



TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

TUM School of Life Sciences

Lehrstuhl für Mikrobielle Ökologie

**Rohmilchmikrobiota in Nord- und Süddeutschland –
Zusammensetzung und Ermittlung hofseitiger Einflussfaktoren**

Annemarie Karoline Siebert

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. Ulrich Kulozik

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

2. Prof. Dr. Rudi F. Vogel

Die Dissertation wurde am 23.06.2021 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die TUM School of Life Sciences am 06.08.2021 angenommen.

INHALTSVERZEICHNIS

LISTE DER VERÖFFENTLICHUNGEN.....	IV
ZUSAMMENFASSUNG.....	VI
ABSTRACT.....	VIII
ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	X
TABELLENVERZEICHNIS.....	XII
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	XIV
I. EINLEITUNG.....	1
1. Rohmilchmikrobiota.....	1
1.1 Mikrobiologie und Hygiene.....	1
1.2 Indikatorkeime für Produktqualität und Rohmilchhygiene.....	3
2. Next-Generation Sequencing.....	4
2.1 16S rRNA-Sequenzierung.....	4
2.2 Amplikon-Sequenzierung von Rohmilch.....	7
3. Taxonomische Klassifizierung bakterieller Taxa.....	8
3.1 Die Familie der <i>Aerococcaceae</i>	9
3.2 Die Gattung <i>Raineyella</i> aus der Familie der <i>Propionibacteriaceae</i>	10
4. Zielsetzung der Arbeit.....	12
II. MATERIAL UND METHODEN.....	13
1. Medien.....	13
2. Rohmilchproben.....	14
2.1 Methodenoptimierung.....	14
2.2 Deskriptive Mikrobiomanalyse.....	14
3. Keimzahlbestimmung.....	16
4. Extraktion bakterieller DNA aus Rohmilch.....	16
4.1 Optimierung des DNA-Extraktionsprotokolls.....	16
4.1.1 Abtrennung bakterieller Zellen.....	16
4.1.2 Reduktion der eukaryotischen DNA durch selektive Lyse.....	17
4.1.3 Bakterielle Lyse und DNA-Extraktion.....	18
4.2 Finales Protokoll zur DNA-Extraktion aus Rohmilch.....	21
5. Quantifizierung bakterieller DNA.....	21
6. Amplikon-Sequenzierung von Rohmilchproben.....	23
6.1 Erstellung der Sequenzierbibliothek per <i>library</i> -PCR.....	23

6.1.1	Optimierung der <i>library</i> -PCR.....	25
6.1.2	Deskriptive Mikrobiomanalyse	25
6.2	Auswertung der Sequenzierdaten.....	25
6.2.1	Methodenoptimierung	26
6.2.2	Deskriptive Mikrobiomanalyse	27
7.	Statistik.....	28
8.	Charakterisierung neuer bakterieller Taxa	29
8.1	Genetische Analysen.....	29
8.1.1	16S rRNA-Phylogenie	29
8.1.2	Genomische Analysen	30
8.1.2.1	Phylogenomische Analysen	31
8.1.2.2	Analyse des Aminosäuremetabolismus per KEGG-Datenbank.....	31
8.2	Phänotypische Analysen	31
8.2.1	Analyse der Zellmorphologie	32
8.2.2	Analyse der Wachstumsbedingungen.....	32
8.2.2.1	<i>Fundicoccus ignavus</i> gen. nov., sp. nov.	32
8.2.2.2	<i>Raineyella</i> sp. nov.	33
8.2.3	Analyse biochemischer Eigenschaften	33
8.3	Chemotaxonomische Analysen.....	35
8.4	Hinterlegung der Stämme	36
III.	ERGEBNISSE	37
1.	Protokolloptimierung zur Amplikon-Sequenzierung von Rohmilch	37
1.1	Bakterienseparation und selektive Lyse zur Reduktion eukaryotischer DNA.....	37
1.2	Vergleich der Lysemethoden zur Extraktion bakterieller DNA	39
1.2.1	DNA-Konzentration nach der <i>library</i> -PCR.....	39
1.2.2	Zusammensetzung der Mikrobiota	41
1.3	Einfluss der PCR-Zyklenzahl auf die Biodiversität.....	45
2.	Deutschlandweite Analyse von Rohmilchmikrobiota.....	49
2.1	Mikrobielle Diversität in Rohmilch	49
2.2	Einfluss hofseitiger Faktoren auf Verderbskeime und Hygieneindikatoren	53
2.2.1	Einfluss der Produktionsart und Tierhaltung.....	53
2.2.2	Einfluss des Melkprozesses	59
2.2.3	Einfluss der Kühlung und Lagerung.....	65
3.	Charakterisierung der Gattung <i>Fundicoccus ignavus</i> gen. nov., sp. nov.	67
3.1	Genetische Charakterisierung	67

3.1.1	Phylogenetische Einordnung	67
3.2.2	Genomische Charakterisierung.....	69
3.2.2.1	Phylogenomische Einordnung	69
3.2.2.2	Charakterisierung des Aminosäuremetabolismus per KEGG-Datenbank ..	70
3.2	Phänotypische Charakterisierung.....	71
3.3	Chemotaxonomische Charakterisierung	73
4.	Charakterisierung einer neuen Spezies <i>Raineyella</i> sp. nov	75
4.1	Genetische Charakterisierung	76
4.1.1	Phylogenetische Einordnung	76
4.1.2	Genomische Charakterisierung.....	77
4.2	Phänotypische Charakterisierung.....	78
4.3	Chemotaxonomische Charakterisierung	81
IV.	DISKUSSION	83
1.	Probenaufbereitung zur Mikrobiomanalyse von Rohmilch	83
1.1	Isolation bakterieller DNA aus Rohmilch.....	83
1.2	Zyklenzahl in der <i>library</i> -PCR zur Erstellung der Sequenzierbibliothek.....	86
2.	Die Mikrobiota von Rohmilch deutscher Erzeugerhöfe	87
2.1	Zusammensetzung der Rohmilchmikrobiota	88
2.2	Einfluss hofseitiger Faktoren auf Indikatorkeime der Rohmilchhygiene	90
2.2.1	Produktionsart und Tierhaltung als Einflussfaktoren	91
2.2.2	Melksystem und der Kühlung als Einflussfaktoren.....	94
3.	Neubeschreibung bakterieller Taxa.....	97
3.1	Beschreibung der neuen Gattung <i>Fundicoccus ignavus</i> gen. nov., sp. nov.....	97
3.2	Beschreibung einer neuen Spezies <i>Raineyella</i> sp. nov.	100
V.	SCHLUSSFOLGERUNG	103
	ANHANG.....	105
	LITERATURVERZEICHNIS	116
	DANKSAGUNG.....	XVI
	EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG.....	XVII
	CURRICULUM VITAE	XVIII

LISTE DER VERÖFFENTLICHUNGEN

Publikationen

Die Daten zur **Methodenoptimierung** und **Neubeschreibung** von *Fundicoccus ignavus* gen. nov., sp. nov. in dieser Arbeit wurden bereits publiziert:

Siebert, A., Hofmann, K., Staib, L., Doll, E. V., Scherer, S., and Wenning, M. (2021). Amplicon-sequencing of raw milk microbiota: impact of DNA extraction and library-PCR. *Appl Microbiol Biotechnol* 105, 4761-4773.

Persönlicher Beitrag: Die Studie wurde von A. Siebert und M. Wenning konzipiert. A. Siebert führte die Versuche zur Abtrennung der bakteriellen Zellen, der selektiven Lyse und der Optimierung der *library*-PCR durch. Die Versuche zum Kitvergleich wurden durch A. Siebert und K. Hofmann ausgeführt und zusammen mit L. Staib ausgewertet. A. Siebert führte die finale Datenanalyse durch und verfasste die erste Version des Manuskriptes, welches von allen Koautoren überarbeitet wurde.

Siebert, A., Huptas, C., Wenning, M., Scherer, S. and Doll, E. V. (2020). *Fundicoccus ignavus* gen. nov, sp. nov., a novel genus of the family *Aerococcaceae* isolated from bulk tank milk. *Int J Syst Evol Microbiol* 70(8), 4774-4781.

Persönlicher Beitrag: Alle phylogenetischen und phänotypischen Analysen wurden von A. Siebert unter der Betreuung von E. V. Doll durchgeführt. Durch C. Huptas erfolgte die Assemblierung und die Annotation der Genome sowie die Erstellung des UBCG-Baums. Alle chemotaxonomischen Analysen wurden bei der DSMZ ausgeführt und von A. Siebert analysiert. A. Siebert verfasste die erste Version des Manuskriptes, welches von allen Koautoren überarbeitet wurde.

Weitere Publikationen:

Kupfer, V., Vogt, E., Siebert, A., Meyer, M.L., Vogel, R.F., and Niessen, L. (2017). Foam-stabilizing properties of yeast protein PAU5 and evaluation of factors that can influence its concentration in must and wine. *Food Res Int* 102, 111-118.

Abellan-Schneyder, I., Siebert, A., Hofmann, K., Wenning, M., and Neuhaus, K. (2021). Full-length SSU rRNA gene sequencing allows species-level detection of bacteria, archaea, and yeasts present in milk. *Microorganisms* 9(6), 1251.

Präsentationen

„Analyse der Rohmilchmikrobiota mittels Amplikon-Sequenzierung – Einfluss der Probenvorbereitung und library-PCR“, 18. Fachsymposium Lebensmittelmikrobiologie, Kiel, Deutschland, Oktober 2019

„Analyse der Rohmilchmikrobiota per Amplikon-Sequenzierung – Status quo und Quantifizierung von Hygieneindikatoren“, Weihenstephaner Milchwirtschaftliche Herbsttagung, Freising, Deutschland, Oktober 2020

Poster

“Analysis of raw milk microbiome by amplicon sequencing – Impact of sample preparation and library-PCR”, FEMS 2019 - 8th Congress of European Microbiologists, Glasgow, UK, Juli 2019

„Comprehensive analysis of raw milk microbiota from German farms“, VAAM - Jahrestagung der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie, Leipzig, Deutschland, März 2020

ZUSAMMENFASSUNG

Die Zusammensetzung der Rohmilchmikrobiota ist äußerst komplex und hat einen entscheidenden Einfluss auf die hygienische und sensorische Beschaffenheit sowie die Qualität resultierender Produkte. Der Eintrag bakterieller Kontamination auf Ebene des milchproduzierenden Betriebes ist ausschlaggebend für die primäre Rohmilchqualität. Daher war das Ziel dieser Arbeit die Mikrobiota von Rohmilch aus Deutschland zu erfassen und hofspezifische Faktoren aufzudecken, welche die Abundanz von verderbsassoziierten und hygiene relevanten Keimgruppen determinieren. Das *Next-Generation Sequencing* (NGS) erleichtert eine detaillierte Mikrobiomanalyse maßgeblich, wobei Rohmilch eine herausfordernde Probenmatrix mit gewöhnlich geringen Keimzahlen von $< 5 \log \text{KbE/ml}$ darstellt und den DNA-Isolationsprozess erschwert. Deshalb war die Optimierung der DNA-Extraktion aus Rohmilch und die Erstellung der *library*-PCR im Rahmen dieser Arbeit die Grundlage für die Durchführung von Amplikon-Sequenzierungen.

Zu Beginn der Methodenoptimierung wurde die Separation der Bakterien aus der Rohmilch und die Reduktion der eukaryotischen DNA evaluiert. Die enzymatische, selektive Lyse der somatischen Zellen mit Proteinase K und dem Abbau der freigewordenen DNA resultierte in einer deutlichen Reduktion der eukaryotischen DNA und in einer Zunahme des Anteils an bakterieller DNA. Eine vergleichende Mikrobiomanalyse verschiedener Methoden zur bakteriellen Lyse ergab, dass die Kombination aus Enzymen und mechanischem Aufschluss notwendig ist, um adäquate Amplikon-Mengen zu erzielen und die Biodiversität akkurat abzudecken. Zudem zeigten hohe Zyklenzahlen in der *library*-PCR signifikante Verzerrungen der Biodiversität mit einer Tendenz zur Über- und Unterrepräsentation einzelner Taxa. Insbesondere für Rohmilchproben mit geringen Keimzahlen wurde gefunden, dass ein Protokoll aus Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)-Zugabe zum Casein-Aufschluss, selektiver Lyse und kombinierter bakterieller Lyse mit niedrigen PCR-Zyklenzahlen geeignet ist, um Rohmilchmikrobiota erfolgreich zu sequenzieren.

Für die Datenerhebung der Rohmilchmikrobiota wurden 313 verschiedene Erzeugerhöfen in ganz Deutschland beprobt und insgesamt 930 Proben analysiert. Trotz einer ausgesprochen hohen Komplexität der taxonomischen Diversität wurde ein Core-Mikrobiom mit 15 verschiedenen Gattungen in 95 - 99% der Rohmilchproben mit *Staphylococcus*, *Streptococcus* und *Corynebacterium* als prävalenteste Taxa detektiert. Neben den absoluten bakteriellen Zellzahlen bestätigten alpha-Diversitätsindizes (Richness und Shannon) eine heterogene

Verteilung der Biodiversität zwischen den einzelnen Rohmilchproben und damit verbundene Schwankungen in der mikrobiologischen Rohmilchqualität. Während die größte Streubreite der Keimzahlen und im Median signifikant höchste Werte aus der konventionellen Erzeugung hervorgingen, zeigten die ökologische Rohmilch und Proben aus Weidehaltung im Schnitt die höchste bakterielle Vielfalt mit ausgewogeneren Anteilen der einzelnen Taxa. Weiterhin führte das automatisierte Melksystem zu signifikant höheren Anteilen der *Streptococcaceae*. Die Analysen lieferten Hinweise darauf, dass eine Assoziation zwischen Herdengröße und dem Aufkommen einer Mastitis bestehen könnte. Verstärkte Melkverunreinigungen durch Fäzes- und Rumenmikrobiota zeigten sich vorwiegend in Verbindung mit Anbindehaltung. *Pseudomonas* spp. und *Acinetobacter* spp. bildeten die dominantesten Gram-negativen Spezies und machten demnach den größten Anteil der psychrotoleranten Mikrobiota aus, die vorwiegend durch Laufstallhaltung und Rekontaminationen bei Kühlung und Proliferation durch längere Kühlagerung determiniert wurde.

Bei einer vorangegangenen, kulturabhängigen Biodiversitätsstudie der aeroben, mesophilen Mikrobiota von Tankmilch wurden Stämme isoliert, die weder einer gültig beschriebenen Gattung noch Spezies zugeordnet werden konnten. Im dritten Teil dieser Arbeit wurden somit Isolate einer potentiell neuen Gattung der Familie *Aerococcaceae* und einer potentiell neuen Spezies der Gattung *Raineyella* der *Propionibacteriaceae* mit einem polyphasischen Ansatz charakterisiert und beschrieben.

ABSTRACT

Raw milk microbiota are complex communities contributing to the hygienic and organoleptic properties as well as quality of dairy products. The primary contamination of raw milk at the milk-producing farm is crucial for microbial raw milk quality. Therefore, this study aims to analyze the microbial composition of German raw milk and to uncover farm-specific factors influencing the abundance of spoilage associated taxa and hygiene indicators. Generally, Next-Generation Sequencing (NGS) facilitates the detailed investigation of complex microbial communities. However, due to its low-density microbiota ($\leq 5 \log \text{KBE/ml}$), raw milk is a challenging matrix and heavily complicates the DNA extraction process. Therefore, in this study, the optimization of bacterial DNA isolation and preparation of *library*-PCR was essential for reliable amplicon sequencing of raw milk microbiota.

In the beginning of the method optimization process, the separation of bacterial cells from raw milk and the depletion of eukaryotic DNA was evaluated. The enzyme-based, selective lysis of eukaryotic cells using proteinase K resulted in a distinct reduction of accessible eukaryotic DNA and an enhanced fraction of bacterial DNA. After applying different methods for bacterial lysis, comparable microbiome analysis revealed that a combination of enzymatic and mechanical lysis is needed to obtain adequate amplicon quantities and cover a broad biodiversity. High cycle numbers in *library*-PCR significantly biased the detected microbial profile with a tendency to over- or underrepresent particular taxa. Thus, the protocol using ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) for dissociation of casein micelles, followed by selective lysis, a combined bacterial lysis and low PCR cycle numbers seems to be appropriate to successfully sequence raw milk. This is particularly important for samples with low bacterial cell counts.

To analyze the raw milk microbiota, a total of 930 samples from 313 different farms throughout Germany were collected. Despite a high taxonomic diversity, a core microbiome with 15 different genera was detected in 95-99% of the raw milk samples with *Staphylococcus*, *Streptococcus*, and *Corynebacterium* as the most prevalent taxa. In addition to absolute bacterial cell counts, alpha-diversity indices (Richness and Shannon) confirmed the heterogeneous biodiversity of raw milk samples and an associated variation in raw milk microbiological quality. While the largest variation of bacterial cell counts and significantly highest median values emerged from conventional production, organic raw milk and pasture-raised samples showed on average the highest bacterial diversity with more balanced

proportions of individual taxa. Automated milking systems resulted in significantly higher levels of the *Streptococcaceae*. An association between farm size and the incidence of mastitis may exist. Increased contamination by fecal and ruminal microbiota, on the other hand, was associated with tethering. *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. were the most dominant Gram-negative species and accounted for the majority of the psychrotolerant microbiota, which was predominantly determined by free-stall barn and recontamination during refrigeration and proliferation due to prolonged cold storage at the farm.

During a culture-dependent analysis of the aerobic, mesophilic raw milk microbiota of bulk-tank milk, bacterial strains were isolated, which could not be assigned to any validly described genus or species. Therefore, in the last part of this study, the isolates of both a potentially novel genus of the family *Aerococcaceae* and a potentially novel species of the genus *Raineyella* of the *Propionibacteriaceae* were characterized and taxonomically described using a polyphasic approach.

ABBILUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1 Potentielle Einflussfaktoren auf die Rohmilchmikrobiota.....	2
Abbildung 2 Schema zur Erstellung einer Sequenzierbibliothek (<i>library</i> -PCR) basierend auf zwei Schritten.....	5
Abbildung 3 Schematischer Überblick zur Optimierung der Bakterienseparation aus Rohmilch sowie zur Reduktion der eukaryotischen DNA.....	18
Abbildung 4 Schematischer Überblick des Kitvergleichs zur Optimierung der Extraktion bakterieller DNA aus Rohmilch.....	20
Abbildung 5 Schematischer Überblick zur Optimierung der Zyklenzahl in der <i>library</i> -PCR.....	25
Abbildung 6 Einfluss der EDTA-Zugabe und der selektiven Lyse (SL) als Behandlungsmethode vor der DNA-Extraktion.....	38
Abbildung 7 NMDS Plot (generalized UniFrac distance) der Rohmilchproben (RM) A und B nach der Anwendung verschiedener DNA-Extraktionsmethoden.....	43
Abbildung 8 Alpha-Diversität mit Richness und Shannon.Effective (A+B) und relative Abundanz (%) auf Gattungsebene (C).....	44
Abbildung 9 OTUs Richness (A) und Shannon.Effective (B) nach Anwendung von 15-35 Zyklen im 1. Schritt der <i>library</i> -PCR.....	46
Abbildung 10 Verteilung der relative Abundanz (%) auf Gattungsebene nach der Anwendung von 15-35 Zyklen im 1. Schritt der <i>library</i> -PCR.....	47
Abbildung 11 NMDS-Plot (generalized UniFrac distance) nach der Anwendung von 15-35 Zyklen im 1. Schritt der <i>library</i> -PCR.....	48
Abbildung 12 Relativer Anteil (%) der zugeordneten 16S rRNA-Gensequenzen auf (A) Phylum- und (B) Gattungsebene.....	50
Abbildung 13 Verteilung der relativen Abundanz (%) der vorherrschenden Gattungen (g) detektiert in Rohmilch von deutschlandweit verteilten Erzeugerhöfen.....	51
Abbildung 14 Hauptkomponentenanalyse (A) und relative Abundanzen (%) auf Gattungsebene (B) von nord- und süddeutschen Rohmilchproben gruppiert nach Regionen.....	54
Abbildung 15 Verteilung der absoluten Zellzahlen (A+C) und alpha-Diversität mit Richness (Observed OTUs) und Shannon Index (B+D) in Rohmilch gruppiert nach Produktionsart und Tierhaltung.....	55
Abbildung 16 Verteilung relativer Abundanzen (%) in Rohmilch gruppiert nach Produktionsart.....	56
Abbildung 17 Beta-Diversität (A) sowie Verteilung der relativen Abundanzen (%) (B) in Rohmilch gruppiert nach Tierhaltungsform.....	58
Abbildung 18 Verteilung der absoluten bakteriellen und somatischen Zellzahlen (A) sowie der alpha-Diversität mit Richness (Observed OTUs) und Shannon Index (B) in Rohmilch gruppiert nach Melksystem.....	60

Abbildung 19 Hauptkomponentenanalyse auf Familienebene (A) und relative Abundanzen (%) (B) auf Gattungsebene von Rohmilch gruppiert nach Melksystem.	61
Abbildung 20 Verteilung relativer Abundanzen (%) in Rohmilch gruppiert nach Melksystem.	62
Abbildung 21 Verteilung der abundantesten OTUs der Gattung <i>Streptococcus</i> detektiert in Rohmilch.	64
Abbildung 22 Verteilung der absoluten bakteriellen Zellzahlen in Rohmilch gruppiert nach Kühlmethode und Intervall der Milchabholung.	66
Abbildung 23 Verteilung relativer Abundanzen auf (%) in Rohmilch gruppiert nach Kühlmethode und Intervall der Milchabholung.	66
Abbildung 24 16S rRNA Maximum-Likelihood Baum mit den drei Stämme WS4939 ^T , WS4753, WS5303 und allen valide beschriebenen Typspezies und Typstämmen der <i>Aerococcaceae</i>	68
Abbildung 25 UBCG-Baum auf Basis eines multigenen Alignments von 92 <i>housekeeping</i> Genen.	70
Abbildung 26 Phasenkontrastaufnahme der Zellmorphologie von <i>Fundicoccus ignavus</i> gen. nov., sp. nov. WS4937 ^T	71
Abbildung 27 Zusammensetzung der polaren Lipide von <i>Fundicoccus ignavus</i> gen. nov., sp. nov. WS4937 ^T nach Analyse per zweidimensionaler DC.	74
Abbildung 28 16S rRNA Maximum-Likelihood Baum von <i>Raineyella</i> sp. nov. WS4898 ^T und WS4899 und den ersten 20 Treffern mit der höchsten 16S rRNA-Identität auf EzBioCloud.	77
Abbildung 29 Phasenkontrastaufnahme der Zellmorphologie von <i>Raineyella</i> sp. nov. WS4898 ^T	78
Abbildung A1 Verteilung der relative Abundanz (%) auf Gattungsebene (A) und NMDS (generalized UniFrac distance) Plot nach der Anwendung von 15-35 Zyklen im 1. Schritt der <i>library</i> -PCR (B).	114
Abbildung A2 Verteilung relativer Abundanzen (%) der Gattungen <i>Staphylococcus</i> und <i>Streptococcus</i> in Rohmilch gruppiert nach Hofgröße.	115

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1 Anzahl der Rohmilchproben pro ausgewähltem hofseitigen Einflussfaktor.	15
Tabelle 2 DNA-Extraktionskits für die Optimierung der DNA Isolation mit dem entsprechenden Extraktionsprinzip.	19
Tabelle 3 Real-time PCR-Ansatz für den Vergleich der Vorbehandlungsmethoden und die Quantifizierung bakterieller DNA zur Methodenoptimierung.	22
Tabelle 4 PCR Programm für den Vergleich der Vorbehandlungsmethoden und die Quantifizierung bakterieller DNA zur Methodenoptimierung.	22
Tabelle 5 PCR-Reaktionsansatz für die <i>library</i> -PCR zur Generierung von Amplikons (V3+V4).	23
Tabelle 6 PCR-Bedingungen für die <i>library</i> -PCR zur Generierung von Amplikons.	24
Tabelle 7 Einstellungen für Verarbeitung der FASTQ-Daten mit IMNGS zur Generierung einer OTUs-Tabelle.	26
Tabelle 8 Einstellungen für die Verarbeitung der FASTQ-Daten mit IMNGS für die Generierung einer zOTUs-Tabelle.	27
Tabelle 9 Effekt der Extraktionsmethode auf die DNA-Konzentrationen nach der <i>library</i> -PCR.	40
Tabelle 10 Readzahlen nach Amplikon-Sequenzierung und Qualitätskontrolle der Rohmilchproben A und B nach Anwendung verschiedener Extraktionsmethoden.	42
Tabelle 11 Zusammensetzung des Core-Rohmilchmikrobioms.	52
Tabelle 12 Charakteristische Eigenschaften des Typstammes WS4939 ^T im Vergleich zu allen valide beschriebenen Typspezies der Familie <i>Aerococcaceae</i>	72
Tabelle 13 Zelluläre Fettsäuren des Typstammes WS4939 ^T und aller valide beschriebenen Typspezies der Familie <i>Aerococcaceae</i>	75
Tabelle 14 Digitale DDH Werte der <i>Raineyella</i> sp. nov. Stämme und den zwei Typstämmen der Gattung <i>Raineyella</i>	78
Tabelle 15 Differenzierende phänotypische Eigenschaften der <i>Raineyella</i> sp. nov. Stämme im Vergleich zu den zwei Typstämmen der Gattung <i>Raineyella</i>	80
Tabelle 16 Zelluläre Fettsäuren von <i>Raineyella</i> sp. nov. WS4898 ^T und WS4899 im Vergleich zu <i>Raineyella antarctica</i> DSM 100494.	82
Tabelle A1 DNA-Konzentration nach dem Test auf selektive Lyse von ausgewählten Gram-negativen und Gram-positiven Bakterien.	105
Tabelle A2 Relative Abundanzen auf Gattungsebene (%) nach Anwendung verschiedener Extraktionsmethoden bei Rohmilchprobe A.	107
Tabelle A3 Relative Abundanzen auf Gattungsebene (%) nach Anwendung verschiedener Extraktionsmethoden bei Rohmilchprobe B.	108

Tabelle A4 Relative Abundanzen (%) auf Gattungsebene gruppiert nach Regionen in Nord- und Süddeutschland..... 109

Tabelle A5 Relative Abundanzen (%) auf Gattungsebene gruppiert nach Produktionsart... 110

Tabelle A6 Relative Abundanzen (%) auf Gattungsebene gruppiert nach Tierhaltungsform.....111

Tabelle A7 Relative Abundanzen (%) auf Gattungsebene gruppiert nach Melksystem..... 112

Tabelle A8 *Assembly* Statistik der Isolate zur Neubeschreibung von *Fundicoccus ignavus* gen. nov. sp. nov..... 113

Tabelle A9 Zelluläre Fettsäuren der drei *Fundicoccus ignavus* gen. nov., sp. nov. Stämme WS4937^T, WS4759 und WS5303..... 113

Tabelle A10 *Assembly* Statistik der Isolate zur Neubeschreibung von *Raineyella* sp. nov... 114

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AAI	<i>average aminoacid identity</i>
AMS	automatisches Melksystem
BCCM	<i>Belgian Coordinated Collection of Microorganisms</i>
BfR	Bundesinstitut für Risikobewertung
Bp	Basenpaare
Ct	<i>Cycle threshold</i>
D	Durchlauf- / Vorlaufkühlung
DC	Dünnschichtchromatografie
dDDH	digitale DNA-DNA Hybridisierung
DDH	DNA-DNA Hybridisierung
DNA	Desoxyribunukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DSMZ	Deutsche Stammsammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EL	enzymatische Lyse
EU	Europäische Union
gen. nov.	<i>genus novum</i>
GKZ	bakterielle Gesamtkeimzahl
IBC	<i>Individual Bacterial Count</i>
IMNGS	<i>Integrated Microbial Next Generation Sequencing</i>
K	konventionell
KbE	koloniebildende Einheit
KEGG	<i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i>
L	Laufstall
LPSN	<i>List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature</i>
LW	Laufstall + Weide
MBL	Name des Kit-Puffers
Mbp	Megabasen
MIDI	<i>Microbial Identification System</i>
ML	Maximum-Likelihood
MRI	Max Rubner-Institut Kiel
MS	Melkstand
MSB	Milchsäurebakterien
MTP	Mikrotiterplatte
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NGS	<i>Next Generation-Sequencing</i>
NK	Negativkontrolle
NMDS	<i>non-metric multidimensional scaling</i>
NO	Nord-Ost
nt	Nukleotide
NW	Nord-West
Ö	ökologisch
OD	optische Dichte
OTU	<i>operational taxonomic unit</i>

PCA	<i>Principal Component Analysis</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PF	PowerFood Kit
PP	PathoProof Kit
R	Rohrmelkanlage
RDP	<i>Ribosomal database project</i>
RM	Rohmilch
rpm	revolutions per minute
rRNA	riobosomale Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
S	Anbindestall
SIM	Sulfid-Indol-Motilität Medium
SL	selektive Lyse
SO	Süd-Ost
SP	Sample Preparation Kit
sp. nov.	<i>species nova</i>
SP2	Star Prep Two Kit
spp.	<i>species pluralis</i>
SW	Süd-West
SZZ	somatische Zellzahl
T	Tankkühlung
TE	TRIS-EDTA
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TSA	Tryptose-Soja-Agar
TSB	Tryptose-Soja-Bouillon
TUM	Technische Universität München
TYGS	<i>Type Strain Genome Server</i>
UBCG	<i>Up-to-date bacterial core genome</i>
ÜNK	Übernachtkultur
V-Region	variable Region
woEL	ohne zusätzliche enzymatische Lyse
zOTU	<i>zero-radius OTU</i>

Abkürzungen von Gattungsnamen

<i>E.</i>	<i>Eremococcus</i>
<i>F.</i>	<i>Fundicoccus</i>
<i>G.</i>	<i>Globicatella</i>
<i>R.</i>	<i>Raineyella</i>
<i>S.</i>	<i>Streptococcus</i>

I. EINLEITUNG

1. Rohmilchmikrobiota

1.1 Mikrobiologie und Hygiene

Deutschland ist der größte Milchproduzent in der Europäischen Union (EU), wodurch die Erzeugung von Milch und Milchprodukten zu einem der umsatzstärksten Industriezweige der deutschen Land- und Ernährungswirtschaft zählt (MIV, 2020b). Im Jahr 2020 wurden insgesamt 31,8 Millionen Tonnen Kuhmilch von deutschen Erzeugerhöfen an milchverarbeitende Unternehmen geliefert (BLE, 2020; MIV, 2020a). Einen stetigen Aufwärtstrend erfährt die Menge an ökologisch produzierter Milch, deren Anteil sich im Vergleich zum Jahr 2008 knapp verdreifachte und schließlich in 2020 bei ca. 1,2 Millionen Tonnen lag (AMI, 2020).

Ganz entscheidend für die Beurteilung der mikrobiologischen Milchqualität nach Abgabe durch den Erzeuger (Anlieferungsmilch) ist die bakterielle Gesamtkeimzahl (GKZ), die im direkten Zusammenhang mit dem Milchpreis steht. Somit ist die GKZ eines der wichtigsten Kontrollinstrumente zur Überprüfung von definierten Richtlinien der generellen Rohmilchhygiene. Zur Erfassung der Qualitätsparameter erfolgt eine geprüfte, verschleppungsfreie Probenahme im Zuge des Milchannahmeprozesses über den Sammelwagen der Molkerei direkt am Erzeugerhof (Baumgartner und Märtlbauer, 2016). Nach Regularien der EU darf die aerobe, mesophile bakterielle GKZ von Anlieferungsmilch tierischen Ursprungs den Wert von 100.000 koloniebildenden Einheiten (KbE)/ml nicht überschreiten (EU-Verordnung, 2004) und ist ein wesentlicher Faktor in der Wertschöpfungskette von Milcherzeugnissen. Frühere Untersuchungen von Rohmilch zeigten, dass die bakterielle Belastung mit Keimzahlen zwischen 3 log und 5 log KbE/ml teilweise sogar deutlich unterhalb des Grenzwertes lag (Fricker et al., 2011; Mallet et al., 2012; von Neubeck et al., 2015; Skeie et al., 2019). Als quantitativer Qualitätsparameter für die Eutergesundheit auf Herdenebene ist auch die somatische Zellzahl auf einen Grenzwert von ≤ 400.000 KbE/ml festgelegt (EU-Verordnung, 2004). Diese Kriterien lassen allerdings keine eindeutigen Rückschlüsse auf die heterogene, komplexe Zusammensetzung der Mikrobiota und das Vorhandensein problematischer Keimgruppen zu, die einen großen Einfluss auf die mikrobiologische Qualität und Sicherheit der Rohmilch haben können (Quigley et al., 2013b; Fusco et al., 2020; Parente et al., 2020). Tatsache ist, dass der Melkvorgang mit der Passage des Strichkanals, der Euter- und Zitzenoberfläche unstrittig eine der ersten Quellen bakterieller

Kontamination in der Primärproduktion von Rohmilch darstellt (Rainard, 2017; Derakhshani et al., 2018a). Ob in einer gesunden Euterdrüse eine natürliche Mikrobiota existiert oder eine Kontamination der ursprünglich sterilen Milch erst während des Melkens erfolgt, wird in der Literatur bislang kontrovers diskutiert (Addis et al., 2016; Rainard, 2017; Derakhshani et al., 2018a). Abgesehen von einer hypothetischen endogenen Mikrobiota, wird die immense taxonomische Diversität von Rohmilch hauptsächlich durch unterschiedlichste kuh- und umweltassoziierte Faktoren im Produktionsumfeld der Milchgewinnung determiniert. So wurden in vergangenen Studien Einflussfaktoren, wie z.B. Hofmanagement und Melkhygiene (Doyle et al., 2017a; Metzger et al., 2018; Albonico et al., 2020; Carafa et al., 2020), Gesundheitsstatus des Kuheuters (Oikonomou et al., 2012; Kuehn et al., 2013), Laktationszustand (Doyle et al., 2017b), Rasse (Cremonesi et al., 2018; Curone et al., 2018) oder auch die Abhängigkeit der Jahreszeit (Doyle et al., 2017a; Li et al., 2018) auf die Zusammensetzung der Mikrobiota untersucht.

Weltweit stieg die Nachfrage regionaler, gesunder und minimal verarbeiteter Lebensmittel und somit auch der Konsum von unpasteurisierter Rohmilch und Rohmilchkäse (Fusco et al., 2020). Damit verbunden sind allerdings mikrobiologische Risiken, die auch mit der hygienischen Sicherheit des Lebensmittels assoziiert sind. Durch den Verzehr dieser Produkte führten pathogene Bakterien wie z.B. *Campylobacter* spp., *Staphylococcus aureus* oder auch Shigatoxin produzierende *Escherichia coli* in den letzten Jahren immer wieder zu Ausbrüchen mit hohem Gesundheitsrisiko (Johler et al., 2015; Mungai et al., 2015; Artursson et al., 2018; Willis et al., 2018). Darüber hinaus gibt es jedoch auch Keimgruppen, die mit dem Lebensmittelverderb assoziiert sind oder Hygieneindikatoren darstellen. Als Qualitätsparameter sind sie damit auch für die milchverarbeitenden Unternehmen von großer qualitativer und technischer Bedeutung. (Abbildung 1).

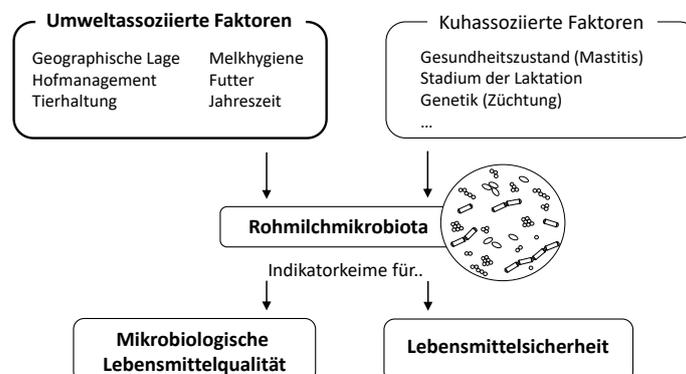


Abbildung 1 Potentielle Einflussfaktoren auf die Rohmilchmikrobiota. Produktions- und Haltungsbedingungen, welche die Abundanz und Prävalenz von Verderbskeimen und Indikatoren der generellen Rohmilchhygiene beeinflussen können.

