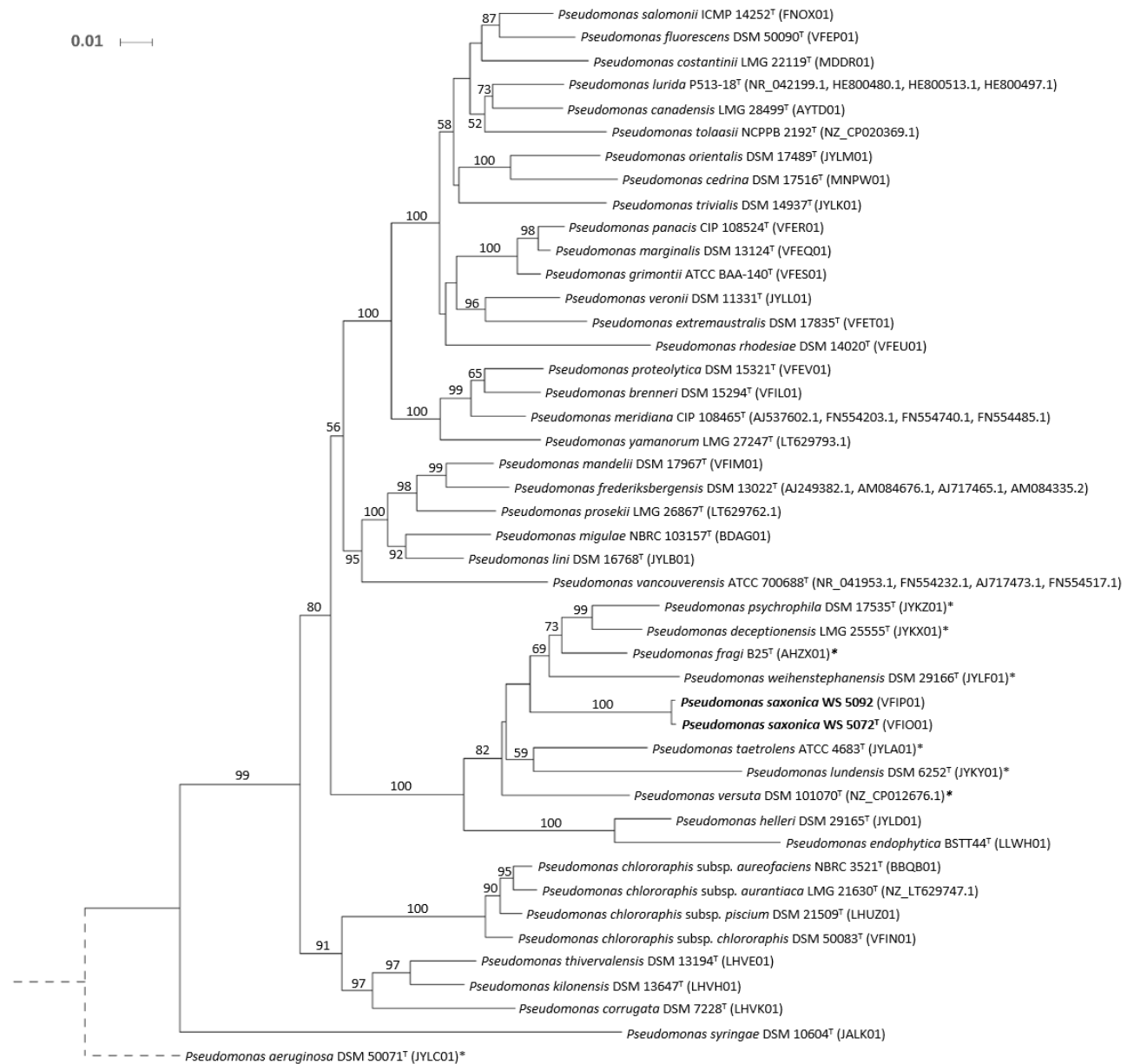


Abbildung 28: Maximum-Likelihood Phylogenie von *P. saxonica* sp. nov. basierend auf MLSA
 Der phylogenetische Baum zeigt WS 5092^T und WS 5072 mit deren am nächsten verwandten Spezies auf Basis der konkatenierten partiellen Sequenzen von 16S rRNA, *gyrB*, *rpoD* und *rpoB* (3636 Nukleotidpositionen im finalen Datenset). *Bootstrap*-Werte > 50 % basierend auf 1000 Wiederholungen sind an den Knotenpunkten notiert. *Pseudomonas aeruginosa* DSM 50071^T wurde als Außengruppe verwendet (gestrichelte Linie, um Faktor zehn verkürzt). Identifizierungsnummern der verwendeten Genom- oder Einzelsequenzen sind in Klammern angegeben. Die in den phylogenetischen Analysen verwendeten Referenzspezies sind mit einem Stern markiert. Die Stämme der neuen Spezies sind fett markiert. Der eingezeichnete Balken entspricht 0,01 Substitutionen pro Nukleotidposition. (Hofmann *et al.*, 2020b)

Pseudomonas haemolytica sp. nov.

Analog zu den *Draft*-Genomassemblierungen von *P. saxonica* sp. nov. waren jene von WS 5063^T und WS 5067 ebenfalls *nearly-complete high quality* mit geringen Leveln an geschätzten Kontaminationen. Weitere Eigenschaften der Genomassemblierungen und -annotationen sind in Tabelle 16 verzeichnet.

Tabelle 16: Charakteristika der Genomassemblierung und –annotation von *P. haemolytica* sp. nov.

Charakteristikum	WS 5063 ^T	WS 5067
Genomassemblierung:		
Größe des <i>Assemblies</i> [Mb]	6,0	6,1
G+C Gehalt [%]	60,03	59,82
Anzahl an Contigs	22	28
Durchschnittliche <i>Contig</i> -Größe [kb]	219	273
N10 [kb]	760	1343
N50 [kb]	592	639
N90 [kb]	144	246
Sequenziertiefe [-fach]	158,6	91,3
Geschätzte Vollständigkeit [%]	90,93	90,93
Geschätzte Kontaminationen [%]	0,41	0,98
Genomannotation:		
Gene (kodierend)	5318	5424
rRNAs (5S, 16S, 23S)	2; 1; 0	6; 1 ;0
tRNAs	64	66

nach Hofmann et al. (2020a)

Die *Maximum-Likelihood* Phylogenie von *P. haemolytica* sp. nov. wurde analog zu *P. saxonica* ermittelt und ist in Abbildung 29 gezeigt. WS 5063^T und WS 5067 bildeten einen deutlich abgetrennten Ast in Nachbarschaft zu *P. libanensis* DSM 17149^T und *P. synxantha* DSM 18928^T innerhalb der *P. fluorescens*-Gruppe (Garrido-Sanz et al., 2016). Auch bei *P. haemolytica* sp. nov. deutete die MLSA-Phylogenie auf das Vorliegen einer neuen Spezies hin.

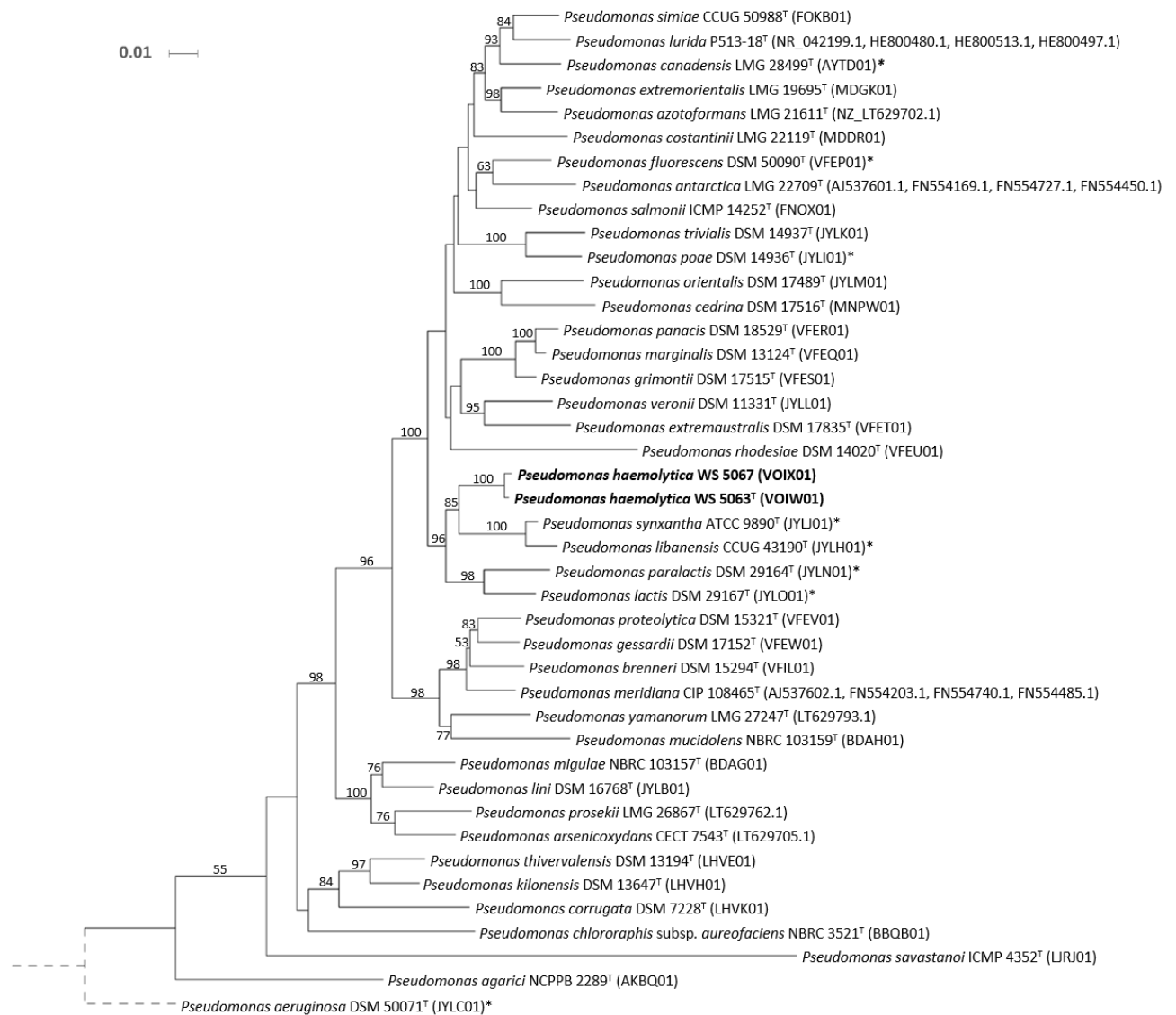


Abbildung 29: Maximum-Likelihood Phylogenie von *P. haemolytica* sp. nov. basierend auf MLSA
 Der phylogenetische Baum zeigt WS 5063^T und WS 5067 mit deren am nächsten verwandten Spezies auf Basis der konkatenierten partiellen Sequenzen von 16S rRNA, *gyrB*, *rpoD* und *rpoB* (3647 Nukleotidpositionen im finalen Datenset). *Bootstrap*-Werte > 50 % basierend auf 1000 Wiederholungen sind an den Knotenpunkten notiert. *Pseudomonas aeruginosa* DSM 50071^T wurde als Außengruppe verwendet (gestrichelte Linie, um Faktor zehn verkürzt). Identifizierungsnummern der verwendeten Genom- oder Einzelsequenzen sind in Klammern angegeben. Die in den phylogenetischen Analysen verwendeten Referenzspezies sind mit einem Stern markiert. Die Stämme der neuen Spezies sind fett markiert. Der eingezeichnete Balken entspricht 0,01 Substitutionen pro Nukleotidposition. (Hofmann et al., 2020a)

2.1.3 Kerngenom-Analysen

Bei *P. cremoris* sp. nov. wurden zu einem späteren Zeitpunkt anstelle der MLSA-Phylogenie Analysen auf Basis des Kerngenoms durchgeführt, um eine höhere Auflösung zu erreichen. Die Assemblierungen der dafür verwendeten *Draft*-Genome von WS 5106^T und WS 5096 waren *nearly complete high quality*, wobei WS 5106^T hohe und WS 5096 geringe geschätzte Kontaminationen aufwies. Die restlichen Charakteristika der Genomassemblierungen und -annotationen von *P. cremoris* sp. nov. sind in Tabelle 17 einsehbar.

Tabelle 17: Charakteristika der Genomassemblierung und –annotation von *P. cremoris* sp. nov.

Charakteristikum	WS 5106 ^T	WS 5096
Genomassemblierung:		
Größe des Assemblies [Mb]	7,2	7,0
G+C Gehalt [%]	60,1	59,7
Anzahl an Contigs	36	50
L50	6	7
L75	11	14
Durchschnittliche Contig-Größe [kb]	201	139
N10 [kb]	786	786
N50 [kb]	433	323
N75 [kb]	323	191
N90 [kb]	143	96
Sequenziertiefe [-fach]	27,4	31,7
Geschätzte Vollständigkeit [%]	99,9	99,9
Geschätzte Kontaminationen [%]	13,7	0,86
Genomannotation:		
Gene (kodierend)	6515	6308
rRNAs (5S, 16S, 23S)	2; 1; 1	2; 1; 1
tRNAs	61	58

nach Hofmann et al. (2021)

Das Kerngenom für die phylogenetischen Analysen bestand aus den Sequenzen von 2280 Genen, welche bei allen Typstämmen des ausgewählten Stammsets vorhanden waren. Dieses bestand aus allen Spezies der *Pseudomonas fluorescens* Gruppe. Abbildung 30 zeigt die *Maximum-Likelihood* Phylogenie von WS 5106^T und WS 5096 mit den verwandten Typstämmen auf Basis des *Alignments* des gemeinsamen Kerngenoms und dem *general time-reversible* Nukleotidsubstitutionsmodells. WS 5106^T und WS 5096 bildeten einen deutlich abgetrennten Ast innerhalb der *Pseudomonas fluorescens* Gruppe (Garrido-Sanz et al., 2016). Die am nächsten verwandten Spezies waren *Pseudomonas kairouanensis* CECT 9766^T und *Pseudomonas nabeulensis* CECT 9765^T. Diese Spezies wurden nach Abschluss der phänotypischen Charakterisierungen valide beschrieben (Oueslati et al., 2019) und konnten deshalb nicht in den initialen Einzelgenanalysen sowie der Auswahl der Typstämmen für die phänotypischen Charakterisierungen berücksichtigt werden.

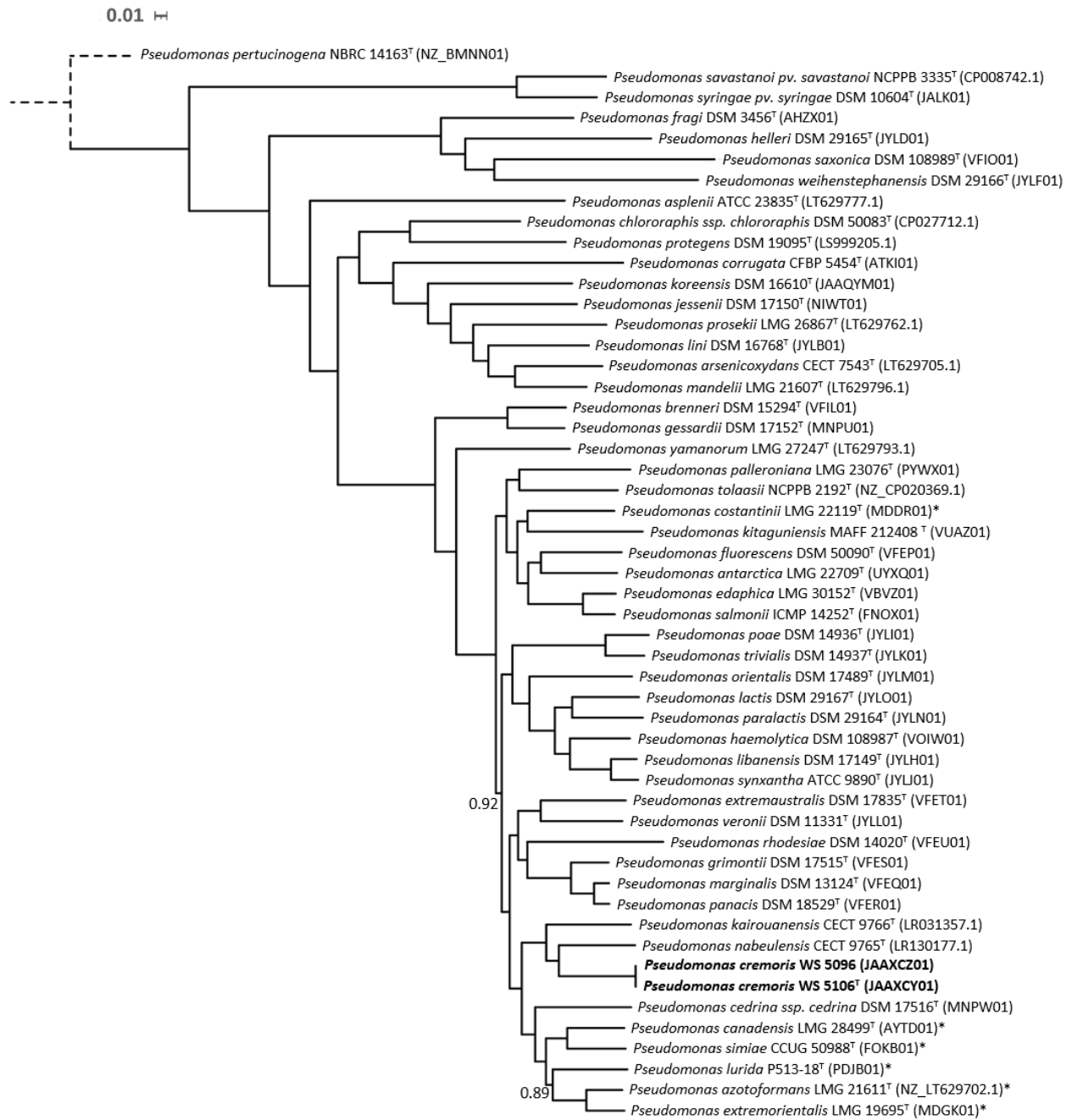


Abbildung 30: Maximum-Likelihood Phylogenie von *P. cremoris* sp. nov. auf Basis des Kerngenoms

Der phylogenetische Baum zeigt WS 5106^T und WS 5096 mit den Spezies der *Pseudomonas fluorescens* Gruppe auf Basis der konkatenierten Sequenzen von 2280 Genen, die das Kerngenom der 52 Typstämme bildeten. Zur Übersichtlichkeit sind nur *ultrafast bootstrap approximation* Werte < 95 % basierend auf 1000 Wiederholungen gezeigt, um unklare Äste zu markieren. *Pseudomonas pertucinogena* NBRC14163^T wurde als Außengruppe genutzt (gestrichelte Linie, um 0,05 Substitutionen pro Nukleotidposition verkürzt). Identifizierungsnummern der verwendeten Genom- oder Einzelsequenzen sind in Klammern angegeben. Die in den phylogenetischen Analysen verwendeten Referenzspezies sind mit einem Stern gekennzeichnet. Die Stämme der neuen Spezies sind fett markiert. Der eingezeichnete Balken entspricht 0,01 Substitutionen pro Nukleotidposition. (Hofmann et al., 2021)

2.1.4 Analysen der Average Nucleotide Identity (ANI)

Als finale Abgrenzung der neuen Spezies wurden paarweise ANIm-Werte zu den am nächsten verwandten Typstämmen auf Basis der vorhergehenden phylogenetischen Analysen berechnet. Der Grenzwert zur Spezieszuordnung liegt hierbei bei einem ANIm von 95 % (Richter & Roselló-Móra, 2009).

Pseudomonas saxonica sp. nov.

Der paarweise ANIm-Wert von 98,9 % zwischen WS 5072^T und WS 5092 bestätigte die Zugehörigkeit zur gleichen Spezies. Der am nächsten verwandte Typstamm war mit 86,3 % *P. fragi* DSM 3456^T. Da dieser Wert jedoch deutlich unter dem Grenzwert von 95 % lag, konnte *P. saxonica* sp. nov. als neue Spezies abgegrenzt werden (Tabelle 18).

Tabelle 18: ANIm Werte zwischen *P. saxonica* sp. nov. und den Referenztypstämmen der verwandten *Pseudomonas* Spezies

Stamm	paarweiser ANIm [%] mit Stamm								
	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1 <i>P. saxonica</i> WS 5072 ^T	98,9	86,3	86,0	85,9	85,9	85,9	85,6	85,5	82,8
2 <i>P. saxonica</i> WS 5092	-	86,3	86,0	85,9	85,9	85,7	85,7	85,5	82,9
3 <i>P. fragi</i> DSM 3456 ^T		-	88,3	88,2	86,7	86,1	86,1	86,4	83,1
4 <i>P. deceptionensis</i> DSM 26521 ^T			-	89,3	87,0	85,9	86,2	86,4	83,0
5 <i>P. psychrophila</i> DSM 17535 ^T				-	86,5	85,7	85,9	86,4	83,0
6 <i>P. versuta</i> LMG 29628 ^T					-	85,6	85,8	86,1	83,0
7 <i>P. lundensis</i> DSM 6252 ^T						-	86,7	85,6	83,0
8 <i>P. weihenstephanensis</i> DSM 29166 ^T							-	85,6	82,9
9 <i>P. taetrolens</i> DSM 21104 ^T								-	83,0
10 <i>P. aeruginosa</i> DSM 50071 ^T									-

nach Hofmann et al. (2020b)

Pseudomonas haemolytica sp. nov.

Auch bei *P. haemolytica* sp. nov, konnte für WS 5063^T und WS 5067 mit einem ANIm-Wert von 98,7 % die Spezieszugehörigkeit bestätigt werden. Als am nächsten verwandte Spezies wurden mit 91,4 % *P. synxantha* DSM 18928^T und *P. libanensis* DSM 17149^T festgestellt. Auch hier waren der ANIm-Werte gering genug, um *P. haemolytica* sp. nov. als neue Spezies abgrenzen zu können (Tabelle 19).

Tabelle 19: ANIm Werte zwischen *P. haemolytica* sp. nov. und den Referenztypstämmen der verwandten *Pseudomonas* Spezies

Stamm	paarweiser ANIm [%] mit Stamm								
	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1 <i>P. haemolytica</i> WS 5063 ^T	98,7	91,4	91,4	90,3	90,2	88,3	88,3	87,8	83,4
2 <i>P. haemolytica</i> WS 5067	-	91,5	91,4	90,5	90,2	88,3	88,3	87,8	83,4
3 <i>P. synxantha</i> DSM 18928 ^T		-	95,7	90,1	90,2	88,0	88,1	87,7	83,5
4 <i>P. libanensis</i> DSM 17149 ^T			-	90,4	90,4	88,0	88,2	87,7	83,5
5 <i>P. lactis</i> DSM 29167 ^T				-	90,9	88,1	88,2	87,9	83,5
6 <i>P. paralactis</i> DSM 29164 ^T					-	87,9	88,1	87,7	83,6
7 <i>P. fluorescens</i> DSM 50090 ^T						-	88,3	87,5	83,4
8 <i>P. canadensis</i> LMG 28499 ^T							-	87,9	83,5
9 <i>P. poae</i> DSM 14936 ^T								-	83,6
10 <i>P. aeruginosa</i> DSM 50071 ^T									-

nach Hofmann et al. (2020a)

Pseudomonas cremoris sp. nov.

Wie bereits bei den Einzelgenanalysen wiesen die Stämme WS 5106^T und WS 5096 auch bei den ANIm Analysen eine hohe Übereinstimmung von 99,9 % auf. Als am nächsten verwandter Referenztypstamm wurde *P. nabeulensis* CECT 9765^T mit einem ANIm-Wert von 90,1 % identifiziert. Auf Basis dieser Ergebnisse konnte auch *P. cremoris* sp. nov. als neue Spezies abgegrenzt werden (Tabelle 20).

Tabelle 20: ANIm Werte zwischen *P. cremoris* sp. nov. und den Referenztypstämmen der verwandten *Pseudomonas* Spezies

Stamm	paarweiser ANIm [%] mit Stamm													
	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1 <i>P. cremoris</i> WS 5106 ^T	99.9	90.1	89.8	88.9	88.9	88.9	88.7	88.6	88.6	88.6	88.6	88.5	88.1	83.4
2 <i>P. cremoris</i> WS 5096	-	90.1	89.8	89.0	88.9	88.9	88.7	88.6	88.6	88.6	88.6	88.5	88.1	83.4
3 <i>P. nabeulensis</i> CECT 9765 ^T		-	89.9	89.1	89.1	89.0	88.8	88.7	88.8	88.7	88.7	88.4	88.0	83.5
4 <i>P. kairouanensis</i> CECT 9766 ^T			-	89.0	89.0	88.9	88.7	88.7	88.7	88.7	88.7	88.3	87.1	83.4
5 <i>P. canadensis</i> LMG 28499 ^T				-	90.7	90.7	92.0	89.1	89.0	90.2	89.0	88.6	88.3	83.5
6 <i>P. azotoformans</i> DSM 18862 ^T					-	94.4	90.4	89.2	89.3	90.6	89.3	88.7	88.3	83.5
7 <i>P. extremorientalis</i> LMG 19695 ^T						-	90.4	89.2	89.3	90.5	89.2	88.5	88.2	83.6
8 <i>P. simiae</i> LMG 28180 ^T							-	89.0	88.9	90.4	94.1	88.3	88.0	83.5
9 <i>P. grimontii</i> CIP 106645 ^T								-	94.1	89.2	94.1	88.7	88.6	83.5
10 <i>P. marginalis</i> DSM 13124 ^T									-	89.2	97.2	88.7	88.5	83.6
11 <i>P. lurida</i> LMG 21995 ^T										-	89.2	88.6	88.2	83.5
12 <i>P. panacis</i> DSM 18529 ^T											-	88.7	88.5	83.6
13 <i>P. costantinii</i> LMG 22119 ^T												-	89.1	83.6
14 <i>P. fluorescens</i> DSM 50090 ^T													-	83.4
15 <i>P. aeruginosa</i> DSM 50071 ^T														-

nach Hofmann et al. (2021)

2.2 Morphologische Charakterisierung

Zur Charakterisierung der Morphologie wurden sowohl die Kolonien makroskopisch nach Wachstum auf Universalagar als auch die Zellen mikroskopisch analysiert.

2.2.1 Morphologie von *Pseudomonas saxonica* sp. nov.

Die Kolonien des Typstammes WS 5072^T wiesen nach 24 h Inkubation auf TSA bei 30 °C eine heterogene Morphologie auf (Abbildung 31A). Die Kolonietypen konnten getrennt isoliert und charakterisiert werden. Der kleinere Kolonietyp wies einen Durchmesser von 0,5-1 mm, eine glänzende Oberfläche, eine konvexe Form sowie eine hellere Farbe auf (Abbildung 31B). Der größere Kolonietyp war durchscheinend und beigefarben, glänzend, flach und hatte einen Durchmesser von 1-2 mm (Abbildung 31C). Durch Abgleich der 16S rRNA und *rpoD*-Sequenzen beider Kolonietypen konnte eine Kontamination mit einer anderen Spezies ausgeschlossen werden. Auch war die mikroskopische Zellmorphologie beider Kolonietypen gleich. WS 5092 zeigte lediglich den größeren Kolonietyp. Der Gramtyp der Zellen wurde per KOH-Test als Gram-negativ identifiziert. Unter dem Mikroskop waren motile, gekrümmte Stäbchen mit einer Länge von durchschnittlich 2,6 µm (1,6-3,5 µm) und einer Breite von 1,2 µm (1,0-2,0 µm) sichtbar (Abbildung 31D). Es konnten keine Zelleinschlüsse festgestellt werden. Die Beweglichkeit wurde im Motilitätstest mit halbfestem Agar bestätigt.

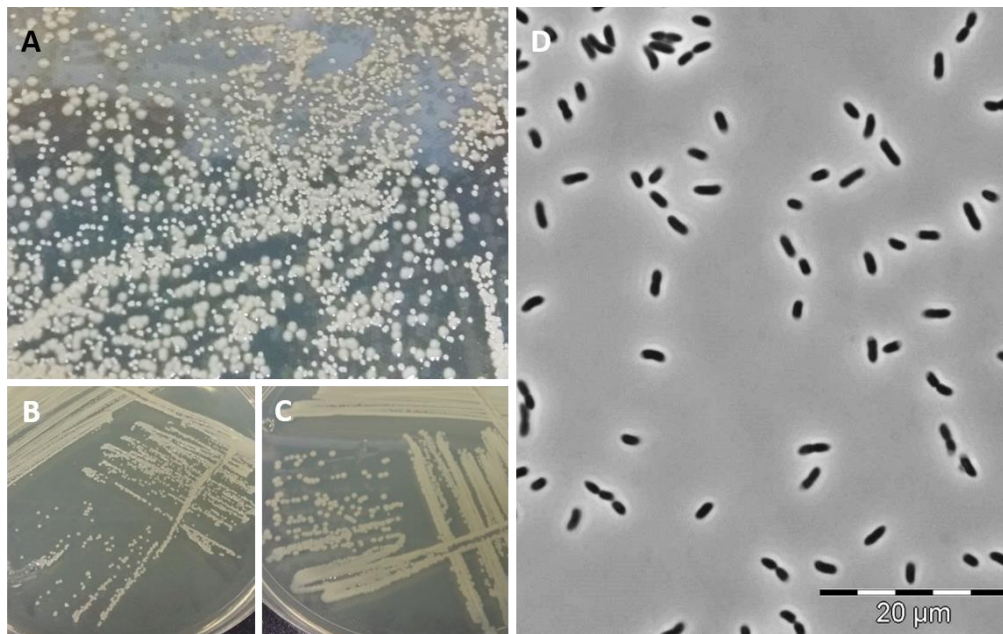


Abbildung 31: Heterogene Koloniemorphologie und Zellmorphologie von *P. saxonica* WS 5072^T
Nach Inkubation auf TSA zeigte der Typstamm von *P. saxonica* eine heterogene Koloniemorphologie auf (A), welche aus dem kleineren Kolonietyp mit hellerer Farbe (B) und dem größeren beigefarbenen Kolonietyp (C) bestand. Die Phasenkontrastaufnahme von *P. saxonica* WS 5072^T entstand nach Inkubation auf TSA für 24 h (D). (Hofmann *et al.*, 2020b)

2.2.2 Morphologie von *Pseudomonas haemolytica* sp. nov.

P. haemolytica WS 5063^T wuchs nach Inkubation für 24 h bei 30 °C auf TSA als beige, glänzende, runde Kolonie mit einem Durchmesser von 1 mm (Abbildung 32A). Die Zellen waren Gram-negativ und hatten eine gekrümmte Stäbchenform ohne Zelleinschlüsse mit einer durchschnittlichen Länge von 2,2 µm (1,5-3,2 µm) und einer Breite von 0,9 µm (0,6-1,2 µm) (Abbildung 32B). Motilität war sowohl mikroskopisch als auch makroskopisch nachweisbar.

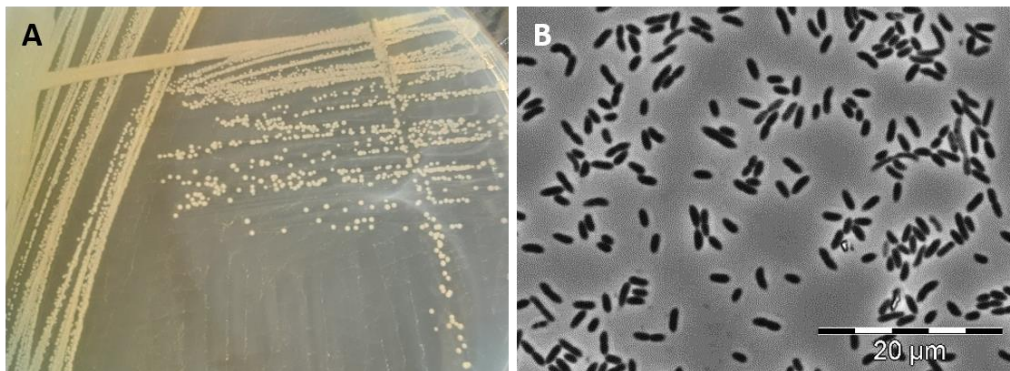


Abbildung 32: Kolonie- und Zellmorphologie von *P. haemolytica* WS 5063^T

Nach Inkubation auf TSA hatte der Typstamm von *P. haemolytica* beige, glänzende und runde Kolonien (A). Die Phasenkontrastaufnahme von *P. haemolytica* WS 5063^T entstand nach Inkubation auf TSA für 24 h (B). (Hofmann *et al.*, 2020a)

2.2.3 Morphologie von *Pseudomonas cremoris* sp. nov.

Nach Inkubation auf TSA für 24 h bei 28 °C wiesen die Kolonien von *P. cremoris* WS 5106^T runde, glänzende und cremefarbene Kolonien mit einem Durchmesser von 1,0-1,5 mm auf (Abbildung 33A). Die Zellen waren Gram-negativ, motil und ohne Zelleinschlüsse. Die gekrümmten Stäbchen hatten eine durchschnittliche Länge von 2,5 µm (1,7-3,7 µm) und eine Breite von 0,9 µm (0,6-1,1 µm) (Abbildung 33B).