1.2 Indikatorkeime für Produktqualität und Rohmilchhygiene

Tierassoziierte Indikatoren für die Melkhygiene sind primär Gram-positive Taxa wie die Gattung *Streptococcus* oder koagulase-negative Staphylokokken, die einen wesentlichen Anteil der originären Eutermikrobiota ausmachen (Derakhshani et al., 2018a). Pathogene Vertreter dieser Gattungen (z.B. koagulase-positiver *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis*) können eine bakterielle Entzündung der Milchdrüsen (Mastitis) verursachen (Derakhshani et al., 2018a; Klaas und Zadoks, 2018). Infolge entzündlicher Prozesse kann es zu Störungen in der Milchverarbeitung und zu sensorischen Abweichungen kommen, wodurch Mastitis fortwährend weltweit in der Milchindustrie enorme veterinärmedizinische und wirtschaftliche Probleme nach sich zieht (Fehlings und Baumgartner, 2016; Ruegg, 2017). Durch das Vorhandensein potentieller Mastitiserreger im Euter von gesunden Kühen (Oikonomou et al., 2014) ist die Entstehung einer intramammären Entzündung vielmehr auf eine Dysbiose in der Zusammensetzung der Mikrobiota zurückzuführen, als auf eine Infektion (Derakhshani et al., 2018a). Weiterhin ist *Corynebacterium* spp. Bestandteil der kommensalen Zitzen- und Eutermikrobiota, sowie der Umgebungsflora der Milchproduktion. Der bekannteste Vertreter ist *Corynebacterium bovis*, der als potentieller pathogener Mastitiserreger jedoch als weniger bedeutend angesehen wird (Vacheyrou et al., 2011; Hiitio et al., 2016; Porcellato et al., 2020). Andererseits sind coryneforme Bakterien (z.B. *Athrobacter* spp., *Brevibacterium* spp., *Corynebacterium* spp.) und Milchsäurebakterien (MSB) der ursprünglichen Mikrobiota insbesondere wertvoll für die Aromaentwicklung von Rohmilchkäse und schmiergereiften Käsesorten (Mounier et al., 2005; Quigley et al., 2013b; Montel et al., 2014).

Strikt anaerobe, endosporenbildende Clostridien sind ubiquitär in terrestrischer Umgebung und als Teil der thermotoleranten Mikrobiota von Rohmilch eng mit dem Umfeld der Milcherzeugung assoziiert (Julien et al., 2008). Eintragsquellen von Clostridiensporen sind die zur Fütterung verwendete Mais- und Grassilage minderer Qualität. Die dadurch bedingte Aufnahme der Sporen und deren Ausscheidung ist folglich mit der Kontamination des Euters und schließlich der Übertragung in die Milch assoziiert (Pahlow et al., 2003; Julien et al., 2008; Borreani et al., 2019). Für die Milchindustrie von Bedeutung ist vor allem die Spezies *Clostridium tyrobutyricum*, da diese Spätblähungen in Hart- und Schnittkäse verursachen kann (Klijn et al., 1995). Zusätzliche Indikatorkeime für Fäkalkontaminationen und mangelnden Hygienemaßnahmen ist die Gruppe der Gram-negativen, coliformen *Enterobacteriaceae* (z.B. *Escherichia* spp., *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp.). Einige Vertreter dieser Familie spalten unter Säure- und Gasbildung, Glukose und Laktose oder repräsentieren

potentielle Krankheitserreger (Zangerl, 2016). Als Indikatorkeime für die Anlagenhygiene (Melkanalge, Leitungen und Lagertank) spielen vorrangig psychrotolerante Gram-negative Taxa eine Rolle, deren Abundanz abhängig von Lagertemperatur und –zeit ist. So sind neben coliformen Bakterien beispielsweise *Pseudomonas* spp. oder *Acinetobacter* spp. aufgrund ihrer psychrotoleranten Natur typische Kontaminationskeime in kühl gelagerter Rohmilch (Hantsis-Zacharov und Halpern, 2007; von Neubeck et al., 2015). Durch die notwendige Kühlung der Rohmilch im Anschluss an das Melken erfolgt eine zunehmende Proliferation psychrotoleranter Keimgruppen, was zu einer drastischen Verschiebung der Rohmilchmikrobiota führen kann (Rasolofo et al., 2010; Fricker et al., 2011). Durch die Bildung von hitzestabilen Proteasen und Lipasen, vorwiegend durch *Pseudomonas* spp. oder *Acinetobacter* spp. (Marchand et al., 2009; von Neubeck et al., 2015; Machado et al., 2017), kann es bei mikrobiell stabiler, ultrahoherhitzter (UHT)-Milch zu sensorischen, sowie textuellen Veränderungen kommen (Stoeckel et al., 2016). Dies hat möglicherweise einen frühzeitigen Proteinabbau zur Folge, was insbesondere bei Dauermilcherzeugnissen zu wirtschaftlichen Schäden führen kann und Molkereien vor große technologische Herausforderungen stellt.

2. Next-Generation Sequencing

Die Einführung der ersten Technologien des *Next-Generation Sequencing* (NGS) oder auch *Second-Generation Sequencing* von Roche (454), Illumina und Applied Biosystems (SOLiD) revolutionierte die DNA Sequenzierung (Mardis, 2008). Eine rasante Entwicklung des NGS in den letzten Jahren eröffnete neue Möglichkeiten zur Charakterisierung hoch komplexer mikrobieller Gemeinschaften (Salipante et al., 2014; Sinclair et al., 2015; Arnold et al., 2016; Cao et al., 2017).

2.1 16S rRNA-Sequenzierung

Die zielgerichtete Sequenzierung des 16S rRNA-Gens etablierte sich in den vergangenen Jahren als eine der bedeutendsten, kulturunabhängigen Methoden. Bis heute ist sie der Goldstandard zur Untersuchung der mikrobiellen Diversität unterschiedlichster Habitate (Wang et al., 2014). Das 16S rRNA-Gen besteht aus insgesamt neun variablen Regionen (V-Region, V1-V9), die von konservierten Abschnitten flankiert sind und eine Gesamtlänge von ca. 1.500 Bp umfassen (Janda und Abbott, 2007). Dabei entwickelten sich die V-Regionen im Laufe der Evolution unterschiedlich und ermöglichen demnach die Differenzierung bakterieller Taxa innerhalb eines mikrobiellen Ökosystems. Die evolutionär stabileren, konservierten

Regionen hingegen werden genutzt, um mit sogenannten „universellen“ Primern eine möglichst breite taxonomische Vielfalt zu erfassen (Patel, 2001; Kuczynski et al., 2011). Mit der NGS-Methode verbreitete sich auch die Polymerasekettenreaktion (PCR)-basierte Sequenzierung von 16S rRNA-Genabschnitten (Amplikons), welche häufig Anwendung auf einer Illumina-Sequenzierplattform findet (z.B. MiSeq, Illumina Inc., San Diego, USA). Eine Methode zur Generierung der Sequenzierbibliothek bzw. zur Generierung von Amplikons ist eine aus zwei Schritten bestehende PCR (Abbildung 2) (Berry et al., 2011). Amplifiziert werden im ersten PCR-Schritt einzelne oder unterschiedliche Kombinationen von bis zu drei benachbarten V-Regionen mit „universellen“ Primern. In einer darauffolgenden, zweiten PCR werden die Amplikons mit Sequenzieradaptern versehen, die für jede Probe zusätzlich individuelle Indexsequenzen enthalten. Komplementäre Sequenzmotive der Adapterprimer ermöglichen eine kovalente Bindung der Amplikons aus der *library*-PCR an die mit Oligonukleotiden beschichtete *Flow Cell*.

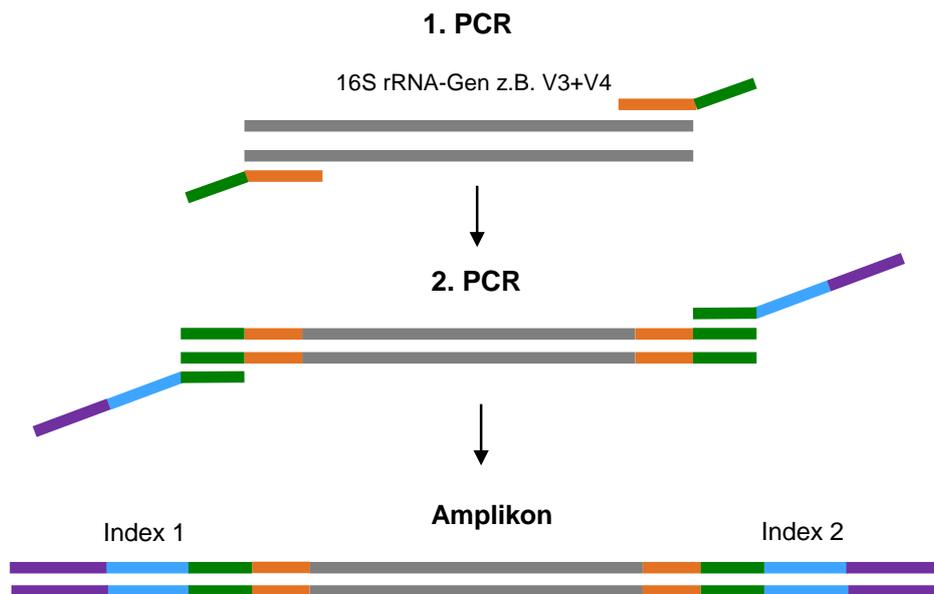


Abbildung 2 Schema zur Erstellung einer Sequenzierbibliothek (*library*-PCR) basierend auf zwei Schritten. 1. PCR: Amplifikation der Ziel-DNA (V-Region des 16S rRNA-Gens) mit universellen Primern, 2. PCR: Anfügen der Indizes für die *forward* und die *reverse* Sequenz sowie die Adapter zum Binden an der *Flow Cell* der Illumina MiSeq.

Die Illumina-Technologie basiert auf der sogenannten „Sequenzierung durch Synthese“ Methode. Dabei werden die gebundenen, einzelsträngigen Amplikons während des Prozesses der Clustergenerierung im Laufe der Sequenzierung durch eine Brückenamplifizierung (*bridged PCR*) kopiert. Demzufolge liegen schließlich bis zu 1.000 Kopien pro initialem DNA Fragment vor. Neben der Polymerase und den Primern werden in jedem Zyklus dNTPs eingebaut, die mit vier verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen und jeweils einer reversiblen

Terminatorsequenz markiert sind. Die übrigen dNTP werden ausgewaschen und für jedes Cluster wird per Laser das Fluoreszenzsignal der eingebauten dNTPs durch die Illumina-Software aufgenommen. Danach wird das Fluoreszenzsignal abgespalten und ein neuer Zyklus beginnt (Shendure und Ji, 2008; Metzker, 2010; Illumina, 2013). Ein großer Fortschritt der Illumina-Sequenzieretechnologie war die Einführung der *paired-end* Methode (Illumina, 2013). Hierbei wird das DNA-Fragment (Amplikon) von beiden Seiten abgelesen und sowohl eine *forward*, als auch eine *reverse* Sequenz generiert, was schließlich zu einem genaueren Sequenz-Alignment führt (Illumina, 2013). Auf einem Illumina MiSeq-Gerät können aktuell bis zu 600 Bp mit Sequenzen von max. 300 Bp Länge im *paired-end* Modus erreicht werden.

Aufgrund der Sequenzlängen ist die taxonomische Auflösung allerdings limitiert und erfolgt nur bis auf *operational taxonomic unit* (OTU)-Ebene. Gegensätzlich dazu, ermöglicht beispielsweise die Sequenzierung des vollständigen 16S rRNA-Gens mit den Regionen V1-V9 mittels *Third-Generation* Strategien die Identifizierung bis auf Spezies Ebene (z.B. Cusco et al., 2019; Loit et al., 2019). Nachteilig ist jedoch, dass diese Methode bisher noch nicht kostengünstig für die Hochdurchsatzsequenzierung einsetzbar und daher nicht konkurrenzfähig ist. Eine weitere Technologie für eine höher auflösende Analyse der mikrobiellen Diversität ist die PCR-freie *shotgun* Metagenomsequenzierung (Sharpton, 2014). Anstatt einer Amplifikation einzelner 16S rRNA-Genabschnitte erfolgt hier die Fragmentierung und die Sequenzierung des kompletten Genoms. Während diese zur Speziesidentifizierung vermehrt für die Analyse von Umweltproben und auch in Kombination mit einer Amplikon-Sequenzierung eingesetzt wird (z.B. Vogtmann et al., 2016; Vangay et al., 2018), ist die Metagenomanalyse für Rohmilch und Milchprodukte vergleichsweise selten (Parente et al., 2017). Ein enormer Vorteil der 16S rDNA-Sequenzierung gegenüber Metagenomanalysen ist jedoch die Vervielfältigung der initialen DNA-Menge des Probenmaterials in der *library*-PCR. Da hierdurch adäquate Mengen an bakterieller DNA für die Sequenzierung generiert werden, ermöglicht der PCR-Schritt die Analyse taxonomischer Gemeinschaften mit niedriger bakterieller Ausgangskeimzahl, wie z.B. Rohmilch. Problematisch bei der Erstellung von 16S rRNA-Gen-Amplikons ist jedoch der Eintrag von PCR-Artefakten, die zur Verzerrung des mikrobiellen Profils führen können. Als Einflussfaktoren wurden in der Literatur z.B. die Verwendung der Polymerase oder die Amplifikationsraten in der PCR genannt (Gohl et al., 2016; Sze und Schloss, 2019).

2.2 Amplikon-Sequenzierung von Rohmilch

Für die Analyse komplexer mikrobieller Ökosysteme von z.B. humanen Stuhlproben (Abellan-Schneyder et al., 2021) oder pflanzlicher Mikrobiota (Thijs et al., 2017), erwies sich in der Vergangenheit die V3-V4 Region des 16S rRNA-Gens mit einer Länge von ca. 460 Bp (Klindworth et al., 2013) als geeignet. Ebenso wurde die V3-V4 Region in früheren Studien zu Biodiversitätsanalysen von Kuhmilch (Doyle et al., 2017a; Cremonesi et al., 2018; Fretin et al., 2018; Li et al., 2018) oder Muttermilch (Biagi et al., 2017; Murphy et al., 2017) gewählt.

Aufgrund der physikalischen und chemischen Eigenschaften mit einer hohen Fett- und Milchproteinfraktion (Casein) ist Rohmilch allerdings eine extrem komplexe Probenmatrix, die eine technische Herausforderung an die Extraktion bakterieller DNA stellt. Neben der Matrix sowie der niedrigen Keimbelastung von Rohmilch, erschwert zusätzlich das unvorteilhafte Verhältnis zwischen bakterieller und eukaryotischer DNA den Isolationsprozess. So wurden für Bakterien, z.B. aus dem menschlichen Darmmikrobiom, Genomgrößen zwischen 2,5 bis 5,8 Mbp detektiert (Nayfach und Pollard, 2015), wohingegen das bovine, diploide Genom eine Größe von ca. 6.000 Mbp (Zimin et al., 2009) aufweist und damit deutlich überwiegt. Obwohl aus diesen Gründen die Extraktion bakterieller DNA aus Rohmilch oder Muttermilch hin und wieder im Fokus stand (Quigley et al., 2012; Sun et al., 2019; Douglas et al., 2020) und vermehrt Studien erschienen, bei denen diese Methode zur Analyse der taxonomischen Diversität von Rohmilch eingesetzt wurde (Doyle et al., 2017b; Lima et al., 2018; Skeie et al., 2019; Dahlberg et al., 2020; Porcellato et al., 2021), existiert bislang kein gut etabliertes Vorgehen. Um nach der Sequenzierung eine adäquate und breite Abdeckung der detektierten mikrobiellen Diversität zu erlangen, ist eine effiziente Lyse sowohl von Gram-positiven, als auch Gram-negativen Bakterien dringend notwendig (Breitenwieser et al., 2020). In der Literatur wurde die DNA-Extraktion in Bezug auf den Eintrag von Artefakten bzw. die Verzerrung mikrobieller Profile bereits für diverse Probenmatrizen, wie z.B. humane Darmmikrobiota (Panek et al., 2018), Rumenmikrobiota von Milchkühen (Vaidya et al., 2018), humane Muttermilch (Douglas et al., 2020) oder auch Räucherlachs (Maillet et al., 2021) thematisiert. Da Gram-positive Taxa eine prominente Gruppe in Rohmilch darstellen (Delbes et al., 2007; Fricker et al., 2011; Lima et al., 2018), besteht die Herausforderung insbesondere in der bakteriellen Lyse mit dem Aufschluss der Gram-positiven Zellwand. Das kann beispielsweise ein chemischer, mechanischer oder enzymatischer Aufschluss sowie eine Kombination verschiedener Methoden sein.

3. Taxonomische Klassifizierung bakterieller Taxa

Studien zur prokaryotischen Taxonomie basieren auf der Klassifizierung zur Einordnung neuer Isolate in taxonomische Gruppen, der Nomenklatur zur Benennung der Taxa sowie der Identifizierung neuer Stämme (Trüper und Schleifer, 2006; Vandamme et al., 2014). Die Benennung der niederen taxonomischen Ebenen wie Familie, Gattung, Spezies oder Subspezies unterliegt hierbei einer bis heute international gültigen Nomenklatur (Lapage et al., 1992; Kämpfer und Glaeser, 2012). Aus der hierarchischen Strukturierung der Domäne Bakterien (Woese et al., 1990; Stackebrandt, 2006) geht die Spezies als das zentrale Element der prokaryotischen Taxonomie hervor (Vandamme et al., 1996; Rosselló-Mora und Amann, 2001). Basierend auf den angepassten Spezieskonzepten von Rosselló-Mora und Amann (2001) sowie Stackebrandt (2002) kann eine Gruppe unbekannter Isolate nur dann adäquat klassifiziert und valide beschrieben werden, sofern diese eine eigenständige, monophyletische Linie bildet und sowohl eine genomische, als auch eine phänotypische Kohärenz aufweist (Rossello-Mora und Amann, 2015).

Genomsequenzen bilden die Grundlage für die Einordnung phylogenetischer Positionen neuer Taxa und liefern die Basis für die polyphasische Taxonomie. Mit der phylogenetischen Rekonstruktion auf Basis des 16S rRNA-Gens erfolgte in den 1970er Jahren ein Durchbruch in der taxonomischen Klassifizierung von Prokaryoten (Woese, 1987). Seither bildet das evolutionär konservierte Gen das Gerüst der prokaryotischen Taxonomie und ist ein unverzichtbarer Bestandteil für die Beschreibung neuer Taxa (Ludwig und Klenk, 2001; Rossello-Mora und Amann, 2015). So dient noch heute die fast vollständige 16S rRNA-Gensequenz als molekularer Marker, um mithilfe von Datenbanken, wie z.B. EzBioCloud (Yoon et al., 2017) die Sequenzidentität abzugleichen und die evolutionären Verwandtschaftsgrade aufzudecken. Während der Grenzwert zur Artabgrenzung bei 98,65% (Kim et al., 2014) Übereinstimmung der fast vollständigen 16S rRNA-Gensequenz mit dem am nächsten verwandten Typstamm liegt, so handelt es sich bei einer Sequenzidentität von $\leq 94,5 - 95,0\%$ (Ludwig et al., 1998; Tindall et al., 2010; Yarza et al., 2014) mit der nächst verwandten Typspezies um eine neue Gattung. Mit der zunehmenden Anzahl an veröffentlichten Typstamm-Genomsequenzen auf Datenbanken wie *Center for Biotechnology Information* (NCBI) (Federhen, 2012), gewinnt das Genom im Rahmen einer Neubeschreibung stark an Bedeutung (Chun und Rainey, 2014; Meier-Kolthoff und Goker, 2019). Dabei realisiert die Genomsequenz *in silico* Analysen von evolutionären Prozessen mit höherer Auflösung und biologischen Funktionen innerhalb eines Taxons (Whitman, 2015). Ein robustes Maß, um

Ähnlichkeiten zwischen Genomen von Typspezies zu definieren und eine neue Gattung abzugrenzen, ist die *average amino acid identity* (AAI) (Konstantinidis und Tiedje, 2005; Rodriguez-R und Konstantinidis, 2014). Auf Artebene wird der Abgleich der homologen Gene zwischen zwei Typstammgenomen genutzt, um die Ähnlichkeit zwischen zwei Spezies zu berechnen. Dieser Index ist in der Literatur als *average nucleotide identity* (ANI) beschrieben (Richter und Rosselló-Móra, 2009). Eine andere *in silico* Methode zur Speziesabgrenzung stützt auf der digitalen DNA-DNA Hybridisierung (dDDH). Diese beruht, analog zur experimentellen DDH, auf einem Reassoziationsgrenzwert von 70%, ab dem von einer genomischen Kohärenz einer prokaryotischen Art ausgegangen werden kann (Meier-Kolthoff et al., 2013; Meier-Kolthoff und Goker, 2019).

Auf Basis phylogenetischer Einordnung und genomischer Daten werden zusätzlich phänotypische und chemotaxonomische Charakteristika untersucht, um unbekannte Stämme von den bisher valide publizierten Taxa abzugrenzen. Der pragmatische, polyphasische Ansatz hat dabei eine Konsensusklassifizierung zum Ziel, bei der möglichst viele unterschiedliche Charakteristika integriert werden (Vandamme et al., 1996). Für eine Reihe verschiedener taxonomischer Gruppen sind sogenannte Minimalstandards verfügbar, die genaue Informationen und Anforderungen zu deren Neubeschreibung enthalten. Standardisierte Bedingungen unter Einbezug von Referenzstämmen zur Aufdeckung differenzierender Merkmale sind dabei gefordert (Tindall et al., 2010).

3.1 Die Familie der *Aerococcaceae*

Die Familie der Gram-positiven, unbeweglichen und fakultativ anaeroben *Aerococcaceae* ist taxonomisch in die Ordnung *Lactobacillales* (MSB) des Phylums *Firmicutes* eingeordnet. Die Namengebung der taxonomischen Familie geht auf den Typgenus *Aerococcus* mit der ersten valide charakterisierten Typspezies *Aerococcus viridans* zurück. Die kokkoiden, ursprünglich aus Luft und Staub isolierten Keime ließen sich aufgrund ihrer Anordnung in Tetraden zunächst morphologisch eindeutig von der Gattung *Streptococcus* abgrenzen, was später mit 16S rRNA-Analysen phylogenetisch verifiziert wurde (Williams et al., 1953; Ludwig et al., 2009; Lawson, 2014a).

Gemäß der Datenbank *List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature* (LPSN) umfasst die Familie *Aerococcaceae* neun valide beschriebene Gattungen, die insgesamt bisher nur 21 charakterisierte Spezies enthält (Stand April 2021): *Aerococcus* (Williams et al., 1953), *Globicatella* (Collins et al., 1992), *Abiotrophia* (Kawamura et al., 1995; Collins und Lawson,

2000), *Facklamia* (Collins et al., 1997), *Ignavigranum* (Collins et al., 1999c), *Eemeococcus* (Collins et al., 1999b), *Dolosicoccus* (Collins et al., 1999a), *Suicoccus* (Li et al., 2019) und die aus der vorliegenden Arbeit hervorgegangene Gattung *Fundicoccus* (Siebert et al., 2020). Mit 8 und 6 Spezies sind *Aerococcus* und *Facklamia* die zwei größten Gattungen der bisher identifizierten Taxa innerhalb der *Aerococcaceae*. Alle weiteren Gattungen bestehen aus der Typspezies oder der Typspezies und einer zweiten Art. Nach phylogenetischen Analysen umfasst die Familie *Aerococcaceae* zwei paraphyletische Gruppen. Hierbei bildet die Gattung *Aerococcus* eine robuste, separate Linie, während alle weiteren Gattungen dieser Familie eine zweite, phylogenetisch enge Gruppe bilden (Ludwig et al., 2009; Huch et al., 2014). Genome aller valide beschriebenen Typspezies der *Aerococcaceae* sind in der Datenbank NCBI hinterlegt. Aus den Genomsequenzen der charakterisierten Typstämme wurden Genomgrößen zwischen 1,7 und 3,0 Mbp ermittelt und ein G+C Gehalt detektiert, der von 35,5 bis 46,9mol% reichte.

Während das erste beschriebene Taxon der *Aerococcaceae* Luftkeime darstellte (Williams et al., 1953), so wurde weiterhin ein Großteil der isolierten Spezies im Kontext mit veterinärmedizinischen oder humanen klinischen Proben (Facklam und Elliott, 1995; Ludwig et al., 2009) charakterisiert. Einzelne Arten der Familie sind sogar als Pathogene in die Risikogruppe 2 eingestuft und treten somit als potentielle Krankheitserreger in Erscheinung (TRBA 466, 2015). Während die in dieser Arbeit präsentierte neue Typspezies *Fundicoccus ignavus* gen. nov., sp. nov. aus Rohmilch isoliert wurde (Siebert et al., 2020), so stammte keiner der bisher beschriebenen Typspezies bzw. Typstämme aus einem lebensmittelassoziierten Habitat. Jedoch wurden einige Gattungen der Familie schon in früheren Studien, z.B. als Teil der Rohmilchmikrobiota detektiert (Delbes et al., 2007; Rasolofo et al., 2010; Skeie et al., 2019; Breitenwieser et al., 2020).

3.2 Die Gattung *Raineyella* aus der Familie der *Propionibacteriaceae*

Die Gram-positive, nicht sporenbildende Gattung *Raineyella* gehört zur Familie der *Propionibacteriaceae* und dem Phylum *Actinobacteria* (Stackebrandt et al., 1997). Im April 2021 waren in der LPSN-Datenbank für die Familie *Propionibacteriaceae* insgesamt 25 valide publizierte Gattungen hinterlegt. Die artenreichste unter ihnen ist aktuell das Taxon *Tessarococcus* (Maszenan et al., 1999), gefolgt von der Typgattung *Propionibacterium* mit 13 bzw. 5 Vertretern.

Erstmals isoliert aus der Rhizosphäre eines Moores vom Ufer des Zub-Sees in der Antarktis, ist die Gattung *Raineyella* dem britischen Mikrobiologen Frederik Andrew Rainey gewidmet. Sie setzt sich aus der Typspezies *Raineyella antarctica* (Pikuta et al., 2016) sowie einer weiteren, valide beschriebenen Art *Raineyella fluvialis* (Kim et al., 2020) zusammen (Stand April 2021). Die Genomanalyse zeigte für beide Arten, *R. antarctica* und *R. fluvialis*, einen außergewöhnlich hohen G+C Gehalt von 70mol% und einer vergleichbaren Genomgröße von 3,8 bzw. 3,6 Mbp.

Aufgrund der limitierten Anzahl an entdeckten Stämmen beschränken sich die Isolationsquellen von *Raineyella* bisher auf Seesediment und den Biofilm einer mikrobiellen Brennstoffzelle (Pikuta et al., 2016; Kim et al., 2020). Weitere Habitate der *Propionibacteriaceae* sind außerdem z.B. menschliche Haut (Mollerup et al., 2016; Scholz und Kilian, 2016), Schlamm (Nakamura et al., 1995) oder boden- und wasserassoziierte Lebensräume (Tamura et al., 1994; An et al., 2008). Auch in dieser Familie werden einzelne Arten als potentiell pathogene Keime in die Risikogruppe 2 eingegliedert (TRBA 466, 2015). Die Typgattung *Propionibacterium* wurde allerdings aus Molkereiprodukten isoliert. Propionat als Endprodukt der Fermentation aus Laktat ist das namensgebende Charakteristikum und aufgrund der typischen Aromausprägung für milchwirtschaftliche Unternehmen besonders wertvoll (Stackebrandt et al., 2006; Zangerl, 2016). Beispielsweise wurde die Spezies *Propionibacterium freudenreichii* durch den Schweizer Käse bekannt und ist fortwährend als Starterkultur von enormer industrieller Bedeutung (Stackebrandt et al., 2006; Thierry et al., 2011; Abeijon Mukdsi et al., 2014). Im Jahr 2020 wurden die *Propionibacteriaceae* gemäß Angaben auf LPSN (Stand April 2021) gleich um vier valide Gattungen erweitert, wovon die Typspezies *Brevilactibacter flavus* (Wenning et al., 2020) aus boviner Rohmilch isoliert wurde und die Bedeutung der *Propionibacteriaceae* in lebensmittelassoziierten Habitaten weiter untermauert.

4. Zielsetzung der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit war die Optimierung eines Protokolls zur Probenvorbereitung für die 16S rRNA (Amplikon) – Sequenzierung, um darauf aufbauend das Mikrobiom von Rohmilch aus Deutschland zu analysieren.

Aufgrund der komplexen Probenmatrix, der geringen Keimzahlen sowie dem hohen Anteil an eukaryotischer Begleit-DNA der Kuh, stellt Rohmilch hohe Anforderungen an die DNA-Extraktion und erschwert die Erstellung der Sequenzierbibliothek mittels *library*-PCR. Daher sollte im ersten Teil dieser Arbeit die bakterielle DNA-Extraktion aus Rohmilch angepasst und der Einfluss der Zyklenzahl auf das detektierte Mikrobiom in der *library*-PCR analysiert werden. Dabei erfordert die Isolation bakterieller DNA drei Schritte: die Bakterienseparation aus der Rohmilchmatrix, die selektive Abreicherung der eukaryotischen DNA und die Lyse der prokaryotischen Zellen. Nach der Methodenoptimierung sollte das Protokoll zu einer verlässlichen Vorbereitung von Rohmilchproben dienen, die zu einer erfolgreichen Sequenzierung mit einer bestmöglich erfassten Biodiversität führt.

Im zweiten Teil der Arbeit sollte die optimierte Methode zur Analyse der Rohmilchmikrobiota per Amplikon-Sequenzierung angewendet werden, um die mikrobielle Diversität von Rohmilch zu analysieren. Für einen möglichst breiten Querschnitt mit einer guten Abdeckung aller relevanten Parameter war zunächst das Ziel, in Zusammenarbeit mit dem Max Rubner-Institut (MRI, Kiel), Mikrobiomdaten von deutschlandweit verteilten Erzeugerhöfen zu erheben. Auf Basis eines umfassenden Datensatzes sollte die mikrobielle Zusammensetzung deutscher Rohmilch und der Einfluss hofseitiger Faktoren auf die Biodiversität untersucht werden. Der Fokus lag dabei auf der Abundanz und Prävalenz taxonomischer Gruppen, die Indikatorkeime für die Rohmilchhygiene darstellen und relevant für die mikrobiologische Rohmilchqualität sind.

Während einer vorangegangenen Studie zur Untersuchung der aeroben, mesophilen Mikrobiota von Rohmilch wurden bakterielle Taxa isoliert, die anhand des 16S rRNA-Markergens keiner valide beschriebenen Gattung oder Spezies zugeordnet werden konnten. Daher war das dritte Ziel dieser Arbeit eine potentiell neue Gattung und eine potentiell neue Spezies unter Anwendung eines polyphasischen Ansatzes von nahe verwandten Typstämmen abzugrenzen und formal zu beschreiben.

II. MATERIAL UND METHODEN

1. Medien

Alle verwendeten Fertignährmedien wurden gemäß Anweisungen des Herstellers hergestellt. Die verwendeten Komponenten wurden in H₂O_{dest.} gelöst und alle Medien, Lösungen und Puffer bei 121 °C für 15 min autoklaviert.

EDTA	0,3 M EDTA 0,5 M EDTA pH 7,8±0,2
Ringer-Lösung	2 Tabletten/L (1/4 starke-Lösung)
Tris-EDTA (TE)-Puffer	10 mM Tris-HCl 1 mM EDTA pH 7,6
TSB (Tryptose-Soja-Bouillon) (0% (w/v) NaCl)	17,0 g/L Pepton aus Casein 3,0 g/L Pepton aus Soja 2,5 g/L K ₂ HPO ₄ 2,5 g/L D-(+)-Glucose Monohydrat pH 7,3
Motilitätsagar	30 g/L TSB Fertignährmedium 3 g/L Agar
Nitratagar	30 g/L TSB Fertignährmedium 1,0 g/L Kaliumnitrat 1,7 g/L Agar-Agar
Nutrient-Gelatine	3,0 g/L Fleischextrakt 5,0 g/L Pepton 120 g/L Gelatine

Stärkeagar	3,0 g/L Fleischextrakt
	10,0 g/L lösliche Stärke
	12,0 g/L Agar
	pH 7,5±0,2

Fertignährmedien und Lösungen:

Tryptose-Soja-Agar (TSA) (Oxoid, Basingstoke, Hampshire)

TSB (Merck, Darmstadt, Deutschland)

Plate-Count-Agar (PC) (Merck)

Columbia Blutagar mit 5% Pferdeblut (BioRad, Hercules, USA)

Columbia Blutagar mit 5% Schafsblut (Oxoid)

Ringer-Lösung (Merck)

Sulfid-Indol-Motilität (SIM) Medium (Merck)

2. Rohmilchproben

2.1 Methodenoptimierung

Die Rohmilchproben für die Methodenoptimierung wurden dem Rohmilchtank eines Bauernhofes bzw. Vorratstank einer Molkerei entnommen. Bis zur weiteren Verarbeitung nach max. 72 Stunden wurde die Milch in sterilen Glas- oder Plastikflaschen ohne die Zugabe von Konservierungsmitteln bei 4 °C gekühlt (Siebert et al., 2021).

2.2 Deskriptive Mikrobiomanalyse

Für die Status quo - Analyse deutscher Rohmilch wurden in dieser Arbeit 930 Proben von insgesamt 313 deutschlandweit verteilten Erzeugerhöfen untersucht. Dafür wurden 126 süddeutsche Höfe von 4 Molkereien sowie eine Prüfstation (mit zwei Molkereien) und 187 norddeutsche Erzeugerhöfe von 8 Molkereien beprobt. Die Untersuchung der Rohmilchproben wurde quartalsweise von Juni 2019 bis Mai 2020 durchgeführt. Die süddeutschen Proben wurden im Rahmen dieser Arbeit bearbeitet, während die Verarbeitung der norddeutschen Rohmilch am MRI in Kiel erfolgte. Die Probenahme erfolgte jeweils im Zuge der routinemäßigen Probenahme bei der Milchabholung durch die Molkereien auf den Bauernhöfen. Dabei wurden 30 -40 ml Rohmilch automatisiert durch den Milchsammelwagen in Probenahmegefäße überführt und gekühlt zur Molkerei transportiert. Nach Konservierung der Rohmilch mit 0.33% (v/v) Azidiol beim Milchprüfing bzw. der Molkerei wurden die

Proben gekühlt an die Forschungsstellen versandt, sodass die Milch ab dem Zeitpunkt der Probenahme max. drei Tage alt war. Das Abholintervall belief sich für einen Großteil der Proben auf zwei Tage, bei wenigen Proben auf ein bzw. drei Tage (Tabelle 1). Zu Beginn der Probenbearbeitung im Labor wurden für die Zellzahlbestimmung per Durchflusszytometrie (BactoCount) je Rohmilchprobe ein Volumen von 1,1 ml entnommen und zunächst bei -20 °C eingefroren. Von der verbliebenen Rohmilch wurde ein Volumen von max. 30 ml für die anschließende DNA-Extraktion herangezogen.

Mithilfe eines Fragebogens wurden über die Molkereien Parameter zu Produktions- und Haltungsbedingungen der entsprechenden Erzeugerhöfe erhoben, sodass für einen Großteil der Proben Metadaten zugeordnet werden konnten. Die Verteilung der Hofdaten zeigt Tabelle 1.