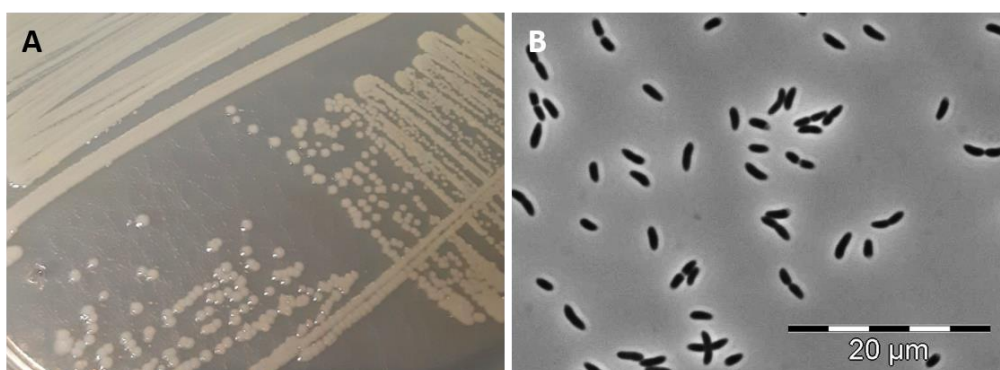


Abbildung 33: Kolonie- und Zellmorphologie von *P. cremoris* WS 5106^T

Nach Inkubation auf TSA hatte der Typstamm von *P. cremoris* cremefarbene, glänzende und runde Kolonien (A). Die Phasenkontrastaufnahme von *P. cremoris* WS 5063^T entstand nach Inkubation auf TSA für 24 h (B). (Hofmann *et al.*, 2021)

2.3 Physiologische und biochemische Charakterisierung

Anhand physiologischer Merkmale wurden die neuen Spezies hinsichtlich ihrer Wachstumseigenschaften charakterisiert. Weiterhin konnten anhand biochemischer Analysen beispielsweise Enzymreaktionen oder Stoffwechseleigenschaften beschrieben werden. Letztendlich sollten die neuen Spezies anhand dieser Charakteristika gegenüber den phänotypisch am nächsten verwandten Typstämmen abgegrenzt werden.

2.3.1 Charakterisierung und Abgrenzung von *Pseudomonas saxonica* sp. nov.

Pseudomonas saxonica sp. nov. zeigte optimales Wachstum bei 25 bis 29 °C, einem pH-Wert zwischen 6,0 und 7,0 sowie einer Salzkonzentration von 0,5-1 %. Die Wachstumskurven, auf deren Basis die optimalen Bedingungen ermittelt wurden, sind in Abbildung A 2 gezeigt. Die oberen und unteren Wachstumsgrenzen lagen bei 4 und 34 °C (Temperaturen unter 4 °C wurden nicht getestet), einem pH von 5,5 bzw. 8 und einer Salzkonzentration von 0 – 7 %. Wachstum unter anaeroben Bedingungen war nicht möglich. Der Oxidase- sowie der Katalasetest waren positiv. Die Stämme wuchsen sowohl auf Cetrimid als auch auf R2A Agar. Es wurden keine Pigmente auf King A Agar produziert. Die Bildung fluoreszierender Pigmente auf King B Agar war stammspezifisch, da dies nur bei WS 5092 auftrat (Abbildung 34).

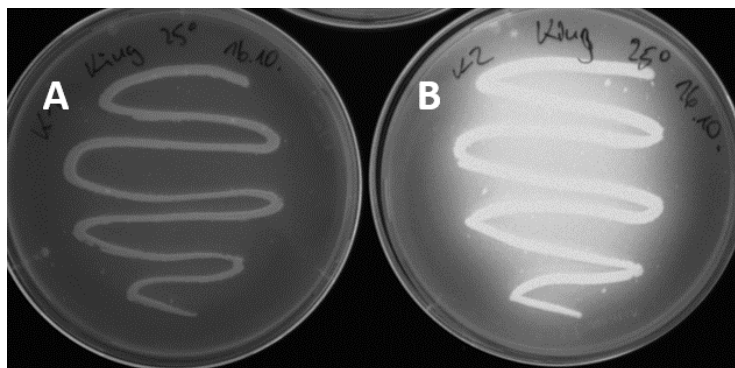


Abbildung 34: Stammspezifische Produktion fluoreszierender Pigmente auf King B Agar bei *P. saxonica* sp. nov.

Bei WS 5072^T konnten nach Inkubation auf King B Agar für sieben Tage bei 25 °C keine fluoreszierenden Pigmente unter UV-Licht festgestellt werden (A), jedoch für WS 5092 (B).

Beide Stämme hatten weder die Fähigkeit zur Stärkehydrolyse, noch zur Proteolyse auf Caseinagar oder zur β -Hämolyse auf Blutagar. Allerdings konnte α -Hämolyse sowie Lipolyse auf Tributyrinagar sowohl bei 4 °C als auch bei 25 °C nachgewiesen werden. Negative Reaktionen wurden im Fall der Nitratreduktion, Denitrifikation, Gelatinehydrolyse, H₂S-Produktion, Voges-Proskauer Reaktion, β -Galactosidase, Lysin-Decarboxylase, Ornithin-Decarboxylase, Urease, Tryptophan-Desaminase und der Indolproduktion gefunden. Positiv

waren Citratmetabolisierung, Arginin-Dihydrolase sowie die Aesculinproduktion. Säureproduktion fand aus folgenden Zuckern statt: D-Arabinose, L-Arabinose, D-Arabit, D-Cellobiose, D-Fructose, D-Fucose, L-Fucose, D-Galactose, D-Glucose, Glycerin, Gentiobiose, Laktose, D-Lyxose, D-Mannose, D-Mannit, Maltose, Melibiose, D-Ribose, L-Rhamnose, D-Sorbitol, L-Xylose (nur bei WS 5072^T) und D-Xylose. Keine Säure wurde aus den Zuckern D-Adonit, N-Acetyl-D-Glucosamin, D-Amygdalin, Arbutin, L-Arabit, Dulcit, Erythrit, Methyl- α -D-Mannopyranosid, D-Melezitose, Raffinose, L-Sorbose, D-Salicin, D-Sucrose, D-Trehalose, D-Turanose, D-Tagatose, Xylit und Methyl- β -D-Xylopyranosid gebildet.

Die Eigenschaften, die *P. saxonica* sp. nov. von den Typstämmen der am nächsten verwandten Spezies unterschieden, sind in Tabelle 21 gelistet. Die Wachstumseigenschaften von WS 5072^T und WS 5092 waren vergleichbar zu jenen der anderen Spezies. Alle Stämme mit Ausnahme von *P. aeruginosa* DSM 50071^T konnten bei 4 °C wachsen und waren aus diesem Grund psychrotolerant. Auch die tolerierte Höchsttemperatur war mit 34 °C für alle Stämme einheitlich, jedoch war bei *P. aeruginosa* DSM 50071^T bis 42 °C Wachstum nachweisbar. Ebenso waren die tolerierten pH-Bereiche für alle Stämme mit min. 5,5 - 6,0 und max. 8,0 vergleichbar. Die maximal tolerierte Salzkonzentration variierte zwischen 5 % (*P. deceptionensis* DSM 26521^T) und 8 % (*P. fragi* DSM 3456^T, *P. versuta* LMG 29628^T und *P. aeruginosa* DSM 50071^T). Obwohl das *aprX-lipA2*-Operon bei einigen Stämmen im Genom vorhanden war, konnte in keinem Fall Proteolyse auf Caseinagar nachgewiesen werden. Bei den phänotypischen Eigenschaften konnte *P. saxonica* sp. nov. mit mindestens fünf Eigenschaften im Fall von *P. taetrolens* DSM 21104^T unterschieden werden. Im Gegensatz zu diesem Typstamm konnte WS 5072^T keine fluoreszierenden Pigmente auf King B Agar bilden, dafür zeigte er jedoch Motilität in halbfestem Medium. Weiterhin konnte er von *P. taetrolens* DSM 21104^T durch die Aesculinhydrolyse sowie durch die Produktion von Säure aus L-Xylose und D-Sorbit unterschieden werden. Als besondere Eigenschaft der neuen Spezies wurde die Aesculinhydrolyse identifiziert, da diese Reaktion bei allen anderen Typstämmen negativ war.

Insgesamt konnte *P. saxonica* sp. nov. auf Basis der phänotypischen und biochemischen Eigenschaften von den am nächsten verwandten Spezies abgegrenzt werden, was die Hypothese des Vorliegens einer neuen Spezies stützte.

Tabelle 21: Eigenschaften, die *P. saxonica* sp. nov. von den Typstämmen der am nächsten verwandten Spezies sowie der Typspezies *P. aeruginosa* unterscheiden

Stämme: 1: *P. saxonica* sp. nov. (WS 5072^T und WS 5092); 2: *P. fragi* DSM 3456^T; 3: *P. weihenstephanensis* DSM 29166^T; 4: *P. deceptionensis* DSM 26521^T; 5: *P. psychrophila* DSM 17535^T; 6: *P. taetrolens* DSM 21104^T; 7: *P. lundensis* DSM 6252^T; 8: *P. versuta* LMG 29628^T; 9: *P. aeruginosa* DSM 50071^T. + positiv; - negativ; NA, nicht messbar; * nur der Typstamm zeigte diese Reaktion

Eigenschaft	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Proteolyse auf Caseinagar bei: 25 °C	-	-	-	-	-	-	-	-	+
4 °C	-	-	-	-	-	-	-	-	NA
Lipolyse auf Tributyrinagar bei: 25 °C	+	+	+	-	+	+	+	+	+
4 °C	+	+	-	+	+	+	+	-	NA
β-Hämolyse auf Blutagar	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Fluoreszierende Pigmente auf King B	-*	-	+	-	-	+	+	+	+
Motilität in halbfestem Medium	+	+	+	-	-	-	+	-	+
Arginin-Dihydrolase	+	-	+	+	+	+	+	+	+
Aesculin-Hydrolyse	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Säureproduktion aus:									
L-Xylose	+*	-	-	-	-	+	-	+	-
Inosit	-	-	+	+	-	+	+	+	-
D-Mannit	+	+	-	+	+	+	-	+	+
D-Sorbit	+	-	-	-	-	-	-	+	-
D-Maltose	+	+	+	+	+	+	+	+	-
D-Lactose	+	+	+	+	+	+	+	+	-
D-Sucrose	-	+	-	+	+	-	-	+	-
D-Trehalose	-	+	+	+	+	-	-	-	+
D-Raffinose	-	-	-	+	+	-	-	-	-
Xylit	-	-	-	-	-	-	-	+	-
D-Lyxose	+	+	+	+	+	+	-	+	+
D-Arabit	+	+	-	+	+	+	-	+	-
Tolerierte pH-Werte	5,5-8	6-8	6-8	6-8	6-8	6-8	5,5-8	6-8	5,5-8
Tolerierte NaCl-Konzentration [% w/v]	0-7	0-8	0-6	0-5	0-6	0-7	0-7	0-8	0-8
Maximale Wachstumstemperatur [°C]	34	34	34	34	34	34	34	34	42
Vorhandensein des <i>aprX-lipA2</i> -Operons	-	+	+	+	-	-	+	+	+

nach Hofmann et al. (2020b)

2.3.2 Charakterisierung und Abgrenzung von *Pseudomonas haemolytica* sp. nov.

Die optimalen Wachstumsbedingungen von *P. haemolytica* sp. nov. waren Temperaturen zwischen 29 und 31 °C, pH-Werte zwischen 6,5 und 7,5 sowie Salzkonzentrationen zwischen 0,5 und 1,0 %. Die Wachstumskurven, die zur Identifizierung der Wachstumsoptima dienten, sind in Abbildung A 3 gezeigt. Die tolerierten Wachstumsbedingungen waren Temperaturen zwischen 4 und 34 °C, pH-Werte zwischen 5,5 und 8,0 sowie maximale NaCl-Konzentrationen von 6,5 - 7,5 %. Wachstum unter anaeroben Bedingungen konnte nicht nachgewiesen werden

und die Oxidase- sowie Katalasereaktion waren positiv. Beide Stämme konnten auf Cetrimid- und R2A Agar wachsen. Eine Pigmentbildung auf King A Agar fand nicht statt, jedoch konnte Fluoreszenz auf King B Agar nachgewiesen werden. *P. haemolytica* sp. nov. zeigte eine starke Proteolyse auf Caseinagar sowie eine Lipolyse auf Tributyrinagar bei 4 und 30 °C. Stärke wurde hingegen nicht hydrolysiert. Auf Blutagar fand eine sehr starke β -Hämolyse bei beiden Stämmen statt, welche letztendlich ausschlaggebend bei der Namensfindung der neuen Spezies war (Abbildung 35).



Abbildung 35: β -Hämolyse von *P. haemolytica* WS 5063T auf Blutagar nach Inkubation für 7 d bei 30 °C. (Hofmann *et al.*, 2020a)

Positive Ergebnisse wurden für die Reaktionen der Gelatinehydrolyse, Citratmetabolisierung und der Arginin-Dihydrolase ermittelt. Negative Ergebnisse ergaben die Nitratreduktion, Denitrifikation, H_2S -Produktion, Voges-Proskauer-Reaktion, β -Galactosidase, Lysin-Decarboxylase, Urease, Tryptophan Desaminase, Indolproduktion sowie Aesculinhydrolyse. Säure wurde aus folgenden Zuckern produziert: D-Adonitol, D-Arabinose, L-Arabinose, D-Arabit, L-Arabit, D-Cellobiose, Erythrit, D-Fructose, D-Fucose, D-Galactose, D-Glucose, Glycerin, Gentiobiose, Inosit, Laktose, D-Lyxose, D-Mannose, D-Sorbit, D-Trehalose, Xylit, L-Xylose und D-Xylose. Keine Säureproduktion wurde bei N-Acetylglucosamin, Amygdalin, Arbutin, Dulcitol, L-Fucose, Methyl- α -D-Glucosid, Glycogen, Inulin, Maltose, Methyl- α -D-Mannosid, D-Melezitose, D-Gluconsäure-Kaliumsalz, Raffinose, L-Sorbose, D-Salicin, D-Sucrose, D-Turanose, D-Tagatose, L-Xylose und Methyl- β -D-Xylopyranose nachgewiesen.

Die differenzierenden Eigenschaften zwischen *P. haemolytica* sp. nov. und den am nächsten verwandten Typstämmen sind in Tabelle 22 gezeigt. Die Wachstumsbedingungen der analysierten Spezies sind ähnlich. Bis auf *P. aeruginosa* DSM 50071^T konnten alle Typstämme bei 4 °C wachsen. Die obere Wachstumsgrenze schwankte zwischen 34 °C für *P. haemolytica* sp. nov, *P. fluorescens* DSM 50090^T, *P. canadensis* LMG 28499^T und *P. poae* DSM 14936^T und 42 °C für *P. aeruginosa* DSM 50071^T. Da ein Wachstum bei 37 °C als möglicher Pathogenitätsfaktor angesehen werden kann, wurde dies ebenfalls als abgrenzendes Charakteristikum der neuen Spezies von *P. synxantha* DSM 18928^T, *P. libanensis* DSM 17149^T, *P. lactis* DSM 29167^T und *P. aeruginosa* DSM 50071^T gewertet. Der tolerierte pH-

Bereich war für alle Stämme mit 5,5-8,0 gleich. Die tolerierte maximale Salzkonzentration variierte zwischen 5 und 8 %. Obwohl alle Typstämme das *aprX-lipA2*-Operon im Genom aufwiesen, waren nur manche, einschließlich *P. haemolytica* sp. nov., proteolytisch auf Caseinagar. Die geringste Anzahl an phänotypischen Unterschieden zu *P. haemolytica* sp. nov. wurden für *P. libanensis* DSM 17149^T und *P. paralactis* DSM 29164^T gefunden. Ersterer Typstamm unterschied sich durch die Fähigkeit, bei 37 °C zu wachsen, Nitrat zu reduzieren, Säure aus L-Xylose zu produzieren sowie der fehlenden β-Hämolyse. *P. paralactis* DSM 29164^T zeigte lediglich Unterschiede bei der Zuckerverwertung, da dieser Säure aus L-Xylose und Maltose produzieren konnte, nicht jedoch aus Inosit und D-Sorbit.

Zusammenfassend stützen die Analysen der phänotypischen und biochemischen Eigenschaften von *P. haemolytica* sp. nov. die Annahme einer neuen Spezies.

Tabelle 22: Eigenschaften, die *P. haemolytica* sp. nov. von den Typstämmen der am nächsten verwandten Spezies sowie der Typspezies *P. aeruginosa* unterscheiden

Stämme: 1, *P. haemolytica* sp. nov. (WS 5063^T und WS 5067); 2, *P. synxantha* DSM 18928^T; 3, *P. libanensis* DSM 17149^T; 4, *P. lactis* DSM 29167^T; 5, *P. fluorescens* DSM 50090^T; 6, *P. paralactis* DSM 29164^T; 7, *P. canadensis* LMG 28499^T; 8, *P. poae* DSM 14936^T; 9, *P. aeruginosa* DSM 50071^T.
+ positiv; - negativ; NA, nicht messbar

Eigenschaft	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Proteolyse auf Caseinagar bei:									
30 °C	+	+	+	+	-	+	-	-	+
4 °C	+	+	+	+	-	+	-	-	NA
β-Hämolyse auf Blutagar	+	-	-	-	-	+	-	-	+
Fluoreszierende Pigmente auf King B	+	+	+	+	+	+	+	-	+
Nitratreduktion / Denitrifikation	-/-	+/-	+/-	-/-	-/-	-/-	-/-	+/+	+/+
Gelatinehydrolyse	+	+	+	+	-	+	-	-	+
Arginin-Dihydrolase	+	+	+	+	+	+	+	-	+
Tryptophan-Desaminase	-	+	-	-	-	-	+	-	-
Aesculinhydrolyse	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Säureproduktion aus:									
Erythrit	+	+	+	+	+	+	+	-	-
D-Arabinose	+	-	+	+	-	+	-	-	+
L-Xylose	-	-	+	+	-	+	-	-	-
D-Adonit	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Methyl-β-D-Xylopyranose	-	+	-	-	-	-	+	+	-
Inosit	+	+	+	+	+	-	+	-	-
D-Sorbit	+	+	+	+	+	-	+	-	-
D-Maltose	-	-	-	-	-	+	-	-	-
D-Lactose	+	+	+	+	-	+	+	-	-
D-Sucrose	-	-	-	+	+	-	+	+	-
D-Raffinose	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Xylit	+	+	+	+	+	+	+	-	-
D-Arabit	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Tolerierte pH-Werte	5,5-8	5,5-8	5,5-8	5,5-8	5,5-8	5,5-8	5,5-8	5,5-8	5,5-8
Tolerierte NaCl-Konzentration [% w/v]	0-7	0-5	0-7	0-6	0-7	0-8	0-6	0-6	0-8
Maximale Wachstumstemperatur [°C]	34	37	37	37	34	36	34	34	42
Vorhandensein des <i>aprX-lipA2</i> -Operons	+	+	+	+	+	+	+	+	+

nach Hofmann et al. (2020a)

2.3.3 Charakterisierung und Abgrenzung von *Pseudomonas cremoris* sp. nov.

P. cremoris sp. nov. zeigte die schnellsten Wachstumsraten bei einer Temperatur von 27-29 °C, einem pH-Wert von 6,5-7,0 und einer NaCl-Konzentration von 0,5-1,0 %. Die entsprechenden Wachstumskurven sind in Abbildung A 4 einsehbar. Als Wachstumsgrenzen konnten 4°C und 34 °C, die pH-Werte 5,5 und 8,0 sowie eine maximale Salzkonzentration von 7 % ermittelt werden. Unter anaeroben Bedingungen fand kein Wachstum statt und die Oxidase- und Katalasereaktion war positiv. Wachstum auf Cetrimid- und R2A Agar war möglich. Keine Pigmente wurden auf King A gebildet und die Fluoreszenz auf King B Agar war Stamm-spezifisch, da nur WS 5069 Pigmente bildete. Proteolyse auf Caseinagar sowie Lipolyse auf Tributyrinagar waren bei beiden Stämmen bei 6 und 28 °C deutlich sichtbar. Die Stärkehydrolyse und β -Hämolyse waren hingegen negativ. Positive Ergebnisse wurden bei Gelatinehydrolyse, Citratmetabolisierung, Voges-Proskauer-Reaktion sowie der Arginin-Dihydrolase gefunden. Die Urease-Reaktion war ebenfalls stammspezifisch und nur bei WS 5096 positiv. Negative Reaktionen zeigten sich bei β -Galactosidase, Lysin-Decarboxylase, Ornithin-Decarboxylase, H₂S-Produktion, Tryptophan-Desaminase sowie Indolproduktion. Im Gegensatz zu den anderen Referenzspezies konnte *P. cremoris* sp. nov. Aesculin hydrolysieren. Säureproduktion wurde aus folgenden Zuckern ermittelt: D-Arabit, D-Cellobiose, D-Fructose, D-Fucose, D-Galactose, D-Glucose, Lactose, D-Lyxose, D-Mannit, D-Mannose, Melibiose, D-Ribose, D-Sorbit, D-Trehalose, D-Xylose, Erythrit, Gentiobiose, Glycerin, Inosit, D-Gluconsäure-Kaliumsalz, L-Arabinose, L-Rhamnose, Methyl- β -D-Xylopyranose, N-Acetylglucosamin und Xylit. Keine Säureproduktion fand aus Amygdalin, Arbutin, D-Adonit, D-Arabinose, Maltose, Melezitose, Raffinose, Sucrose, D-Tagatose, Turanose, Dulcitol, Glycogen, Harnstoff, Inulin, L-Arabit, L-Fucose, L-Sorbose, L-Xylose, Methyl- α -D-Mannosid und Salicin statt.

Tabelle 23 zeigt die differenzierenden Eigenschaften zwischen *P. cremoris* sp. nov. und dessen am nächsten verwandten Typstämmen. Da die Veröffentlichung der Spezies *P. nabeulensis* CECT 9765^T und *P. kairouanensis* CECT 9766^T erst nach Abschluss der dieser Charakterisierungen stattfand, wurden die Daten aus der Primärpublikation zum Vergleich verwendet. Die geringste Anzahl an differenzierenden Merkmalen wurde zu *P. kairouanensis* CECT 9766^T gefunden. Dieser unterschied sich durch die Produktion fluoreszierender Pigmente auf King B Agar, der fehlenden Gelatinehydrolyse sowie der Säureproduktion aus D-Arabinose. Da ein Großteil der Analysen nicht durch die Autoren der Primärpublikation durchgeführt wurden, wird das Vorliegen weiterer Unterschiede vermutet.

Insgesamt wurde durch die vorliegenden Ergebnisse die Hypothese des Vorhandenseins einer neuen Spezies mit *P. cremoris* sp. nov. unterstützt.

Tabelle 23: Eigenschaften, die *P. cremoris* sp. nov. von den Typstämmen der am nächsten verwandten Spezies sowie der Typspezies *P. aeruginosa* unterscheiden

Stämme: 1: *P. cremoris* sp. nov. (WS 5106^T und WS 5096); 2: *P. canadensis* LMG 28499^T; 3: *P. simiae* LMG 28180^T; 4: *P. extremorientalis* LMG 19695^T; 5: *P. lurida* LMG 21995^T; 6: *P. costantini* LMG 22119^T; 7: *P. azotoformans* DSM 18862^T; 8: *P. nabeulensis* CECT 9765^T (Oueslati *et al.*, 2019); 9: *P. kairouanensis* CECT 9766^T (Oueslati *et al.*, 2019); 10: *P. aeruginosa* DSM 50071^T. + positiv; - negativ; NA, nicht messbar; KA, Keine Angabe; * nur der Typstamm WS 5106^T war negativ

Eigenschaft	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Proteolyse auf Caseinagar bei: 28 °C	+	-	+	+	+	+	+	KA	KA	+
6 °C	+	-	+	-	+	+	+	KA	KA	NA
Lipolyse auf Tributyrinagar bei: 6 °C	+	-	+	-	-	+	+	KA	KA	NA
β-Hämolyse auf Tributyrinagar	-	-	-	-	+	-	+	KA	KA	+
Fluoreszierende Pigmente auf King B	-*	+	+	+	+	-	+	+	+	+
Nitratreduktion / Denitrifikation	-/-	-/-	+/-	+/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	+/+
Gelatinehydrolyse	+	-	+	-	+	+	+	-	-	+
Lysin-Decarboxylase	-	-	-	-	+	-	-	KA	KA	-
Ornithin-Decarboxylase	-	-	+	-	-	-	-	KA	KA	-
Urease	-*	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Tryptophan-Desaminase	-	-	-	-	+	+	-	KA	KA	-
Aesculinhydrolyse	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Säureproduktion aus:										
D-Arabinose	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+
L-Xylose	-	-	-	-	-	+	-	KA	KA	+
D-Adonitol	-	+	+	+	+	+	+	KA	KA	-
Methyl-β-D-Xylopyranose	+	+	-	+	-	-	-	KA	KA	-
D-Lactose	+	-	+	+	-	-	+	KA	KA	-
D-Sucrose	-	+	-	+	-	+	+	KA	KA	-
D-Trehalose	+	+	-	+	+	+	+	KA	KA	+
L-Arabit	-	+	+	+	+	+	+	KA	KA	-
Tolerierte pH-Werte	6-8	6-8	6-8	6-8	6-8	6-8	6-8	5-9	5-9	5,5-8
Tolerierte NaCl-Konzentration [% w/v]	0-5	0-6	0-7	0-7	0-6	0-5	0-7	0-6	0-6	0-8
Maximale Wachstumstemperatur [°C]	34	34	37	37	37	32	34	37	37	42
Vorhandensein des <i>aprX-lipA2</i> -Operons	+	+	+	+	+	+	+	KA	KA	+

nach Hofmann *et al.* (2021)

2.4 Chemotaxonomische Analysen

Zur chemotaxonomischen Charakterisierung wurden die respiratorischen Chinone, die Zusammensetzung der polaren Lipide sowie die zellulären Fettsäuren der Typstämmen der drei neuen Spezies ermittelt. Weiterhin wurden die Fettsäureprofile der Referenztypstämmen zum Vergleich jeweils mitbestimmt.

2.4.1 *Pseudomonas saxonica* sp. nov.

Bei den respiratorischen Chinonen wies *P. saxonica* WS 5072^T als Hauptkomponente Q9 mit 94 % auf. Zudem wurden Q8 (5 %) und Spuren von Q7 und Q10 nachgewiesen. Bei den zellulären Fettsäuren des Typstammes WS 5072^T dominierte C16:0 mit 32,2 %, gefolgt von *summed feature* C_{16:1}ω7c/C_{15:0}iso2-OH (27,4 %) und C_{17:0}cyclo (13,2 %). Die relativen Anteile aller Fettsäuren sowie die Zusammensetzung der Referenztypstämme ist in Tabelle 24 gelistet. Die Komposition von *P. saxonica* sp. nov. ähnelte jenen der anderen Spezies. Die Typspezies *P. aeruginosa* hingegen wies als dominante Fettsäure C_{18:0}ω7c mit 42,1 % auf, gefolgt von *summed feature* C_{16:1}ω7c/C_{15:0}iso2-OH und C_{16:0}. Als polare Lipide konnten bei WS 5072^T Phosphatidylethanolamin, Phosphatidylglycerin, Diphosphatidylglycerin und drei verschiedene Lipide nachgewiesen werden (Abbildung 36).

Tabelle 24: Zelluläre Fettsäurezusammensetzung [%] von *P. saxonica* sp. nov. WS 5072^T, den am nächsten verwandten Spezies sowie der Typspezies *P. aeruginosa*

Stämme: 1, *P. saxonica* sp. nov. WS 5072^T; 2, *P. fragi* DSM 3456^T; 3, *P. weihenstephanensis* DSM 29166^T; 4, *P. deceptionensis* DSM 26521^T; 5, *P. psychrophila* DSM 17535^T; 6, *P. taetrolens* DSM 21104^T; 7, *P. lundensis* DSM 6252^T; 8, *P. versuta* LMG 29628^T; 9, *P. aeruginosa* DSM 50071^T. Relative Anteile > 5 % sind fett markiert. TR, Spuren < 1 %; –, unter der Nachweisgrenze.

Fettsäure	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Gesättigt									
C _{10:0}	-	TR	TR	TR	TR	TR	-	TR	TR
C _{12:0}	3,02	4,74	2,5	2,8	4,0	2,2	TR	2,4	2,7
C _{14:0}	TR	TR	TR	1,3	TR	TR	1,2	TR	TR
C _{15:0}	TR	TR	TR	-	TR	TR	TR	TR	TR
C _{16:0}	32,2	33,7	32,8	36,8	32,1	32,3	36,3	35,1	20,0
C _{17:0} iso	-	TR	-	-	-	TR	TR	TR	-
C _{17:0}	TR	TR	TR	-	TR	-	-	TR	TR
C _{18:0}	TR	TR	TR	TR	TR	TR	TR	TR	TR
C _{19:0} iso	-	-	-	TR	-	-	-	-	-
Ungesättigt									
C _{16:1} ω5c	-	TR	TR	-	TR	TR	TR	TR	TR
C _{17:1} ω8c	-	-	-	-	-	-	-	-	TR
C _{18:1} ω5c	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C _{18:1} ω7c	9,7	7,8	8,7	7,2	9,4	8,8	6,7	7,7	42,1
Hydroxy									
C _{10:0} 3-OH	3,06	3,7	3,1	3,6	3,4	4,1	3,3	2,6	3,4
C _{11:0} iso 3-OH	-	TR	TR	-	-	TR	-	-	-
C _{12:0} 2-OH	3,72	3,1	4,6	4,4	3,4	5,2	5,6	4,4	4,7
C _{12:1} 3-OH	-	-	-	-	-	-	-	-	TR
C _{12:0} 3-OH	3,4	3,9	4,1	4,1	3,7	4,3	4,2	4,0	4,2
Cyclopropan									
C _{17:0} cyclo	13,2	12,5	4,4	13,6	6,6	8,5	1,7	12,8	TR
C _{19:0} cyclo ω8c	3,0	TR	TR	TR	-	TR	TR	1,4	TR
Summed features									
C _{15:1} iso I/H/C _{13:0} 3-OH	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C _{16:1} ω7c/C _{15:0} iso 2-OH	27,4	27,7	38,1	25,2	35,8	32,9	39,3	28,0	20,3
Methyliert									
11-methyl C _{18:1} ω7c	-	-	-	-	-	-	-	-	-

nach Hofmann et al. (2020b)

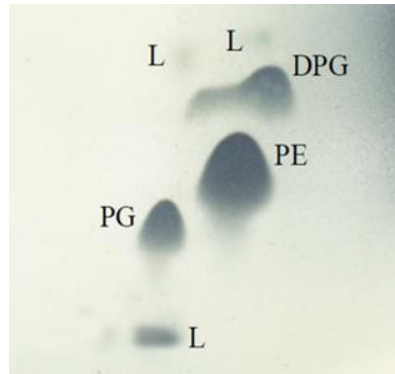


Abbildung 36: Polare Lipide von *P. saxonica* WS 5072^T

Zweidimensionale Dünnschichtchromatographie der polaren Lipide von *P. saxonica* WS 5072^T. DPG, Diphosphatidylglycerin; PG, Phosphatidylglycerin; PE, Phosphatidylethanolamin; L, Lipid. (Hofmann *et al.*, 2020b)

2.4.2 *Pseudomonas haemolytica* sp. nov.

Die respiratorischen Chinone bei WS 5063^T waren mit einem Anteil von 90 % dominiert von Q9, gefolgt von 9 % Q8 und Spuren von Q10. Die dominanten zellulären Fettsäuren waren analog zu *P. saxonica* sp. nov. C_{16:0} (31,1 %), *summed feature* C_{16:1}ω7c/C_{15:0} iso 2-OH (28,3 %) und C_{18:1}ω7c (15,9 %). Auch hier war die Fettsäurekomposition vergleichbar zu den Referenztypstämmen, mit Ausnahme von *P. aeruginosa* DSM 50071^T (Tabelle 25). Der Nachweis der polaren Lipide ergab Phosphatidylethanolamin, Phosphatidylglycerin, Diphosphatidylglycerin, ein Phospholipid und vier verschiedene Lipide (Abbildung 37).