Tabelle 1 Anzahl der Rohmilchproben pro ausgewähltem hofseitigen Einflussfaktor. Daten wurden mithilfe eines Fragebogens durch die Molkereien erhoben.

	Nord	Süd
Anzahl der Höfe gesamt	187	126
Anzahl der Proben gesamt	540	390
Produktionsart		
Konventionell (K)	390	301
Ökologisch (Ö)	150	89
Tierhaltung		
Laufstall	193	94
Laufstall + Weide	226	54
Stall- / Anbindehaltung	2	59
Melksysteme: Anzahl der Proben (Höfe)		
Automatisiertes Melksystem (AMS)	127	26
Melkstand	357	175
Anbindehaltung	44	76
Hofgröße / Liefermenge (Liter) pro Jahr		
Klein (≤ 500.000)	205	224
Groß (> 500.000)	335	80
Median Liefermenge pro Jahr	710.000	278.000
Kühlung		
Durchlauf / Vorlaufkühlung + Tankkühlung	215	6
Tankkühlung	314	257
Abholungsintervall		
1-tägig	107	4
2-tägig	396	296
3-tägig	111	-

3. Keimzahlbestimmung

Zur Analyse der aeroben, mesophilen GKZ im Zuge der Methodenoptimierung wurde das Oberflächenverfahren durchgeführt. Für das klassische Oberflächenverfahren wurde die zu untersuchende Probe in Ringer-Lösung (1/4-starke) dezimal verdünnt und 100 µl der Suspension für jede Verdünnungsstufe in technischen Replikaten auf TSA ausplattiert. Das gewichtete Mittel der bakteriellen Keimzahlen (KbE/ml) wurde für alle Platten nach einer Inkubation bei 30 °C für 5 d berechnet (Siebert et al., 2021). Im Rahmen der deskriptiven Mikrobiomanalyse erfolgte die Bestimmung der absoluten bakteriellen Zellzahl für jede Rohmilchprobe durchflusszytometrisch mit einem BactoCount™ (Bentley Instruments, Chaska, Minnesota) am MRI in Kiel. Diese wurden nach Bestimmung per Durchflusszytometrie in der Einheit *Individual Bacterial Count* (IBC) pro ml ausgegeben. Dafür wurden die Proben des süddeutschen Raumes aus dieser Arbeit in regelmäßigen Abständen im gefrorenen Zustand nach Kiel versendet (Kapitel II 2.2).

4. Extraktion bakterieller DNA aus Rohmilch

4.1 Optimierung des DNA-Extraktionsprotokolls

Die Optimierung der DNA-Extraktion und der *library*-PCR der Probenvorbereitung für die Amplikon-Sequenzierung des Rohmilchmikrobioms wurde bereits in Siebert et al. (2021) publiziert.

4.1.1 Abtrennung bakterieller Zellen

Um die Bakterien aus der Rohmilchmatrix zu separieren, wurden im Zuge der Zentrifugation zwei verschiedenen EDTA Behandlungsmethoden zur Dissoziation der Casein-Mizellen getestet. Für die Zentrifugation wurde ein Rohmilchvolumen von 45 ml eingesetzt und die Zellen 13.000 x g bei 4 °C für 20 min abgetrennt. Zwischen allen folgenden Schritten wurden die Proben durchgehend auf Eis gekühlt. Nach der Zentrifugation wurde mit einer sterilen Pipettenspitze zunächst die Fettschicht entfernt und der Magermilchüberstand vorsichtig mit einer Pipette bis auf ca. 1 – 2 ml abgenommen. Die Zugabe des Chelatbildners EDTA wurde in zwei Varianten getestet. Bei der ersten Variante erfolgte die Zugabe von 3,0 ml 0,5 M EDTA (Roth, Karlsruhe, Germany) und 2,0 ml Tris-EDTA (TE)-Puffer (10 mM Tris-HCl + 1 mM EDTA, pH 7,6) zur Rohmilch, die direkt invertiert und zentrifugiert wurde. Bei der zweiten Variante hingegen wurde das entstandene Pellet nach der Zentrifugation 1 min bei Raumtemperatur (RT) mit 300 µl 0,5 M EDTA und 200 µl TE-Puffer behandelt (Murphy et al.

2002). Das in dem verbliebenen Magermilchüberstand resuspendierte Pellet wurde bei beiden Ausführungen jeweils in ein 2 ml Tube überführt, bei 16.000 x g (RT) für 1 min zentrifugiert und der Überstand bis auf ca. 100 µl abgenommen. Die zwei verschiedenen EDTA-Behandlungen wurden insgesamt mit vier unterschiedlichen Rohmilchproben getestet, jeweils in drei bis sechs Replikaten (Abbildung 3A). Für jedes technische Replikat erfolgte die Ausführung der real-time PCR in Duplikaten (Siebert et al., 2021).

4.1.2 Reduktion der eukaryotischen DNA durch selektive Lyse

Im Anschluss an die Bakterienseparation erfolgten Untersuchungen zur selektiven Lyse (SL) mit dem Ziel die Zellmembran der von der Kuh stammenden somatischen Zellen zu lysieren und den Anteil der freigewordenen und verfügbaren eukaryotischen DNA zu vermindern. Dafür wurden zu den verbleibenden 100 µl Suspension aus dem vorangegangenen Schritt (Kapitel II 4.1.1) 880 µl ¼-starke Ringer-Lösung (Merck) (100 µl, wenn keine SL angewendet wurde) pipettiert und das entstandene Pellet gelöst. Im Anschluss erfolgte eine Zugabe von 20 µl Proteinase K Lösung und eine Inkubation der Proben bei 55°C und 350 rpm für 30 min. Freigewordene eukaryotische DNA aus den destabilisierten Zellen (Murphy et al. 2002) wurde nach einer Zentrifugation bei 5.000 x g für 5 min (RT) mit dem Überstand abgenommen und das Pellet in 80 µl PCR-Grade Water (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) resuspendiert. Durch die Zugabe von 10 µl 10X Reaktionspuffer (+MgCl₂) und 10 µl DNase I (1 U / µl) (ThermoFisher, Waltham, USA) wurden während einer Inkubation bei 37°C und 350 rpm für 20 min Rückstände der eukaryotischen DNA enzymatisch verdaut. Die anschließende Inaktivierung der zugegebenen Enzyme erfolgte bei 85 °C für 10 min. Alle Proben wurden im Anschluss an die SL bis zur DNA-Extraktion bei -20 °C gelagert. Eine Rohmilchprobe wurde eingesetzt, um den Einfluss der selektiven Lyse in Kombination mit jeder EDTA-Vorbehandlungsvariante jeweils in Triplikaten zu untersuchen (Abbildung 3B). Die real-time PCR erfolgte je getesteter Behandlung in technischen Replikaten. Mit Ausnahme der Versuche zur Analyse der SL wurde die Abreicherung der eukaryotischen DNA für jede DNA-Extraktion im Rahmen der Optimierungsversuche durchgeführt. Bei allen Vorbehandlungsversuchen erfolgte die DNA-Extraktion mit dem PowerFood Kit (+ 1,0 h zusätzliche enzymatische Lyse, Kapitel II 4.1.3) (Siebert et al., 2021).

Um zu testen, ob prokaryotische Zellen von der SL beeinflusst werden, wurden jeweils 7 verschiedene Gram-positive und Gram-negative Bakterien aus der Stammsammlung des Lehrstuhls für Mikrobielle Ökologie (Technische Universität München (TUM), Freising) in Reinkultur untersucht (Anhang Tabelle A1). Dafür wurden die Stämme reaktiviert und auf TSA

bei 30 °C für 3 d inkubiert. Nach zweimaliger Passage wurden jeweils 5 ml Tryptose-Soja-Bouillon (TSB) mit der aktiven Kultur der Stämme beimpft und bei 30 °C und 150 rpm über Nacht bebrütet. Anschließend erfolgte in 500 µl der Übernachtskultur (ÜNK) die SL wie beschrieben mit Proteinase K und DNase I, allerdings mit einer Inkubationszeit von jeweils 1,0 h anstatt 30 min. Als Negativkontrolle (NK) diente die Reinkultur ohne den Zusatz von Enzymen. Anschließend erfolgte die DNA-Extraktion mit dem PowerFood Kit und einer zusätzlichen enzymatischen Lyse von 1,0 h, wie in Kapitel II 4.1.3 beschrieben. Je Stamm wurde die SL und die entsprechende NK in Triplikaten getestet.

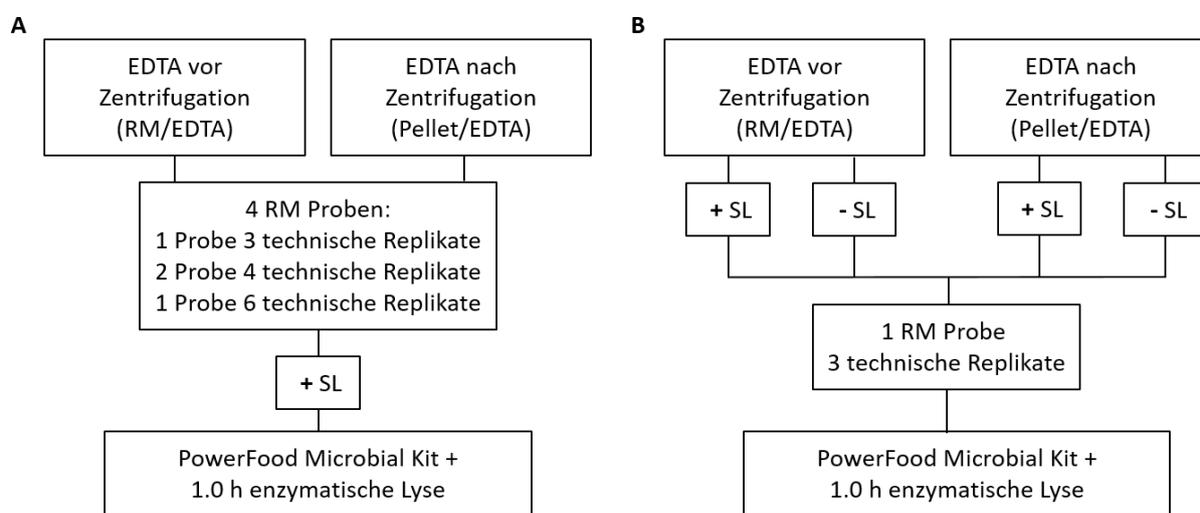


Abbildung 3 Schematischer Überblick zur Optimierung der Bakterienseparation aus Rohmilch sowie zur Reduktion der eukaryotischen DNA. A: Separation der bakteriellen Zellen durch Zentrifugation und EDTA. B: Selektive Lyse in Kombination mit jeweils einer der EDTA-Behandlungsvarianten. EDTA: Ethylendiamintetraacetat; RM: Rohmilch; SL: selektive Lyse. Abbildung modifiziert nach Siebert et al. (2021).

4.1.3 Bakterielle Lyse und DNA-Extraktion

Im Anschluss an die Vorbehandlungsmethoden wurde die bakterielle Lyse getestet. Dafür wurde die DNA-Extraktion mit drei kommerziell erhältlichen DNA-Extraktionskits sowie den Extraktionssubstanzen des PathoProof™ Complete-16 Kit (Thermo Scientific, Waltham, USA) evaluiert (Tabelle 2, Abbildung 4). Mit dem PathoProof™ Complete-16 Kit und dem foodproof® Sample Preparation Kit II (Biotecon Diagnostics, Potsdam, Germany) wurde die reine enzymatische Lyse mit einer finalen säulenbasierten Aufreinigung getestet. Die Anwendung des foodproof® StarPrep Two Kit (Biotecon Diagnostics, Potsdam, Germany) beruhte auf mechanischem Zellaufschluss per *bead-beating*, welches in dieser Arbeit mit

6,5 m/s für 30 sek im FastPrep 24™ instrument (MP Biomedicals, Santa Ana, USA) durchgeführt wurde. Alle drei Extraktionsverfahren wurden gemäß Herstellerangaben mit minimalen Modifikationen angewandt: begonnen wurde mit der direkten Zugabe des Lysepuffers und die Elution der DNA mit einem Volumen von 35 µl durchgeführt (Siebert et al., 2021).

Tabelle 2 DNA-Extraktionskits für die Optimierung der DNA Isolation mit dem entsprechenden Extraktionsprinzip. Tabelle aus Siebert et al. (2021).

Lysemethode	DNA-Extraktionskit	Prinzip
Enzyme	PathoProof™ Complete-16 Kit (ThermoFisher)	Puffer (Kit) Lysozyme, Proteinase K (Kit) Spinsäule
Enzyme	foodproof® Sample Preparation Kit II (Bioteccon Diagnostics)	Puffer (Kit) Lysozyme, Proteinase K (Kit) Spinsäule
<i>Bead-beating</i>	foodproof® StarPrep Two Kit (Bioteccon Diagnostics)	Puffer (Kit) <i>Bead-beating</i>
Enzyme + <i>Bead-beating</i>	DNeasy® PowerFood® Microbial Kit (Qiagen)	Puffer (Kit) <i>Bead-beating</i> Spinsäule <u>Zusätzliche Schritte:</u> Modifiziert nach Quigley et al. (2012): Zusätzliche enzymatische Lyse (Lysozym, Mutanolysin, Proteinase K) Hitzeschritt: 70 °C für 10 min

Eine Kombination aus enzymatischer und mechanischer Lyse mit Säulen-basierter Isolation der DNA wurde unter Einsatz des DNeasy® PowerFood® Microbial Kits (Qiagen, Hilden, Germany) getestet. In Anlehnung an vorausgegangene Studien durch Quigley et al. (2012) wurde eine zusätzliche enzymatische Lyse angewandt. Zu Beginn der DNA-Extraktion nach der SL wurden hier den 450 µl der MBL-Kit Lösung zusätzlich 1 µl (25 µg / ml) Lysozym (Roth, Karlsruhe, Germany) und 100 U Mutanolysin (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) hinzugefügt. Nach einer Inkubation bei 37 °C und 350 rpm für 60 min folgte eine Zugabe von 20 µl Proteinase K Lösung (20 mg / ml) mit einer weiteren Inkubation bei 55 °C und 350 rpm für 60 min. Eine Modifikation des PowerFood Kits bestand in einer reduzierten Inkubationszeit der zusätzlichen enzymatischen Lyse mit jeweils 30 anstatt 60 min (Abbildung 4). Zur Destabilisierung der Zellwände wurde die Suspension bei 70 °C für 10 min erhitzt und

anschließend in das mitgelieferte MicroBead Tube überführt. Die mechanische Lyse erfolgte standardmäßig bei 4x6,5 m/s für 30 s (kombinierte Lyse) im FastPrep-24™. Alternativ dazu wurde das *bead-beating* in der dritten Variante des PowerFood Kits (ohne zusätzliche enzymatische Lyse) auf 6x6,5 m/s für 30 s erhöht (Abbildung 4). Während des *bead-beating* wurden die Proben jeweils nach 90 sek 1 min auf Eis inkubiert. Die weitere Extraktion erfolgte nach Herstellerangaben. Das Volumen zur DNA Elution variierte im Laufe der Protokolloptimierung, um die DNA-Ausbeute zu maximieren. Somit wurde das Elutionsvolumen zunächst auf 50 µl reduziert und entsprach beim Kitvergleich schließlich einem Volumen von 35 µl PCR-Grade Water. Dieses wurde für 1 min auf der Säule inkubiert und bei 13,000 x g zentrifugiert. Wasser-Extraktionen dienten zur Kontrolle (NK) von Kontaminationen während der DNA-Extraktion. Alle Extraktionen der Optimierungsversuche zur Vorbehandlung der Rohmilch (EDTA und SL) und zur Analyse der PCR-Zykluszahl im 1. Schritt der *library*-PCR wurden mit dem PowerFood Kit und dem zusätzlichen enzymatischen Aufschluss von 1,0 h durchgeführt (Abbildung 3). Die DNA-Extraktion des Kitvergleichs erfolgte in Duplikaten oder Triplikaten, wobei für die Proben A+B beispielhaft eine Mikrobiomanalyse durchgeführt wurde. Für die Rohmilchproben C+D erfolgte lediglich die Quantifizierung der DNA nach der *library*-PCR (Abbildung 4) (Siebert et al., 2021).

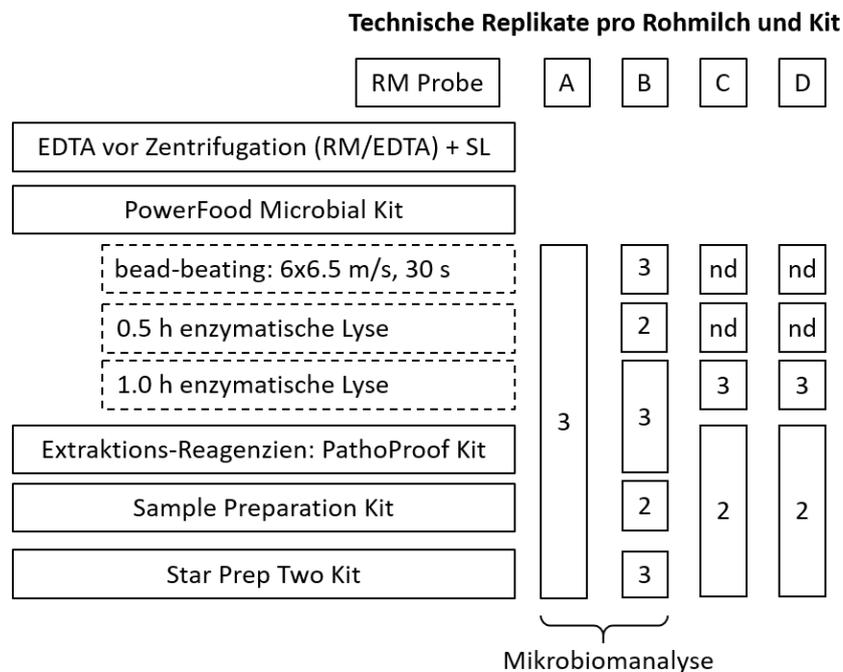


Abbildung 4 Schematischer Überblick des Kitvergleichs zur Optimierung der Extraktion bakterieller DNA aus Rohmilch. Dargestellt sind die verschiedenen Extraktionskits mit den entsprechenden Replikaten für jede untersuchte Rohmilchprobe A-D. EDTA: Ethylendiamintetraacetat; nd: nicht determiniert; RM: Rohmilch; SL: selektive Lyse. Abbildung modifiziert nach Siebert et al. (2021).

4.2 Finales Protokoll zur DNA-Extraktion aus Rohmilch

Das finale Protokoll war die Grundlage für die Extraktion bakterieller DNA zur Amplikon-Sequenzierung der Rohmilchmikrobiota im Rahmen dieser Arbeit. Hierfür wurden von jeder Rohmilchprobe standardmäßig 30 ml verarbeitet. Um weniger harsche Bedingungen zu erzeugen, wurden 1,8 ml einer 0,3 M EDTA Lösung eingesetzt. Nach Zugabe von EDTA direkt zur Rohmilch wurde die Probe invertiert, unmittelbar bei 13.000 x g bei 4 °C für 20 min zentrifugiert und anschließend durchgehend auf Eis gehalten. Das Milchlager wurde mit einer Pipettenspitze steril entfernt und der Magermilchrückstand vorsichtig mit einer Pipette bis auf ca. 1 – 2 ml abgenommen ohne das Pellet zu berühren. Das Pellet wurde schließlich resuspendiert und nach der Zentrifugation bei 16.000 x g (RT) für 1 min erfolgte die SL wie in Kapitel II 4.1.2 beschrieben. Die anschließende bakterielle Lyse basierte auf einer Kombination aus mechanischer (*bead-beating*) und zusätzlicher enzymatischer Lyse unter Verwendung des DNeasy® PowerFood® Microbial Kit. Im ersten Schritt des DNA-Isolationsprozesses wurden für die zusätzliche Enzymbehandlung 1 µl Lysozym und 100 U Mutanolysin zusammen mit 450 µl MBL Kit-Puffer (auf 55 °C erhitzt) bei 37 °C und 350 rpm für 30 min inkubiert. Danach wurden die Proben mit 20 µl Proteinase K Lösung (20 mg / ml) bei 55 °C und 350 rpm für 30 min verdaut. Nach einer Hitzebehandlung bei 70 °C für 10 min wurde die Suspension in das mitgelieferte MicroBead Tube überführt. Die mechanische Lyse erfolgte bei 6x6,5 m/s für 30 sek im FastPrep™ mit einer Kühlung der Proben nach jeweils 90 sek für 1 min auf Eis. Im weiteren Verlauf der Extraktion wurde nach Angaben des Herstellers verfahren. Schließlich setzte sich die Elution der DNA aus zwei aufeinanderfolgenden Schritten zusammen, bei denen jeweils ein Volumen von 24 µl PCR-Grade Water (55°C) auf die Säule gegeben und bei 13.000 x g für 1 min (RT) zentrifugiert wurde. Wasser-Extraktionen dienten zur Kontrolle (NK) von Kontaminationen während der DNA-Extraktion. Also Positivkontrolle für die Sequenzierung wurde eine MOCK *Community* bestehend aus 6 Gram-negativen Taxa (*Acinetobacter*, *Chryseobacterium*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Moraxella*, *Pseudomonas*) und 8 Gram-positiven Taxa (*Clostridium*, *Corynebacterium*, *Enterococcus*, *Janibacter*, *Listeria*, *Microbacterium*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*) extrahiert. Bis zur Erstellung der *library*-PCR für die Sequenzierung wurden die Proben bei -20 °C gelagert.

5. Quantifizierung bakterieller DNA

Eine real-time PCR mit universellen 16S rDNA-Primern wurde angewandt, um die Vorbehandlungsmethoden während der Methodenoptimierung zu vergleichen. Der

PCR-Ansatz und das PCR-Programm für den Cycler CFX96 (Biorad) sind in Tabelle 3 und Tabelle 4 aufgeführt. Alle Messungen wurden in technischen Replikaten durchgeführt und mit der zugehörigen Software CFX Maestro™ (Biorad) die Ct-Werte ermittelt. Als Referenz diente ein Standard aus einer Mischung bakterieller DNA, isoliert aus Reinkulturen der Gattungen *Acinetobacter*, *Corynebacterium*, *Kocuria*, *Lactococcus*, *Microbacterium*, *Pseudomonas*, und *Staphylococcus*. Diese DNA-Mischung wurde weiterhin verwendet, um einen Standard bestehend aus eukaryotischer und bakterieller DNA in einem Mischungsverhältnis von 10%, 1% und 0,1% herzustellen (Siebert et al., 2021). Anhand dieses Standards erfolgte die Analyse des prozentualen Anteiles der bakteriellen DNA am Gesamt-DNA Extrakt. Dieser wurde gemäß der Formel von Schreiner (2014) berechnet, wobei die Variablen a und b durch lineare Regression ermittelt wurden:

$$\text{Anteil bakterieller DNA (\%)} = \frac{10^{a \cdot Ct + b}}{\text{GesamtDNA (ng)}} * 100$$

Die DNA-Konzentration nach Erstellung der *library*-PCR wurde per Qubit Fluorometer 2.0 mit dem entsprechenden Qubit™ dsDNA HS Assay Kit (ThermoFisher, Waltham, USA) nach Herstellerangaben bestimmt (Siebert et al., 2021).

Tabelle 3 Real-time PCR-Ansatz für den Vergleich der Vorbehandlungsmethoden und die Quantifizierung bakterieller DNA zur Methodenoptimierung.

Komponente	Volumen (µl)
SYBR Green Supermix	10 µl
515 <i>forward</i> Primer (10 pmol/µl)	1 µl
806 <i>reverse</i> Primer (10 pmol/µl)	1 µl
qPCR H ₂ O	3 µl
Probe	5 µl
Gesamt	20 µl

Tabelle 4 PCR Programm für den Vergleich der Vorbehandlungsmethoden und die Quantifizierung bakterieller DNA zur Methodenoptimierung.

Schritt	Temperatur (°C)	Zeit (sek)
Initiale Denaturierung	98	300
Denaturierung	98	20
Annealing	52,5	30
Elongation	72	40
Kühlung	10	∞

6. Amplikon-Sequenzierung von Rohmilchproben

6.1 Erstellung der Sequenzierbibliothek per *library*-PCR

Für die Erstellung der Sequenzierbibliothek mit der *library*-PCR in Vorbereitung auf die Amplikon-Sequenzierung wurde die V3-V4 Region des bakteriellen 16S rRNA-Genabschnitts mithilfe einer zweistufigen PCR (Berry et al., 2011) vervielfältigt. Unter Verwendung der Primer 341F und 785R entsprachen die Amplikons einer Länge von ca. 460 Bp (Klindworth et al., 2013). Nach der Amplifikation der Ziel-DNA im 1. Schritt der *library*-PCR wurde in der 2. PCR für jede Probe eine individuelle Primerkombination aus Barcode und Illumina-Adapter eingesetzt. Da der DNA-Extrakt eine Mischung aus eukaryotischer und bakterieller DNA war, wurde die DNA-Konzentration aus dem 1. PCR Schritt für den Einsatz in der 2. PCR nicht angepasst. Die Zusammensetzung der entsprechenden PCR-Reaktionsansätze und die PCR-Bedingungen, sowohl für die Methodenoptimierung, als auch für die Rohmilch-Mikrobiomanalyse zeigen Tabelle 5 und Tabelle 6.

Tabelle 5 PCR-Reaktionsansatz für die *library*-PCR zur Generierung von Amplikons (V3+V4).

Komponente	Volumen (µl)
1.Schritt <i>library</i>-PCR	
Phusion HF Buffer	4
dNTPs	0,4
341F-ovh-Primer (20µM)	0,125
785R-ovh-Primer (20µM)	0,125
Phusion High-Fidelity II DNA Polymerase Hotstart	0,1
DMSO 7,5%	1,5
PCR-Grade Water	6,75
DNA-Probe	7
Gesamt	20
2.Schritt	
Phusion HF Buffer	10
dNTPs (10 mM)	1
341F-ovh-HTS (20µM)	0,313
785R-ovh-HTS (2,5µM)	2,5
Phusion High-Fidelity II DNA Polymerase Hotstart	0,2
DMSO 7,5%	2,5
PCR-Grade Water	28,5
DNA-Probe aus 1. PCR	5
Gesamt	50

Tabelle 6 PCR-Bedingungen für die *library*-PCR zur Generierung von Amplikons.

Schritt	Temperatur (°C)	Zeit (sek)		Zyklen	
		1. Schritt	2. Schritt	1. Schritt	2. Schritt
Initiale Denaturierung	98	120	40	1	1
Denaturierung	98	20	20		
Annealing	55	40	40	20*	10
Elongation	72	40	40		
Finale Elongation	72	120	120	1	1
Kühlung	10		∞	-	-

*Variation bei Optimierungsversuchen: 15, 20, 25, 30 und 35 Zyklen im 1. PCR-Schritt

Das PCR-Produkt wurde nach dem Zusammenführen paralleler PCRs derselben Proben im Anschluss an den 2. Schritt der PCR unter Verwendung des 1,8-fachen PCR-Volumens von Agencourt AMPure XP beads (Beckman Coulter, Inc., Brea, USA) aufbereitet. Dabei wurden die magnetischen *Beads* und das PCR-Produkt für 5 min bei RT inkubiert, gefolgt von zwei aufeinanderfolgenden Waschschritten mit jeweils 200 µl 70% (v/v) Ethanol und einer Inkubationszeit von 30 sek. Um die Überstände zu entfernen, wurden die Tubes zwischen jedem Schritt in einen Magnetständer gestellt. Nachdem sich die *Beads* an der Seite der Gefäße festsetzten (nach ca. 2 min) wurde der Überstand abgenommen und zurückgebliebenes Ethanol für ca. 10 min verdampft. Abschließend wurden die *Beads* in einem Endvolumen von 25 µl PCR-Grade Water gelöst, um nach erneutem Einsatz des Magnetständers die DNA mit dem Überstand nach ca. 2 min zu entnehmen. Zur Erstellung des DNA-Pools wurden die DNA-Konzentrationen der Proben entweder auf 0,5 oder 2,0 nM (abhängig von Konzentration der Proben nach der *library*-PCR) eingestellt:

$$\text{Konzentration in nM} = \text{Konzentration (DNA)} \frac{\text{ng}}{\mu\text{l}} * \frac{10^6 \left(\frac{\text{ng}}{\mu\text{l}}\right)}{572 \text{ Bp} * 650 \left(\frac{\text{g}}{\text{mol}}\right)}$$

Nach einem Protokoll der Core Facility Microbiome (TUM, Freising, Deutschland) wurde die DNA des finalen Probenpools zunächst mit 0,2 N NaOH und 0,2 N Tris-HCl (pH 7) denaturiert, mit einer Pufferlösung versehen und auf eine Endkonzentration von 12 pmol verdünnt. Dem Probenpool (*library*-PCR) wurden 25% des denaturierten Bakteriophagen-Genoms PhiX beigemischt, welches zur Kontrolle der Sequenzierung diente. Die vorbereitete Sequenzierbibliothek wurde schließlich auf die mit H₂O_{dest.} und Ethanol gespülte *Flow Cell* gegeben und mit 2x275 Zyklen (Methodenoptimierung) bzw. 2x300 Zyklen (deskriptive Mikrobiomanalyse) unter Einsatz einer MiSeq-Reagent Kit v3 auf einem Illumina MiSeq-Sequenzierer nach Herstellerangaben sequenziert.

6.1.1 Optimierung der *library*-PCR

Die *library*-PCR für die Versuche zur Optimierung der Amplikon-Sequenzierung von Rohmilchproben wurde in zwei bis vier Replikaten (abhängig von der Zyklenzahl und der verwendeten Rohmilch) mit unterschiedlichen oder einheitlichem Barcode im Thermocycler CFX96 (Biorad) ausgeführt. Getestet wurden vier Rohmilchproben mit 15-35 Zyklen (Zunahme um jeweils 5 Zyklen) im 1. Schritt der 2-Stufen-PCR, gefolgt von jeweils 10 Zyklen im 2. PCR-Schritt (Abbildung 5) (Siebert et al., 2021).

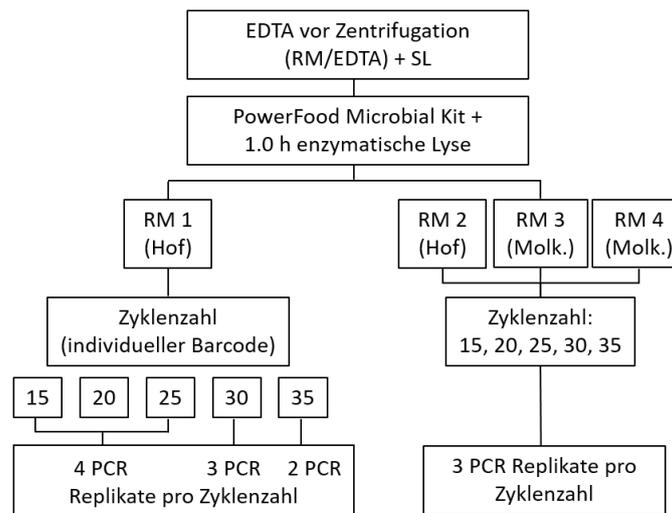


Abbildung 5 Schematischer Überblick zur Optimierung der Zyklenzahl in der *library*-PCR. Dargestellt sind die untersuchten Proben mit entsprechender Zyklenzahl und den jeweiligen PCR-Replikaten. RM: Rohmilch; EDTA: Ethylendiamintetraacetat; SL: selektive Lyse; Molk.: Molkerei. Abbildung modifiziert nach Siebert et al. (2021).

6.1.2 Deskriptive Mikrobiomanalyse

Für die deutschlandweite Mikrobiomanalyse wurde die *library*-PCR sowie die Sequenzierung von allen Proben von der Core Facility Microbiome (TUM, Freising) durchgeführt. Je extrahierter Probe erfolgten hierbei vier parallele PCRs mit einheitlichem Barcode. Die *library*-PCR erfolgte mit 20 + 10 Zyklen in der ersten bzw. zweiten PCR.

6.2 Auswertung der Sequenzierdaten

Zur Verarbeitung der Sequenzierdaten wurde die Plattform *Integrated Microbial Next-Generation Sequencing* (IMNGS) (Lagkouvardos et al., 2016) verwendet. In der Pipeline ist eine modifizierte Version des Programms UPARSE (Edgar, 2013) zur *de novo* Konstruktion von OTUs aus NGS Sequenzen implementiert.

6.2.1 Methodenoptimierung

Das *Clustering* der qualitätsgeprüften FASTQ-Daten aus der Sequenzierung erfolgte mit USEARCH Version 11.0 (Edgar, 2010), basierend auf einer Sequenzidentität von 97%. Durch das Abgleichen der OTUs mit der *Ribosomal Database Project* (RDP) Datenbank (Cole et al., 2014) wurden chimäre Sequenzen mit UCHIME (Edgar et al., 2011) sowie nicht-prokaryotische OTUs mithilfe von SortmeRNA (Kopylova et al., 2012) herausgefiltert. Die finalen OTU Sequenzen wurden mit SINA Version 1.6.1 (Pruesse et al., 2012) unter Verwendung der Referenzdatenbank Silva (Quast et al., 2013) taxonomisch eingeordnet und eine Tabelle mit der Anzahl der Sequenzen pro detektierter OTU ausgegeben (Siebert et al., 2021). Die Einstellungen für die Prozessierung der Daten in IMNGS ist in Tabelle 7 aufgeführt.

Tabelle 7 Einstellungen für Verarbeitung der FASTQ-Daten mit IMNGS zur Generierung einer OTUs-Tabelle. nt: Nukelotide; OTU: *operational taxonomic unit*.

Bezeichnung der Einstellung	Wert
Number of allowed mismatches in the barcode	2
Min fastq quality score for trimming of unpaired reads	3
Min length for amplicons for paired overlapping sequences [nt]	300
Max length for amplicons for paired overlapping sequences [nt]	600
Max rate of expected errors in paired sequences	0.005
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

Alle OTUs mit einer relativen Abundanz von <0,25% in allen Proben wurden verworfen (Tabelle 7). Bei einer geringen Probenzahl werden dadurch auch OTUs mit einer niedrigen Abundanz entfernt, was mit einer verzerrten, niedrigeren Richness einhergeht. Um die Vielfalt für die alpha-Diversitätsanalyse zu erhöhen wurden die Sequenzierdaten weiterer 100 Proben anderer Sequenzierungen vor dem Remultiplexen und der Prozessierung auf IMNGS in das Datenset mit eingespeist (Siebert et al., 2021).

Diese Daten dienen der Biodiversitätsanalyse unter Verwendung des R-Skriptes Rhea (Lagkourdos et al., 2017). Vor der Normalisierung zu Beginn der Analyse wurden alle Proben, die nicht Teil dieser Studie waren und eine Gesamtsequenzanzahl <7.348 aufwiesen, aus dem Datensatz entfernt. Die Analyse der alpha-Diversität ergab sich aus der Berechnung der Richness und des Shannon.Effective. Die beta-Diversität, ebenso ein Teil des

Rhea-Skriptes, basierte auf der generalized UniFrac distance (Chen et al., 2012; Siebert et al., 2021).