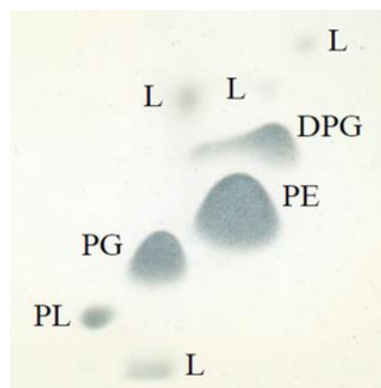


Abbildung 37: Polare Lipide von *P. haemolytica* WS 5063^T

Zweidimensionale Dünnschichtchromatographie der polaren Lipide von *P. haemolytica* WS 5063^T. DPG, Diphosphatidylglycerin; PG, Phosphatidylglycerin; PE, Phosphatidylethanolamin; PL, Phospholipid; L, Lipid. (Hofmann *et al.*, 2020a)

Tabelle 25: Zelluläre Fettsäurezusammensetzung [%] von *P. haemolytica* sp. nov. WS 5063^T, den am nächsten verwandten Spezies sowie der Typspezies *P. aeruginosa*

Stämme: 1: *P. haemolytica* sp. nov. WS 5063^T; 2: *P. synxantha* DSM 18928^T; 3: *P. libanensis* DSM 17149^T; 4: *P. lactis* DSM 29167^T; 5: *P. fluorescens* DSM 50090^T; 6: *P. paralactis* DSM 29164^T; 7: *P. canadensis* LMG 28499^T; 8: *P. poae* DSM 14936^T; 9: *P. aeruginosa* DSM 50071^T. Relative Anteile > 5 % sind fett markiert. TR, Spuren < 1 %; –, unter der Nachweisgrenze.

Fettsäure	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Gesättigt									
C _{10:0}	TR	3,3	TR	TR	TR	TR	TR	TR	TR
C _{12:0}	1,9	2,1	2,3	2,0	2,6	2,5	3,2	2,3	2,7
C _{14:0}	TR	TR	TR	TR	TR	TR	TR	TR	TR
C _{15:0}	TR	-	TR	TR	-	-	TR	-	TR
C _{16:0}	31,1	30,4	32,8	32,2	32,9	33,2	30,4	29,6	20,0
C _{17:0} iso	TR	-	-	-	-	TR	-	-	-
C _{17:0}	TR	-	TR	-	-	TR	TR	TR	TR
C _{18:0}	TR	TR	TR	TR	TR	TR	TR	TR	TR
C _{19:0} iso	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ungesättigt									
C _{16:1} ω5c	TR	-	-	-	TR	-	TR	TR	TR
C _{17:1} ω8c	TR	-	-	-	-	-	-	-	TR
C _{18:1} ω5c	TR	-	-	-	-	-	-	-	-
C _{18:1} ω7c	15,9	20,7	11,4	12,6	16,0	12,8	14,5	16,9	42,1
Hydroxy									
C _{10:0} 3-OH	2,4	-	3,7	2,9	3,1	3,4	3,2	2,7	3,4
C _{11:0} iso 3-OH	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C _{12:0} 2-OH	4,7	4,7	5,0	5,1	4,2	4,4	4,5	4,9	4,7
C _{12:1} 3-OH	-	TR	-	-	-	TR	-	-	TR
C _{12:0} 3-OH	4,1	4,3	4,4	4,2	3,6	4,6	4,1	3,9	4,2
Cyclopropan									
C _{17:0} cyclo	9,0	5,0	10,6	8,2	4,6	6,8	6,2	1,3	TR
C _{19:0} cyclo ω8c	TR	TR	1,7	TR	TR	TR	TR	-	TR
Summed features									
C _{15:1} iso I/H/C _{13:0} 3-OH	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C _{16:1} ω7c/C _{15:0} iso 2-OH	28,3	27,4	26,6	30,7	31,6	30,1	32,5	37,1	20,3
Methyliert									
11-methyl C _{18:1} ω7c	-	-	TR	-	TR	-	-	-	-

nach Hofmann et al. (2020a)

2.4.3 Pseudomonas cremoris sp. nov.

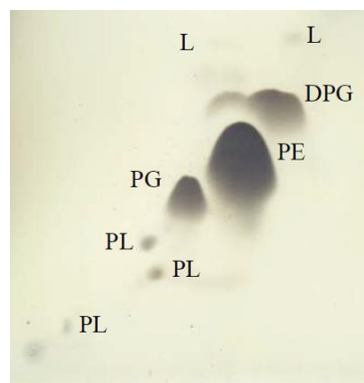
Vergleichbar zu den anderen beiden charakterisierten Spezies wies *P. cremoris* WS 5106^T als dominantes respiratorisches Chinon Q9 mit 90,5 % auf, gefolgt von 9 % Q8 und Spuren von Q7 und Q10. Die Komposition der zellulären Fettsäuren von *P. cremoris* WS 5106^T und den Referenztypstämmen ist in Tabelle 26 gezeigt. Neben C_{16:0} (32,7 %), *summed feature* C_{16:1}ω7c/C_{15:0} iso 2-OH (21,5 %) und C_{18:1}ω7c (12,5 %) konnte noch C_{17:0}cyclo mit 16,1 % in größeren Anteilen nachgewiesen werden. Die polaren Lipide setzten sich aus Phosphatidylethanolamin, Phosphatidylglycerin, Diphosphatidylglycerin, drei Phospholipiden und zwei Lipiden zusammen (Abbildung 38).

Tabelle 26: Zelluläre Fettsäurezusammensetzung [%] von *P. cremoris* sp. nov. WS 5106^T, den nächsten verwandten Spezies sowie der Typspezies *P. aeruginosa*

Stämme: 1: *P. cremoris* sp. nov. WS 5106^T; 2: *P. canadensis* LMG 28499^T; 3: *P. simiae* LMG 28180^T; 4: *P. extremorientalis* LMG 19695^T; 5: *P. lurida* LMG 21995^T; 6: *P. constantinii* LMG 22119^T; 7: *P. azotoformans* DSM 18862^T; 8: *P. aeruginosa* DSM 50071^T. Relative Anteile > 5 % sind fett markiert. TR, Spuren < 1 %; –, unter der Nachweisgrenze.

Fettsäure	1	2	3	4	5	6	7	8
Gesättigt								
C _{10:0}	TR	TR	TR	TR	TR	TR	TR	TR
C _{12:0}	2,9	3,2	2,6	3,2	3,6	1,6	2,9	2,9
C _{14:0}	TR	TR	TR	TR	TR	TR	TR	TR
C _{15:0}	TR	TR	TR	TR	TR	TR	TR	TR
C _{16:0}	32,7	30,2	31,2	31,7	30,4	34,7	30,9	20,9
C _{17:0iso}	TR	-	TR	-	-	TR	TR	-
C _{17:0}	TR	TR	TR	TR	TR	TR	TR	TR
C _{18:0}	TR	TR	TR	TR	TR	TR	TR	TR
C _{19:0iso}	-	-	-	-	-	TR	TR	-
Ungesättigt								
C _{16:1ω5c}	-	TR	TR	TR	TR	TR	TR	TR
C _{17:1ω8c}	TR	-	-	-	-	-	TR	TR
C _{18:1ω5c}	-	-	-	-	-	-	-	-
C _{18:1ω7c}	12,5	15,8	13,9	15,2	16,2	12,4	14,7	42,0
Hydroxy								
C _{10:0} 3-OH	3,1	3,1	3,1	3,6	3,3	2,9	2,9	2,8
C _{11:0iso} 3-OH	TR	-	-	-	-	-	-	-
C _{12:0} 2-OH	4,0	4,1	4,6	4,0	3,9	4,8	3,8	4,7
C _{12:1} 3-OH	-	-	-	-	-	TR	-	-
C _{12:0} 3-OH	3,7	4,0	4,1	4,2	4,1	4,1	3,6	4,2
Cyclopropan								
C _{17:0cyclo}	16,1	7,8	5,2	6,7	4,3	4,3	11,3	TR
C _{19:0cyclo ω8c}	TR	TR	TR	TR	-	-	TR	TR
Summed features								
C _{15:1 iso} I/H/C _{13:0} 3-OH	-	-	-	-	-	-	-	-
C _{16:1ω7c} /C _{15:0 iso} 2-OH	21,5	30,0	32,9	29,5	32,7	32,6	26,7	19,8
Methyliert								
11-methyl C _{18:1ω7c}	-	TR	TR	TR	TR	-	TR	-

nach Hofmann et al. (2021)

**Abbildung 38: Polare Lipide von *P. cremoris* WS 5106^T**

Zweidimensionale Dünnschichtchromatographie der polaren Lipide von *P. cremoris* WS 5106^T. DPG, Diphosphatidylglycerin; PG, Phosphatidylglycerin; PE, Phosphatidylethanolamin; PL, Phospholipid; L, Lipid. (Hofmann et al., 2021)

Diskussion

1 *Pseudomonas* in Rohmilch deutscher Erzeugerbetriebe

Aufgrund der starken Produktion von proteolytischen Enzymen gilt *Pseudomonas* als Hauptverursacher des enzymatischen Verderbs von haltbaren Milchprodukten. Geringere Proteasemengen im Endprodukt können wegen der hohen Hitzeresistenz des Enzyms nur durch einen reduzierten Eintrag von *Pseudomonas* in die Rohmilch sowie durch eine Hemmung des Wachstums dieser Gattung während der Lagerung erreicht werden (s. Einleitung 3.2). Aus diesem Grund sollten im Rahmen der vorliegenden Arbeit mögliche Einflussfaktoren auf die *Pseudomonas*-Belastung in deutscher Rohmilch analysiert, sowie Eintrittsrouten identifiziert werden, um Handlungsempfehlungen zur Senkung der *Pseudomonas*-Belastung ableiten zu können.

1.1 Vergleich verschiedener *Pseudomonas*-spezifischer Quantifizierungsmethoden

Wegen des hohen Aufwandes an Material und Zeit wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Alternative zur klassischen Kultivierung von *Pseudomonas* auf CFC-Agar gesucht (Quigley *et al.*, 2013a). Mit den 16S rRNA Sequenzierdaten lagen die relativen Anteile an *Pseudomonas* pro Probe vor. Durch Multiplikation mit der per Durchflusszytometrie bestimmten Gesamtkeimzahl der Probe konnte die absolute *Pseudomonas*-Keimzahl berechnet werden. Als weitere Möglichkeit wurde ein Spezies-spezifischer qPCR-Assay verwendet, der auf den kultivierten *Pseudomonas*-Keimzahlen basierte. Hierzu wurde dieselbe DNA verwendet, die zum Zweck der 16S rRNA Sequenzierung aus den Milchproben isoliert wurde. Bei Vergleich dieser Methoden war auffällig, dass die aus den Mikrobiomdaten berechneten *Pseudomonas*-Keimzahlen signifikant niedriger als die plattierten oder per qPCR-Assay gemessenen Werte waren (Abbildung 10).

Eine mögliche Ursache könnte die mangelnde Selektivität des CFC-Agars zur kulturellen Quantifizierung sein. Untersuchungen an unserem Institut konnten zeigen, dass auf diesem, neben *Pseudomonas*, noch weitere Gattungen wie beispielsweise Enterobakterien wachsen können (unpublizierte Daten). Weiterhin wurden Aliquots der Rohmilch vor der durchflusszytometrischen Messung aus Praxisgründen eingefroren und gesammelt an das MRI in Kiel verschickt. Dies könnte zu einer Zerstörung intakter Zellen und somit zu niedrigeren Gesamtkeimzahlen führen, was in geringeren berechneten absoluten Keimzahlen aus den Mikrobiomdaten resultiert. Insbesondere Gram-negative Gattungen können abhängig vom Medium empfindlich auf Einfrieren und Auftauen reagieren (Archer, 2004). Zudem könnten

Abweichungen in der Bindesequenz der universellen 16S-Primer zu einer verringerten Amplifikationseffizienz und somit zu einer Unterschätzung der relativen Anteile im Mikrobiom führen (Breitenwieser *et al.*, 2020). Jedoch konnte dies durch einen Abgleich der Primersequenz mit den Bindesequenzen verschiedener *Pseudomonas*-Spezies ausgeschlossen werden (Daten nicht gezeigt).

Als entscheidender Faktor wird die Methodik zur absoluten Quantifizierung von relativen Mikrobiomdaten vermutet. In der Literatur existierten zum Zeitpunkt der Analysen unterschiedliche Ansätze hierzu, jedoch keine einheitlichen Empfehlungen (Galazzo *et al.*, 2020; Jian *et al.*, 2020; Vandeputte *et al.*, 2017). Als Gemeinsamkeit hatten die Methoden eine Korrektur der Anzahl von 16S rRNA Sequenzkopien je Gattung, allerdings mit unterschiedlichen Vorgehensweisen. Vandeputte *et al.* (2017) analysierten das Mikrobiom aus 16 Stuhlproben quantitativ, indem zunächst ein *copy corrected profile* je Probe erstellt wurde. Hierzu wurde die *Read*-Zahl je Gattung mithilfe der entsprechenden durchschnittlichen 16S rRNA Kopienzahl korrigiert, sodass ein *Read* einer einzelnen Bakterienzelle entsprach. In einem weiteren Schritt wurde das korrigierte *Read*-Profil durch die per Durchflusszytometrie bestimmte Gesamtkeimzahl pro Probe dividiert, um die *sampling depth* zu erhalten. Schließlich wurden alle Proben auf die niedrigste *sampling depth* des Probensets normalisiert, was der Anpassung auf eine einheitliche *Read*-Zahl bei den relativen Vorgehensweisen entspricht. Bei Jian *et al.* (2020) wurden die Gesamtkeimzahlen von 114 Stuhlproben per qPCR ermittelt. Die absolute Abundanz je Gattung wurde durch Multiplikation der relativen Anteile mit der Gesamtkeimzahl ermittelt. Erst nachträglich wurden die absoluten Zellzahlen durch die 16S rRNA Kopienzahlen je Gattung dividiert. Galazzo *et al.* (2020) verglichen verschiedene Methoden zur quantitativen Mikrobiomanalyse und konnte hierbei hohe Differenzen feststellen. Beispielsweise unterschieden sich die Ergebnisse durch die Wahl der Methode zur Quantifizierung der Gesamtkeimzahl (qPCR und Durchflusszytometrie). Letztendlich konnten Starke *et al.* (2021) anhand von Analysen mit sog. *Mock-communities*, was einem Set an verschiedenen mikrobiellen Taxa oder DNA mit definierter Zusammensetzung entspricht, zeigen, dass eine Korrektur der 16S rRNA Kopienzahl zu keiner Verbesserung der quantitativen Mikrobiomanalysen führte. Als problematisch wurde hierbei die variierende Anzahl an 16S rRNA Gensequenzen innerhalb der gleichen Gattung angesehen sowie der Einfluss von Pseudogen-Bildung oder horizontalen Gentransfer.

Aufgrund der fehlenden einheitlichen Vorgehensweise zur Korrektur der Mikrobiomdaten auf die 16S rRNA Kopienzahlen, der aktuell bestehenden Schwächen dieser Methodik sowie der Problematik der stark variierenden Kopienzahl des 16S rRNA Gens bei *Pseudomonas*

(zwischen 1 und 9 (Stoddard *et al.*, 2015)) wurde in dieser Arbeit auf eine Anpassung verzichtet. Es wird jedoch vermutet, dass dies eine bedeutende Ursache für die Diskrepanz zu den per qPCR oder Kultivierung ermittelten Keimzahlen darstellen könnte. Stattdessen wurde die bereits etablierte Gattungsspezifische qPCR verwendet (Maier *et al.*, 2021). Diese Methode wird auch für andere Gattungen in Rohmilch verwendet, wie beispielsweise in einem Multiplex-Ansatz zur Detektion von *Escherichia*, *Salmonella* und *Listeria* (Amagliani *et al.*, 2012). Als Vorteile der qPCR wurden in dieser Studie die hohe Sensitivität sowie die schnelle und benutzerfreundliche Durchführung hervorgehoben.

Generell können, wie bereits für die Berechnung absoluter Keimzahlen aus Mikrobiomdaten erwähnt, Differenzen in der Methodik zu unterschiedlichen Ergebnissen zwischen verschiedenen Studien führen. Beispielsweise wurden in dieser Arbeit die Milchproben mit Azidiol konserviert, um die Qualität der Rohmilch zum Zeitpunkt der Abholung beim Erzeuger durch den Sammelwagen abzubilden. In Voruntersuchungen unseres Institutes mit inokulierten Rohmilchproben bekannter Keimzahlen wurden hierzu diverse Konservierungsmittel in unterschiedlichen Konzentrationen getestet. Azidiol in jener Menge, wie sie routinemäßig von den Molkereien verwendet wird, zeigte hierbei die beste Abbildung der tatsächlichen Gesamt- und *Pseudomonas*-Keimzahl, auch nach einer Lagerung von bis zu vier Tagen (Daten nicht gezeigt). Dies wird durch Untersuchungen von Ouamba *et al.* (2020) unterstützt, die zeigen konnten, dass Azidiol das Rohmilchmikrobiom bis zu 10 Tage lang und besser als andere Reagenzien konserviert. Viele Studien, auf die in dieser Arbeit verwiesen wird, verwendeten kein Konservierungsmittel und ein weiteres Wachstum der psychrotoleranten Gattungen während des gekühlten Transports und eventueller Lagerung bis zur Probenaufarbeitung könnte zu höheren Keimzahlen von beispielsweise *Pseudomonas* geführt haben. Ein umfassender Überblick zu Arbeiten, die das Rohmilchmikrobiom fokussieren, wurde von Parente *et al.* (2020) erstellt. Unterschiede lagen u.a. bei Hofmanagement, Probenahme, Probenanzahl oder DNA-Extraktion vor. Mehrere Studien sowie Analysen an unserem Institut konnten zeigen, dass verschiedene DNA-Extraktionskits zu Unterschieden in der mikrobiellen Zusammensetzung führen können, beispielsweise durch Differenzen in der Lyseeffizienz von Gram-positiven Gattungen (Breitenwieser *et al.*, 2020; Siebert *et al.*, 2021). Weiterhin unterscheiden sich die Methoden zur selektiven Quantifizierung einzelner Spezies sowie zur Analyse der Zusammensetzung der Rohmilch. Letzteres kann durch 16S rRNA Amplikonsequenzierung, *Shotgun-Sequencing*, Erstellung von 16S Klon-Bibliotheken oder klassische Kultivierung erfolgen (Hahne *et al.*, 2019; Marchand *et al.*, 2009a; Parente *et al.*, 2020). Auch innerhalb einer Methodik können beispielsweise bei der 16S rRNA Amplikonsequenzierung durch die Wahl der variablen Zielregionen im 16S rRNA Gen oder der

Zykluszahl in der biphasischen PCR Diskrepanzen entstehen (Parente *et al.*, 2020; Siebert *et al.*, 2021). Nach dem Sequenzieren kann die Verwendung unterschiedlicher Datenbanken zum Sequenzabgleich oder Programme zur Datenauswertung zu Differenzen in den Ergebnissen führen. Dies erschwert direkte Vergleiche zu anderen Studien und könnte konträre Aussagen möglicherweise erklären. Daher ist die Etablierung einheitlicher Richtlinien für diesen Zweck erstrebenswert (Parente *et al.*, 2020).

1.2 Prävalenz von *Pseudomonas* in Rohmilch von deutschen Erzeugerbetrieben

Zur Analyse der Prävalenz von *Pseudomonas* in deutscher Rohmilch wurden bei 444 Rohmilchproben aus den Hofsammlertanks von 122 Höfen die *Pseudomonas*- und Gesamtkeimzahlen ermittelt (Abbildung 11). Letztere wurden per Durchflusssytometrie gemessen, wobei auf eine Umrechnung auf plattierte KbE-Werte verzichtet wurde, um auch nicht-kultivierbare Gattungen zu erfassen. Aus diesem Grund sind die in dieser Arbeit gezeigten Gesamtkeimzahlen mit einem Mittelwert von $\log 5,14 \text{ Zellen} \cdot \text{ml}^{-1}$ höher als die in der Literatur berichteten per Kultivierung ($\log 3,6 - \log 4,1 \text{ KbE} \cdot \text{ml}^{-1}$ (Bava *et al.*, 2011; Fricker *et al.*, 2011; Mallet *et al.*, 2012; O'Connell *et al.*, 2016)) oder Durchflusssytometrie mit Umrechnung auf KbE ($\log 4,3 \text{ KbE} \cdot \text{ml}^{-1}$ (Skeie *et al.*, 2019)) ermittelten Werte.

Die schiefe Verteilung der *Pseudomonas*-Keimzahlen zeigte, dass ein Großteil der Rohmilchproben aus Hofsammlertanks mit $< \log 3 \text{ Zellen} \cdot \text{ml}^{-1}$ nur gering mit dieser Gattung belastet war. Allerdings wiesen die oberen 20 % der Proben Keimzahlen von bis zu $\log 7,7 \text{ Zellen} \cdot \text{ml}^{-1}$ auf. Dies deckt sich nicht mit der in der Literatur berichteten Dominanz gekühlt gelagerter Rohmilch mit *Pseudomonas* (De Jonghe *et al.*, 2011; Hahne *et al.*, 2019; Porcellato *et al.*, 2021; von Neubeck *et al.*, 2015). In der Studie von Neubeck *et al.* (2015) wurde in 20 Rohmilchproben *Pseudomonas* mit 25 % der Isolate als vorherrschende Gattung identifiziert. Die Proben wurden jedoch nicht konserviert und waren 3-4 Tage alt, wohingegen die meisten Proben in der vorliegenden Arbeit nach einem Abholungsintervall von 2 Tagen konserviert wurden, was die Diskrepanz zu den Daten der vorliegenden Arbeit erklären könnte. Weiterhin unterscheiden sich die Vorgehensweisen zur Ermittlung der *Pseudomonas*-Prävalenz. Hahne *et al.* (2019) ermittelten beispielsweise die Diversität der Rohmilchproben anhand Kultivierung und Identifizierung verschiedener Kolonimorphotypen per 16S rRNA Gen Klon-Bibliotheken. Arbeiten von De Jonghe *et al.*, (2011) weisen darauf hin, dass die Lagertemperatur in den Hofsammlertanks Einfluss auf die *Pseudomonas*-Keimzahlen in der Rohmilch hat. Hier hatten Milchproben, die drei Tage bei einer suboptimalen Temperatur von 6 °C gelagert wurden, mit $\log 4,5 - \log 5,5 \text{ KbE} \cdot \text{ml}^{-1}$ mehr Pseudomonaden als Proben mit einer optimalen Lagertemperatur von 3,5 °C ($\log 3,5 - 4,5 \text{ KbE} \cdot \text{ml}^{-1}$). Die Lagerungstemperatur wurde in der

vorliegenden Arbeit nicht ermittelt. Insgesamt ist eine systematische selektive Erfassung von der *Pseudomonas*-Keimzahl in Hofsammlertankproben in bisherigen Arbeiten nicht erfolgt, was einen direkten Vergleich erschwert. Allerdings weisen die sporadisch stark belasteten Rohmilchproben in der vorliegenden Arbeit auf das bestehende Problem des proteolytischen Verderbs von Milchprodukten durch *Pseudomonas* hin. Die Zuordnung der Proben zu den einzelnen Erzeugern ergab bei 8,2 % der Höfe eine Belastung mit *Pseudomonas* über dem definierten Grenzwert für auffällige Proben von $\log 3,82 \text{ Zellen} \cdot \text{ml}^{-1}$ für drei Quartalsproben. Demgegenüber wiesen 55,7 % der Höfe für alle Proben Belastungen unter dem Grenzwert auf. Dies indiziert das Vorliegen von Höfen, deren Management wiederholt zu hohen *Pseudomonas*-Konzentrationen führt.

Die Analyse des Rohmilchmikrobioms der Proben ergab für die relative *Pseudomonas*-Belastung ein vergleichbares Bild zu den absoluten Keimzahlen, da ein Großteil der Proben nur geringe Anteile $< 5 \%$ aufwies, jedoch Prävalenzen von bis zu 96 % detektiert wurden (Abbildung 13). Im Durchschnitt wiesen die Proben 5,5 % *Pseudomonas* auf, was den Ergebnissen von McHugh *et al.* (2020) ähnelt, in deren Studie bei 67 Hofsammlertankproben im Mittel 6,6 % dieser Gattung detektiert wurde. Konträr hierzu stehen die Ergebnisse der Mikrobiomanalysen von Porcellato *et al.* (2021), welche die Zusammensetzung der Rohmilch von fünf Höfen ermittelten, die über sieben Monate hinweg wöchentlich beprobt wurden. Hier wurde *Pseudomonas* mit 27 % als dominante Gattung identifiziert. Bei Zuordnung der Proben der vorliegenden Arbeit zu den Erzeugerbetrieben konnten drei häufig vorkommende mikrobielle Profile identifiziert werden (Abbildung 14). Rohmilch von Höfen mit einem stabilen Mikrobiom war dominiert von Gram-Positiven wie beispielsweise *Corynebacterium* (Profil 1). Zudem war die Gattungsverteilung zwischen einem Großteil dieser Betriebe vergleichbar. Dieses mikrobielle Profil könnte die „gesunde“ Rohmilchmikrobiota ohne Kontaminationen mit unerwünschten Gattungen darstellen. Demgegenüber standen Höfe mit variierender Zusammensetzung zwischen den einzelnen Quartalsproben und höheren durchschnittlichen Gesamtkeimzahlen. Hierbei konnte zwischen Höfen ohne (Profil 2) und mit sporadisch hohen *Pseudomonas*-Keimzahlen (Profil 3) unterschieden werden. Diese Daten unterstützen die Hypothese, dass Höfe existieren, deren Management zu einem erhöhten Eintrag bzw. Wachstum von unerwünschten Bakterien wie *Pseudomonas* oder *Acinetobacter* führt. Die gelegentlichen hohen Anteile an *Streptococcus* bei Profil 2 und 3 weisen auf Mastitis-Fälle in der Herde hin, da manche Spezies dieser Gattung Euterentzündungen hervorrufen können (Oikonomou *et al.*, 2012; Ruegg, 2017). In den Untersuchungen von Porcellato *et al.* (2021) wurden neben den wöchentlichen Beprobungen von fünf Höfen zusätzlich die Rohmilch von 37 Höfen im Abstand von zwei Jahren beprobt. Auch hier konnte eine stabile, Hof-spezifische

Mikrobiota festgestellt werden. Kurzfristige Änderungen wurden durch erhöhte Anteile von *Streptococcus* und *Staphylococcus* auf Mastitisfälle zurückgeführt. Langfristige Verschiebungen waren vor allem mit den Faktoren Wetter und Fütterung und weniger mit Melksystem, Herdengröße und Milchqualität assoziiert. Verdier-Metz *et al.* (2009) analysierten das Rohmilchmikrobiom von Höfen mit unterschiedlichem Hygienemanagement. Hierbei war Rohmilch von Höfen mit mangelhaften Standards dominiert von Gram-Negativen und Milchsäurebakterien wie *Lactococcus*, *Brevibacterium* und *Leuconostoc*. *Lactococcus* und Gram-Negative wie *Acinetobacter* und *Pseudomonas* wurden auch in vorliegender Arbeit in hohen Konzentrationen bei Profil 2 und 3 gefunden, jedoch nicht *Brevibacterium* und *Leuconostoc*. Das von Gram-positiven Gattungen dominierte Profil 1 ähnelt jenem, dass in genannter Studie mit hohen Hygienestandards assoziiert war und durch Gram-positive, nicht-Milchsäurebakterien mit hohen Anteilen an *Corynebacterium* charakterisiert wurde (Verdier-Metz *et al.*, 2009). Insgesamt bestärken diese Daten die Hypothese von hofspezifischen Faktoren, die zu hohen *Pseudomonas*-Belastungen in der Rohmilch führen können. Es wird jedoch darauf hingewiesen, dass die drei identifizierten, häufig vorkommenden mikrobiellen Profile nicht die gesamte Diversität der hof-spezifischen Rohmilchmikrobiota abdeckt.

Obwohl keine relevanten Korrelationen zwischen *Pseudomonas* und anderen Gattungen errechnet werden konnten, ergaben die Analysen signifikante negative Trends zu Gram-positiven Gattungen wie *Clostridium* Cluster XI oder *Turicibacter* (Abbildung 16). Dies könnte durch die Veränderung der mikrobiellen Zusammensetzung der Rohmilch während der gekühlten Lagerung erklärt werden, bei der sich die von Gram-Positiven dominierte Flora hin zu psychrotoleranten Gram-Negativen verschiebt (Martins *et al.*, 2006). Weiterhin könnte dies mit den drei verschiedenen mikrobiellen Profilen assoziiert sein, da die hohen *Pseudomonas*-Konzentrationen in Profil 3 nicht mit dem von Gram-positiven Gattungen dominierten Profil 1 assoziiert waren.

1.3 Einflussfaktoren auf die *Pseudomonas*-Belastung der Rohmilch

Zur Analyse hofseitiger Einflussfaktoren auf die *Pseudomonas*-Keimzahl wurden die per Fragebogen ermittelten Hof-spezifischen Charakteristiken mit den *Pseudomonas*- und Gesamtkeimzahlen korreliert. Die Tatsache, dass eine verlängerte Rohmilchstapelung zu einem Wachstum der psychrotoleranten Pseudomonaden führt, wurde in vielen Studien demonstriert (De Jonghe *et al.*, 2011; Machado *et al.*, 2017; Vithanage *et al.*, 2016). De Jonghe *et al.* (2011) simulierten den ersten Teil der Produktionskette von Milchprodukten von der Lagerung am Hof bis zur Prozessierung in der Molkerei. Hierbei lagerte die Rohmilch insgesamt fünfeinhalb Tage bei 10 °C, was zu einem kontinuierlichen Anstieg der

Pseudomonas-Keimzahlen von bis zu sechs Log-Stufen führte. Ein Wachstum von vier Log-Stufen fand hierbei bereits während der viertägigen gekühlten Lagerung im Hofsammeltank statt. Auch in der vorliegenden Arbeit konnten signifikant höhere *Pseudomonas*-Keimzahlen bei zweitägiger im Vergleich zur täglichen Abholung ermittelt werden. Bei dreitägiger Abholung waren keine signifikanten Unterschiede sichtbar (Abbildung 17). Dies könnte zum einen an der geringeren Probenanzahl liegen (1 Tag, n = 70; 2 Tage, n = 347; 3 Tage, n = 27), da dieses lange Abholungsintervall mittlerweile in Deutschland unüblich ist. Zum anderen werden nach Verordnung (EG) Nr. 853/2004 niedrigere Lagerungstemperaturen bei längeren Abholungsintervallen vorgeschrieben, was in einem verlangsamten Wachstum dieser Gattung resultiert. Auch könnte hypothesiert werden, dass die Erzeuger sensibilisiert für das mikrobielle Wachstum während verlängerter Rohmilchstapelung sind und die Hygienemaßnahmen entsprechend sorgfältig umsetzen, um Keimzahlen über dem tolerierten Grenzwert zu vermeiden. Da für die Gesamtkeimzahlen keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Abholungsintervallen vorlagen, ist es naheliegend, dass die Dauer der gekühlten Lagerung ein Faktor ist, der exklusiv *Pseudomonas* und vermutlich andere psychrotolerante Gattungen beeinflusst. Zu einem ähnlichen Fazit kam eine Studie von O'Connell *et al.* (2016), bei der sich die Gesamtkeimzahl von Rohmilchproben über eine Lagerdauer von vier Tagen nicht wesentlich veränderte, es jedoch zu einem signifikanten Anstieg psychrotoleranter Bakterien kam. Interessanterweise wiesen 10 % der Proben in der vorliegenden Arbeit trotz täglicher Abholung Keimzahlen über dem Grenzwert für *Pseudomonas*-auffällige Rohmilch auf. Dies unterstützt die Hypothese, dass die *Pseudomonas*-Belastung neben der Stapeldauer der Rohmilch noch durch weitere Kriterien beeinflusst wird.