6.2.2 Deskriptive Mikrobiomanalyse

Die FASTQ-Dateien der *forward* (R1) und der *reverse* (R2) Sequenz wurden mit dem Programm Trimmomatic (Bolger et al., 2014) jeweils am 3'-Ende auf 275 Nukleotide (nt) gekürzt (durchgeführt von Dr. Christopher Huptas, Lehrstuhl für Mikrobielle Ökologie, TUM, Freising). Danach wurden die gekürzten FASTQ-Dateien durch Dr. Sandra Reitmeier (Core Facility, TUM, Freising) unter Einsatz einer überarbeitete offline Version von IMNGS (NGSToolkit Version 3.3) mit den in Tabelle 8 aufgeführten Einstellungen bearbeitet. Hier erfolgte die Generierung von *zero-radius* OTUs (zOTUs) und das *Clustering* mit USEARCH Version 11.0.667 basierte auf einer Sequenzidentität von 99% (Edgar, 2010; 2018). Der Sequenzabgleich wurde ebenso mit der RDP Datenbank (Cole et al., 2014) durchgeführt sowie Chimäre mit UCHIME (Edgar et al., 2011) und nicht-prokaryotische mit OTUs SortmeRNA (Kopylova et al., 2012) entfernt. Die taxonomische Zuordnung der OTUs erfolgte schließlich durch den RDP *classifier* (Wang et al., 2007) mit der Referenzdatenbank Silva (Quast et al., 2013).

Tabelle 8 Einstellungen für die Verarbeitung der FASTQ-Daten mit IMNGS für die Generierung einer zOTUs-Tabelle. nt: Nukleotide; OTU: *operational taxonomic unit*.

Bezeichnung der Einstellung	Wert
Number of allowed mismatches in the barcode	1
Min fastq quality score for trimming of unpaired reads	20
Min length for amplicons for paired overlapping sequences [nt]	300
Max length for 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

Die Analyse der Daten erfolgte in Kooperation mit Dr. Tasja Buschhardt vom Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR, Berlin, Deutschland) unter Verwendung des R-phyloseq package Version 1.34.0 (McMurdie und Holmes, 2013) und der Software R Version 4.02 (R Core Team, 2020). Die Daten wurden auf die Probe mit der geringsten Readzahl (7.400) normalisiert. Für die Mikrobiomanalysen erfolgte die alpha-Diversität mit den Indizes Richness (Observed

OTUs) und Shannon. Die relativen Abundanzen wurden auf Phylums-, Familien- und Gattungsebene determiniert. Integrierte R-Funktionen wurden genutzt um eine Hauptkomponentenanalysen (*Principal Component Analysis*, PCA) auf Familien- und Gattungsebene durchzuführen. Mithilfe des Rhea Skriptes (Lagkouvardos et al., 2017) erfolgte die beta-Diversitätsanalyse auf Basis der generalized UniFrac distance nach der vorangegangenen Normalisierung der Daten (auf die geringste Readzahl).

Zur Identifizierung der OTUs auf Speziesebene wurde die öffentlich zugängliche Datenbank EzBioCloud (Yoon et al., 2017) genutzt. Mit einer verwertbaren Sequenzlänge von ca. 445 Bp wurden alle OTUs, die in der Sequenzierung der Gattung *Streptococcus* zugeordnet wurden, mit den verfügbaren, fast vollständigen Typstammsequenzen des 16S rRNA-Gens abgeglichen. Einbezogen wurden nur Sequenzen, die eine Sequenzübereinstimmung >98,65% und damit oberhalb der gültigen Speziesgrenze zeigten. Alle OTU-Sequenzen der gleichen Art wurden zusammengefasst.

7. Statistik

Alle statistischen Analysen wurden mit der Software R Version 4.02 (R Core Team, 2020) durchgeführt. Für die Versuche im Rahmen der Optimierung von DNA-Extraktion und *library*-PCR wurde die Normalverteilung und die Varianzhomogenität der Daten mit den R-Funktionen Shapiro-Wilk und F-Test ausgeführt. Statistische Unterschiede bei den Behandlungsvarianten vor der bakteriellen Lyse, der Amplikon-Konzentration und der Zyklenzahl in der *library*-PCR wurden mit dem gepaarten t-Test, dem Welch t-Test und dem Wilcoxon-Rangsummentest analysiert (Siebert et al., 2021).

Die Skripte für die statistische Auswertung der Daten zur Rohmilchmikrobiota wurden von Dr. Tasja Buschhardt (BfR, Berlin) erstellt. Zum Vergleich der bakteriellen und somatischen Zellzahlen, der alpha-Diversitätswerte Richness (Observed OTUs) und Shannon sowie der relativen Abundanzen wurde zunächst die Normalverteilung der Daten mit der integrierten R-Funktion Shapiro-Wilke überprüft. Für die durchgängig nicht parametrischen Datensätze wurde zum Test auf statistische Signifikanz der Kruskal-Wallis Test in Kombination mit dem Dunn's Test für den Mehrfachvergleich angewandt. Die Bonferroni-Methode diente der Korrektur des multiplen Vergleichs.

8. Charakterisierung neuer bakterieller Taxa

Die Beschreibung neuer Taxa erfolgte mithilfe eines polyphasischen Ansatzes, bei dem genomische, phänotypische und chemotaxonomische Eigenschaften analysiert wurden. Die Neubeschreibung der Gattung *Fundicoccus ignavus* gen. nov., sp. nov. mit den drei Stämmen WS4937^T, WS4759 und WS5303 der Familie *Aerococcaceae* wurde gemäß den Minimalstandards von Mattarelli et al. (2014) und Chun et al. (2018) durchgeführt und bereits in Siebert et al. (2020) publiziert. Für Taxa der Familie der *Propionibacteriaceae* existieren keine angepassten Minimalstandards, allerdings wurde für die Charakterisierung von *Raineyella* sp. nov. (WS4998^T und WS4999) der Referenzstamm *Raineyella antarctica* eingesetzt. *Raineyella fluvialis* wurde erst nach Abschluss der experimentellen Versuche publiziert.

8.1 Genetische Analysen

8.1.1 16S rRNA-Phylogenie

Die fast vollständige Sequenz des konservierten 16S rRNA-Genabschnittes wurde genutzt, um Sequenzidentitäten abzugleichen und die Stämme beider Neubeschreibungen phylogenetisch einzuordnen. Nach einer Inkubation auf TSA bei 30 °C für 4 d wurde die DNA aller Stämme gemäß von Neubeck et al. (2016) isoliert. Für die Analyse der phylogenetischen Beziehungen wurden zunächst die 16S rRNA-Sequenzen der neuen Gattung sowie der neuen Spezies mit den Primern 16S_519 for (5'-CAGCAGCCGCGGTAATAC-3') und 16S_907 rev (5'-CCGTCAATTCMTTGGAGTTT-3') bestimmt. Beide Sequenzen wurden durch ein Alignment überlappender Regionen zu der fast vollständigen 16S rRNA-Gensequenz zusammengesetzt. Zum Abgleich der 16S rDNA-Sequenzidentitäten mit bereits gültig beschriebenen Typspezies bzw. Typstämmen wurde die Datenbank EzBioCloud (Yoon et al., 2017) genutzt, von der auch die Vergleichssequenzen für die phylogenetischen Analysen herangezogen wurden. Mit diesen 16S rRNA-Gensequenzen sowie jeweils einer *Outgroup* wurde ein ClustalW Alignment erstellt (Thompson et al., 1994). Die anschließende Berechnung eines Maximum-Likelihood (ML)-Baums zur Rekonstruktion der evolutionären Verwandtschaft erfolgte in MEGA X (Hall, 2013) und basierte auf dem Tamura-Nei-Model. Die Bootstrap Werte zur Beurteilung der statistischen Unterstützung wurden aus 500 Wiederholungen für *F. ignavus* gen. nov., sp. nov. und 1000 Wiederholungen für *Raineyella* sp. nov. errechnet (Siebert et al., 2020).

8.1.2 Genomische Analysen

Um Eigenschaften wie Größe und G+C Gehalt aufzudecken und *in silico* Analysen auf Genomebene durchführen zu können, erfolgte die Genomsequenzierung der Stämme WS4937^T, WS4759 und WS5303 (Gattung) sowie der Stämme WS4998^T und WS4999 (Spezies). Zunächst wurden alle Isolate bei 30 °C für 4 d kultiviert und deren DNA unter Verwendung des Qiagen QIAamp DNA Mini Kit nach Herstellerangaben isoliert. In Vorbereitung auf die Genomsequenzierung erfolgte die Erstellung einer PCR-freien Sequenzierbibliothek. Dabei wurde für die Fragmentierung der DNA sowie die Sequenzieradapter-Ligation gemäß dem Protokoll von Huptas et al. (2016) verfahren und das TruSeq DNA PCR-free Sample Preparation Kit (Illumina) verwendet. Die Genomsequenzierung erfolgte in einer MiSeq-Reagent Kit v3 Kartusche auf einer Illumina MiSeq-Plattform nach Vorgaben des Herstellers. Im Anschluss wurden die Sequenzen mit Hilfe der Pipeline FastQC Version 0.10.1 (www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/) des NGS QC Toolkits Version 2.2.3 (Patel und Jain, 2012) einer Qualitätskontrolle unterzogen. Aus den resultierenden hochqualitativen Sequenzen wurde mit SPAdes Version 2.5.1 die finale Genomsequenz assembliert (Bankevich et al., 2012). Mit der Annotationspipeline für prokaryotische Genome der Datenbank NCBI (Tatusova et al., 2016; Haft et al., 2017) erfolgte die Identifizierung der codierenden Regionen (Siebert et al., 2020).

Zur Analyse der Ähnlichkeit zwischen Typstämmen bzw. Typspezies wurde für die neue Gattung die Berechnung der Aminosäureidentität (AAI) und für die neue Spezies die dDDH angewandt. Die Genomsequenzen der Typspezies bzw. Typstämme, die sich aus der phylogenetischen Analyse als Referenzstämme ableiten ließen wurden von der Datenbank NCBI bezogen. Die Berechnung der AAI-Werte wurde mit CompareM (<https://github.com/dparks1134/CompareM>) durchgeführt und resultierte aus den paarweisen Vergleichen, bei denen jeweils die neue Typspezies WS4937^T mit einem der Referenzgenome abgeglichen wurde (Siebert et al., 2020). Sowohl die Assemblierung und Annotation der Genome, als auch die Berechnung der AAI-Werte wurde von Dr. Christopher Huptas (Lehrstuhl für Mikrobielle Ökologie) durchgeführt.

Die dDDH der Speziesneubeschreibung (*Raineyella* sp. nov.) erfolgte mit den rekonstruierten Genomen der Stämme WS4998^T und WS4999 und den Genomsequenzen der Vergleichsstämme durch den *Type Strain Genome Server* (TYGS) der Deutschen Stammsammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ, Braunschweig, Deutschland) (Meier-Kolthoff und Goker, 2019).

8.1.2.1 Phylogenomische Analysen

Um evolutionäre Verwandtschaften mit noch höherer Auflösung zu analysieren wurden phylogenomische Analysen durchgeführt. Entsprechend den genomischen Minimalstandards für die Neubeschreibung einer Gattung nach Chun et al. (2018) wurde die phylogenomische Position von *F. ignavus* gen. nov., sp. nov. mithilfe eines *up-to-date bacterial core gene* (UBCG)-Baums bestimmt. Für die Erstellung eines Alignments wurden hierfür die verfügbaren Genomsequenzen aller Referenzstämme (abgeleitet aus der phylogenetischen Analyse) sowie eine *Outgroup* von der Datenbank NCBI bezogen. Zusammen mit den Isolaten WS4937^T, WS4759 und WS5303 wurde basierend auf 92 *housekeeping* Genen mit der UBCG Software Version 3.0 (Na et al., 2018) ein multiples Sequenzalignment erstellt und per MEGA X ein UBCG-Baum berechnet. Hierfür wurde das Tamura-Nei Model mit 200 Wiederholungen angewandt (Siebert et al., 2020). Die Analysen wurden von Dr. Christopher Huptas (Lehrstuhl für Mikrobielle Ökologie) ausgeführt.

8.1.2.2 Analyse des Aminosäuremetabolismus per KEGG-Datenbank

Die *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG) Datenbank wurde genutzt, um in Ergänzung zum Phänotyp auf Genomebene den Aminosäuremetabolismus des Typstammes der neuen Gattung *F. ignavus* gen. nov., sp. nov. WS4939^T zu interpretieren (Siebert et al. 2020). Zunächst wurden mit dem Programm Prodigal (Hyatt et al., 2010) die Protein-codierenden Gene des assemblierten Genoms von Isolat WS4939^T vorhergesagt (durch Dr. Christopher Huptas, Lehrstuhl für Mikrobielle Ökologie). Die daraus resultierenden Sequenzen wurden mit BlastKOALA (Kanehisa et al., 2016) annotiert und funktionalen, orthologen Sequenzen (*K numbers*) aus dem molekularen Netzwerk der KEGG Datenbank zugeordnet (KEGG *Orthology*). Mit diesen Orthologen erfolgte per KEGG *mapping* die Rekonstruktion der KEGG Signalwege (KEGG pathway).

8.2 Phänotypische Analysen

Im Rahmen der phänotypischen Analysen wurden morphologische, physiologische und biochemische Merkmale der neuen Taxa bestimmt. Die Stämme der neuen Gattung *Fundicoccus ignavus* gen. nov., sp. nov. (WS4937^T, WS4759 und WS5303) (Siebert et al., 2020) sowie der neuen Spezies *Raineyella* sp. nov. (WS4898^T und WS4899) mit dem Referenzstamm *R. antarctica* DSM 100494 wurden dafür routinemäßig auf TSA bei 30 °C für

4 d kultiviert, sofern nicht anders angegeben. Alle Versuche wurden in zwei unabhängigen, biologischen Replikaten durchgeführt.

8.2.1 Analyse der Zellmorphologie

Im Zuge der Ermittlung der morphologischen Charakteristika wurden Zellgröße und Form, Gram-Typ und Motilität aller unbekanntem Stämme beider Neubeschreibungen analysiert. Für die mikroskopischen Aufnahmen wurde ein Phasenkontrastmikroskop (BX51 Olympus, Hamburg, Deutschland) mit einer 100-fachen Vergrößerung eingesetzt, nachdem die Isolate auf TSA bei 30 °C für 48 h inkubiert, das Zellmaterial mit ¼ starker Ringer-Lösung gewaschen und in 50 µl suspendiert wurde. Um die Zellen sichtbar zu machen, diente das zugehörige Software F-view Soft Imaging System (Olympus, Hamburg, Deutschland). Unter Verwendung von 3% (w/v) KOH wurde die Methode nach Gregersen (1978) zur Untersuchung des Gram-Typs angewandt. Die Beurteilung der Motilität der Zellen in halbfestem TSA (TSB + 0.3% (w/v) Agar) erfolgte nach einer Inkubation bei 30 °C für 7 d (Siebert et al., 2020).

8.2.2 Analyse der Wachstumsbedingungen

Zur Charakterisierung der Wachstumsbedingungen der neuen Taxa wurde jeweils der Einfluss von Sauerstoff, Temperatur, NaCl und pH getestet. Die Fähigkeit unter anaeroben Bedingungen zu wachsen wurde für alle Isolate unter Einsatz eines Oxoid AnaeroGen (Thermo Scientific) gemäß Anweisungen des Herstellers analysiert. Bewertet wurde das Wachstum nach der Inkubation auf TSA bei 30 °C für 7 d. Die optimalen Wachstumsbedingungen bezüglich Temperatur, NaCl und pH wurden für die Stämme beider Neubeschreibungen (Gattung und Spezies) in TSB getestet. Die Salzkonzentrationen wurden durch die Zugabe von NaCl (in 1,0%-Schritten) modifiziert und die pH-Werte mit einer schrittweisen Erhöhung von 0,5, basierend auf dem Puffersystem von Xu et al (2005), eingestellt (Siebert et al., 2020).

8.2.2.1 *Fundicoccus ignavus* gen. nov., sp. nov.

Für die Stämme der neuen Gattung WS4939^T, WS4759 und WS5303 wurden die Wachstumskurven per Bioscreen C (Oy Growth Curves AB Ltd., Helsinki, Finnland) automatisiert aufgenommen. Die Temperaturoptima wurden bei 23-37 °C in 2 °C - Schritten, die optimalen NaCl-Bedingungen bei 0%, 0,5%, 6,5% und 1% - 7% (w/v) NaCl sowie der optimale pH-Wert von pH 5 - 8,5 getestet. Für alle Versuche wurde das entsprechende Testmedium jeweils 1:500 mit einer ÜNK (30 °C, 150 rpm für 24 h) beimpft. Bei den Bioscreen Messungen wurden je 200 µl des beimpften Mediums in eine Vertiefung der

100-Well-Mikrotiterplatte (MTP) pipettiert. Die Optima wurden im Fünffach- (Temperatur) bzw. im Dreifachansatz (NaCl und pH) ermittelt, indem die optische Dichte der Zellkulturen bei 600 nm (OD_{600}) alle 20 min unter kontinuierlichem Schütteln für 48 h dokumentiert wurde (Siebert et al., 2020). Entsprechend dem Wachstumsoptimum der Stämme wurde die Untersuchung der optimalen NaCl- und pH-Bedingungen bei einer Temperatur von 30 °C durchgeführt. Die Bestimmung der unteren und oberen Wachstumsgrenzen für Temperatur (bei 4 °C – 12 °C, 37 °C, 39 °C, 40 °C), NaCl- (0%- 9% und 6,5%) sowie pH-Toleranz (4,5 – 9,5) erfolgte in Röhren mit größeren Volumina. Durch visuelle Begutachtung der Testmedien erfolgte die Auswertung nach 7 d, die bei Trübung positiv gewertet wurde (Siebert et al., 2020).

8.2.2.2 *Raineyella* sp. nov.