Als Hof-unspezifischer Faktor wurde die Jahreszeit der Probenahme analysiert (Abbildung 18A). Die niedrigsten *Pseudomonas*-Keimzahlen wurden in den Sommermonaten gefunden. Bei den Gesamtkeimzahlen wurde hingegen ein kontinuierlicher Anstieg von den Frühlings- hin zu den Winterproben festgestellt. Als möglicher Grund könnte das Überwachen von psychrotoleranten Gattungen wie *Pseudomonas* durch mesophile Arten bei den wärmeren Temperaturen im Sommer sein. Die kältetoleranten Arten hingegen könnten einen Wachstumsvorteil im Winter haben. Weiterhin wäre es denkbar, dass im Sommer andere Hygienepraktiken zum Einsatz kommen, um ein erhöhtes Keimwachstum bei warmen Temperaturen zu vermeiden. Bisher existieren keine Analysen des Einflusses der Jahreszeit oder des Klimas auf die *Pseudomonas*-Keimzahlen in Rohmilch für Deutschland. Allerdings konnten Studien aus China und Norwegen zeigen, dass höhere *Pseudomonas*-Konzentrationen mit niedrigeren Umgebungstemperaturen assoziiert sind (Li *et al.*, 2018;

Porcellato *et al.*, 2018). Eine israelische Studie berichtete eine Dominanz von Gammaproteobakterien in den Winter- und Frühlingsmonaten (Hantsis-Zacharov & Halpern, 2007). Übereinstimmend dazu fanden Vithanage *et al.* (2016) erhöhte mesophile Keimzahlen in australischer Rohmilch aus Hofsammeltanks im Sommer, während im Winter psychrotolerante Gattungen dominierten. Auch Marchand *et al.* (2009a) konnten deutlich höhere proteolytische psychrotolerante Keimzahlen in Rohmilch in Winter- im Vergleich zu Sommerproben feststellen. Zudem wiesen die Winter-Isolate ein signifikant höheres Verderbspotential auf. In einer Studie aus Frankreich hingegen konnte kein Einfluss der Jahreszeit auf *Pseudomonas*-Keimzahlen in Rohmilch festgestellt werden (Leriche & Fayolle, 2012).

Die signifikant geringeren *Pseudomonas*- und Gesamtkeimzahlen bei den ökologisch im Vergleich zu den konventionell produzierten Rohmilchproben könnten durch die Unterschiede in der Haltungform erklärt werden (Abbildung 18B). Dort zeigten sich niedrigere *Pseudomonas*- und Gesamtkeimzahlen, wenn die Möglichkeit des Weidegangs oder eines Auslaufs gegeben war (Abbildung 18C). Bei den analysierten ökologischen Betrieben ermöglichten 94,4 % ihren Kühen Auslauf oder Weidegang, wohingegen dies nur bei 11,6 % der konventionellen Betriebe der Fall war. Auch in weiteren Studien konnten Unterschiede im Rohmilchmikrobiom festgestellt werden, deren Ursache ebenfalls in einer Kombination mit unterschiedlichen Managementfaktoren wie Futter oder Tierhaltung vermutet wurde (Coorevits *et al.*, 2010; Gomes *et al.*, 2020). Insgesamt war in der vorliegenden Arbeit die Tierhaltung der einzige Faktor, der eine moderate statt kleine Effektstärke aufwies und wird deshalb als am einflussreichsten auf die *Pseudomonas*-Keimzahl angesehen. In einer italienischen Studie von Carafa *et al.* (2020) wurden Unterschiede im Rohmilchmikrobiom zwischen Kühen, die ganzjährig im Stall gehalten wurden und jenen, die im Sommer auf alpine Weiden getrieben wurden, untersucht. Das anfänglich vergleichbare Mikrobiom änderte sich bei den Weidetieren durch einen Anstieg zahlreicher Gattungen wie *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* und *Propionibacterium*. Lediglich bei *Pseudomonas* wurde eine signifikante Reduktion festgestellt. Die Differenzen im Rohmilchmikrobiom verschwanden nach Rückkehr der Weidekühe in den Stall. Als mögliche Ursache hierfür wurde die drastische Umstellung der Haltungsbedingungen vermutet, die in Veränderungen des Futterangebotes, der Umgebung sowie einem Anstieg an physischer Aktivität resultierte. Insbesondere der Kontakt des Euters zu Gras, Erde und Kot könnte Einfluss auf das Euter- und damit auf das Rohmilchmikrobiom haben. In einer weiteren Studie wurden ebenfalls Einflüsse der Haltungform auf das Rohmilchmikrobiom berichtet, jedoch in Abhängigkeit von der Euterhygiene. Bei Vergleich von Rohmilchproben ohne Euterbehandlung hatten jene von Kühen in Stallhaltung geringere

Pseudomonas-Konzentrationen als jene von Kühen mit Weidegang. Fand eine Euterreinigung statt, wiesen die Proben aus Stallhaltung höhere *Pseudomonas*-Belastungen auf (Doyle *et al.*, 2017b). Ein signifikanter Einfluss der Euterhygiene konnte in unserer Arbeit weder bei *Pseudomonas* noch bei den Gesamtkeimzahlen festgestellt werden. Vermutlich stellt das Euter an sich keine bedeutende Kontaminationsquelle für *Pseudomonas* dar, da dies kein Haut-assoziiertes Keim wie beispielsweise *Staphylococcus* ist. Auch Leriche & Fayolle (2012) konnten keine Pseudomonaden auf dem Kuheuter feststellen. Kuehn *et al.* (2013) hingegen isolierten hohe Keimzahlen an *Pseudomonas* von Eutern gesunder Kühe und hypothesisierten eine Kontamination durch das Wasser zur Reinigung von Euter und Melkeinheit.

Als letzter hofseitiger Faktor mit signifikanten Unterschieden bei den *Pseudomonas*-Keimzahlen wurde die Art der Milchkühlung identifiziert. Hier wurden die geringsten Konzentrationen bei den Proben mit reiner Tankkühlung gefunden, wohingegen die Kombination mit Vorlaufkühlung sowie die Tauchkühlung signifikant höhere Werte aufwiesen (Abbildung 18D). Letztere fand lediglich bei den beiden Betrieben mit Kannenmelkanlagen Anwendung. Durch die Vorlaufkühlung soll mithilfe eines Platten- oder Rohrkühlers die rasche Abkühlung der Rohmilch noch vor Erreichen des Sammel tanks ermöglicht werden, was zu verringerten Energiekosten führt (Krömker, 2006). Obwohl durch das schnellere Erreichen der Kühltemperatur Vorteile für die mikrobielle Qualität der Rohmilch vermutet werden könnten, birgt die vergrößerte Oberfläche des Plattenkühlers eine höhere Gefahr von Biofilmbildung oder dem Verbleib von Restwasser nach der Spülung. Insbesondere bei mangelnder Reinigung könnte dies das Wachstum unerwünschter Bakterien wie *Pseudomonas* begünstigen (interne Kommunikation mit Molkereivertretern). Analog zu den Ergebnissen dieser Arbeit berichteten Molineri *et al.* (2012) höhere Gesamtkeimzahlen sowie Konzentrationen an proteolytischen psychrotoleranten Arten in Rohmilch von Höfen mit Plattenkühlern oder Tauchkühlern im Vergleich zu jenen mit reiner Tankkühlung. In dieser Studie, die Rohmilch von 27 Betrieben analysierte, war die Art der Milchkühlung der einzige Faktor, welcher mit erhöhten Gesamtkeimzahlen und der Keimzahl an proteolytischen Psychrotoleranten in einem linearen Regressionsmodell assoziiert war.

Zusammenfassend weisen die Ergebnisse darauf hin, dass Faktoren existieren, die exklusiv die *Pseudomonas*-Konzentration beeinflussen. Zu diesen gehören die Jahreszeit, das Abholungsintervall der Rohmilch sowie die Art der Milchkühlung, da hierbei keine signifikanten Unterschiede bei der Gesamtkeimzahl, jedoch bei der *Pseudomonas*-Belastung festgestellt werden konnten. Daneben haben die Parameter Produktionsart und Haltungsumfassenderen Einfluss auf das Rohmilchmikrobiom, da sich die Gesamtkeimzahl und die

Pseudomonas-Keimzahl ähnlich verhielt. Die Daten indizierten zudem, dass hohe *Pseudomonas*-Konzentrationen mit einer niedrigeren Rohmilchdiversität assoziiert sind. Dies könnte dadurch erklärt werden, dass bei hohen Keimzahlen einer einzelnen Gattung andere Arten beispielsweise durch Konkurrenz um Nährstoffe oder negative Interaktionen verdrängt wurden, was in einer verringerten Diversität resultiert. Bei den hofspezifischen Faktoren Melksystem, Reinigungsmethode für das Melksystem, Art der Milchstapelung, Euterhygiene, Wasserversorgung und Region (Nord- vs. Süddeutschland) wurden keine signifikanten Unterschiede der *Pseudomonas*-Keimzahlen zwischen den einzelnen Ausprägungen gefunden (Abbildung A 1). Es muss jedoch berücksichtigt werden, dass die Hofauswahl dieser Studie keine repräsentative Stichprobe darstellt, die exakt die Situation in Deutschland widerspiegelt. Beispielsweise praktizierten 30 % der analysierten Höfe eine ökologische und 70 % eine konventionelle Produktionsart. Der Anteil an Biohöfen in Deutschland ist nicht verzeichnet, aber der Anteil von ökologisch gehaltenem Milchvieh von 4 % (s. Einleitung 1.2.2) indiziert einen geringeren Anteil als in der vorliegenden Studie. Allerdings konnten durch die ausgeglichene Verteilung der Parameter mögliche Unterschiede aufgrund einer höheren Probenzahl besser identifiziert werden. Weiterführende Arbeiten sollten sich auf die Interaktionen der Faktoren untereinander fokussieren. Man konnte beispielsweise bei oben genanntem Zusammenhang der Haltungsform und der Produktionsart sehen, dass die ökologischen Betriebe zu einem deutlich höheren Anteil Weidegang oder Auslauf anboten, weshalb der Effekt der Produktionsart vermutlich durch die Haltungsform bedingt ist. Von daher wird zum aktuellen Zeitpunkt von Tasja Buschhardt am BfR, Berlin, eine Hauptkomponentenanalyse erstellt, die die analysierten Faktoren zusammen in einem Modell betrachtet, um mögliche Interaktionen und Abhängigkeiten berücksichtigen zu können.

1.4 Hof-spezifische Schwachstellen als mögliche Eintragsquellen der *Pseudomonaden* in die Rohmilch beim Erzeuger

Insgesamt deuten die Daten der Stufenkontrollen auf den Erzeugerbetrieben darauf hin, dass jeder Hof spezifische Schwachstellen aufweist, die durch hohe *Pseudomonas*- und Gesamtkeimzahlen charakterisiert sind (Abbildung 19, Abbildung 20, Tabelle 14). Hierbei waren die *Pseudomonas*-unauffälligen Höfe keineswegs frei von diesem Keim. Allerdings konnten grundsätzlich im Bereich Melkzeug und Melksystem bei den *Pseudomonas*-auffälligen Höfen höhere Belastungen identifiziert werden. Insbesondere Stellen, die schlecht von der automatischen Reinigung erfasst werden wie Gummidichtungen bei z.B. der Dichtung des Sammelstücks des Melkzeugs oder die Halterung des Rohrs für die Milchzufuhr, welches je Bauart nicht Teil des automatischen Spülsystems ist, waren häufig mit *Pseudomonas*

belastet. Auch die Halterungen der Zitzenbecher wiesen höhere *Pseudomonas*-Keimzahlen auf. Diese werden auch in der Literatur als Bereich mit hohen Keimzahlen an *Pseudomonas* bzw. *Proteobacteria* berichtet (Leriche & Fayolle, 2012; Weber *et al.*, 2019). Keimwachstum an dieser Stelle könnte minimiert werden, indem die Zitzenbecher nach der Reinigung zum Trocknen aus den Halterungen genommen werden, damit sich dort kein Wasser sammelt. Dies wurde jedoch häufig bei den beprobten Betrieben vernachlässigt, obwohl die Empfehlung bekannt war. Eine regelmäßige manuelle Reinigung der schlecht zugänglichen Stellen sowie der Austausch von z.B. Dichtungsringen wird auf Basis der vorliegenden Daten empfohlen. Neben der schlechten Erreichbarkeit durch die automatische Reinigung wäre denkbar, dass Gummioberflächen die Biofilmbildung stärker begünstigt als Edelstahl. Daten unserer Kooperationspartner am MRI in Kiel, welche die Stärke der Biofilmbildung von *Pseudomonas* auf verschiedenen Oberflächen untersuchten, unterstützen diese Hypothese (unpublizierte Daten). Weiterhin wiesen die Milchfilter hohe *Pseudomonas*- und Gesamtkeimzahlen auf. Dies wird auch in der Literatur häufig erwähnt und als mögliche Kontaminationsquelle von Rohmilchkeimen hypothetisiert (Latorre *et al.*, 2009; Leriche & Fayolle, 2012; Scheldeman *et al.*, 2005). Letztendlich könnten die hohen Keimzahlen durch Adhäsion an Schmutzpartikel erklärt werden, die durch den Filterstoff aufgehalten werden. Latorre *et al.* (2009) postulierten die Verwendung von Milchfiltern zum sensitiveren Nachweis von Pathogenen wie *Listeria* oder *Salmonella* als anhand der Rohmilch, da die Mikroorganismen im Filter aufkonzentriert werden.

Grundsätzlich muss zur Beurteilung eines möglichen Kontaminationspunktes zwischen Stellen differenziert werden, die direkten Milchkontakt haben, wie beispielsweise dem Zapfhahn, und solchen ohne direkten Kontakt, wie dem Deckel des Zapfhahns. Mögliche Eintrittspunkte von *Pseudomonas* bei den belasteten Höfen könnten daher beispielsweise der Zapfhahn sein, da dieser im Vergleich zu den unauffälligen Höfen häufiger und stärker belastet war und direkten Kontakt zur Rohmilch hat. Dies wurde ebenfalls als kritische Stelle mit hohen Keimzahlen u.a. an *Proteobacteria* in anderen Studien berichtet und ein Eintrag dieser Mikroorganismen in die Rohmilch bei Abholung durch den Sammelwagen hypothetisiert (Flach *et al.*, 2014; Weber *et al.*, 2019). Die hohen Keimzahlen wurden dadurch erklärt, dass der Zapfhahn lediglich bei Abholung der Milch gereinigt wird und nicht, wie beispielsweise die milchführenden Leitungen, nach jedem Melkprozess. Es wurde kritisiert, dass Rohmilch vom Erzeuger z.B. zum Direktverkauf aus dem Zapfhahn entnommen wurde, ohne dass danach eine adäquate Reinigung erfolgte (Weber *et al.*, 2019). Dies wurde auch in der vorliegenden Arbeit festgestellt. Weiterhin wäre die Halterung des Rohres für die Milchzufuhr eine denkbare Kontaminationsroute, da das Rohr beim Melken in den Rohmilchtank geführt wird und dort je

Bauart direkt in die Milch eintaucht. Allerdings könnten auch Stellen, die nicht Kontakt zur Milch haben, dennoch potentielle Kontaminationsrouten ermöglichen, wie beispielsweise der Deckel des Kühltanks. Hier könnte Kondenswasser entstehen, das in die Rohmilch läuft oder tropft und somit Mikroorganismen transportiert. Als kontinuierlich sehr keimarme Probenahmestelle wurde die Innenseite des Rohmilchtanks identifiziert, bei dem bei keinem Hof *Pseudomonaden* isoliert und nur bei zwei Höfen mittlere Gesamtkeimzahl-Konzentrationen detektiert wurden. Dies indiziert eine adäquate Reinigung des Rohmilchtanks. In einer brasilianischen Studie hingegen wurden hohe Keimzahlen von bis zu $\log 6$ KbE/cm² auf der Innenseite der Sammeltanks detektiert, mit *Pseudomonas* als verbreitetster Gattung (Flach *et al.*, 2014). Dies könnte auf Unterschiede in den Reinigungsstandards zwischen verschiedenen Ländern hinweisen.

Auf Basis der Daten dieser Arbeit ist der Eintrag von *Pseudomonas* in die Rohmilch über die Stallluft unwahrscheinlich. Dies widerspricht den Annahmen von Carafa *et al.* (2020), dass *Pseudomonas* durch Staub in die Rohmilch gelangt, basierend auf Studien, die *Proteobacteria* in Stallluft nachweisen konnten (Dungan, 2012; Pfister *et al.*, 2017). Jedoch wurde hierbei der Staub nach Aufschütteln der Einstreu gesammelt (Pfister *et al.*, 2017) bzw. das Abwasser eines Stalls mithilfe eines Zerstäubers verteilt und die Aerosole mit einem Luftkeimsammler aufgefangen (Dungan, 2012). Da dies jedoch nicht den realistischen Bedingungen bei den Erzeugerbetrieben entspricht, werden die Schlussfolgerungen von Carafa *et al.* (2020) angezweifelt.

Eine umfassende Analyse zur Identifikation von Kontaminationsquellen für *Pseudomonas* wurde von Nucera *et al.* (2016) auf sechs italienischen Betrieben durchgeführt, die jeweils drei Mal beprobt wurden. Hier konnte *Pseudomonas* in 77 % der Proben detektiert werden. Eine kontinuierliche Belastung mit persistenten Stämmen wurde hierbei in den Wasserproben sowie den Zitzenbechern detektiert. Aus diesem Grund wurde das Wasser als Primäreintrag von *Pseudomonas* hypothetisiert, was eine Kontamination sowie Biofilmbildung in der Melkanlage nach sich zieht. Letztere führen anschließend zu einer anhaltenden Kontamination der Rohmilch. Die Persistenz der Stämme könnte auf eine Resistenz gegenüber Reinigungsmitteln hinweisen. Vidal *et al.* (2017) beprobten zehn brasilianische Milchbetriebe zur Analyse möglicher Eintragsquellen von *Pseudomonas*. Hier konnten u.a. in 100 % der analysierten Wischproben der Kühltanks, 95 % der Zitzenbecher nach dem Melken, 90 % der Euter vor Euterreinigung, 85 % der Zitzenbecher vor dem Melken und 50 % der Euter nach Euterreinigung *Pseudomonaden* detektiert werden. Im Falle der Wasserproben wurden in 70 % der Fälle *Pseudomonas* isoliert, jedoch konnte keine Übereinstimmung mit den

Rohmilch-Isolaten hergestellt werden. Daher wurde Wasser als unbedeutende Kontaminationsquelle bewertet. Die Autoren schlussfolgerten, dass *Pseudomonas* auf den Betrieben sehr verbreitet und ein gutes Hygienemanagement zur Kontrolle von Kontaminationen mit dieser Gattung vonnöten sei.

Auch in der vorliegenden Arbeit wird der Eintrag von *Pseudomonas* über Wasser aufgrund der geringen detektierten Keimzahlen in den Proben als unwahrscheinlich angesehen. Zudem konnten keine Unterschiede zwischen Brunnenwasser und konventioneller Wasserversorgung festgestellt werden (Abbildung A 1E). Die hohen *Pseudomonas*- und Gesamtkeimzahlen im Nachspülwasser hingegen indizieren Reinigungsmängel. Dies wird durch die Auffälligkeiten, die während der Probenahme notiert wurden, unterstützt. Häufig wurde ein falsches Reinigungsmittel verwendet. Hierbei gibt es Unterschiede in Art und Zusammensetzung der Säure oder Lauge und es muss zwischen Produkten für den Sammel-tank und die Anlage unterschieden werden. Weiterhin fiel eine zu geringe Reinigungstemperatur auf, was auch in der Literatur wiederholt berichtet wird (Bava *et al.*, 2009; Bava *et al.*, 2011; Latorre *et al.*, 2010). Beispielsweise wurden in einer italienischen Studie, in der 22 Betriebe jeweils zwei Mal hinsichtlich der Reinigungsprozeduren analysiert wurden, in 89 % der Fälle eine zu geringe Reinigungstemperatur ($< 45\text{ °C}$) festgestellt. Dies war assoziiert mit höheren Belastungen der Rohmilch und des Nachspülwassers mit psychrotoleranten Bakterien. Eine routinemäßige Kontrolle und Korrektur der Reinigungstemperatur wurde als einfache und effektive Methode zur Verbesserung der Rohmilchqualität empfohlen (Bava *et al.*, 2011). Hof 4 wies mit $\log 3,22\text{ KbE}\cdot\text{ml}^{-1}$ *Pseudomonas* und einer Gesamtkeimzahl $\log 4,84\text{ KbE}\cdot\text{ml}^{-1}$ die höchsten Belastungen im Nachspülwasser auf. Nach Angaben des Landwirtes bestanden Probleme mit dem Keimgehalt der Milch seit dem Wechsel auf ein chlorfreies Reinigungsmittel. An seinen Hygienepraktiken habe er nichts verändert. Auffällig war, dass die Leitungen nach der Reinigung nicht entwässert wurden und das Nachspülwasser bis zum nächsten Melkvorgang in den Rohren stand. Dies könnte zu einem starken Wachstum von Mikroorganismen geführt haben, die vermutlich Biofilme in den Rohren bildeten. Es wäre denkbar, dass das aggressivere, chlorhaltige Reinigungsmittel vor der Umstellung diese Biofilme entfernt hatte, das neue Reinigungsmittel jedoch nicht. Dem Landwirt wurde empfohlen, nach jedem Spülvorgang die Leitungen zu entwässern. Dieses Beispiel soll exemplarisch die individuellen Problematiken und Gegebenheiten auf den Höfen verdeutlichen und unterstreichen, dass umfassende Aussagen zu möglichen Eintrittsrouten aufgrund der Komplexität problematisch sind. Obwohl viele Informationen zu den Betrieben vorlagen, konnte im Rahmen unserer Studie nicht erfasst werden, wie die Hygienepraktiken auf den einzelnen Höfen durchgeführt wurden. Von diesen wird ein substanzieller Einfluss auf die Rohmilchqualität vermutet.

Zusammenfassend konnten mögliche Kontaminationsquellen der Rohmilch mit *Pseudomonas* wie beispielsweise der Zapfhahn des Rohmilchtanks festgestellt werden. Weiterhin werden eine Kontrolle der Reinigungstemperatur sowie die manuelle Reinigung von Bereichen empfohlen, die schwer von der automatischen Spülung erreicht werden. Jedoch hatte jeder Hof individuelle Schwachstellen im Hygienemanagement, die zu hohen *Pseudomonas*-Belastungen führen, weshalb keine universellen Handlungsempfehlungen ausgesprochen werden können. Der Eintrag über Wasser oder Luft wurde als unbedeutend eingeschätzt. Vergleiche zu anderen Studien sind aufgrund der unterschiedlichen Vorgehensweisen zur Beprobung und Differenzen in den Hygienestandards zwischen verschiedenen Ländern problematisch. In weiterführenden Arbeiten könnten die gleichen Höfe wiederholt beprobt werden, um kontinuierlich belastete Bereiche oder persistierende Stämme zu identifizieren. Ein weiterer Ansatz wäre die Überprüfung des Effekts von Handlungsempfehlungen an den Erzeuger durch eine erneute Beprobung. Grundsätzlich wäre für einen besseren Vergleich der Keimbelastung zwischen den einzelnen Probenahmestellen eine Festlegung von einheitlichen Flächen für die Beprobung mit den Tupfern sinnvoll. Damit könnte man auch die Keimzahlen statt auf das Volumen der Ringerlösung, in die die Tupper ausgegossen wurden, auf die beprobte Fläche beziehen, wie es beispielsweise in der Studie von Flach *et al.* (2014) praktiziert wurde. Dies war jedoch durch die Vielzahl an Probenahmestellen mit Differenzen in Zugänglichkeit und verfügbarer Fläche für die Beprobung in der vorliegenden Studie nicht durchführbar. Durch eine Einschränkung auf wenige, interessante Probenahmestellen wäre es jedoch in zukünftigen Untersuchungen möglicherweise umsetzbar.

1.5 Rohmilchtransport als potentielle Quelle für hohe *Pseudomonas*-Keimzahlen

Zur Analyse des Einflusses des Transports der Rohmilch zur Molkerei sowie der anschließenden Stapelung im Rohmilchtank auf die *Pseudomonas*- und Gesamtkeimzahlen wurden sieben vollständige Sammeltouren beprobt. Da keine Informationen zu den Volumina der einzelnen Hofstapeltankproben vorlagen, konnten die präzisen durchschnittlichen *Pseudomonas*-Belastungen der Hofproben nicht berechnet werden, um sie mit den entsprechenden Sammelwagenproben zu vergleichen. Allerdings indiziert eine Belastung des Sammelwagens, die höher als jene aller zugehörigen Hofproben ist, einen Anstieg der *Pseudomonas*-Keimzahlen. Gleiches gilt auch für den Vergleich der Sammelwagenproben mit der entsprechenden Stapeltankprobe in den Touren mit zwei Sammelwägen. Die Ergebnisse der Analysen ergaben, dass es unabhängig von der Transport- und Lagerzeit zu hohen *Pseudomonas*-Keimzahlen kommen kann (Abbildung 23). Die Gattung weist mit 5,5 bis 14,7 h bei 4-6 °C die kürzesten Generationszeiten der psychrotoleranten Bakterien in Rohmilch auf

(Cousin, 1982; Sørhaug & Stepaniak, 1997). Während der Anstieg im Stapeltank von Tour D von über einer Log-Stufe während der Lagerdauer von 36 h daher auf Wachstum zurückführbar ist, können die Veränderungen von bis zu $\log 2,5$ Zellen* ml^{-1} in den Sammelwägen von Tour E, F und G nicht allein durch Zellteilung während den relativ kurzen Transportzeiten von 1,5 – 3,25 h erklärt werden. Weiterhin fanden nennenswerte Anstiege der Gesamtkeimzahl über eine Log-Stufe ebenfalls nur in Sammelwägen von Tour E und F statt. Dies konzentriert die Problematik hoher *Pseudomonas*-Keimzahlen auf die Sammelwägen und indiziert Kontaminationsquellen, beispielsweise durch unzureichende Reinigung der Sammelwägen. Letzteres wird auch in der Literatur häufig berichtet, da Bereiche in den Sammelwägen gefunden wurden, die trotz CIP hohe Keimzahlen aufwiesen (Bell *et al.*, 1994; Darchuk *et al.*, 2015a; Paez *et al.*, 2013). In Studien von Teh *et al.* konnten Bakterien aus den Sammelwagentanks isoliert werden, die eine starke Fähigkeit zur Biofilmbildung und hohe proteolytische Aktivitäten aufwiesen. Häufig wurde auch *Pseudomonas* isoliert (Teh *et al.*, 2012; Teh *et al.*, 2014; Teh *et al.*, 2011). Weiterhin konnte nachgewiesen werden, dass Biofilme, insbesondere, wenn sie aus mehreren verschiedenen Arten bestehen, proteolytisch aktiver als planktonische Zellen sind (Frolund *et al.*, 1995; Teh *et al.*, 2012) und zudem in ihrer proteolytischen Aktivität und Zusammensetzung jahreszeitliche Unterschiede zeigen (Teh *et al.*, 2011). Analysen unserer Kooperationspartner in Kiel konnten eine stammspezifische und bis zu 100-fach höhere Proteolyse bei Biofilmbildung im Vergleich zu planktonischen Zellen feststellen (unpublizierte Daten). Dies verdeutlicht, dass neben der Problematik des kontinuierlichen Keimeintrages Biofilme eine stärkere Belastung der Rohmilch mit Proteasen in den Sammelwägen erzeugen können, auch bei einer guten Ausgangsqualität der ursprünglichen Hofmilch. Eine weitere Ursache für hohe Keimzahlen nach dem Transport der Rohmilch könnte die Tatsache sein, dass die Sammelwägen alle 24 h gereinigt werden, unabhängig von der Anzahl an durchgeführten Touren (Darchuk *et al.*, 2015b; Kuhn *et al.*, 2018). Da die Tanks meist nicht aktiv gekühlt, sondern lediglich isoliert sind, könnten die Temperaturen während der Leerfahrten zwischen den Befüllungen im Tank ansteigen und zu einem Wachstum der Mikroorganismen in der Restmilch führen. Teh *et al.* (2012) konnten zeigen, dass die Oberfläche eines leeren, isolierten Milchtanks 20 °C bei warmen Außentemperaturen erreicht. In der vorliegenden Arbeit konnten die stärksten *Pseudomonas*-Anstiege in den beiden Touren mit der höchsten Außentemperatur von 27 °C verzeichnet werden (Tour E und F). Zudem waren dies die einzigen Touren mit einer höheren Gesamtkeimzahl, welche ansonsten kaum durch die Lagerung und den Transport beeinflusst wurde. Dies indiziert, dass die Hygienepraktiken bei heißen Außentemperaturen nicht ausreichend sind. Demgegenüber stehen jedoch Untersuchungen von Kuhn *et al.* (2018),

welche zwar Kreuzkontaminationen von frischer Rohmilch in Milchkanen nachweisen konnten, die zuvor ungereinigt mit Restmilch für einige Stunden bei Raumtemperatur standen, aber nicht bei Sammelwagentanks. Vermutlich ist hier das Volumen der Restmilch zu gering, um zu einem nennenswerten Bakterieneintrag zu führen. Dies wurde auch von Darchuk *et al.* (2015a) berichtet. Allerdings konnte eine signifikante Reduktion von Bakterien auf Tankoberflächen nach einer Spülung mit Wasser nachgewiesen werden (Darchuk *et al.*, 2015a; Darchuk *et al.*, 2015b; Dommert *et al.*, 1980). Wenn dies nach jeder Leerung bei der Molkerei angewendet würde, könnte es langfristig ein effektives Verfahren zur Verminderung des Eintrages von Mikroorganismen durch die Sammel tanks darstellen.

Bei Analyse der Veränderungen des Rohmilchmikrobioms während Transport und Lagerung von zwei ähnlich aufgebauten Touren fiel auf, dass der Transport nur einen geringen Einfluss hat, da die Sammelwagenproben eine gute Repräsentation der entsprechenden Hofproben darstellten. Bei den Stapeltankproben beider Touren konnten hingegen größere, vergleichbare Veränderungen festgestellt werden. Insbesondere die Gram-positiven Gattungen, die das Kernmikrobiom der einzelnen Proben der Sammel touren bildeten, wie *Clostridium* und *Corynebacterium*, hatten geringere relative Anteile in den Stapeltankproben (Abbildung 24). Dies konnte durch das Wachstum von teilweise psychrotoleranten Gattungen wie *Lactococcus* erklärt werden. *Pseudomonas* konnte lediglich in einer Hofprobe mit Anteilen > 1,5 % detektiert werden. Die zugehörige Stapeltankprobe hatte hingegen mit 3,4 % bereits eine erhöhte Belastung und zeigte auch bei den absoluten Keimzahlen einen deutlichen Anstieg an *Pseudomonas*. Obwohl in den analysierten Sammel touren keine dominanten Anteile dieser Gattung gefunden wurden, weisen die Ergebnisse darauf hin, dass bereits ein geringer initialer Eintrag ausreichend ist, um zu hohen finalen Konzentrationen zu führen, die ein Risiko für die Rohmilchqualität darstellen. McHugh *et al.* (2020) analysierten die Rohmilch von 22 Sammelwagentanks, wobei zwischen zwei Laktationsphasen unterschieden wurde. Insbesondere in der späten Laktationsphase (Oktober) wurde *Pseudomonas* mit durchschnittlich 20,3 % neben *Acinetobacter* (25,4 %) als dominante Gattung identifiziert. Diese waren bereits in den zugehörigen Hof sammeltank mit hohen Anteilen vertreten, was sich jedoch im Sammelwagen verstärkte. In der mittleren Laktationsphase (Mai) war *Pseudomonas* in signifikant geringeren Anteilen vertreten. Dies könnte möglicherweise die niedrigen Anteile in den Sammelwägen unserer Arbeit erklären, da die Touren in den Frühlings- und Sommermonaten beprobt wurden. In einer Studie von Kable *et al.* (2016) wurde die mikrobielle Zusammensetzung von 899 Sammelwagentanks untersucht. Hierbei wurden hochdiverse Rohmilchmikrobiota gefunden und bei 40 % der Proben hatten seltene Gattungen, die unter 1 % des Mikrobioms ausmachten, insgesamt einen Anteil von über 50 %.

Dies deckt sich nicht mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit, da der Anteil an Gattungen < 1,5 % zwischen 6,5 und 14,7 % am Mikrobiom der analysierten vier Sammelwägen betrug. Jedoch können Übereinstimmungen zu den Gattungen des Kernmikrobioms der Studie gefunden werden. Zu diesem zählten *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Clostridiales*, *Corynebacterium*, *Turicibacter* und *Acinetobacter*. *Pseudomonas* wurde analog zu unseren Ergebnissen nicht als Teil des Kernmikrobioms detektiert, wies jedoch in einigen Proben hohe Anteile auf. In der Studie wurden neben den Sammelwägen noch fünf Rohmilchstapeltanks in Molkereien analysiert. Auch hier wurden deutliche Unterschiede zu den Sammelwagenproben gefunden, mit erhöhten Anteilen von *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Acinetobacter* und *Pseudomonas*, wohingegen *Corynebacterium* und *Clostridiales* verringert waren. Dies bestätigt ebenfalls die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit. Eine Studie von Porcellato *et al.* (2018) fokussierte sich auf die Zusammensetzung der Stapeltankproben aus zwei Molkereien und beprobte diese 13 Monate lang. Als Kernmikrobiom der Rohmilch beider Molkereien wurde *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Acinetobacter*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Chryseobacterium* und *Firmicutes* ermittelt. Zudem konnte ein jahreszeitlicher Zusammenhang mit der Komposition der Rohmilchmikrobiota identifiziert werden, da *Pseudomonas* in den Wintermonaten dominierte, *Bacillus* wiederum in den Sommermonaten. In der Studie von McHugh *et al.* (2020) machten in den Rohmilchproben von vier Stapeltanks psychrotolerante Gattungen wie *Pseudomonas*, *Acinetobacter* und *Lactococcus* den Großteil des Mikrobioms aus. Jedoch war die Zusammensetzung nicht abhängig von der Laktationsphase, wie es bei den Sammelwagenproben der Fall war.

Zusammenfassend ergaben die Analysen der Sammeltouren, dass die Sammelwägen ein hohes Risiko für Kontaminationen mit *Pseudomonas* bergen. Aus diesem Grund werden eine Überprüfung und ggf. Optimierung der Hygienepraktiken empfohlen. Die Veränderungen der Rohmilchmikrobiota während der Lagerung im Rohmilchstapeltank sind durch das Wachstum psychrotoleranter Arten bedingt. Abhängig vom initialen Eintrag an *Pseudomonas* durch die Erzeuger oder die Sammelwägen in die Rohmilch können während der finalen Lagerung *Pseudomonas*-Konzentrationen entstehen, die ein Risiko für den enzymatischen Verderb darstellen. Intensivere Analysen dieser Thematik könnten den jahreszeitlichen Einfluss fokussieren sowie, durch die Berücksichtigung der Milchvolumina, eine genauere Berechnung der durchschnittlichen Keimzahlen ermöglichen. Weiterhin wären Analysen zum Temperaturverlauf im Sammelwagentank, insbesondere bei Leerfahrten, sowie Beprobungen der Wägen zur Identifikation der möglichen Kontaminationsquellen aufschlussreich.

2 Charakterisierung neuer *Pseudomonas*-Spezies

Im Rahmen dieser Arbeit wurden drei neue *Pseudomonas*-Spezies charakterisiert, deren Stämme aus Rohmilch oder Milchalbfabrikaten isoliert wurden. Aus diesem Grund wird eine Relevanz dieser Spezies für die Milchindustrie vermutet. Als zentrale Bestandteile einer Neubeschreibung gelten die Abgrenzung der neuen Spezies von bereits bekannten Arten sowie die Charakterisierung von typischen Eigenschaften und Merkmalen auf genotypischer, phänotypischer und chemotaxonomischer Ebene (vgl. Einleitung 4.3).

2.1 *Pseudomonas saxonica* sp. nov.

Die ersten phylogenetischen Analysen der Stämme WS 5072^T und WS 5092 auf Basis von 16S rRNA und *rpoD* indizierten die Zugehörigkeit zur gleichen, bisher unbekanntem Spezies (Ergebnisse 2.1.1). Zudem wurden die Sequenzübereinstimmungen mit Typstämmen valide beschriebener Arten verglichen. Da die 16S rRNA aufgrund der nahen Verwandtschaftsverhältnisse von *Pseudomonas* nicht ausreichend differenzierend ist (Mulet *et al.*, 2010), wurde sich hierbei insbesondere auf die Ergebnisse der *rpoD*-Analyse gestützt. Diese ergaben eine maximale Sequenzübereinstimmung zu *P. fragi* DSM 3456^T mit 93 %, was deutlich unter dem Grenzwert zur Spezieszugehörigkeit von 98 % lag. Allerdings wurde ein phylogenetischer Baum auf Basis des 16S rRNA Gens berechnet, da dies nach wie vor einen essentiellen Bestandteil einer validen Neubeschreibung darstellt (Logan *et al.*, 2009; Tindall *et al.*, 2010). Hier konnte *P. saxonica* sp. nov. in Nachbarschaft zu *P. fragi* und *P. deceptionensis* lokalisiert werden (Abbildung 25). In den MLSA-Analysen wurde die zu charakterisierende Spezies schließlich als klar abgegrenzter Ast innerhalb der *P. fragi*-Gruppe des *P. fluorescens*-Komplexes eingeordnet (Abbildung 28). Anhand der Ergebnisse der ANI-Berechnungen konnte schließlich die Zugehörigkeit der beiden Isolate zur gleichen Spezies und gleichzeitig das Vorliegen einer bisher nicht valide beschriebenen Art bestätigt werden, da der am nächsten verwandte Typstamm *P. fragi* DSM 3456^T mit 86,3 % deutlich unter dem von Richter & Roselló-Móra (2009) postulierten Grenzwert von 95 % lag (Tabelle 18).

Die neue Spezies zeigte eine für *Pseudomonas* typische Zell- und Koloniemorphologie (vgl. Ergebnisse 2.2.1). Eine Besonderheit wies jedoch der Typstamm WS 5072^T durch die heterogene Koloniemorphologie auf (Abbildung 31A), wohingegen WS 5092 lediglich in Form des größeren Kolonietyps wuchs. Dieses Phänomen wird als *phenotypic switching* oder Bistabilität bezeichnet und wurde bereits bei verschiedenen *Pseudomonas*-Spezies wie *P. fluorescens*, *P. tolaasii* oder *P. aeruginosa* beschrieben (Gallie *et al.*, 2019; Gallie *et al.*, 2015; Han *et al.*, 1997; Häussler, 2004). Es ist evolutionär gesehen eine Überlebensstrategie,

die insbesondere bei unvorhersehbaren Umweltbedingungen eintritt und zu einem schnellen stochastischen Wechsel zwischen phänotypischen Ausprägungen führt. Als molekulare Grundlage gelten hierfür kurze repetitive DNA-Sequenzen, die zu einem *Slippage* der Polymerase und damit zu einer veränderten Genexpression führen (Gallie *et al.*, 2015). Auch bei der Pathogenität von Bakterien spielt *phenotypic switching* eine Rolle, wie beispielsweise bei *Pseudomonas aeruginosa*. Als bekanntester Morphotyp dieser Gattung gilt die *Small colony variant*, welche Biofilme bildet, eine höhere Resistenz gegenüber Antibiotika zeigt und häufig aus chronisch infizierten Lungen isoliert werden kann (Häussler, 2004).

Neben den morphologischen Unterschieden zwischen den beiden Isolaten WS 5072^T und WS 5092 konnten auch bei den phänotypischen und biochemischen Analysen Differenzen festgestellt werden (Ergebnisse 2.3.1). Sowohl die Bildung fluoreszierender Pigmente als auch die Säureproduktion aus L-Xylose waren stammspezifisch (Abbildung 34). Insgesamt weist dies auf die Heterogenität innerhalb einer Spezies hin. Daher sollten Neubeschreibungen nicht auf einem einzelnen Isolat basieren (Logan *et al.*, 2009; Oren & Garrity, 2014). Im Vergleich zu den am nächsten verwandten Referenzspezies wies *P. saxonica* sp. nov. vergleichbare, für *Pseudomonas* typische Wachstumsbedingungen auf. Sie konnte jedoch durch mindestens fünf Eigenschaften von den anderen Spezies abgegrenzt und damit auch auf phänotypischer Ebene als eigenständige Art nachgewiesen werden. Neben der Bistabilität in der Koloniemorphologie war die positive Aesculinhydrolyse eine Eigenschaft, die exklusiv für *P. saxonica* sp. nov. beobachtet wurde. Bei den chemotaxonomischen Analysen wies WS 5072^T für diese Gattung typische respiratorische Chinone mit Q9 als Hauptkomponente auf, sowie ein bekanntes Muster an polaren Lipiden (Abbildung 36) (Moore *et al.*, 2006). Die Zusammensetzung der zellulären Fettsäuren war mit einer Prädominanz von C16:0 mit einem Anteil von 32,2 % vergleichbar mit jenen der nah verwandten Typstämme. Lediglich *P. aeruginosa* DSM 50071^T, welche als Typspezies der Gattung in die phänotypischen und chemotaxonomischen Analysen aufgenommen wurde, zeigte Differenzen im Fettsäureprofil (Tabelle 24). Dies kann auf den geringen Verwandtschaftsgrad zu *P. saxonica* sp. nov. zurückgeführt werden, der sich auch in einem ANIm Wert von lediglich 83 % zeigte (Tabelle 18).

Im Vergleich zu den Originalbeschreibungen der verwendeten Referenzspezies konnten einige Unstimmigkeiten gefunden werden. Für *P. psychrophila* DSM 17535^T und *P. versuta* LMG 29628^T wurde eine positive Urease-Reaktion berichtet (See-Too *et al.*, 2017; Yumoto *et al.*, 2001). Dies deckt sich nicht mit den Ergebnissen vorliegender Studie, da dies nur bei *P. aeruginosa* DSM 50071^T detektiert wurde. Weiterhin konnte die beschriebene Produktion

von Pyoverdin bei *P. versuta* LMG 29628^T nicht bestätigt werden (See-Too *et al.*, 2017). Schließlich konnten noch kleinere Unterschiede in den tolerierten Bereichen für pH, NaCl-Konzentration und Temperatur ermittelt werden. Letztendlich unterstreichen diese Differenzen die Notwendigkeit der parallelen Analyse der unbekanntes Spezies mit den am nächsten verwandten Referenzspezies, da andere Gegebenheiten zwischen verschiedenen Laboren die Ergebnisse beeinflussen können. Weiterhin verwendet jedes Labor eine eigene Zusammenstellung an zu untersuchenden Charakteristika, sodass nicht für jede Reaktion das Ergebnis für die entsprechende Referenzspezies aus den Originalbeschreibungen ermittelt werden kann.

In Anlehnung an den Ort der Isolation des Typstammes aus Magermilchkonzentrat, eine Stadt im Bundesland Sachsen, wurde der Name *Pseudomonas saxonica* sp. nov. (sa.xo'ni.ca. M.L. fem. adj. *saxonica*) gewählt. WS 5072^T wurde als Typstamm festgelegt und als DSM 108989^T bzw. LMG 31234^T in den Stammsammlungen der DSMZ und BCCM/LMG hinterlegt. Aufgrund der negativen Proteolyse auf Caseinagar sowohl bei 4 °C als auch bei 25 °C sowie der Abwesenheit des *aprX-lipA2*-Operons wird von einem geringen proteolytischen Verderbspotential ausgegangen. Allerdings konnte Lipolyse auf Tributyrinagar bei beiden analysierten Temperaturen festgestellt werden, weshalb aus diesem Grund eine Relevanz dieser Spezies für die Milchindustrie vermutet wird.

2.2 *Pseudomonas haemolytica* sp. nov.

Bei den beiden Isolaten WS 5063^T und WS 5067, welche später als *Pseudomonas haemolytica* sp. nov. bezeichnet wurden, konnte analog zu *P. saxonica* sp. nov. durch die Einzelgenanalysen von 16S rRNA und *rpoD* die Zugehörigkeit zur gleichen, bisher unbekanntes Spezies nachgewiesen werden (Ergebnisse 2.1.1). Als maximale Sequenzübereinstimmung von *rpoD* konnte 95 % im Fall von *P. libanensis* DSM 17149^T festgestellt werden, was unter dem Grenzwert von 98 % lag. In der 16S rRNA Phylogenie wies *P. haemolytica* sp. nov. einen abgegrenzten Ast neben *P. fluorescens* DSM 50090^T, *P. canadensis* LMG 28499^T und *P. salomonii* CFBP 2022^T auf (Abbildung 26). In der höher auflösenden MLSA-Phylogenie hingegen war er in Nachbarschaft zu *P. libanensis* DSM 17149^T und *P. synxantha* DSM 18928^T innerhalb der *P. fluorescens*-Gruppe lokalisiert (Abbildung 29). Die ANIm-Analysen lieferten letztendlich den Nachweis des Vorliegens einer bisher nicht valide beschriebenen Spezies, da die beiden Isolate WS 5063^T und WS 5067 mit einer Übereinstimmung von 98,7 % der gleichen Spezies zugeordnet werden konnten, jedoch mit 91,4 % nicht den am nächsten verwandten Arten *P. synxantha* DSM 18928^T und *P. libanensis* DSM 17149^T (Tabelle 19).

Die Spezies zeigte eine für die Gattung typische Morphologie (Ergebnisse 2.2.2). Es konnten keine Unterschiede zwischen den beiden Isolaten festgestellt werden, wie es bei *P. saxonica* sp. nov. der Fall war. Auch konnten bei den phänotypischen und biochemischen Untersuchungen keine Differenzen verzeichnet werden (Ergebnisse 2.3.2). Die tolerierten und optimalen Wachstumsbedingungen waren ebenfalls typisch für die Gattung und mit den am nächsten verwandten Referenzspezies vergleichbar. Neben der starken Proteolyse auf Caseinagar sowie Lipolyse auf Tributyrinagar sowohl bei der optimalen Wachstumstemperatur von 30 °C als auch bei 4 °C wurde bei beiden Stämmen eine starke β -Hämolyse auf Blutagar nachgewiesen (Abbildung 35). Diese konnte neben *P. haemolytica* sp. nov. lediglich bei *P. paralactis* DSM 29164^T und *P. aeruginosa* DSM 50071^T gezeigt werden (Tabelle 22), jedoch in einer geringeren Intensität. Aus diesem Grund war die β -Hämolyse ausschlaggebend bei der Namensfindung für die neue Spezies. Die Fähigkeit, Erythrozyten zu lysieren, könnte ein potentieller Pathogenitätsfaktor sein. Bei *P. aeruginosa*, welches ein opportunistisches Humanpathogen darstellt und verantwortlich für zahlreiche nosokomiale Infektionen ist, ist das Hämolysin ExlA bekannt. Dieses gehört zur Familie der Cytolysine/Hämolysine, deren Aktivität am besten für ShlA von *Serratia marcescens* beschrieben ist (Reboud *et al.*, 2017). Genombasierte Analysen von WS 5063^T und WS 5067 ergaben das Vorliegen eines Hämolysinclusters mit *shlA*, sowie den Sequenzen für die Transporterproteine *shlB_1*, *shlB_2* und *shlB_3* (letzteres war nur bei WS 5063^T vorhanden). Tiefergehende Analysen, die von Christopher Huptas, Lehrstuhl für Mikrobielle Ökologie, TUM, durchgeführt wurden, ergaben, dass Homologe des *shlA*-Gens von WS 5063^T auch in weiteren Typstämmen von *Pseudomonas*-Spezies wie *P. synxantha* DSM 18928^T, *P. libanensis* DSM 17149^T oder *P. paralactis* DSM 29164^T vorhanden waren. Jedoch zeigten nicht alle dieser Spezies die β -Hämolyse auf Blutagar. Letztendlich konnte keine Homologie zu ExlA von *P. aeruginosa* DSM 50071^T gefunden werden, weshalb von dem Vorhandensein eines Paralogs ausgegangen wird. Vermutlich existieren bei *Pseudomonas* mehrere verschiedene Hämolysine. Informationen zur Zusammensetzung der Proteinfamilie sowie die Unterschiede zwischen den einzelnen Hämolysinen erfordern weiterführende Untersuchungen. Auch könnte die Pathogenität von *P. haemolytica* sp. nov. in Zellkultur- und Tierversuchen analysiert werden. Da jedoch *P. aeruginosa* der einzige bekannte humanpathogene Vertreter dieser Gattung ist und eine relativ weite Verwandtschaft mit *P. haemolytica* sp. nov. aufweist (paarweiser Anim von 83,6 %), wird eine Pathogenität der vorliegenden Spezies als unwahrscheinlich angesehen.

Auf Basis der phänotypischen Analysen konnte *P. haemolytica* sp. nov. durch vier Faktoren als eigenständige Art von den phänotypisch ähnlichsten Typstämmen *P. libanensis* DSM

17149^T und *P. paralactis* DSM 29164^T abgegrenzt werden (Tabelle 22). Hier wurde zudem die maximal tolerierte Wachstumstemperatur als differenzierende Eigenschaft gewertet, da einige Spezies wie *P. libanensis* DSM 17149^T bei 37 °C wachsen konnten, *P. haemolytica* sp. nov. jedoch nicht. Die Fähigkeit, bei 37 °C zu proliferieren, kann als möglicher Pathogenitätsfaktor angesehen werden (Rosa e Silva *et al.*, 2008). Auch dies unterstützt die Annahme, dass mit *P. haemolytica* sp. nov. keine humanpathogene Spezies vorliegt. Insgesamt konnten die biochemischen und phänotypischen Analysen das Vorliegen einer neuen Spezies bestätigen. Die chemotaxonomischen Charakterisierungen ergaben ebenfalls für diese Gattung typische Ergebnisse (Ergebnisse 2.4.2). Bei den respiratorischen Chinonen von WS 5063^T wurde Q9 als dominant ermittelt. Im Gegensatz zu *P. saxonica* sp. nov. konnten jedoch keine Spuren von Q7 nachgewiesen werden. Die zellulären Fettsäuren zeigten das für die *Pseudomonas fluorescens* Gruppe typische Muster, mit C16:0 mit 31,1 % als häufigste Fettsäureart (Tabelle 25). Bei den polaren Lipiden wurden zusätzlich zu jenen von *P. saxonica* sp. nov. noch ein Phospholipid und zwei Lipide gefunden (Abbildung 37).

Auch bei den Analysen zur Charakterisierung von *P. haemolytica* sp. nov. konnten einige Diskrepanzen zu den Originalbeschreibungen der verwendeten Referenzspezies detektiert werden. Urease-Aktivität konnte in der vorliegenden Arbeit lediglich für *P. aeruginosa* DSM 50071^T detektiert werden, wurde jedoch zudem für *P. canadensis* LMG 28499^T berichtet (Tambong *et al.*, 2017). Ebenfalls konnte die Produktion fluoreszierender Pigmente auf King B Agar bei *P. poae* DSM 14936^T nicht nachgewiesen werden (Behrendt *et al.*, 2003). Wie bei *P. saxonica* sp. nov. bereits beschrieben traten auch Abweichungen zu den berichteten tolerierten Wachstumsbedingungen auf.

Da auf Basis des polyphasischen Ansatzes das Vorliegen einer neuen Spezies gezeigt werden konnte, wurde WS 5063^T als Typstamm definiert und als DSM 108987^T bzw. LMG 31232^T in den oben genannten Stammsammlungen hinterlegt. Die Namensgebung von *P. haemolytica* sp. nov. (hae.mo.ly'ti.ca. Gr. neut. n. *haima* Blut; Gr. masc. adj. *lytikos* auflösend; N.L. fem. adj. *haemolytica*) basierte, wie bereits erwähnt, auf der starken β -Hämolyse. Die ebenfalls ausgeprägten Lysehöfe auf Caseinagar und Tributyrinagar sowohl bei Optimaltemperatur von 30 °C als auch bei 4 °C weisen auf ein hohes enzymatisches Verderbspotential dieser Gattung hin.

2.3 *Pseudomonas cremoris* sp. nov.

Bei den Einzelgenanalysen wiesen die Stämme WS 5106^T und WS 5096 sowohl bei der 16S rRNA als auch bei *rpoD* eine vollständige Sequenzhomologie auf (Ergebnisse 2.1.1). Aufgrund unterschiedlicher Isolationsorte und –medien wurde dennoch von dem Vorliegen zweier

unterschiedlicher Stämme ausgegangen. Auf Basis einer maximalen *rpoD*-Sequenzhomologie von 95,6 % zu *P. grimontii* DSM 17515^T konnten die Isolate keiner bisher bekannten Spezies zugeordnet werden. Auch in der 16S rRNA Phylogenie bildete die später als *Pseudomonas cremoris* sp. nov. bezeichnete Art einen abgegrenzten Ast (Abbildung 27). Auf Basis der Einzelgenanalysen sowie der MLSA-Phylogenie (Daten nicht gezeigt) wurden die Referenzspezies für die phänotypischen Analysen ausgewählt. Erst nach Abschluss der Arbeiten wurden *Pseudomonas kairouanensis* CECT 9766^T und *Pseudomonas nabeulensis* CECT 9765^T als nah verwandte Spezies publiziert (Oueslati *et al.*, 2019). Aus diesem Grund wurde ein aktueller phylogenetischer Baum berechnet, wobei statt MLSA eine hochauflösende Kerngenom-Phylogenie verwendet wurde. Hier konnte *P. cremoris* sp. nov. klar als eigener Ast von *P. kairouanensis* CECT 9766^T und *P. nabeulensis* CECT 9765^T abgegrenzt werden (Abbildung 30). Auch bei der ANIm-Analyse lag die Übereinstimmung bei maximal 90,1 % im Fall von *P. nabeulensis* CECT 9765^T, was das Vorliegen einer neuen Spezies bewies. Die Übereinstimmung zwischen WS 5106^T und WS 5096 war mit 99,9 % sehr hoch (Tabelle 20). Allerdings werden ANIm-Werte von bis zu 100 % für verschiedene Stämme der gleichen Spezies berichtet (Richter & Roselló-Móra, 2009).

Die Morphologie sowie die Wachstumsbedingungen von *P. cremoris* sp. nov. waren typisch für *Pseudomonas* und wiesen keine Besonderheiten auf (Ergebnisse 2.2.3, 2.3.3). WS 5106^T unterschied sich von WS 5096 durch die fehlende Produktion von fluoreszierenden Pigmenten auf King B Agar sowie die negative Urease-Reaktion. Dies unterstützt neben der Herkunft der Isolate die Hypothese des Vorliegens zweier unterschiedlicher Stämme. Der Vergleich der phänotypischen Eigenschaften von *P. cremoris* sp. nov. mit den am nächsten verwandten Arten war problematisch, da die Analysen zu *P. kairouanensis* CECT 9766^T und *P. nabeulensis* CECT 9765^T nicht in unserem Institut durchgeführt, sondern lediglich aus der Originalbeschreibung verwendet wurden (Tabelle 23). Allerdings wurden von diesen Autoren die meisten von uns analysierten Charakteristika nicht beschrieben. Dennoch konnte *P. cremoris* sp. nov. durch mindestens drei Faktoren von der phänotypisch am ähnlichsten Gattung *P. kairouanensis* CECT 9766^T unterschieden werden. Es wird vermutet, dass die Zahl der differenzierenden Charakteristika höher wäre, wenn die Ergebnisse aller Analysen für *P. kairouanensis* CECT 9766^T vorlägen. Das Heranziehen der Ergebnisse der Originalpublikation zum Vergleich ist zudem ungünstig, da, wie bereits erwähnt, unterschiedliche Gegebenheiten zwischen Instituten zu anderen Ergebnissen führen können. Dies konnte auch bei der β -Hämolyse bei *P. extremorientalis* DSM 15824^T festgestellt werden, die laut Ivanova *et al.* (2002) positiv ausfallen sollte. Gleiches galt auch für *P. simiae* DSM 18861^T (Vela *et al.*, 2006). Weiterhin konnten die berichtete Produktion fluoreszierender

Pigmente auf King B Agar bei *P. costantinii* DSM 16734^T sowie die positiven Reaktionen der Urease und Gelatinehydrolyse bei *P. canadensis* LMG 28499^T nicht nachgewiesen werden (Munsch *et al.*, 2002; Tambong *et al.*, 2017). Bei den chemotaxonomischen Analysen waren die Ergebnisse der respiratorischen Chinone vergleichbar zu *P. saxonica* sp. nov. und *P. haemolytica* sp. nov., da das dominante Chinon Q9 dem Anteil von ca. 90 % von *P. haemolytica* sp. nov. ähnelte, jedoch wie bei *P. saxonica* sp. nov. neben Q7 noch Spuren von Q10 detektiert wurden (Ergebnisse 2.4.3). Auch die Zusammensetzung der zellulären Fettsäuren ergab ähnliche Ergebnisse (Tabelle 26). Bei den polaren Lipiden konnten im Vergleich zu *P. haemolytica* sp. nov. zwei Lipide weniger, dafür zwei zusätzliche Phospholipide gefunden werden (Abbildung 38). Dennoch ist dies ein für *Pseudomonas* typisches Muster (Moore *et al.*, 2006).

Anhand der Ergebnisse der verschiedenen Analysen konnte *P. cremoris* sp. nov. ebenfalls als neue Spezies charakterisiert werden. WS 5106^T wurde als Typstamm mit den Stammsammlungsnummern DSM 111143^T bzw. LMG 31863^T bei der DSMZ bzw. BCCM/LMG hinterlegt. Der Name wurde anhand des Isolationsmediums Sahne des Typstamms abgeleitet (cre.mo'ris. L. gen. n. *cremoris*, aus Sahne). Da beide Stämme eine starke Proteolyse sowie Lipolyse bei 28 °C und bei Kühltemperaturen aufwiesen, wird das enzymatische Verderbspotential als hoch eingeschätzt.

2.4 Phänotypische Charakterisierungen in Zeiten von Hochdurchsatzsequenzierung

Die Charakterisierungen der drei neuen Spezies erfolgten anhand eines polyphasischen Ansatzes, der neben genetischen Markern auch biochemische, phylogenetische und chemotaxonomische Faktoren berücksichtigt. Insbesondere die biochemischen und phylogenetischen Analysen basieren hierbei auf traditionellen Methoden, wie sie vor der Verbreitung moderner Technologien wie der Genomsequenzierung zur Charakterisierung und Abgrenzung verwendet wurden (Thompson *et al.*, 2015). Wie bereits erwähnt können die Ergebnisse der Analysen häufig aufgrund unterschiedlicher Gegebenheiten in anderen Instituten nicht reproduziert werden. Die Auswertungen erfolgen zum Großteil visuell, beispielsweise anhand eines Farbumschlages, wie es der Fall bei der Säureproduktion aus Zuckern ist. Dieser ist häufig jedoch nicht klar definierbar. Unter anderem aus diesem Grund werden mindestens zwei biologische Replikate durchgeführt. Bei konträren Ergebnissen wurde in der vorliegenden Arbeit ein drittes oder viertes Replikat produziert. Insgesamt erfolgen die Auswertungen sehr subjektiv, da die Entscheidung, ob ein unklarer Farbumschlag als positiv oder negativ gewertet wird oder ob eine leichte Trübung im Anzuchtmedium auf Zellwachstum zurückzuführen ist, sprichwörtlich im Auge des Betrachters liegt. Die Ergebnisse

der Charakterisierung der α -Hämolyse, gekennzeichnet durch eine Grünfärbung des roten Blutagars, wurde beispielsweise in unseren Analysen nicht herangezogen. Alle analysierten Stämme inklusive des verwendeten Typstamms für die Negativkontrolle bzw. γ -Hämolyse, *Staphylococcus epidermidis* DSM 20044^T, wies eine dunkle Verfärbung des umliegenden Agars auf und es konnten keine eindeutigen Unterschiede zur Grünfärbung der α -Hämolyse identifiziert werden. Nun stellt sich die Frage, ob phänotypische oder traditionelle phylogenetische Analysen beispielsweise auf Basis der 16S rRNA in Zeiten von Hochdurchsatzsequenzierung noch ihre Berechtigung haben. Insbesondere bei der Publikation von *P. cremoris* sp. nov. wurde von den Prüfern kaum Wert auf die phänotypische Charakterisierung gelegt und die 16S rRNA Phylogenie, die nach wie vor als essentieller Bestandteil einer Neubeschreibung angesehen wird (Logan *et al.*, 2009; Tindall *et al.*, 2010), als nicht aussagekräftig eingestuft. Hier wurde der Fokus auf genombasierte Analysen wie der Kerngenom-Phylogenie sowie der ANI gelegt.

Vandamme & Peeters (2014) kritisierten insbesondere den zeitlichen Aufwand des polyphasischen Ansatzes zur Charakterisierung neuer Spezies, der zu grundsätzlichen Verzögerungen bei der prokaryotischen Taxonomie führe. Die parallele Analyse mehrerer Stämme der potentiellen neuen Art sei mit einem hohen Arbeitsaufwand verbunden und erschwere die Suche nach biochemischen differenzierenden Merkmalen. Gerade bei den Gram-negativen, nicht-fermentierenden Spezies sei es aufgrund der hohen Ähnlichkeiten problematisch, zwei oder mehr abgrenzende Faktoren zu finden. Dem gegenüber steht der Fakt, dass sich die Stämme untereinander häufig durch einige Charakteristika unterscheiden. Als Paradoxon führten die Autoren weiterhin auf, dass der Goldstandard zur Speziesabgrenzung, die DNA-DNA-Hybridisierung (DDH), etabliert wurde, um sich möglichst an die Informationen von Gesamtgenomsequenzen anzunähern. Heutzutage seien diese Informationen direkt verfügbar, dennoch möchte man die Ergebnisse an die physisch-chemischen Experimente der DDH anpassen. Die Autoren postulierten, dass in Zeiten der Hochdurchsatzsequenzierung eine Genomsequenz in Kombination mit der Beschreibung minimaler phänotypischer Charakteristika ausreichend seien und zu einer Beschleunigung der Aufklärung der prokaryotischen Taxonomie führen würden. Auch Thompson *et al.* (2015) sieht in dem hohen Arbeitsaufwand der phänotypischen Analysen, insbesondere durch den parallelen Vergleich mit nah verwandten Typstämmen, eine Hürde für Mikrobiologen zur validen Beschreibung neuer Arten. Demgegenüber stünden zahlreiche Genomsequenzen, die öffentlich hinterlegt wurden, aber keiner bisher beschriebenen Spezies zugeordnet werden können. Weiterhin könnten mit dem polyphasischen Ansatz unkultivierbare Spezies nicht charakterisiert werden. Insgesamt sei die Definition einer Spezies anhand dieses Ansatzes zu

breit gefasst und nicht auf dem evolutionären Spezies-Konzept basierend. Hierbei würden häufig ökologisch oder genomisch entfernte Populationen zur Beschreibung einer Spezies herangezogen. Zudem führe der Grenzwert von 70 % bei der DDH zu einer Unterschätzung der Speziesvielfalt und die 16S rRNA Phylogenie sei auf Speziesebene nicht auflösend genug. Ein Paradigmenwechsel hin zu Genom-basierten Methoden als Standards für Neubeschreibungen wurde von den Autoren als erstrebenswert angesehen. Zu diesen Methoden gehörten u.a. ANI, Kerngenomanalysen oder *in silico* Proteomanalysen. Unabdingbar sei letztendlich das Vorliegen von mindestens einer vollständigen Genomsequenz der Spezies. Aus dieser könnten phänotypische Charakteristika wie das Vorhandensein spezifischer Enzyme wie beispielsweise der Urease abgeleitet werden, ohne die zeitintensiven Analysen im Labor durchzuführen (Genotyp-zu-Phänotyp-Strategie). Die Autoren räumten jedoch Schwächen der aktuell praktizierten Genomsequenzierung und Annotation ein. Die meisten Genome würden beispielsweise bisher mit der *Next-Generation-Sequencing* Methodik ermittelt, die aufgrund kurzer *Read*-Längen zu Problemen bei der Assemblierung führe. Dies resultierte vorwiegend in *Draft*-Genomen, deren vollständiger Schluss sehr zeitaufwändig und teuer sei. Weiterhin sei die automatisierte Genomannotation fehleranfällig und nur für wenige Proteine wurde die Funktion bisher experimentell verifiziert. Diesen Autoren stehen Befürworter des etablierten, polyphasischen Ansatzes gegenüber. Oren & Garrity (2014) sehen beispielsweise trotz der Möglichkeit, in Zukunft *in silico* chemotaxonomische oder phänotypische Charakteristika vorherzusagen, keine Aussagen über die tatsächliche Expression der entsprechenden Gene im Labor oder dem natürlichen Habitat. Eine Verknüpfung ökologischer und phänotypischer Informationen mit Genomsequenzen sei zur Einordnung des Organismus im Mikrobiom und der Umwelt unabdingbar (Garrity, 2016). Letztendlich sei eine Ergänzung des polyphasischen Ansatzes durch robustere, Genom-basierte Marker laut Mahato *et al.* (2017) der Weg, um die Taxonomie und Systematik von Prokaryoten in das genomische Zeitalter fortschreiten zu lassen. Diese Sicht teilen auch andere Autoren (Chun & Rainey, 2014; Kämpfer & Glaeser, 2012), wie beispielsweise Ramasamy *et al.* (2014), welche ihre Strategie der Integration von genomischen Informationen in etablierte Methoden des polyphasischen Ansatzes als „*Taxono-Genomics*“ bezeichneten. Notwendig sei allerdings eine Zusammenstellung an empfohlenen Parametern oder Methoden zur Vereinheitlichung der Genomsequenz-basierten Analysen zur Charakterisierung neuer Arten (Mahato *et al.*, 2017). Ein solcher Ansatz wurde 2018 von Chun *et al.* (2018) publiziert. Bisher erfolgte jedoch noch kein international anerkannter Ersatz der etablierten DDH als Goldstandard zur Speziesabgrenzung durch Daten aus

Genomsequenzierungen oder die Aufnahme genombasierter Analysen als unabdingbarer Parameter zur validen Neubeschreibung einer Art.

Ich persönlich sehe in der Hochdurchsatzsequenzierung eine große Chance für die Taxonomie und Systematik und befürworte den Ersatz der DDH durch für eine valide Neubeschreibung essentielle, genombasierte Marker zur Speziesabgrenzung. Allerdings gehört zur Charakterisierung einer Spezies neben genomischen Aspekten auch die Sicht auf die Zelle als Ganzes, weshalb die Beschreibung von morphologischen und phänotypischen Eigenschaften unabdingbar ist. Weiterhin macht es meines Erachtens den Reiz der Mikrobiologie aus, mit Organismen im Labor zu arbeiten und die unendliche Vielfalt an Morphologien und Enzymreaktionen visuell charakterisieren zu können. Auch fortführende Arbeiten mit neuen Mikroorganismen benötigen Informationen zu Kultivierungsbedingungen, Enzymreaktionen oder der Morphologie.

Schlussfolgerung und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit sollten Einflussfaktoren auf die *Pseudomonas*-Belastung in Rohmilch sowie mögliche Eintrittsrouten beim Erzeuger untersucht werden. Die Ergebnisse ließen auf das Vorhandensein von Höfen schließen, deren Management zu hohen *Pseudomonas*-Keimzahlen in der Rohmilch führt. Unabhängig von der Stapeldauer am Hof wiesen deren Milchproben wiederholt hohe Belastungen mit dieser Gattung auf. Demgegenüber standen Höfe mit einem stabilen, von Gram-Positiven dominierten Rohmilchmikrobiom, das geringe *Pseudomonas*-Prävalenzen aufwies. Als Hof-spezifische Einflussfaktoren, die mit höheren *Pseudomonas*-Keimzahlen assoziiert waren, konnten eine Stapeldauer von zwei Tagen, kühle Jahreszeiten, die konventionelle Produktionsart, Tierhaltung ohne Auslauf oder Weidegang sowie eine Milchkühlung per Tauchkühler oder Vorlaufkühlung identifiziert werden. Da diese Faktoren teilweise nicht durch kurzfristige Maßnahmen beeinflusst werden, können keine schnell umsetzbaren Handlungsempfehlungen ausgesprochen werden, von denen eine Reduktion der *Pseudomonas*-Belastung erwartet wird. Allerdings zeigte eine Tierhaltung mit Auslauf oder Weidegang die größte Effektstärke, sowohl bei Lauf- als auch bei Anbindestallhaltung, weshalb dies eine langfristige Möglichkeit zur Senkung der *Pseudomonas*-Belastung in Rohmilch sein könnte. In zukünftigen Analysen sollten die Interaktionen der möglichen Einflussfaktoren berücksichtigt werden, da der Effekt der Produktionsart beispielsweise durch die unterschiedlichen Standards für Tierhaltung bei ökologischen und konventionellen Höfen erklärt werden könnte. Bei der Identifikation möglicher Eintrittsrouten beim Erzeuger ergaben sich hof-spezifische, individuelle Schwachstellen. Grundsätzlich wird eine manuelle Reinigung von Bereichen empfohlen, die schwer von der automatischen Spülung erreicht werden. Durch eine wiederholte Beprobung der Betriebe nach Umsetzung der Empfehlungen durch den Landwirt könnten weitere Informationen zu möglichen Eintrittsrouten identifiziert werden. Bei Rohmilchtransport im Sammelwagen kann es, vermutlich durch unzureichende Reinigung, zu einem Anstieg der *Pseudomonas*-Keimzahlen kommen. Daher wird eine Überprüfung und bei Bedarf Intensivierung der Hygienepraktiken empfohlen. Weitere Studien zur Identifikation möglicher Kontaminationsrouten in den Sammelwägen könnten hierbei unterstützend sein. Die Rohmilchstapelung in der Molkerei hat auf Basis dieser Arbeit nur einen geringen Einfluss auf die *Pseudomonas*-Keimzahlen, jedoch konnte die typische Verschiebung des Rohmilchmikrobioms hin zu Gram-negativen, psychrotoleranten Gattungen bei kühler Lagerung beobachtet werden.

Insgesamt liefern die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit Anknüpfungspunkte für zukünftige Studien, die konkrete Empfehlungen zur Reduktion des *Pseudomonas*-Eintrages beim Erzeuger etablieren könnten. Allerdings zeigten die Daten der Sammeltouren, dass Handlungsbedarf auch bei den Molkereien liegt. Zur schnellen Beurteilung der Rohmilchqualität wäre für die Zukunft ein Analysewerkzeug wünschenswert, das direkt die Peptidasekonzentrationen der Milch bei Anlieferung an die Molkerei quantifiziert. Auf dieser Basis könnte Enzym-arme Rohmilch gezielt für die Produktion haltbarer Produkte herangezogen werden, wohingegen Milch mit hohem Risiko für den enzymatischen Verderb für Frischmilchprodukte verwendet wird. Hierzu wurden bereits Untersuchungen auf Antikörper-Basis durchgeführt (Volk *et al.*, 2021). Bis zur Etablierung kann lediglich anhand der Pseudomonaden-Keimzahl eine Abschätzung des enzymatischen Potentials erfolgen. Diese könnte daher als neuer Qualitätsparameter für Rohmilch eingeführt werden, ähnlich zu dem Sporengelalt bei Käseemilch.

Anhand eines polyphasischen Ansatzes wurden im Rahmen dieser Arbeit drei *Pseudomonas*-Spezies charakterisiert und valide publiziert (*P. saxonica* sp. nov., *P. haemolytica* sp. nov. und *P. cremoris* sp. nov.). Aufgrund ihres enzymatischen Potentials wird eine Relevanz für die Milchindustrie vermutet. Weiterführende Analysen könnten dies anhand der Prävalenz der drei Spezies in deutscher Rohmilch sowie der Quantifizierung der Proteaseproduktion, beispielsweise mit einem Azocasein-Assay bei verschiedenen Lagerungstemperaturen, bestätigen. Letztendlich steht die Taxonomie und Systematik durch neue, genombasierte Methodiken vor großen Veränderungen und eine Aufnahme genomischer Marker als essentieller Bestandteil einer validen Neubeschreibung ist zu erwarten.

Literaturverzeichnis

- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J.** (1990). Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*, 215(3), 503-410. doi:10.1016/S0022-2836(05)80360-2
- Amagliani, G., Petruzzelli, A., Omiccioli, E., Tonucci, F., Magnani, M., & Brandi, G.** (2012). Microbiological surveillance of a bovine raw milk farm through multiplex real-time PCR. *Foodborne Pathog Dis*, 9(5), 406-411. doi:10.1089/fpd.2011.1041
- Anderegg, F.** (1894). *Allgemeine Geschichte der Milchwirtschaft*. Cornell University: Art. Institut Orell Füssli.
- Archer, D. L.** (2004). Freezing: an underutilized food safety technology? *Int J Food Microbiol*, 90(2), 127-138. doi:10.1016/s0168-1605(03)00215-0
- Bankevich, A., Nurk, S., Antipov, D., Gurevich, A. A., Dvorkin, M., Kulikov, A. S., et al.** (2012). SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J Comput Biol*, 19(5), 455-477. doi:10.1089/cmb.2012.0021
- Barach, J. T., & Adams, D. M.** (1977). Thermostability at ultrahigh temperatures of Thermolysin and a protease from a psychrotrophic *Pseudomonas*. *Biochemica et Biophysica Acta*, 485, 417-423.
- Baur, C., Krewinkel, M., Kranz, B., von Neubeck, M., Wenning, M., Scherer, S., et al.** (2015a). Quantification of the proteolytic and lipolytic activity of microorganisms isolated from raw milk. *Int Dairy J*, 49, 23-29. doi:10.1016/j.idairyj.2015.04.005
- Baur, C., Krewinkel, M., Kutzli, I., Kranz, B., von Neubeck, M., Huptas, C., et al.** (2015b). Isolation and characterisation of a heat-resistant peptidase from *Pseudomonas panacis* withstanding general UHT processes. *Int Dairy J*, 49, 46-55. doi:10.1016/j.idairyj.2015.04.009
- Bava, L., Zucali, M., Brasca, M., Zanini, L., & Sandrucci, A.** (2009). Efficiency of cleaning procedure of milking equipment and bacterial quality of milk. *Ital J Anim Sci*, 8, 387-389.
- Bava, L., Zucali, M., Sandrucci, A., Brasca, M., Vanoni, L., Zanini, L., et al.** (2011). Effect of cleaning procedure and hygienic condition of milking equipment on bacterial count of bulk tank milk. *J Dairy Res*, 78(2), 211-219. doi:10.1017/S002202991100001X
- Bayliss, S. C., Thorpe, H. A., Coyle, N. M., Sheppard, S. K., & Feil, E. J.** (2019). PIRATE: A fast and scalable pangenomics toolbox for clustering diverged orthologues in bacteria. *Gigascience*, 8(10). doi:10.1093/gigascience/giz119
- 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. *Int J Syst Evol Microbiol*, 53(Pt 5), 1461-1469. doi:10.1099/ijs.0.02567-0
- Behrendt, U., Ulrich, A., Schumann, P., Meyer, J. M., & Sproer, C.** (2007). *Pseudomonas lurida* sp. nov., a fluorescent species associated with the phyllosphere of grasses. *Int J Syst Evol Microbiol*, 57(Pt 5), 979-985. doi:10.1099/ijs.0.64793-0
- Bell, C., Stallard, P. A., Brown, S. E., & Standley, J. T. E.** (1994). ATP-Bioluminescence Techniques for Assessing the Hygienic Condition of Milk Transport Tankers. *Int Dairy J*, 4, 629-640.
- Benson, D. A., Cavanaugh, M., Clark, K., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D. J., Ostell, J., et al.** (2013). GenBank. *Nucleic Acids Res*, 41, D36-42. doi:10.1093/nar/gks1195

- Bergey, D. H.** (1923). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Baltimore: Williams & Wilkins Company.
- Berry, D., Ben Mahfoudh, K., Wagner, M., & Loy, A.** (2011). Barcoded primers used in multiplex amplicon pyrosequencing bias amplification. *Appl Environ Microbiol*, 77(21), 7846-7849. doi:10.1128/AEM.05220-11
- Bligh, E. G., & Dyer, W. J.** (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol*, 37, 911-917. doi:10.1139/o59-099
- Bolger, A. M., Lohse, M., & Usadel, B.** (2014). Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30(15), 2114-2120. doi:10.1093/bioinformatics/btu170
- Börgermann, B.** (2020). Fakten Milch - Informationsbroschüre des Milchindustrie-Verbandes e.V., September 2020. Retrieved from <https://milchindustrie.de/wp-content/uploads/2020/09/Fakten-Milch-September-2020.pdf> on 19.04.2021
- Breitenwieser, F., Doll, E. V., Clavel, T., Scherer, S., & Wenning, M.** (2020). Complementary Use of Cultivation and High-Throughput Amplicon Sequencing Reveals High Biodiversity Within Raw Milk Microbiota. *Front Microbiol*, 11, 1557. doi:10.3389/fmicb.2020.01557
- Capodifoglio, E., Vidal, A. M. C., Lima, J. A. S., Bortoletto, F., D'Abreu, L. F., Goncalves, A. C. S., et al.** (2016). Lipolytic and proteolytic activity of *Pseudomonas* spp. isolated during milking and storage of refrigerated raw milk. *J Dairy Sci*, 99(7), 5214-5223. doi:10.3168/jds.2015-10453
- Carafa, I., Navarro, I. C., Bittante, G., Tagliapietra, F., Gallo, L., Tuohy, K., et al.** (2020). Shift in the cow milk microbiota during alpine pasture as analyzed by culture dependent and high-throughput sequencing techniques. *Food Microbiol*, 91, 103504. doi:10.1016/j.fm.2020.103504
- Carrion, O., Minana-Galbis, D., Montes, M. J., & Mercade, E.** (2011). *Pseudomonas deceptionensis* sp. nov., a psychrotolerant bacterium from the Antarctic. *Int J Syst Evol Microbiol*, 61(Pt 10), 2401-2405. doi:10.1099/ijs.0.024919-0
- 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*. *J Bacteriol*, 183(6), 2117-2120. doi:10.1128/JB.183.6.2117-2120.2001
- Chain, P. S., Grafham, D. V., Fulton, R. S., Fitzgerald, M. G., Hostetler, J., Muzny, D., et al.** (2009). Genomics. Genome project standards in a new era of sequencing. *Science*, 326(5950), 236-237. doi:10.1126/science.1180614
- Champagne, C. P., Laing, R. R., Roy, D., Mafu, A. A., Griffiths, M. W., & White, C.** (1994). Psychrotrophs in dairy products: their effects and their control. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 34(1), 1-30.
- Charlton, S., Ramsøe, A., Collins, M., Craig, O. E., Fischer, R., Alexander, M., et al.** (2019). New insights into Neolithic milk consumption through proteomic analysis of dental calculus. *Archaeol Anthropol Sci*, 11(11), 6183-6196. doi:10.1007/s12520-019-00911-7
- Cheng, X., de Bruijn, I., van der Voort, M., Loper, J. E., & Raaijmakers, J. M.** (2013). The Gac regulon of *Pseudomonas fluorescens* SBW25. *Environ Microbiol Rep*, 5(4), 608-619. doi:10.1111/1758-2229.12061

- Cherif-Antar, A., Moussa–Boudjemâa, B., Didouh, N., Medjahdi, K., Mayo, B., & Flórez, A. B.** (2016). Diversity and biofilm-forming capability of bacteria recovered from stainless steel pipes of a milk-processing dairy plant. *Dairy Sci Technol*, *96*(1), 27-38. doi:10.1007/s13594-015-0235-4
- Chun, J., Oren, A., Ventosa, A., Christensen, H., Arahal, D. R., da Costa, M. S., et al.** (2018). Proposed minimal standards for the use of genome data for the taxonomy of prokaryotes. *Int J Syst Evol Microbiol*, *68*(1), 461-466. doi:10.1099/ijsem.0.002516
- Chun, J., & Rainey, F. A.** (2014). Integrating genomics into the taxonomy and systematics of the Bacteria and Archaea. *Int J Syst Evol Microbiol*, *64*(Pt 2), 316-324. doi:10.1099/ijs.0.054171-0
- Coe, R.** (2002). It's the effect size, stupid: What effect size is and why it is important. Paper presented at the Annual Conference of the British Educational Research Association, *University of Exeter*, England.
- Cohen, J.** (1988). *Statistical Power Analysis for the Behavioral Sciences* (2nd Edition ed.). New York: Routledge.
- Cole, J. R., Wang, Q., Fish, J. A., Chai, B., McGarrell, D. M., Sun, Y., et al.** (2014). Ribosomal Database Project: data and tools for high throughput rRNA analysis. *Nucleic Acids Res*, *42*(Database issue), D633-642. doi:10.1093/nar/gkt1244
- Coorevits, A., De Jonghe, V., Vandroemme, J., Van Landschoot, A., Heyndrickx, M., & De Vos, P.** (2010). How can the type of dairy farming influence the bacterial flora in milk? *Organic Farming and Peanut Crops*, 123-136.
- Cousin, M. A.** (1982). Presence and Activity of Psychrotrophic Microorganisms in Milk and Dairy Products: A Review. *J Food Prot*, *45*(2), 172-207. doi:10.4315/0362-028X-45.2.172
- Daboussi, F., Hamze, M., Elomari, M., Verhille, S., Baida, N., Izard, D., et al.** (1999). *Pseudomonas libanensis* sp. nov., a new species isolated from Lebanese spring waters. *Int J Syst Evol Microbiol*, *49*, 1091-1101.
- Darchuk, E. M., Meunier-Goddik, L., & Waite-Cusic, J.** (2015a). Microbial quality of raw milk following commercial long-distance hauling. *J Dairy Sci*, *98*(12), 8572-8576.
- Darchuk, E. M., Waite-Cusic, J., & Meunier-Goddik, L.** (2015b). Effect of commercial hauling practices and tanker cleaning treatments on raw milk microbiological quality. *J Dairy Sci*, *98*(10), 7384-7393.
- De Jonghe, V., Coorevits, A., Van Hoorde, K., Messens, W., Van Landschoot, A., De Vos, P., et al.** (2011). Influence of storage conditions on the growth of *Pseudomonas* species in refrigerated raw milk. *Appl Environ Microbiol*, *77*(2), 460-470. doi:10.1128/AEM.00521-10
- Destatis.** (2016). Land und Forstwirtschaft, Fischerei; Viehhaltung der Betriebe: Agrarstrukturhebung. Retrieved from https://www.destatis.de/DE/Themen/Branchen-Unternehmen/Landwirtschaft-Forstwirtschaft-Fischerei/Tiere-Tierische-Erzeugung/Publikationen/Downloads-Tiere-und-tierische-Erzeugung/viehhaltung-2030213169004.pdf?__blob=publicationFile on 03.02.2020
- Dogan, B., & Boor, K. J.** (2003). Genetic diversity and spoilage potentials among *Pseudomonas* spp. isolated from fluid milk products and dairy processing plants. *Appl Environ Microbiol*, *69*(1), 130-138. doi:10.1128/aem.69.1.130-138.2003
- Dommett, T. W., Baseby, L. J., & Wighton, P. A.** (1980). Influence of tanker cleaning procedures on bacterial counts of farm milk. *Aust J Dairy Technol*, *35*, 128-131.

- Doyle, C. J., Gleeson, D., O'Toole, P. W., & Cotter, P. D.** (2017a). High-throughput metataxonomic characterization of the raw milk microbiota identifies changes reflecting lactation stage and storage conditions. *Int J Food Microbiol*, *255*, 1-6. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2017.05.019
- Doyle, C. J., Gleeson, D., O'Toole, P. W., & Cotter, P. D.** (2017b). Impacts of Seasonal Housing and Teat Preparation on Raw Milk Microbiota: a High-Throughput Sequencing Study. *Appl Environ Microbiol*, *83*(2). doi:10.1128/AEM.02694-16
- Dufour, D., Nicodeme, M., Perrin, C., Driou, A., Brusseau, E., Humbert, G., et al.** (2008). Molecular typing of industrial strains of *Pseudomonas* spp. isolated from milk and genetical and biochemical characterization of an extracellular protease produced by one of them. *Int J Food Microbiol*, *125*(2), 188-196. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2008.04.004
- Dungan, R. S.** (2012). Use of a culture-independent approach to characterize aerosolized bacteria near an open-freestall dairy operation. *Environ Int*, *41*, 8-14. doi:10.1016/j.envint.2011.12.004
- Edgar, R. C.** (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res*, *32*(5), 1792-1797. doi:10.1093/nar/gkh340
- Edgar, R. C.** (2010). Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics*, *26*(19), 2460-2461. doi:10.1093/bioinformatics/btq461
- Edgar, R. C.** (2013). UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads. *Nat Methods*, *10*(10), 996-998. doi:10.1038/nmeth.2604
- Edgar, R. C.** (2018). Updating the 97% identity threshold for 16S ribosomal RNA OTUs. *Bioinformatics*, *34*(14), 2371-2375. doi:10.1093/bioinformatics/bty113
- Edgar, R. C., Haas, B. J., Clemente, J. C., Quince, C., & Knight, R.** (2011). UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics*, *27*(16), 2194-2200. doi:10.1093/bioinformatics/btr381
- Eichholz, W.** (1902). Erdbeerbacillus (*Bacterium fragi*). *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene, Abteilung II*(9), 425-428.
- Flach, J., Grzybowski, V., Toniazzo, G., & Corção, G.** (2014). Adhesion and production of degrading enzymes by bacteria isolated from biofilms in raw milk cooling tanks. *Food Sci Technol (Campinas)*, *34*(3), 571-576. doi:10.1590/1678-457x.6374
- Frank, J.** (2007). Milk and Dairy Products. In B. L. Doyle M (Ed.), *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers, Third Edition* (pp. 141-155). Washington DC: ASM Press.
- Fretin, M., Martin, B., Rifa, E., Isabelle, V. M., Pomies, D., Ferlay, A., et al.** (2018). Bacterial community assembly from cow teat skin to ripened cheeses is influenced by grazing systems. *Sci Rep*, *8*(1), 200. doi:10.1038/s41598-017-18447-y
- 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. *Int J Food Microbiol*, *145*, S24-S30.
- Frister, H.** (2007). Zusammensetzung der Milch. In V. Krömker (Ed.), *Kurzes Lehrbuch Milchkunde und Milchhygiene* (pp. 80-101). Stuttgart: Paray.
- Frolund, B., Griebe, T., & Nielsen, P. H.** (1995). Enzymatic activity in the activated-sludge floc matrix. *Appl Microbiol Biotechnol*, *43*(4), 755-761. doi:10.1007/BF00164784

- Fusco, V., Chieffi, D., Fanelli, F., Logrieco, A. F., Cho, G. S., Kabisch, J., et al.** (2020). Microbial quality and safety of milk and milk products in the 21st century. *Compr Rev Food Sci Food Saf*, 19(4), 2013-2049. doi:10.1111/1541-4337.12568
- Galazzo, G., van Best, N., Benedikter, B. J., Janssen, K., Bervoets, L., Driessen, C., et al.** (2020). How to Count Our Microbes? The Effect of Different Quantitative Microbiome Profiling Approaches. *Front Cell Infect Microbiol*, 10, 403. doi:10.3389/fcimb.2020.00403
- Gallie, J., Bertels, F., Remigi, P., Ferguson, G. C., Nestmann, S., & Rainey, P. B.** (2019). Repeated Phenotypic Evolution by Different Genetic Routes in *Pseudomonas fluorescens* SBW25. *Mol Biol Evol*, 36(5), 1071-1085. doi:10.1093/molbev/msz040
- Gallie, J., Libby, E., Bertels, F., Remigi, P., Jendresen, C. B., Ferguson, G. C., et al.** (2015). Bistability in a metabolic network underpins the de novo evolution of colony switching in *Pseudomonas fluorescens*. *PLoS Biol*, 13(3), e1002109. doi:10.1371/journal.pbio.1002109
- Garrido-Sanz, D., Meier-Kolthoff, J. P., Goker, M., Martin, M., Rivilla, R., & Redondo-Nieto, M.** (2016). Genomic and Genetic Diversity within the *Pseudomonas fluorescens* Complex. *PLoS One*, 11(2), e0150183. doi:10.1371/journal.pone.0150183
- Garrity, G. M.** (2016). A New Genomics-Driven Taxonomy of Bacteria and Archaea: Are We There Yet? *J Clin Microbiol*, 54(8), 1956-1963. doi:10.1128/JCM.00200-16
- Gevers, D., Dawyndt, P., Vandamme, P., Willems, A., Vancanneyt, M., Swings, J., et al.** (2006). Stepping stones towards a new prokaryotic taxonomy. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 361(1475), 1911-1916. doi:10.1098/rstb.2006.1915
- Gieschler, S., Fiedler, G., Böhnlein, C., Grimmmler, C., Franz, C., & Kabisch, J.** (2019). *Pseudomonas kielensis* sp. nov. and *Pseudomonas baltica* sp. nov., isolated from raw milk in Germany. *Int J Syst Evol Microbiol*, 71(3). doi:10.1099/ijsem.0.004717
- Girard, L., Lood, C., Rokni-Zadeh, H., van Noort, V., Lavigne, R., & De Mot, R.** (2020). Reliable Identification of Environmental *Pseudomonas* Isolates Using the *rpoD* Gene. *Microorganisms*, 8(8). doi:10.3390/microorganisms8081166
- Gomes, S. I. F., van Bodegom, P. M., van Agtmaal, M., Soudzilovskaia, N. A., Bestman, M., Duijm, E., et al.** (2020). Microbiota in Dung and Milk Differ Between Organic and Conventional Dairy Farms. *Front Microbiol*, 11, 1746. doi:10.3389/fmicb.2020.01746
- Gomila, M., Pena, A., Mulet, M., Lalucat, J., & Garcia-Valdes, E.** (2015). Phylogenomics and systematics in *Pseudomonas*. *Front Microbiol*, 6, 214. doi:10.3389/fmicb.2015.00214
- Guinot-Thomas, P., Ammourey, M. A., & Laurent, F.** (1995). Effects of storage conditions on the composition of raw milk. *Int Dairy J*, 5, 211-223.
- Hahne, J., Isele, D., Berning, J., & Lipski, A.** (2019). The contribution of fast growing, psychrotrophic microorganisms on biodiversity of refrigerated raw cow's milk with high bacterial counts and their food spoilage potential. *Food Microbiol*, 79, 11-19. doi:10.1016/j.fm.2018.10.019
- Han, B., Johnstone, K., & Pain, A.** (1997). Spontaneous duplication of a 661 bp element within a two-component sensor regulator gene causes phenotypic switching in colonies of *Pseudomonas tolaasii*, cause of brown blotch disease of mushrooms. *Mol Microbiol*, 25(2), 211-218.
- Hantsis-Zacharov, E., & Halpern, M.** (2007). Culturable psychrotrophic bacterial communities in raw milk and their proteolytic and lipolytic traits. *Appl Environ Microbiol*, 73(22), 7162-7168. doi:10.1128/AEM.00866-07

- Häussler, S. (2004). Biofilm formation by the small colony variant phenotype of *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ Microbiol*, 6(6), 546-551. doi:10.1111/j.1462-2920.2004.00618.x
- Hoang, D. T., Chernomor, O., von Haeseler, A., Minh, B. Q., & Vinh, L. S. (2018). UFBoot2: Improving the Ultrafast Bootstrap Approximation. *Mol Biol Evol*, 35(2), 518-522. doi:10.1093/molbev/msx281
- Hofmann, K., Huptas, C., Doll, E. V., Scherer, S., & Wenning, M. (2020a). *Pseudomonas haemolytica* sp. nov., isolated from raw milk and skimmed milk concentrate. *Int J Syst Evol Microbiol*, 70(4), 2339-2347. doi:10.1099/ijsem.0.004043
- Hofmann, K., Huptas, C., Doll, E. V., Scherer, S., & Wenning, M. (2020b). *Pseudomonas saxonica* sp. nov., isolated from raw milk and skimmed milk concentrate. *Int J Syst Evol Microbiol*, 70(2), 935-943. doi:10.1099/ijsem.0.003851
- Hofmann, K., Woller, A., Huptas, C., Wenning, M., Scherer, S., & Doll, E. V. (2021). *Pseudomonas cremoris* sp. nov., a novel proteolytic species isolated from cream. *Int J Syst Evol Microbiol*, 71(1). doi:10.1099/ijsem.0.004597
- 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 Res Notes*, 9, 269. doi:10.1186/s13104-016-2072-9
- Ivanova, E. P., Gorshkova, N. M., Sawabe, T., Hayashi, K., Kalinovskaya, N. I., Lysenko, A. M., et al. (2002). *Pseudomonas extremorientalis* sp. nov., isolated from a drinking water reservoir. *Int J Syst Evol Microbiol*, 52(Pt 6), 2113-2120. doi:10.1099/00207713-52-6-2113
- Jian, C., Luukkonen, P., Yki-Jarvinen, H., Salonen, A., & Korpela, K. (2020). Quantitative PCR provides a simple and accessible method for quantitative microbiota profiling. *PLoS One*, 15(1), e0227285. doi:10.1371/journal.pone.0227285
- Jungbluth, T., Büscher, W., & Krause, M. (2017). *Technik Tierhaltung* (Vol. 2). Deutschland: UTB GmbH.
- Kable, M. E., Srisengfa, Y., Laird, M., Zaragoza, J., McLeod, J., Heidenreich, J., et al. (2016). The Core and Seasonal Microbiota of Raw Bovine Milk in Tanker Trucks and the Impact of Transfer to a Milk Processing Facility. *mBio*, 7(4). doi:10.1128/mBio.00836-16
- Kämpfer, P., & Glaeser, S. P. (2012). Prokaryotic taxonomy in the sequencing era--the polyphasic approach revisited. *Environ Microbiol*, 14(2), 291-317. doi:10.1111/j.1462-2920.2011.02615.x
- Kämpfer, P., & Kroppenstedt, R. M. (1996). Numerical analysis of fatty acid patterns of coryneform bacteria and related taxa. *Can J Microbiol*, 42, 989-1005.
- 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. *Int J Syst Evol Microbiol*, 64(Pt 2), 346-351. doi:10.1099/ijms.0.059774-0
- Kim, O. S., Cho, Y. J., Lee, K., Yoon, S. H., Kim, M., Na, H., et al. (2012). Introducing EzTaxon-e: a prokaryotic 16S rRNA gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species. *Int J Syst Evol Microbiol*, 62(Pt 3), 716-721. doi:10.1099/ijms.0.038075-0
- King, E. O., Ward, M. K., & Raney, D. E. (1954). Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *J Lab Clin Med*, 44, 301-307.
- Klindworth, A., Pruesse, E., Schweer, T., Peplies, J., Quast, C., Horn, M., et al. (2013). Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Res*, 41(1), e1. doi:10.1093/nar/gks808

- Kopylova, E., Noe, L., & Touzet, H.** (2012). SortMeRNA: fast and accurate filtering of ribosomal RNAs in metatranscriptomic data. *Bioinformatics*, 28(24), 3211-3217. doi:10.1093/bioinformatics/bts611
- Krömker, V.** (2006). *Kurzes Lehrbuch Milchkunde und Milchhygiene*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
- Kuehn, J. S., Gorden, P. J., Munro, D., Rong, R., Dong, Q., Plummer, P. J., et al.** (2013). Bacterial community profiling of milk samples as a means to understand culture-negative bovine clinical mastitis. *PLoS One*, 8(4), e61959. doi:10.1371/journal.pone.0061959
- Kuhn, E., Meunier-Goddik, L., & Waite-Cusic, J. G.** (2018). Effect of leaving milk trucks empty and idle for 6 h between raw milk loads. *J Dairy Sci*, 101(2), 1767-1776. doi:10.3168/jds.2017-13387
- Kuykendall, L., Roy, M. A., O'Neill, J., & Devine, T.** (1988). Fatty acids, antibiotic resistance, and deoxyribonucleic acid homology groups of *Bradyrhizobium japonicum*. *Int J Syst Evol Microbiol*, 38, 358 - 361. doi:10.1099/00207713-38-4-358
- Lafarge, V., Ogier, J. C., Girard, V., Maladen, V., Leveau, J. Y., Gruss, A., et al.** (2004). Raw cow milk bacterial population shifts attributable to refrigeration. *Appl Environ Microbiol*, 70(9), 5644-5650. doi:10.1128/AEM.70.9.5644-5650.2004
- Lagkouvardos, I., Fischer, S., Kumar, N., & Clavel, T.** (2017). Rhea: a transparent and modular R pipeline for microbial profiling based on 16S rRNA gene amplicons. *PeerJ*, 5, e2836. doi:10.7717/peerj.2836
- Lagkouvardos, I., Joseph, D., Kapfhammer, M., Giritli, S., Horn, M., Haller, D., et al.** (2016). IMNGS: A comprehensive open resource of processed 16S rRNA microbial profiles for ecology and diversity studies. *Sci Rep*, 6, 33721. doi:10.1038/srep33721
- Lapage, S. P., Sneath, P. H. A., Lessel, E. F., Skerman, V. B. D., Seeliger, H. P. R., & Clark, W. A.** (1992). In *International Code of Nomenclature of Bacteria: Bacteriological Code, 1990 Revision*. Washington (DC): ASM Press.
- Latorre, A. A., Van Kessel, J. A., Karns, J. S., Zurakowski, M. J., Pradhan, A. K., Zadoks, R. N., et al.** (2009). Molecular ecology of *Listeria monocytogenes*: evidence for a reservoir in milking equipment on a dairy farm. *Appl Environ Microbiol*, 75(5), 1315-1323. doi:10.1128/AEM.01826-08
- Latorre, A. A., Van Kessel, J. S., Karns, J. S., Zurakowski, M. J., Pradhan, A. K., Boor, K. J., et al.** (2010). Biofilm in milking equipment on a dairy farm as a potential source of bulk tank milk contamination with *Listeria monocytogenes*. *J Dairy Sci*, 93(6), 2792-2802. doi:10.3168/jds.2009-2717
- Ledenbach, L. H., & Marshall, R. T.** (2009). Microbiological Spoilage of Dairy Products. In *Compendium of the Microbiological Spoilage of Foods and Beverages* (pp. 41-67).
- Leonardi, M., Gerbault, P., Thomas, M. G., & Burger, J.** (2012). The evolution of lactase persistence in Europe. A synthesis of archaeological and genetic evidence. *Int Dairy J*, 22(2), 88-97. doi:10.1016/j.idairyj.2011.10.010
- Leriche, F., & Fayolle, K.** (2012). No seasonal effect on culturable pseudomonads in fresh milks from cattle herds. *J Dairy Sci*, 95(5), 2299-2306. doi:10.3168/jds.2011-4785
- Letunic, I., & Bork, P.** (2019). Interactive Tree Of Life (iTOL) v4: recent updates and new developments. *Nucleic Acids Res*, 47(W1), W256-W259. doi:10.1093/nar/gkz239

- Li, N., Wang, Y., You, C., Ren, J., Chen, W., Zheng, H., et al.** (2018). Variation in Raw Milk Microbiota Throughout 12 Months and the Impact of Weather Conditions. *Sci Rep*, 8(1), 2371. doi:10.1038/s41598-018-20862-8
- Lick, S., Kröckel, L., Wibberg, D., Winkler, A., Blom, J., Bantleon, A., et al.** (2020a). *Pseudomonas carnis* sp. nov., isolated from meat. *Int J Syst Evol Microbiol*, 70(3), 1528-1540. doi:10.1099/ijsem.0.003928
- Lick, S., Kröckel, L., Wibberg, D., Winkler, A., Blom, J., Goesmann, A., et al.** (2020b). *Pseudomonas bubulae* sp. nov., isolated from beef. *Int J Syst Evol Microbiol*, 70(1), 292-301. doi:10.1099/ijsem.0.003751
- Lima, S. F., Bicalho, M. L. S., & Bicalho, R. C.** (2018). Evaluation of milk sample fractions for characterization of milk microbiota from healthy and clinical mastitis cows. *PLoS One*, 13(3), e0193671. doi:10.1371/journal.pone.0193671
- Logan, N. A., Berge, O., Bishop, A. H., Busse, H. J., De Vos, P., Fritze, D., et al.** (2009). Proposed minimal standards for describing new taxa of aerobic, endospore-forming bacteria. *Int J Syst Evol Microbiol*, 59(Pt 8), 2114-2121. doi:10.1099/ijms.0.013649-0
- Lucey, J. A.** (2015). Raw Milk Consumption: Risks and Benefits. *Nutr Today*, 50(4), 189-193. doi:10.1097/NT.0000000000000108
- Machado, S. G., Baglinière, F., Marchand, S., Van Coillie, E., Vanetti, M. C. D., De Block, J., et al.** (2017). The Biodiversity of the Microbiota Producing Heat-Resistant Enzymes Responsible for Spoilage in Processed Bovine Milk and Dairy Products. *Front Microbiol*, 8(302). doi:10.3389/fmicb.2017.00302
- Mackenbach, J. P.** (2004). Carl von Linné, Thomas McKeown, and the inadequacy of disease classifications. *Eur J Pub Health*, 14(3), 225-225. doi:10.1093/eurpub/14.3.225
- Mahato, N. K., Gupta, V., Singh, P., Kumari, R., Verma, H., Tripathi, C., et al.** (2017). Microbial taxonomy in the era of OMICS: application of DNA sequences, computational tools and techniques. *Antonie van Leeuwenhoek*, 110(10), 1357-1371. doi:10.1007/s10482-017-0928-1
- Maier, C., Hofmann, K., Huptas, C., Scherer, S., Wenning, M., & Lucking, G.** (2021). Simultaneous quantification of the most common and proteolytic *Pseudomonas* species in raw milk by multiplex qPCR. *Appl Microbiol Biotechnol*, 105(4), 1693-1708. doi:10.1007/s00253-021-11109-0
- Maier, C., Huptas, C., von Neubeck, M., Scherer, S., Wenning, M., & Lucking, G.** (2020). Genetic Organization of the *aprX-lipA2* Operon Affects the Proteolytic Potential of *Pseudomonas* Species in Milk. *Front Microbiol*, 11, 1190. doi:10.3389/fmicb.2020.01190
- Mallet, A., Guéguen, M., Kauffmann, F., Chesneau, C., Sesboué, A., & Desmasures, N.** (2012). Quantitative and qualitative microbial analysis of raw milk reveals substantial diversity influenced by herd management practices. *Int Dairy J*, 27(1-2), 13-21. doi:10.1016/j.idairyj.2012.07.009
- Marchand, S., Heylen, K., Messens, W., Coudijzer, K., De Vos, P., Dewettinck, K., et al.** (2009a). Seasonal influence on heat-resistant proteolytic capacity of *Pseudomonas lundensis* and *Pseudomonas fragi*, predominant milk spoilers isolated from Belgian raw milk samples. *Environ Microbiol*, 11(2), 467-482. doi:10.1111/j.1462-2920.2008.01785.x
- Marchand, S., Vandriesche, G., Coorevits, A., Coudijzer, K., De Jonghe, V., Dewettinck, K., et al.** (2009b). Heterogeneity of heat-resistant proteases from milk *Pseudomonas* species. *Int J Food Microbiol*, 133(1-2), 68-77. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2009.04.027

- 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. *Int J Food Microbiol*, *111*(2), 144-148. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2006.06.020
- Martins, M. L., Pinto, U. M., Riedel, K., & Vanetti, M. C.** (2015). Milk-deteriorating exoenzymes from *Pseudomonas fluorescens* 041 isolated from refrigerated raw milk. *Braz J Microbiol*, *46*(1), 207-217. doi:10.1590/S1517-838246120130859
- Märtlbauer, E., & Becker, H.** (2016). *Milchkunde und Milchhygiene*: UTB GmbH.
- 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*(Pt 1), 29-42. doi:10.1099/mic.0.28379-0
- McHugh, A. J., Feehily, C., Fenelon, M. A., Gleeson, D., Hill, C., & Cotter, P. D.** (2020). Tracking the Dairy Microbiota from Farm Bulk Tank to Skimmed Milk Powder. *mSystems*, *5*(2). doi:10.1128/mSystems.00226-20
- McKellar, R.** (1982). Factors influencing the production of extracellular proteinase by *Pseudomonas fluorescens*. *J Appl Bacteriol*, *53*, 305-316.
- McKellar, R., & Cholette, H.** (1987). Effect of Temperature Shifts on Extracellular Proteinase-Specific mRNA Pools in *Pseudomonas fluorescens* B52. *Appl Environ Microbiol*, *53*(8), 1973-1976.
- Metzger, S., Hernandez, L., Skarlupka, J., Suen, G., Walker, T., & Ruegg, P.** (2018). Influence of sampling technique and bedding type on the milk microbiota: Results of a pilot study. *J Dairy Sci*, *101*(7), 6346-6356.
- Migula, W.** (1894). Über ein neues System der Bakterien. *Arb Bakteriolog Inst Karlsruhe*, *1*, 235-328.
- Migula, W.** (1895). *Bacteriaceae* (Stäbchenbakterien). In A. Engler & K. Prantl (Eds.), *Die Natürlichen Pflanzenfamilien. Teil I* (pp. 20-30): W. Engelmann.
- Migula, W.** (1897). *System der Bakterien: Handbuch der Morphologie, Entwicklungsgeschichte und Systematik der Bakterien*. Jena: Verlag von Gustav Fischer.
- MilchGüV.** Verordnung über die Güteprüfung und Bezahlung der Anlieferungsmilch (Milch-Güteverordnung), § 3(1) (1980).
- Miller, L. T.** (1982). Single derivatization method for routine analysis of bacterial whole-cell fatty acid methyl esters, including hydroxy acids. *J Clin Microbiol*, *16*, 584-586.
- Minh, B. Q., Schmidt, H. A., Chernomor, O., Schrempf, D., Woodhams, M. D., von Haeseler, A., et al.** (2020). IQ-TREE 2: New Models and Efficient Methods for Phylogenetic Inference in the Genomic Era. *Mol Biol Evol*, *37*(5), 1530-1534. doi:10.1093/molbev/msaa015
- MIV.** (2020). Milchindustrie-Verband e.V. - Beilage zum Geschäftsbericht 2019/2020 - Zahlen-Daten-Fakten. Retrieved from https://milchindustrie.de/wp-content/uploads/2020/09/ZahlenDatenFakten_2019-20.pdf on 19.04.2021
- Miyatake, H., Hata, Y., Fujii, T., Hamada, K., Morihara, K., & Katsube, Y.** (1995). Crystal Structure of the Unliganded Alkaline Protease from *Pseudomonas aeruginosa* IFO3080 and Its Conformational Changes on Ligand Binding. *J Biochem*, *118*, 474-479.
- Mohr, H., & Schopfer, P.** (1978). *Lehrbuch der Pflanzenphysiologie*. Berlin: Springer-Verlag.
- Molin, G., Ternstrom, A., & Ursing, J.** (1986). Notes: *Pseudomonas lundensis*, a New Bacterial Species Isolated from Meat. *Int J Syst Bacteriol*, *36*(2), 339-342. doi:10.1099/00207713-36-2-339

- Molineri, A. I., Signorini, M. L., Cuatrín, A. L., Canavesio, V. R., Neder, V. E., Russi, N. B., et al.** (2012). Association between milking practices and psychrotrophic bacterial counts in bulk tank milk. *Rev Argent Microbiol*, *44*, 187-194.
- 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* (pp. 646-703).
- Mu, Z., Du, M., & Bai, Y.** (2009). Purification and properties of a heat-stable enzyme of *Pseudomonas fluorescens* Rm12 from raw milk. *Eur Food Res Technol*, *228*(5), 725-734. doi:10.1007/s00217-008-0983-y
- Mulet, M., Bennasar, J. L., & Garcia-Valdes, E.** (2009). An *rpoD*-based PCR procedure for the identification of *Pseudomonas* species and for their detection in environmental samples. *Mol Cell Probes*, *23*(3-4), 140-147. doi:doi.org/10.1016/j.mcp.2009.02.001
- Mulet, M., Lalucat, J., & Garcia-Valdes, E.** (2010). DNA sequence-based analysis of the *Pseudomonas* species. *Environ Microbiol*, *12*(6), 1513-1530. doi:10.1111/j.1462-2920.2010.02181.x
- Munsch, P., Alatossava, T., Marttinen, N., Meyer, J. M., Christen, R., & Gardan, L.** (2002). *Pseudomonas constantinii* sp. nov., another causal agent of brown blotch disease, isolated from cultivated mushroom sporophores in Finland. *Int J Syst Evol Microbiol*, *52*(Pt 6), 1973-1983. doi:10.1099/00207713-52-6-1973
- Murphy, S., & Boor, K.** (2000). Trouble-shooting sources and causes of high bacteria counts in raw milk. *Dairy Food Environ Sanit*, *20*, 606-611.
- Na, S. I., Kim, Y. O., Yoon, S. H., Ha, S. M., Baek, I., & Chun, J.** (2018). UBCG: Up-to-date bacterial core gene set and pipeline for phylogenomic tree reconstruction. *J Microbiol*, *56*(4), 280-285. doi:10.1007/s12275-018-8014-6
- Natzke, D.** (2019). 2019 U.S. Dairy Statistics. Retrieved from <https://www.progressivepublish.com/downloads/2020/general/2019-pd-stats-lowres.pdf> on 03.02.2021
- Nicodeme, M., Grill, J. P., Humbert, G., & Gaillard, J. L.** (2005). Extracellular protease activity of different *Pseudomonas* strains: dependence of proteolytic activity on culture conditions. *J Appl Microbiol*, *99*(3), 641-648. doi:10.1111/j.1365-2672.2005.02634.x
- Nonakaran, S. H., Pazhouhandeh, M., Keyvani, A., Abdollahipour, F. Z., & Shirzad, A.** (2015). Isolation and identification of *Pseudomonas azotoformans* for induced calcite precipitation. *World J Microbiol Biotechnol*, *31*(12), 1993-2001. doi:10.1007/s11274-015-1948-5
- Nucera, D. M., Lomonaco, S., Morra, P., Ortoffi, M. F., Giaccone, D., & Grassi, M. A.** (2016). Dissemination and Persistence of *Pseudomonas* spp. in Small-Scale Dairy Farms. *Ital J Food Saf*, *5*(2), 5652. doi:10.4081/ijfs.2016.5652
- O'Connell, A., Rugg, P. L., Jordan, K., O'Brien, B., & Gleeson, D.** (2016). The effect of storage temperature and duration on the microbial quality of bulk tank milk. *J Dairy Sci*, *99*(5), 3367-3374. doi:http://dx.doi.org/10.3168/jds.2015-10495
- Oikonomou, G., Machado, V. S., Santisteban, C., Schukken, Y. H., & Bicalho, R. C.** (2012). Microbial diversity of bovine mastitic milk as described by pyrosequencing of metagenomic 16s rDNA. *PLoS One*, *7*(10), e47671. doi:10.1371/journal.pone.0047671
- Oren, A., & Garrity, G. M.** (2014). Then and now: a systematic review of the systematics of prokaryotes in the last 80 years. *Antonie van Leeuwenhoek*, *106*(1), 43-56. doi:10.1007/s10482-013-0084-1

- Ouamba, A. J. K., LaPointe, G., Dufour, S., & Roy, D.** (2020). Optimization of Preservation Methods Allows Deeper Insights into Changes of Raw Milk Microbiota. *Microorganisms*, 8(3). doi:10.3390/microorganisms8030368
- Oueslati, M., Mulet, M., Gomila, M., Berge, O., Hajlaoui, M. R., Lalucat, J., et al.** (2019). New species of pathogenic *Pseudomonas* isolated from citrus in Tunisia: Proposal of *Pseudomonas kairouanensis* sp. nov. and *Pseudomonas nabeulensis* sp. nov. *Syst Appl Microbiol*, 42(3), 348-359. doi:10.1016/j.syapm.2019.03.002
- Paez, R., Taverna, V., Charlon, A., Cuatrin, F., Etcheverry, F., & DaCosta, L.** (2013). Application of ATP-bioluminescence technique for assessing cleanliness of milking equipment, bulk tank and milk transport tankers. *Food Prot. Trend*, 23, 308-314.
- Palleroni, N. J.** (2010). The *Pseudomonas* story. *Environ Microbiol*, 12(6), 1377-1383. doi:10.1111/j.1462-2920.2009.02041.x
- Parente, E., Ricciardi, A., & Zotta, T.** (2020). The microbiota of dairy milk: A review. *Int Dairy J*, 107. doi:10.1016/j.idairyj.2020.104714
- Parks, D. H., Imelfort, M., Skennerton, C. T., Hugenholtz, P., & Tyson, G. W.** (2015). CheckM: assessing the quality of microbial genomes recovered from isolates, single cells, and metagenomes. *Genome Res*, 25(7), 1043-1055. doi:10.1101/gr.186072.114
- Parte, A. C.** (2014). LPSN -- list of prokaryotic names with standing in nomenclature. *Nucleic Acids Res*, 42, D613-D616. doi:10.1093/nar/gkt1111
- Patel, R. K., & Jain, M.** (2012). NGS QC Toolkit: a toolkit for quality control of next generation sequencing data. *PLoS One*, 7(2), e30619. doi:10.1371/journal.pone.0030619
- Pfister, H., Morzadec, C., Le Cann, P., Madec, L., Lecureur, V., Chouvet, M., et al.** (2017). Granulometry, microbial composition and biological activity of dusts collected in French dairy farms. *Environ Res*, 158, 691-702. doi:10.1016/j.envres.2017.07.025
- Poole, K.** (2011). *Pseudomonas aeruginosa*: resistance to the max. *Front Microbiol*, 2, 65. doi:10.3389/fmicb.2011.00065
- Porcellato, D., Aspholm, M., Skeie, S. B., Monshaugen, M., Brendehaug, J., & Mellegard, H.** (2018). Microbial diversity of consumption milk during processing and storage. *Int J Food Microbiol*, 266, 21-30. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2017.11.004
- Porcellato, D., Smistad, M., Bombelli, A., Abdelghani, A., Jorgensen, H. J., & Skeie, S. B.** (2021). Longitudinal Study of the Bulk Tank Milk Microbiota Reveals Major Temporal Shifts in Composition. *Front Microbiol*, 12, 616429. doi:10.3389/fmicb.2021.616429
- Porter, J. R.** (1976). Antony van Leeuwenhoek: tercentenary of his discovery of bacteria. *Bacteriol Rev*, 40(2), 260-269.
- Qin, J., Hu, Y., Wu, W., Feng, Y., & Zong, Z.** (2020). *Pseudomonas defluvii* sp. nov., isolated from hospital sewage. *Int J Syst Evol Microbiol*, 70(7), 4199-4203. doi:10.1099/ijsem.0.004272
- Quigley, L., McCarthy, R., O'Sullivan, O., Beresford, T. P., Fitzgerald, G. F., Ross, R. P., et al.** (2013a). The microbial content of raw and pasteurized cow milk as determined by molecular approaches. *J Dairy Sci*, 96(8), 4928-4937. doi:10.3168/jds.2013-6688
- 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. *Int J Food Microbiol*, 150(2-3), 81-94. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2011.08.001

- Quigley, L., O'Sullivan, O., Stanton, C., Beresford, T. P., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., *et al.* (2013b). The complex microbiota of raw milk. *FEMS Microbiol Rev*, *37*(5), 664-698. doi:10.1111/1574-6976.12030
- Ramasamy, D., Mishra, A. K., Lagier, J. C., Padhmanabhan, R., Rossi, M., Sentausa, E., *et al.* (2014). A polyphasic strategy incorporating genomic data for the taxonomic description of novel bacterial species. *Int J Syst Evol Microbiol*, *64*(Pt 2), 384-391. doi:10.1099/ij.s.0.057091-0
- Rasolofo, 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. *Int J Food Microbiol*, *138*(1-2), 108-118. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2010.01.008
- Reasoner, D. J., & Geldreich, E. (1985). A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water. *Appl Environ Microbiol*, *49*, 1-7.
- Reboud, E., Basso, P., Maillard, A. P., Huber, P., & Attree, I. (2017). Exolysin Shapes the Virulence of *Pseudomonas aeruginosa* Clonal Outliers. *Toxins (Basel)*, *9*(11). doi:10.3390/toxins9110364
- Reddy, C., Beveridge, T. J., Breznak, J. A., & Marzluf, G. (2007). Methods for general and molecular microbiology. *American Society for Microbiology Press*.
- Richter, M., & Roselló-Móra, R. (2009). Shifting the genomic gold standard for the prokaryotic species definition. *Proc Natl Acad Sci USA*, *106*(45), 19126-19131. doi:10.1073/pnas.0906412106
- Rosa e Silva, L. K., Staats, C. C., Goulart, L. S., Morello, L. G., Pelegrinelli Fungaro, M. H., Schrank, A., *et al.* (2008). Identification of novel temperature-regulated genes in the human pathogen *Cryptococcus neoformans* using representational difference analysis. *Res Microbiol*, *159*(3), 221-229. doi:https://doi.org/10.1016/j.resmic.2007.12.006
- Roselló-Móra, R., & Amann, R. (2001). The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiol Rev*, *25*, 39-67.
- Ruegg, P. L. (2017). A 100-Year Review: Mastitis detection, management, and prevention. *J Dairy Sci*, *100*(12), 10381-10397. doi:10.3168/jds.2017-13023
- Ryu, E. A. (1940). A simple method of differentiation between gram-positive and gram-negative organisms without staining. *Kitasato Arch Exp Med*, *17*, 58-63.
- Samaržija, D., Zamberlin, Š., & Pogačić, T. (2012). Psychrotrophic bacteria and their negative effects on milk and dairy products quality. *Mljekarstvo*, *62*(2), 77-95.
- Sawada, H., Fujikawa, T., & Horita, H. (2020). *Pseudomonas brassicae* sp. nov., a pathogen causing head rot of broccoli in Japan. *Int J Syst Evol Microbiol*, *70*(10), 5319-5329. doi:10.1099/ijsem.0.004412
- Schäffler, E. (2019). Milchleistungsprüfung in Bayern. Retrieved from http://www.lkv.bayern.de/lkv/medien/Jahresberichte/mlp_jahresbericht2019.pdf on 08.03.2021
- Scheldeman, P., Pil, A., Herman, L., De Vos, P., & Heyndrickx, M. (2005). Incidence and diversity of potentially highly heat-resistant spores isolated at dairy farms. *Appl Environ Microbiol*, *71*(3), 1480-1494. doi:10.1128/AEM.71.3.1480-1494.2005
- See-Too, W. S., Salazar, S., Ee, R., Convey, P., Chan, K. G., & Peix, A. (2017). *Pseudomonas versuta* sp. nov., isolated from Antarctic soil. *Syst Appl Microbiol*, *40*(4), 191-198. doi:10.1016/j.syapm.2017.03.002

- Seemann, T.** (2014). Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics*, *30*(14), 2068-2069. doi:10.1093/bioinformatics/btu153
- Segurel, L., & Bon, C.** (2017). On the Evolution of Lactase Persistence in Humans. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, *18*, 297-319. doi:10.1146/annurev-genom-091416-035340
- Siebert, A., Hofmann, K., Staib, L., Doll, E. V., Scherer, S., & Wenning, M.** (2021). Amplicon-sequencing of raw milk microbiota: Impact of DNA extraction and library-PCR. *Appl Microbiol Biotechnol*, *105*, 4761–4773. doi:10.1007/s00253-021-11353-4
- Simpson, G. G.** (1961). *Principles of Animal Taxonomy*. (1961/05/19 ed.). New York: Columbia University Press.
- Skeie, S. B., Haland, M., Thorsen, I. M., Narvhus, J., & Porcellato, D.** (2019). Bulk tank raw milk microbiota differs within and between farms: A moving goalpost challenging quality control. *J Dairy Sci*, *102*(3), 1959-1971. doi:10.3168/jds.2017-14083
- Skerman, V. B. D., McGowan, V., & Sneath, P. H. A.** (1980). Approved lists of bacterial names. *Int J Syst Bacteriol*, *30*, 225-420.
- Sly, L. I.** (1995). Taxonomic Note: V. B. D. Skerman (1921-1993), a Reforming Force in Bacterial Systematics and Nomenclature. *Int J Syst Evol Microbiol*, *45*(2), 412-413. doi:https://doi.org/10.1099/00207713-45-2-412
- Sørhaug, T., & Stepaniak, L.** (1997). Psychrotrophs and their enzymes in milk and dairy products: quality aspects. *Trends Food Sci Technol*, *8*(2), 35-41. doi:10.1016/S0924-2244(97)01006-6
- Stackebrandt, E.** (2006). Defining Taxonomic Ranks. In M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, *et al.* (Eds.), *The Prokaryotes - Third Edition. A Handbook on the Biology of Bacteria* (Vol. Volume 1: Symbiotic associations, Biotechnology, Applied Microbiology, pp. 29-57). New York: Springer.
- Stackebrandt, E., Frederiksen, W., Garrity, G. M., Grimont, P. A. D., Kämpfer, P., Maiden, M. C. J., *et al.*** (2002). Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *Int J Syst Evol Microbiol*, *52*(Pt 3), 1043-1047. doi:10.1099/00207713-52-3-1043
- Starke, R., Pylro, V. S., & Morais, D. K.** (2021). 16S rRNA Gene Copy Number Normalization Does Not Provide More Reliable Conclusions in Metataxonomic Surveys. *Microb Ecol*, *81*(2), 535-539. doi:10.1007/s00248-020-01586-7
- Steel, K. J.** (1961). The Oxidase Reaction as a Taxonomic Tool. *J Gen Microbiol*, *25*(2), 297-306. doi:10.1099/00221287-25-2-297
- Stoddard, S. F., Smith, B. J., Hein, R., Roller, B. R., & Schmidt, T. M.** (2015). rrnDB: improved tools for interpreting rRNA gene abundance in bacteria and archaea and a new foundation for future development. *Nucleic Acids Res*, *43*, D593-598. doi:10.1093/nar/gku1201
- Stoeckel, M., Lidolt, M., Achberger, V., Glück, C., Krewinkel, M., Stressler, T., *et al.*** (2016). Growth of *Pseudomonas weihenstephanensis*, *Pseudomonas proteolytica* and *Pseudomonas* sp. in raw milk: Impact of residual heat-stable enzyme activity on stability of UHT milk during shelf-life. *Int Dairy J*, *59*, 20-28. doi:10.1016/j.idairyj.2016.02.045
- Tambong, J. T., Xu, R., & Bromfield, E. S. P.** (2017). *Pseudomonas canadensis* sp. nov., a biological control agent isolated from a field plot under long-term mineral fertilization. *Int J Syst Evol Microbiol*, *67*(4), 889-895. doi:10.1099/ijsem.0.001698
- Teh, K. H., Flint, S., Palmer, J., Andrewes, P., Bremer, P., & Lindsay, D.** (2012). Proteolysis produced within biofilms of bacterial isolates from raw milk tankers. *Int J Food Microbiol*, *157*(1), 28-34. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2012.04.008

- Teh, K. H., Flint, S., Palmer, J., Andrewes, P., Bremer, P., & Lindsay, D.** (2014). Biofilm – An unrecognised source of spoilage enzymes in dairy products? *Int Dairy J*, *34*(1), 32-40. doi:10.1016/j.idairyj.2013.07.002
- 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. *Int Dairy J*, *21*(10), 742-747. doi:10.1016/j.idairyj.2011.04.013
- Tergast, H., & Hansen, H.** (2020). Steckbriefe zur Tierhaltung in Deutschland: Milchkühe. Retrieved from https://www.mpr-bayern.de/Statistiken/Steckbrief_Milchkuehe_2020.pdf on 03.02.2021
- Thompson, C. C., Amaral, G. R., Campeao, M., Edwards, R. A., Polz, M. F., Dutilh, B. E., et al.** (2015). Microbial taxonomy in the post-genomic era: rebuilding from scratch? *Arch Microbiol*, *197*(3), 359-370. doi:10.1007/s00203-014-1071-2
- Tier-LMHV.** Tierische Lebensmittel-Hygieneverordnung, § 17 - Abgabe von Rohmilch oder Rohrahm an Verbraucher, (2021).
- Tindall, B. J.** (1990a). A comparative study of the lipid composition of *Halobacterium saccharovorum* from various sources. *Syst Appl Microbiol*, *13*, 128-130. doi:10.1016/S0723-2020(11)80158-X
- Tindall, B. J.** (1990b). Lipid composition of *Halobacterium lacusprofundi*. *FEMS Microbiol Lett*, *66*, 199-202. doi:10.1016/0378-1097(90)90282-U
- Tindall, B. J., Rossello-Mora, R., Busse, H. J., Ludwig, W., & Kampfer, P.** (2010). Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes. *Int J Syst Evol Microbiol*, *60*(Pt 1), 249-266. doi:10.1099/ijs.0.016949-0
- Tindall, B. J., Sikorski, J., & Krieg, N. R.** (2007). Phenotypic Characterization and the Principles of Comparative Systematics. In C. Reddy, T. Beveridge, J. A. Breznak, et al. (Eds.), *Methods for General and Molecular Microbiology* (pp. 330-393). Washington DC: American Society for Microbiology.
- Tolle, A.** (1980). The microflora of the udder. *Bulletin of the International Dairy Federation*, *120*, 4-10.
- Trüper, H. G., & Schleifer, K. H.** (2006). Prokaryote Characterization and Identification. In M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, et al. (Eds.), *The Prokaryotes - Third Edition. A Handbook on the Biology of Bacteria* (Vol. Volume 1: Symbiotic associations, Biotechnology, Applied Microbiology, pp. 58-79). New York: Springer.
- 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. *Int J Food Microbiol*, *146*(3), 253-262. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2011.02.033
- Vandamme, P., & Peeters, C.** (2014). Time to revisit polyphasic taxonomy. *Antonie van Leeuwenhoek*, *106*(1), 57-65. doi:10.1007/s10482-014-0148-x
- Vandamme, P., Pot, B., Gillis, M., de Vos, P., Kersters, K., & Swings, J.** (1996). Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol Rev*, *60*(2), 407-438.
- Vandeputte, D., Kathagen, G., D'Hoe, K., Vieira-Silva, S., Valles-Colomer, M., Sabino, J., et al.** (2017). Quantitative microbiome profiling links gut community variation to microbial load. *Nature*, *551*(7681), 507-511. doi:10.1038/nature24460
- VDLUFA.** (2002). Methode M 7.12.2, Bestimmung von Pseudomonaden, Koloniezählverfahren mit C-F-C-Selektivagar. In *Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten, Handbuch der Landwirtschaftlichen Versuchs- und*

- Untersuchungsmethodik (VDLUFA-Methodenbuch), Bd. VI Milch und Milchprodukte (Vol. 4).* Darmstadt: VDLUFA-Verlag.
- Vela, A. I., Gutierrez, M. C., Falsen, E., Rollan, E., Simarro, I., Garcia, P., et al.** (2006). *Pseudomonas simiae* sp. nov., isolated from clinical specimens from monkeys (*Callithrix geoffroyi*). *Int J Syst Evol Microbiol*, 56(Pt 11), 2671-2676. doi:10.1099/ijms.0.64378-0
- Verdier-Metz, I., Michel, V., Delbes, C., & Montel, M. C.** (2009). Do milking practices influence the bacterial diversity of raw milk? *Food Microbiol*, 26(3), 305-310. doi:10.1016/j.fm.2008.12.005
- Vidal, A., Saran Netto, A., Vaz, A. C., Capodifoglio, E., Gonçalves, A., Rossi, G. A., et al.** (2017). *Pseudomonas* spp.: contamination sources in bulk tanks of dairy farms. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 37(9), 941-948.
- 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. *Int Dairy J*, 57, 80-90. doi:10.1016/j.idairyj.2016.02.042
- Vithanage, N. R., Dissanayake, M., Bolge, G., Palombo, E. A., Yeager, T. R., & Datta, N.** (2017). Microbiological quality of raw milk attributable to prolonged refrigeration conditions. *J Dairy Res*, 84(1), 92-101. doi:10.1017/S0022029916000728
- Volk, V., Gluck, C., Leptihn, S., Ewert, J., Stressler, T., & Fischer, L.** (2019). Two Heat Resistant Endopeptidases from *Pseudomonas* Species with Destabilizing Potential during Milk Storage. *J Agric Food Chem*, 67(3), 905-915. doi:10.1021/acs.jafc.8b04802
- Volk, V., Graw, N., Stressler, T., & Fischer, L.** (2021). An indirect ELISA system for the detection of heat-stable *Pseudomonas* endopeptidases (AprX) in milk. *J Dairy Sci*, 104(5), 5185-5196. doi:10.3168/jds.2020-19790
- von Neubeck, M., Baur, C., Krewinkel, M., Stoeckel, M., Kranz, B., Stressler, T., et al.** (2015). Biodiversity of refrigerated raw milk microbiota and their enzymatic spoilage potential. *Int J Food Microbiol*, 211, 57-65. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2015.07.001
- von Neubeck, M., Huptas, C., Gluck, C., Krewinkel, M., Stoeckel, M., Stressler, T., et al.** (2016). *Pseudomonas helleri* sp. nov. and *Pseudomonas weihenstephanensis* sp. nov., isolated from raw cow's milk. *Int J Syst Evol Microbiol*, 66(3), 1163-1173. doi:10.1099/ijsem.0.000852
- von Neubeck, M., Huptas, C., Gluck, C., Krewinkel, M., Stoeckel, M., Stressler, T., et al.** (2017). *Pseudomonas lactis* sp. nov. and *Pseudomonas paralactis* sp. nov., isolated from bovine raw milk. *Int J Syst Evol Microbiol*, 67(6), 1656-1664. doi:10.1099/ijsem.0.001836
- Weber, M., Geißert, J., Kruse, M., & Lipski, A.** (2014). Comparative analysis of bacterial community composition in bulk tank raw milk by culture-dependent and culture-independent methods using the viability dye propidium monoazide. *J Dairy Sci*, 97(11), 6761-6776.
- Weber, M., Liedtke, J., Plattes, S., & Lipski, A.** (2019). Bacterial community composition of biofilms in milking machines of two dairy farms assessed by a combination of culture-dependent and -independent methods. *PLoS One*, 14(9), e0222238. doi:10.1371/journal.pone.0222238
- Willis, A.** (1960). The lipolytic activity of some clostridia. *J Pathol*, 80, 379-390.
- 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. doi:10.1099/00221287-147-2-345

- Xu, P., Li, W. J., Tang, S. K., Zhang, Y. Q., Chen, G. Z., Chen, H. H., et al.** (2005). *Naxibacter alkalitolerans* gen. nov., sp. nov., a novel member of the family 'Oxalobacteraceae' isolated from China. *Int J Syst Evol Microbiol*, 55(Pt 3), 1149-1153. doi:10.1099/ijms.0.63407-0
- Young, W., Hine, B. C., Wallace, O. A., Callaghan, M., & Bibiloni, R.** (2015). Transfer of intestinal bacterial components to mammary secretions in the cow. *PeerJ*, 3, e888. doi:10.7717/peerj.888
- Yuan, L., Sadiq, F. A., Liu, T. J., Li, Y., Gu, J. S., Yang, H. Y., et al.** (2018). Spoilage potential of psychrotrophic bacteria isolated from raw milk and the thermo-stability of their enzymes. *J Zhejiang Univ Sci B*, 19(8), 630-642. doi:10.1631/jzus.B1700352
- 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(5), 343-349. doi:10.1007/s007920100199
- Zhu, C., Delmont, T. O., Vogel, T. M., & Bromberg, Y.** (2015). Functional Basis of Microorganism Classification. *PLoS Comput Biol*, 11(8), e1004472. doi:10.1371/journal.pcbi.1004472
- ZuivelNL.** (2019). Dutch dairy in figures. Retrieved from https://www.zuivelnl.org/uploads/images/Marktinformatie-en-Export/20200209-ZuivelNL-Zuivel-in-Cijfers-ENG_lowres_spreads.pdf on 08.03.2021

Tabelle A 2: *Pseudomonas*- und Gesamtkeimzahlen der Rohmilchproben der Sammeltouren

Tour	Probenbezeichnung	<i>Pseudomonas</i> -Keimzahl [log Zellen*ml ⁻¹]	Gesamtkeimzahl [log Zellen*ml ⁻¹]
A	Hof 1.1_A	1,70	4,62
	Hof 1.2_A	2,10	5,19
	Hof 1.3_A	2,01	4,86
	Wagen 1_A	1,75	4,86
	Hof 2.1_A	2,32	4,92
	Hof 2.2_A	1,70	5,29
	Hof 2.3_A	1,70	4,18
	Wagen 2_A	2,05	5,03
	Tank A	1,83	4,99
B	Hof 1_B	2,03	4,94
	Hof 2_B	4,34	6,03
	Hof 3_B	1,97	4,87
	Hof 4_B	2,21	4,90
	Hof 5_B	2,95	5,38
	Hof 6_B	2,51	5,02
	Hof 7_B	4,75	4,88
	Hof 8_B	2,20	5,00
	Hof 9_B	2,61	5,05
	Hof 10_B	2,35	5,58
	Wagen B	3,76	5,27
C	Hof C	1,70	5,20
	Wagen C	2,01	5,24
	Tank C	2,19	5,22
D	Hof 1.1_D	1,70	3,90
	Hof 1.2_D	1,70	4,81
	Hof 1.3_D	2,30	4,85
	Hof 1.4_D	2,14	5,11
	Hof 1.5_D	2,48	4,57
	Hof 1.6_D	1,70	4,63
	Hof 1.7_D	2,80	4,97
	Hof 1.8_D	2,44	NV
	Hof 1.9_D	1,75	NV
	Hof 1.10_D	2,74	5,15
	Wagen 1_D	2,29	4,88
	Hof 2.1_D	2,48	5,45
	Hof 2.2_D	1,70	4,51
	Hof 2.3_D	1,70	4,66
Hof 2.4_D	2,98	5,01	
Wagen 2_D	1,70	4,77	
	Tank D	3,27	5,19
E	Hof 1_E	2,26	5,05
	Hof 2_E	2,91	5,11
	Hof 3_E	2,00	5,47
	Wagen E	5,18	6,21
F	Hof 1_F	2,47	5,68
	Hof 2_F	2,97	5,53
	Hof 3_F	2,09	5,22
	Hof 4_F	1,83	5,10
	Hof 5_F	2,77	5,54
	Hof 6_F	2,03	5,27
	Hof 7_F	2,04	5,06
	Hof 8_F	2,01	4,91
	Hof 9_F	2,17	5,74
	Hof 10_F	2,51	5,09
	Hof 11_F	2,75	5,60
	Wagen F	4,44	6,75
G	Hof G	1,96	5,29
	Wagen G	2,99	5,34

Tabelle A 3: Relative Zusammensetzung der Rohmilchproben von Sammeltour A auf Gattungsebene

Die mikrobielle Zusammensetzung der sechs Hofsammlertankproben, zwei Sammelwagenproben sowie der Stapeltankprobe von Tour A wurde per 16S rRNA Amplikonsequenzierung ermittelt. Relative Anteile > 30 % pro Gattung sind fett markiert. Gattungen mit einem relativen Anteil < 1,5 % in allen Proben sind als „Gattungen < 1,5 %“ summiert. zOTUs die keiner Gattung zugeordnet werden konnten, sind als „Unbekannt“ zusammengefasst. -, Spuren < 1,5 %.

Gattung	Hof 1.1_A	Hof 1.2_A	Hof 1.3_A	Wagen 1_A	Hof 2.1_A	Hof 2.2_A	Hof 2.3_A	Wagen 2_A	Tank A
<i>Acinetobacter</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Aerococcus</i>	-	2,1	6,7	4,7	6,4	-	-	-	-
<i>Atopostipes</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Bifidobacterium</i>	-	-	2,2	-	-	-	3,1	-	-
<i>Chryseobacterium</i>	-	-	-	-	-	-	1,8	-	-
<i>Clostridium s. str.</i>	-	-	2,0	-	-	-	-	-	-
<i>Clostridium XI</i>	4,2	3,4	7,8	4,8	10,6	4,8	3,6	5,7	3,4
<i>Corynebacterium</i>	11,8	33,3	16,5	21,6	30,5	9,7	14,6	17,7	12,2
<i>Dietzia</i>	-	1,9	-	-	-	-	2,7	-	-
<i>Enhydrobacter</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Enterococcus</i>	3,3	2,6	-	2,4	-	4,5	-	4,0	2,9
<i>Escherichia/ Shigella</i>	-	-	1,7	-	-	-	-	-	-
<i>Facklamia</i>	-	3,1	2,7	2,9	2,7	-	1,5	1,7	-
<i>Jeotgalicoccus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Kocuria</i>	-	-	2,4	1,6	1,8	-	-	-	-
<i>Lactobacillus</i>	-	2,1	-	-	-	-	4,6	-	-
<i>Lactococcus</i>	-	4,2	-	2,3	-	49,4	-	32,2	40,8
<i>Leuconostoc</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Microbacterium</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Neisseria</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Olsenella</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Ornithinimicrobium</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Romboutsia</i>	6,1	6,1	10,3	7,0	14,8	5,7	6,6	7,6	4,8
<i>Rothia</i>	-	-	-	-	-	-	23,0	-	1,5
<i>Sphingomonas</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus</i>	36,9	7,6	8,4	17,6	2,8	2,3	2,9	2,6	6,7
<i>Streptococcus</i>	-	1,7	14,9	6,3	-	-	-	-	2,5
<i>Streptophyta</i>	6,5	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Thauera</i>	2,6	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Trueperella</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Turicibacter</i>	2,7	3,1	6,6	3,5	5,5	3,0	3,4	3,8	2,5
Gattungen < 1.5 %	10,0	12,1	8,7	9,0	13,6	8,2	15,1	10,1	7,1
Unbekannt	8,1	9,7	6,1	8,0	5,6	4,4	10,0	4,7	5,5

Tabelle A 4: Relative Zusammensetzung der Rohmilchproben von Sammeltour D auf Gattungsebene

Die mikrobielle Zusammensetzung der 14 Hofsammlertankproben, 2 Sammelwagenproben sowie der Stapeltankprobe von Tour D wurde per 16S rRNA Amplikonsequenzierung ermittelt. Relative Anteile > 30 % pro Gattung sind fett markiert. Gattungen mit einem relativen Anteil < 1,5 % in allen Proben sind als „Gattungen < 1,5 %“ summiert. zOTUs die keiner Gattung zugeordnet werden konnten, sind als „Unbekannt“ zusammengefasst. -, Spuren < 1,5 %.

Gattung	Hof 1.1_D	Hof 1.2_D	Hof 1.3_D	Hof 1.4_D	Hof 1.5_D	Hof 1.6_D	Hof 1.7_D	Hof 1.8_D	Hof 1.9_D	Hof 1.10_D	Wagen 1_D	Hof 2.1_D	Hof 2.2_D	Hof 2.3_D	Hof 2.4_D	Wagen 2_D	Tank D
<i>Acinetobacter</i>	-	-	3,3	-	-	-	-	3,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Aerococcus</i>	-	2,1	18,3	-	2,1	-	-	1,8	2,4	5,5	2,1	3,4	-	-	-	-	-
<i>Atopostipes</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,1	-	-	-	-	-
<i>Bifidobacterium</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	3,1	-	-	-	1,7	-	-	-	-
<i>Chryseobacterium</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Clostridium s. str.</i>	-	1,6	-	6,4	-	-	1,9	2,6	1,9	-	3,3	-	3,1	1,6	-	-	-
<i>Clostridium XI</i>	1,8	9,9	4,7	10,0	9,9	7,5	7,1	7,1	5,4	3,6	9,1	10,8	9,9	4,1	3,2	5,0	1,8
<i>Corynebacterium</i>	18,7	11,2	16,8	15,5	7,4	6,1	21,8	10,0	7,2	41,6	17,6	27,7	26,8	10,0	1,9	7,8	4,1
<i>Dietzia</i>	-	-	-	2,2	-	-	2,8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Enhydrobacter</i>	-	-	-	-	-	3,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Enterococcus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	11,0	-	4,2	7,3
<i>Escherichia/</i> <i>Shigella</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Facklamia</i>	-	1,9	6,9	2,8	2,1	3,7	3,2	3,8	3,8	4,4	2,5	5,3	-	-	-	-	-
<i>Jeotgalicoccus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4,2	-	-	-	-	-
<i>Kocuria</i>	-	2,0	4,5	-	1,9	24,0	2,2	5,8	5,1	-	-	4,1	1,7	-	-	-	-
<i>Lactobacillus</i>	-	-	-	-	21,5	-	-	-	16,1	7,2	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactococcus</i>	-	-	-	-	-	8,6	-	4,6	16,6	-	-	-	2,7	20,1	-	2,9	16,1
<i>Leuconostoc</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	2,8	-	-	-	-	-	-	-	6,6
<i>Microbacterium</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,4	-	-	-	69,5	48,3	11,9
<i>Neisseria</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	2,0	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Olsenella</i>	-	-	3,5	2,3	2,4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Ornithini-microbium</i>	-	-	-	-	-	-	1,6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas</i>	-	-	-	-	-	-	-	1,7	-	-	-	-	-	-	-	-	3,4
<i>Romboutsia</i>	2,9	17,1	7,8	16,5	13,2	10,7	11,6	17,0	9,3	5,4	14,8	14,7	14,2	5,9	5,0	6,5	2,6
<i>Rothia</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,3	-	-	-	-
<i>Sphingomonas</i>	-	-	-	-	-	-	-	2,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus</i>	4,2	2,7	7,1	-	9,8	5,1	2,4	7,5	3,5	3,7	2,6	3,2	3,5	22,7	2,6	4,7	32,4
<i>Streptococcus</i>	60,9	14,3	-	-	2,9	-	3,9	4,5	-	7,5	5,7	-	2,1	1,7	-	-	2,5
<i>Streptophyta</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Thauera</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Trueperella</i>	-	-	2,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Turicibacter</i>	2,5	7,7	2,9	13,7	5,4	5,6	6,4	3,2	4,2	1,6	8,1	4,2	8,1	4,1	4,5	4,1	-
Gattungen < 1.5 %	2,8	15,0	10,3	18,5	9,3	11,0	19,7	11,8	6,2	4,6	14,7	9,4	11,2	8,1	3,1	6,5	2,1
Unbekannt	3,4	8,9	7,3	6,1	6,4	7,5	9,3	7,4	5,8	8,6	7,4	4,8	5,8	5,4	2,1	3,1	2,2

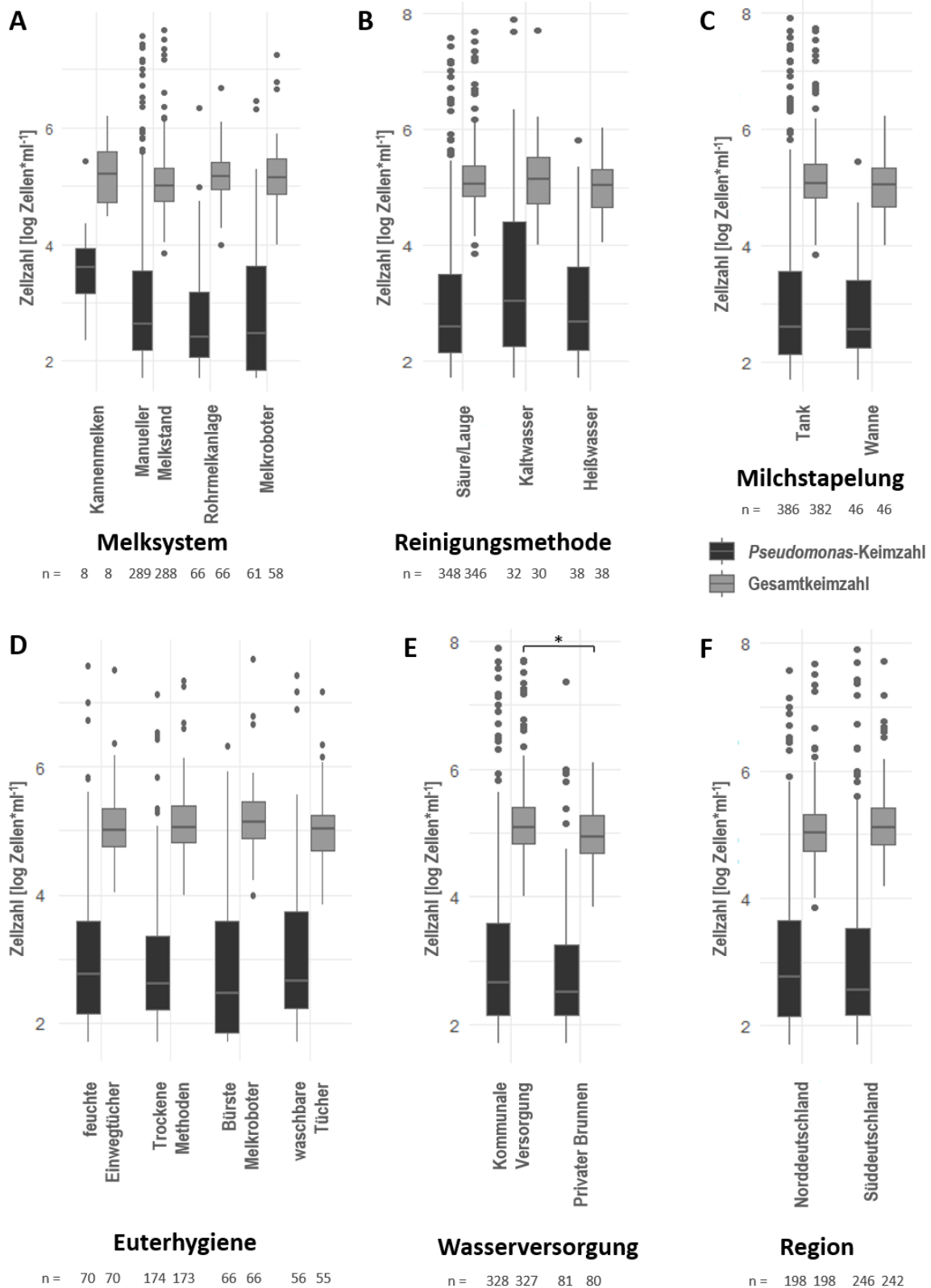


Abbildung A 1: *Pseudomonas*- und Gesamtkeimzahlen in Abhängigkeit hofspezifischer Faktoren ohne signifikanten Effekt auf die *Pseudomonas*-Keimzahl

Pseudomonas-Keimzahlen (dunkelgrau) und Gesamtkeimzahlen (hellgrau) in Abhängigkeit der Faktoren ohne signifikanten Effekt auf die *Pseudomonas*-Keimzahl (Melksystem, Reinigungsmethode, Milchstapelung, Euterhygiene, Wasserversorgung und Region). Signifikante Unterschiede wurden per Kruskal-Wallis Test mit nachfolgendem Dunn's Test mit Bonferroni-Korrektur für multiple Vergleiche durchgeführt.

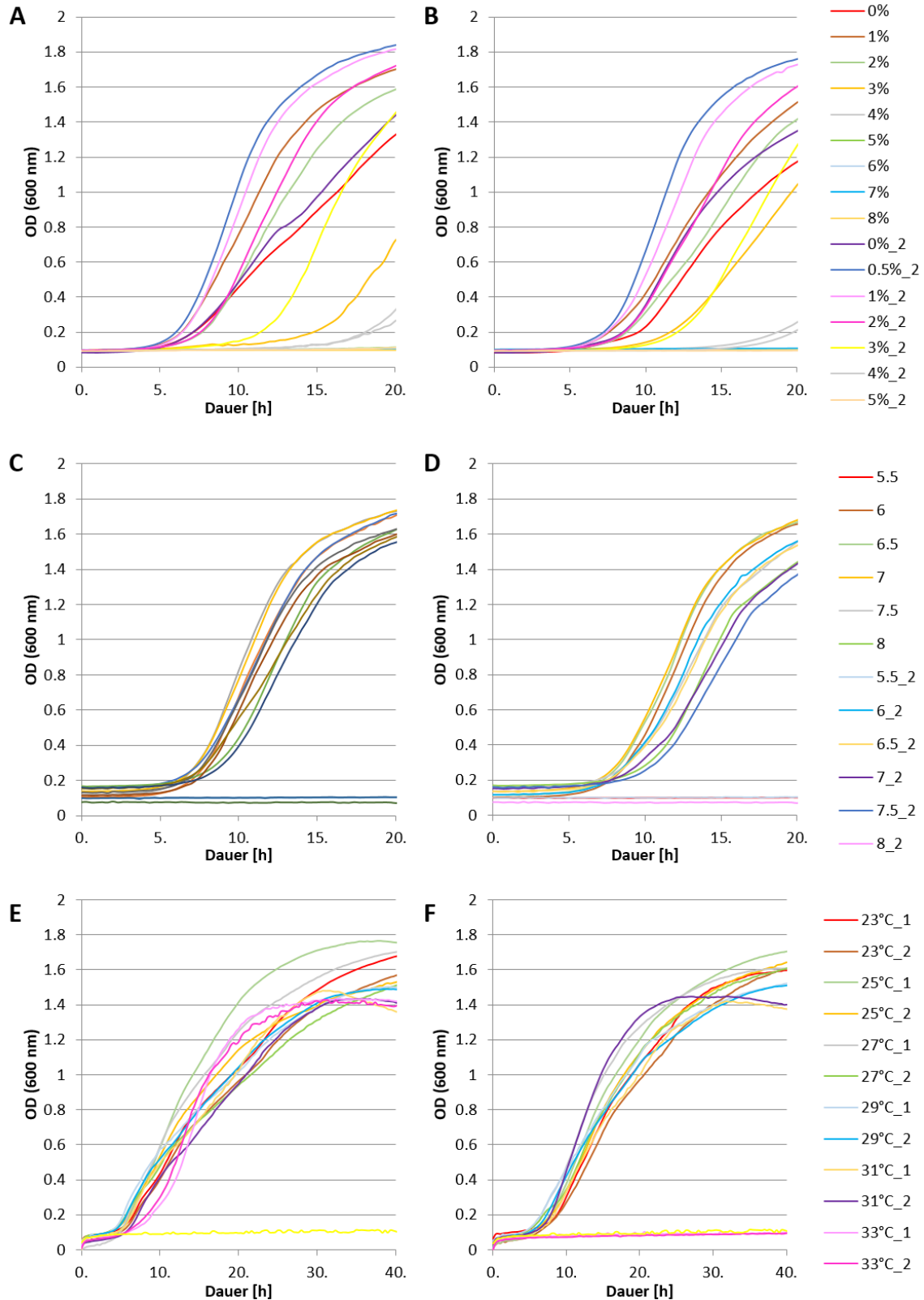


Abbildung A 2: Wachstumskurven zur Ermittlung der optimalen Wachstumsbedingungen für *P. saxonica* sp. nov.

Die Stämme wurden bei verschiedenen Salzkonzentrationen (WS 5072^T: A, WS 5092 B), pH-Werten (WS 5072^T: C, WS 5092: D) und Temperaturen (WS 5072^T: E, WS 5092: F) in zwei biologischen Replikaten inkubiert und die Wachstumskurven anhand der gemessenen optischen Dichte erstellt. Die Linienfarben entsprechen den zugehörigen NaCl-Konzentrationen, pH-Werten bzw. Temperaturen.

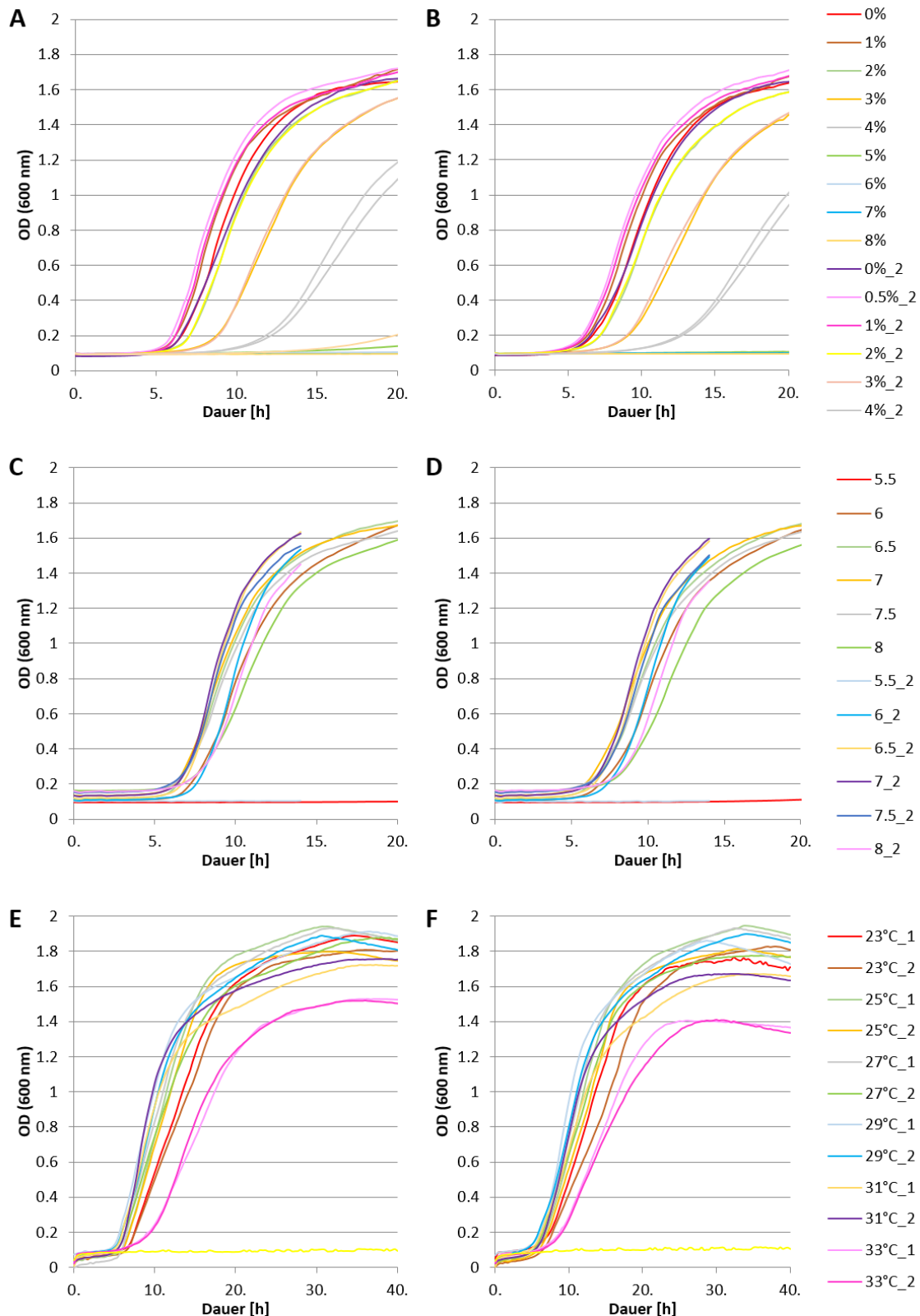


Abbildung A 3: Wachstumskurven zur Ermittlung der optimalen Wachstumsbedingungen für *P. haemolytica* sp. nov.

Die Stämme wurden bei verschiedenen Salzkonzentrationen (WS 5063^T: A, WS 5067 B), pH-Werten (WS 5063^T: C, WS 5067: D) und Temperaturen (WS 5063^T: E, WS 5067: F) in zwei biologischen Replikaten inkubiert und die Wachstumskurven anhand der gemessenen optischen Dichte erstellt. Die Linienfarben entsprechen den zugehörigen NaCl-Konzentrationen, pH-Werten bzw. Temperaturen.

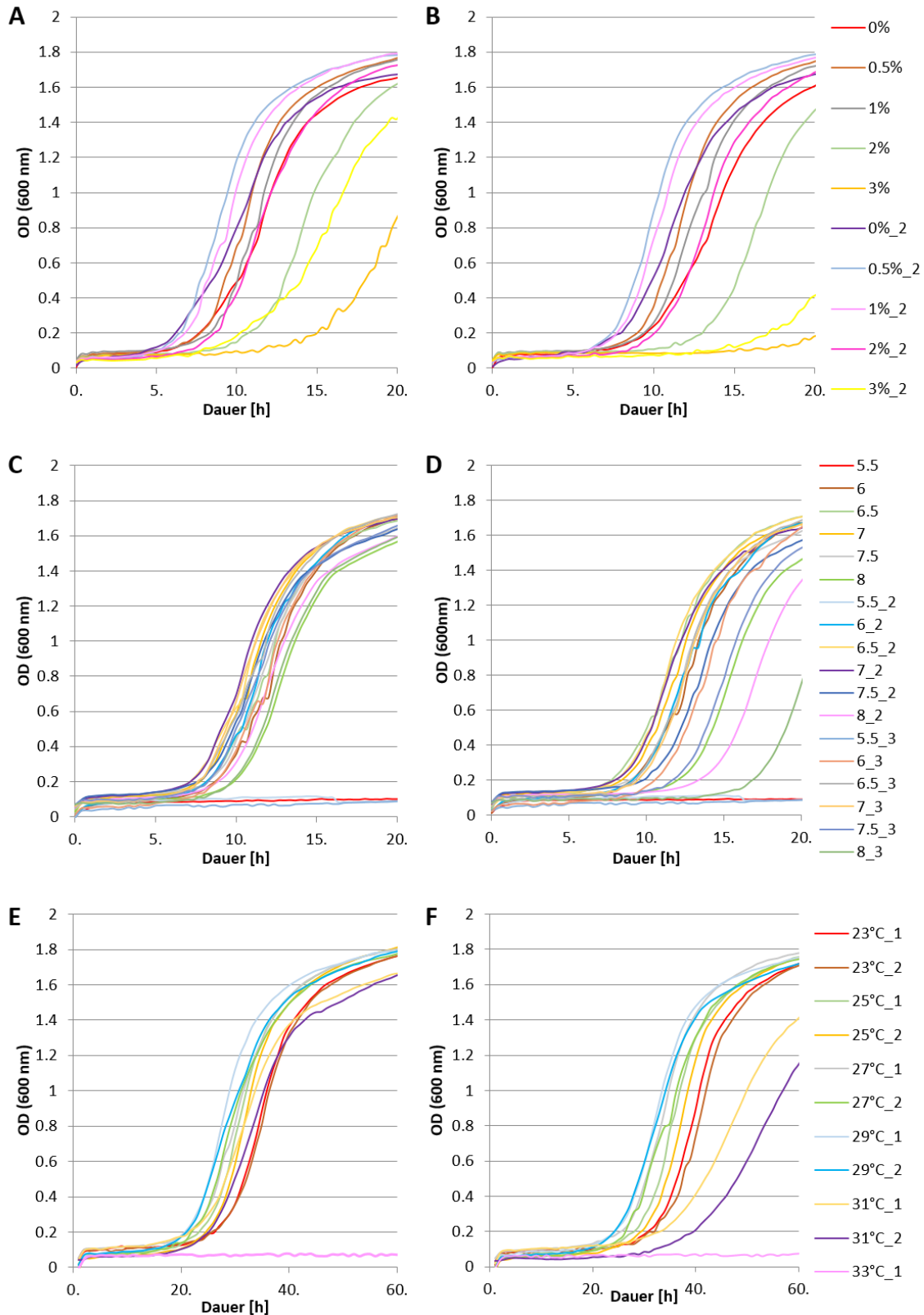


Abbildung A 4: Wachstumskurven zur Ermittlung der optimalen Wachstumsbedingungen für *P. haemolytica* sp. nov.

Die Stämme wurden bei verschiedenen Salzkonzentrationen (WS 5106^T: A, WS 5096 B), pH-Werten (WS 5106^T: C, WS 5096: D) und Temperaturen (WS 5106^T: E, WS 5096: F) in zwei biologischen Replikaten inkubiert und die Wachstumskurven anhand der gemessenen optischen Dichte erstellt. Die Linienfarben entsprechen den zugehörigen NaCl-Konzentrationen, pH-Werten bzw. Temperaturen.

Danksagung

Zu Beginn möchte ich meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Siegfried Scherer danken. Bereits im Bachelor-Studium faszinierten mich in Ihrer Vorlesung der Allgemeinen Mikrobiologie die farbenfrohe Welt der Mikroorganismen sowie Ihre Fähigkeit, Menschen zu begeistern. Herzlichen Dank, dass ich als Praktikantin, Masterstudentin sowie als eine Ihrer letzten Doktorandinnen an Ihrem Lehrstuhl arbeiten durfte. Die Atmosphäre, die unter Ihrer Leitung am Institut herrschte, habe ich stets als sehr kollegial, beruhigend und motivierend empfunden und Ihre Tür stand buchstäblich jeder Zeit offen, wenn Bedarf an einem Gespräch bestand.

Weiterhin möchte ich mich bei Mareike Wenning für die optimistische und motivierende Art der Betreuung bedanken. Durch Dein umfassendes Fachwissen und Deine Erfahrung hattest du stets eine Erklärung zu jeglichen Problemen oder Beobachtungen parat und trotz des neuen Berufs war die Erreichbarkeit gegeben.

Herrn Prof. Dr. Kulozik möchte ich sehr für die Übernahme des Zweitgutachtens danken, sowie Herrn Prof. Dr. Vogel als Prüfungsvorsitz.

Den Projektpartnern aus der Milchindustrie möchte ich ebenfalls für die Bereitstellung der Proben und den interessanten und unentbehrlichen Wissenstransfer „Danke“ sagen.

Mein Dank gilt zudem Genia Lücking sowie Etienne Doll für die freundliche, geduldige und hilfsbereite Führung in fachlichen und persönlichen Anliegen sowie den vielen Korrekturarbeiten für Publikationen und Berichte. Weiterhin möchte ich mich für die wertvolle Unterstützung im Labor sowie den vielen hilfreichen Tipps aus dem TA-Erfahrungsschatz bei Inge, Angela und Patrick bedanken. Meinen Bürokollegen Lena und Chris gilt natürlich ebenfalls mein herzlichster Dank für das freundschaftliche Verhältnis, die guten Gespräche, sowie die bioinformatische Unterstützung von Dir, Chris!

Allen weiteren Kollegen und Studenten danke ich für die angenehme Stimmung am Lehrstuhl und die schönen Stunden bei Betriebsausflügen oder bei Treffen nach Feierabend.

Letztendlich gilt mein Dank meiner Familie sowie den engen Freunden, die während der Dauer meines Studiums sowie der Promotion in allen Höhen und Tiefen an meiner Seite standen, um mir Halt zu geben sowie die Motivation, weiterzumachen.

Der größte Dank gilt meinem Mann Samuel. Deine Liebe und Unterstützung konnten mir jeden Zweifel bei der Bewältigung der Promotion nehmen.

- DANKE -

Liste der Vorveröffentlichungen

Publikationen

Hofmann K, Huptas C, Doll EV, Scherer S, Wenning M. *Pseudomonas saxonica* sp. nov., isolated from raw milk and skimmed milk concentrate. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2020. doi: 10.1099/ijsem.0.004043

Hofmann K, Huptas C, Doll EV, Scherer S, Wenning M. *Pseudomonas haemolytica* sp. nov., isolated from raw milk and skimmed milk concentrate. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2020. doi: 10.1099/ijsem.0.003851

Hofmann K, Woller A, Huptas C, Wenning M, Scherer S, Doll EV. "Pseudomonas cremoris sp. nov., a novel proteolytic species isolated from cream" *Int J Syst Evol Microbiol*. 2021. doi: 10.1099/ijsem.0.004597

Siebert A, Hofmann K, Staib L, Doll EV, Scherer S, Wenning M. "Amplicon-sequencing of raw milk microbiota: Impact of DNA extraction and library-PCR" *Appl Microbiol Biotechnol*. 2021. doi: 10.1007/s00253-021-11353-4

Präsentation

„Analyse hofseitiger Einflussfaktoren auf die *Pseudomonas*-Keimzahl in Rohmilch und Identifikation möglicher Eintrittsrouten“, Weihenstephaner Milchwirtschaftliche Herbsttagung, Freising, Deutschland, Oktober 2020 (online)

Poster

“Quantification of *Pseudomonas* in raw milk and correlation with farm-specific influencing factors“, 6th Joint Conference of the DGHM & VAAM, Leipzig, Deutschland, März 2016

„Neubeschreibung von zwei *Pseudomonas*-Spezies, isoliert aus Rohmilch und Magermilchkonzentrat“, 18. Fachsymposium Lebensmittelmikrobiologie, Kiel, Deutschland, Oktober 2019