Aufgrund eines sehr langsamen Wachstums erfolgte die Kultivierung der Stämme WS4898^T und WS4899 für alle Messungen in größeren Volumina. Die Wachstumskurven der optimalen Bedingungen wurden durch manuelle Messungen der OD in Röhren bei 610 nm (WinLab Data Line LED-Photometer, WINLAB, Clausthal-Zellerfeld, Deutschland) aufgezeichnet. Für alle Wachstumsversuche diente eine ÜNK (30 °C für 48 h) der Stämme zum Inokulieren des entsprechenden Testmediums, die zuvor auf TSA bei 30 °C für 3 d inkubiert wurden. Nach der Beimpfung der zu testenden Medien mit der ÜNK (1:50) erfolgte die Untersuchung der Optima in einem Temperaturbereich von 23-37 °C, in NaCl Konzentrationen von 0%, 0,5%, 1-9% (w/v) sowie pH-Werten von 5-9 im Doppelansatz. Die Kultivierung zur Feststellung der NaCl- und pH-Optima erfolgte bei der optimalen Wachstumstemperatur von 27 °C für Stamm WS4899 und 32 °C für WS4898^T. Um die unteren und oberen Toleranzbereiche von WS4898^T, WS4899 und dem Referenzstamm *R. antarctica* DSM 100494 gegenüber Temperatur (3 °C-12 °C, 34 °C-42 °C), NaCl (0%-10% (w/v)) und pH (4,5-9,5) zu bestimmen, wurde die ÜNK in einer Konzentration von 1:500 eingesetzt. Nach 14 d wurde eine sichtbare Trübung positiv gewertet.

8.2.3 Analyse biochemischer Eigenschaften

Als Teil der Charakterisierung des Phänotyps wurden enzymatische Aktivitäten sowie die Substratverwertung untersucht. Dies erfolgte für alle Isolate beider Neubeschreibungen (Gattung und Spezies) bei einer Inkubationstemperatur von 30 °C. Der Nachweis der Cytochrom C Oxidase erfolgte mit Baccident® Oxidase-Teststreifen (Merck) nach Herstellerangaben. Die Analyse der Katalaseaktivität wurde mit 3% (v/v) H₂O₂ (Reddy et al., 2007) getestet. Für den Test auf Hämolyse wurde Columbia Agar mit 5% Schafsblut (Oxoid) eingesetzt und für 72 h bebrütet. Die Fähigkeit der Isolate Gelatine zu hydrolysieren wurde

mittels Nutrient-Gelatine in Röhrcchen untersucht. Nach der Inkubation für 48 h und 14 d wurden die Röhrcchen jeweils zunächst bei 5 °C für 15 min abgekühlt und schließlich auf Trübung sowie Verflüssigung der Gelatine überprüft. Für den Test auf Stärkehydrolyse (Reddy et al., 2007) wurden alle Stämme auf Stärke-Agar für 7 d inkubiert. Klare Lysehöfe nach der Zugabe von 1 ml Lugolscher Lösung zeigten dabei ein positives Ergebnis an. Die Reagenzien Nit 1, Nit 2 (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, Frankreich) und Zinkpulver dienten zur Analyse der Nitrat- und Nitritreduktion und wurden nach der Kultivierung der Bakterienstämme unter semi-anaeroben Bedingungen zugegeben. Eine Rotfärbung nach ca. 5 min bzw. durch die Zugabe von Zinkpulver nach ausgebliebener Rotfärbung belegten bzw. widerlegten die Nitratreduktion. Der Nachweis zur Bildung von H₂S und Indol erfolgte mithilfe von SIM-Medium und Kovac's Reagenz nach Vorgaben des Herstellers (Siebert et al., 2020). Zusätzlich wurde *Raineyella* sp. nov. gemäß Reddy et al. (2007) auf Caseinhydrolyse getestet. Die Bildung eines klaren Lysehofes auf dem Caseinagar nach 14 d wurde positiv gewertet.

Weitere Analysen zu enzymatischen Aktivitäten im Rahmen phänotypischer Untersuchungen erfolgten mit dem API Rapid ID32 STREP (*F. ignavus* gen. nov., sp. nov.) bzw. dem API 20 NE (*Raineyella* sp. nov.) (bioMérieux). Zusätzlich wurde das API CH/CHL System genutzt (bioMérieux), um für alle Stämme Säurebildung durch die Umsetzung von Kohlenhydraten zu untersuchen. In Vorbereitung auf die Durchführung aller drei API-Testsysteme wurden ÜNK von allen Stämmen beider Neubeschreibungen (Gattung und Spezies) in 50 ml TSB angesetzt. Nach einer Bebrütung bei 30 °C für 24 h wurden je 1,0 ml der Kulturen bei 13.000 x g für 1 min zentrifugiert. Danach wurde der Überstand abgenommen, die Zellen dreimal in ¼-starker Ringer-Lösung gewaschen und schließlich in 400 µl resuspendiert. Anschließend wurde die Dichte der Zellsuspension mit ¼-starker Ringer-Lösung entsprechend McFarland Standard 2 eingestellt. Die Bakterienlösungen wurden für die Analysen mit dem API Rapid ID32 STREP und dem API 20 NE entsprechend der Herstellerangaben eingesetzt und nach einer Inkubationszeit von 24 h bei 30 °C (API Rapid ID32 STREP) bzw. 48 h bei 30 °C (API 20 NE) ausgewertet. Die vom Hersteller angegebenen Farbänderungen wurden als positives Ergebnis gewertet (Siebert et al., 2020).

Im API 50 CH/CHL System wurde die Säurebildung mit insgesamt 47 Kohlenhydraten untersucht, wobei für *F. ignavus* gen. nov., sp. nov. Stämme das API CHL und für die *Raineyella* sp. nov. Isolate das API CH Inokulationsmedium genutzt wurde. Abweichend von den Spezifikationen des Herstellers wurde hier eine modifizierte Version des API-Systems in einer 96-Well-MPT durchgeführt und die eingesetzten Zucker doppelt so hoch konzentriert

(mg / Vertiefung / 100 µl). Gelöst wurde jedes Kohlehydrat in H₂O_{dest.} und jeweils mit einem Filter sterilisiert. Die Analyse zur Säurebildung setzte sich dabei aus einem Volumen von 100 µl des jeweiligen Zuckers und 100 µl des API CHL bzw. API CH Mediums zusammen, welches mit der Bakteriensuspension (McFarland 2) gemäß Herstellerangaben inokuliert wurde. Um Kontaminationen auszuschließen wurden sowohl alle Zucker, als auch das nicht inokulierte API CH/CHL Medium als Kontrollen mitgeführt. Die MTP wurde mit einer Breathe-Easy[®] Membran (Merck) verschlossen und einem Plastikdeckel abgedeckt. Nach einer Inkubationszeit von 7 d wurde die Säurebildung bewertet, die sich durch einen Farbumschlag des pH-Indikators äußerte (Siebert et al., 2020).

8.3 Chemotaxonomische Analysen

Für die chemotaxonomische Charakterisierung wurde das Peptidoglykanprofil, die polaren Lipide (*F. ignavus* gen. nov., sp. nov.) sowie die zellulären Fettsäuren analysiert (*F. ignavus* gen. nov., sp. nov. und *Raineyella* sp. nov.). Alle chemotaxonomischen Analysen wurden bei der DSMZ durchgeführt.

Im Rahmen dieser Arbeit erfolgten die Analyse der Peptidoglykanstruktur und der polaren Lipide nur für den Typstamm WS4939^T der neuen Gattung. Dafür wurden 8 und 6 Liter TSB mit einer ÜNK (30 °C für 24 h) von WS4939^T 1:500 inokuliert und bei 30 °C für 48 h inkubiert. Nach der schrittweisen Zentrifugation bei 10.000 rpm und 10 °C für 15 min wurde das Pellet für die Peptidoglykananalyse in Isopropanol/Wasser (1:1 v/v) resuspendiert und für die Untersuchung der polaren Lipide gefriergetrocknet (Siebert et al., 2020). Zur Bestimmung des Peptidoglykanprofils wurde das Zellmaterial bei der DSMZ einer Hydrolyse (4 N HCl, 100 °C, 16 h; 6 N HCl, 120 °C, 16 h und 4 N, 100 °C, 45 min) ausgesetzt, per Dünnschichtchromatographie (DC) aufgetrennt (Rhuland et al., 1955) und schließlich die Mureinstruktur bestimmt (Schumann, 2011). Die Untersuchung der polaren Lipide erfolgte mit ca. 200 mg gefriergetrocknetem Zellmaterial und einer Chloroform:Methanol:0.3% wässriger NaCl Lösung (v/v/v), modifiziert nach (Bligh und Dyer, 1959). Gemäß dem Protokoll von (Tindall et al., 2007) wurden die polaren Lipide mit einer zweidimensionalen DC separiert. Unter Verwendung von spezifischen Reagenzien wurden die polaren Lipide und ihre verschiedenen funktionellen Gruppen detektiert (Tindall et al., 2007).

Die Untersuchung der zellulären Fettsäuren erfolgte für die Gattungsneubeschreibung mit aktiven Kulturen der Stämme WS4939^T, WS4759, WS5303 und *Globicatella sanguinis* NBRC 15551^T. Gemäß Li et al. (2019) wurden die Isolate auf Columbia Agar (+ 5% (v/v)

Pferdeblut) (Biorad) bei 37 °C für 24 h in einer Atmosphäre mit 5% CO₂ kultiviert (Siebert et al., 2020). Für die Beschreibung der neuen Spezies *Raineyella* sp. nov. wurden die Stämme WS4898^T, WS4899 sowie der Typstamm *R. antarctica* DSM 100494 auf TSA bei 30 °C für 72 h inkubiert und anschließend das Fettsäureprofil der aktiven Kulturen parallel analysiert. Nach einem modifizierten Protokoll von Miller (1982) und Kuykendall et al. (1988) wurden die Fettsäureester gewonnen und per Gaschromatographie aufgetrennt. Um die Fettsäuren zu determinieren, wurde das *Standard Sherlock Microbial Identification System* (MIDI, Inc., Newark, USA) mit der TSB6.0 Datenbank verwendet.

8.4 Hinterlegung der Stämme

Mit der Publikation eines neuen Taxons müssen die beschriebenen Isolate und die genomischen Sequenzen öffentlich zugänglich gemacht werden. Dafür wurden die Stämme beider Neubeschreibungen bei den zwei internationalen Stammsammlungen *Belgian Coordinated Collection of Microorganisms* (BCCM) und DSMZ hinterlegt. Für die neu beschriebene Typspezies *F. ignavus* gen. nov., sp. nov. wurden der Typstamm WS4937^T (= DSM109652 = LMG 31441) sowie ein weiteres Isolat WS5303 (= DSM109653 = LMG 31442) in die Sammlungen aufgenommen (Siebert et al., 2020). Für *Raineyella* sp. nov. wurde der Typstamm WS4898^T (= DSM100887 = LMG 29088) hinterlegt. Zusätzlich sind die *draft*-Genome aller Stämme der Gattung WS4937^T, WS4759, WS5303 unter den Kennungen WJQT00000000, WJQS00000000 und WJQR00000000 auf der NCBI Datenbank zugänglich. Die Sequenzen des 16S rRNA-Gens sind auf NCBI/GenBank unter folgenden Nummern zu finden: MN640086 (WS4937^T), MN640404 (WS4759) und MN640402 (WS5303) (Siebert et al., 2020).

III. ERGEBNISSE

1. Protokolloptimierung zur Amplikon-Sequenzierung von Rohmilch

Um eine erfolgreiche Sequenzierung zur Analyse der Rohmilchmikrobiota durchzuführen erfolgte in dieser Arbeit die Optimierung eines Protokolls zur Aufbereitung von Rohmilch für die 16S rRNA-Amplikon-Sequenzierung (NGS). Der Fokus lag hierbei auf der Abtrennung der bakteriellen Zellen, der enzymatischen selektiven Lyse zur Reduktion der eukaryotischen DNA und der bakteriellen Lysemethode. Daneben wurde der Einfluss der Zyklenzahl im 1. Schritt der *library*-PCR auf die Biodiversität untersucht. Diese Ergebnisse wurden bereits in Siebert et al. (2021) publiziert.

1.1 Bakterienseparation und selektive Lyse zur Reduktion eukaryotischer DNA

Um die Separation der Bakterienzellen aus der Rohmilchmatrix zu optimieren, die eukaryotische DNA zu reduzieren und schließlich die DNA-Mengen der *library*-PCR zu erhöhen wurden zwei Vorbehandlungsschritte getestet.

Die Hauptprobleme bei der DNA-Isolation aus Rohmilch bestehen darin, dass einerseits ein hoher Milchproteinanteil (Casein) vorliegt und andererseits das bakterielle Genom dem der Kuh in einem unausgewogenen Verhältnis gegenübersteht (ca. 1:1000) und eine klare Dominanz der eukaryotischen DNA herrscht. Die eukaryotische DNA könnte problematisch für die Amplifikation der bakteriellen Ziel-DNA (16S rRNA-Abschnitt) in der späteren *library*-PCR sein. Daher lag der Fokus bei der selektiven Lyse (SL) als ein Vorbehandlungsschritt auf dem Abbau der eukaryotischen Zellen und deren DNA, um die Ausbeute an bakterieller DNA und die PCR Effizienz zu erhöhen. Dies erfolgte durch einen enzymatischen Verdau mit Proteinase K zur Destabilisierung der eukaryotischen Zellmembranen und einem anschließenden Abbau der dadurch freigewordenen und verfügbaren DNA durch das Enzym DNase I. Die Auswirkung der eingesetzten Enzyme während der SL auf die prokaryotischen Zellen wurde zuvor mit Reinkulturen von jeweils 7 Stämmen Gram-negativer (*Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Citrobacter*, *Chryseobacterium*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Hafnia*) und Gram-positiver (*Aerococcus*, *Brachybacterium*, *Carnobacterium*, *Kocuria*, *Corynebacterium*, *Lactococcus*, *Listeria*) Bakterien in TSB überprüft. Nach Quantifizierung der DNA-Konzentrationen im Vergleich zur Negativkontrolle schwankten die relativen Mengen zwischen 90-155% (im Schnitt 112%) für die Gram-negativen und zwischen 70-158% (im Schnitt 106%) für die Gram-positiven Stämme (Anhang Tabelle A1). Da die Anwendung der

SL auch bei der 16S rDNA real-time PCR jeweils im Vergleich zur Negativkontrolle keinen Effekt auf den Ct-Wert zeigte, wurde angenommen, dass durch den Vorgang der SL kein bedeutender Abbau der prokaryotischen Zellen erfolgte (Siebert et al., 2021).

Da die hohe Milchproteinfraktion in der Rohmilch einen Störfaktor bei der SL darstellt und dadurch die Effizienz der Enzym-basierten Reduktion herabsetzen könnte, wurde die Anwendung von EDTA als zweiter Vorbehandlungsschritt evaluiert. Zum Spalten der Casein-Mizellen in der Rohmilch durch den Chelatbildner wurde einerseits die Zugabe von EDTA zur Rohmilch vor der initialen Zentrifugation und andererseits die Pellet-Behandlung nach der Zentrifugation getestet. Die beiden EDTA-Behandlungsmethoden wurden jeweils im Vergleich bei insgesamt vier verschiedenen Rohmilchproben untersucht, deren aerobe, mesophile Keimzahlen zwischen 4,1 – 5,4 log KBE/ml variierten. Anschließend erfolgte für jede Probe eine SL, bevor schließlich die bakterielle DNA extrahiert wurde. Während nach der EDTA-Behandlung des Pellets Ct-Werte im Schnitt zwischen 18 und 21 detektiert wurden, resultierte die EDTA Zugabe direkt zur Rohmilch, vor der initialen Zentrifugation, in merklich niedrigeren Ct-Werten von 16 – 19 (Abbildung 6A). Die durchschnittliche Reduktion der Ct-Werte betrug zwischen 1,6 und 2,0. Somit war die Reduktion in Folge der EDTA-Behandlung der Rohmilch vor der Zentrifugation bei drei der vier Rohmilchproben signifikant und insgesamt bei allen vier Proben reproduzierbar (Siebert et al., 2021).

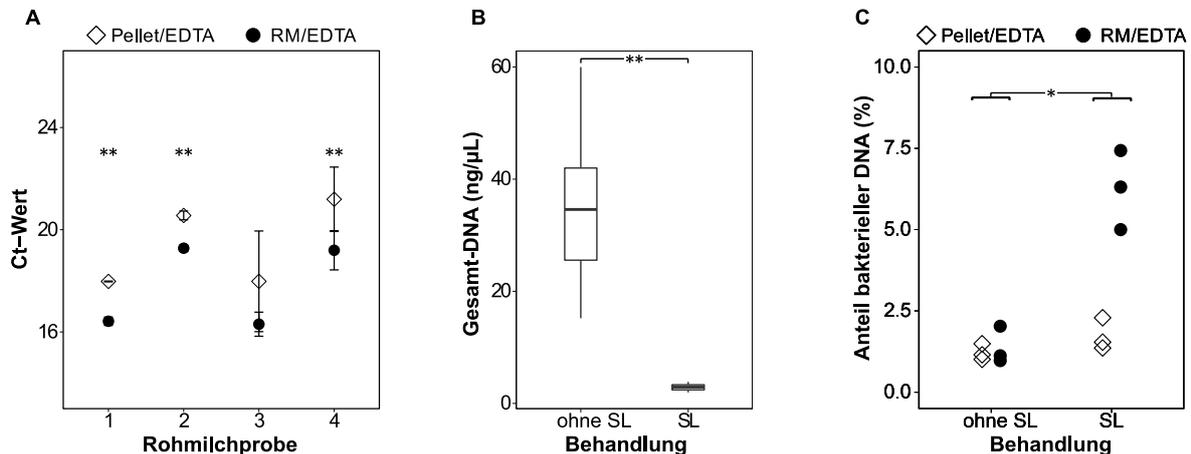


Abbildung 6 Einfluss der EDTA-Zugabe und der selektiven Lyse (SL) als Behandlungsmethode vor der DNA-Extraktion. A: Vergleich der 16S rDNA-Quantität per real-time PCR nach der Vorbehandlung mit EDTA. Rohmilchproben (n=4) wurden durch Zugabe von 0,5 M EDTA vor (RM/EDTA) bzw. nach (Pellet/EDTA) der initialen Zentrifugation behandelt. SL wurde bei jeder Probe angewendet. B+C: Einfluss der SL auf die Gesamt-DNA Konzentration (B) und den Anteil (%) an bakterieller DNA (C) nachdem die Proben mit EDTA vor (RM/EDTA) oder nach (Pellet/EDTA) der Zentrifugation behandelt wurden. n=6 Replikate jeweils für die Behandlung jeder EDTA-Kombination mit oder ohne SL. Alle Extraktionen erfolgten mit dem DNeasy® PowerFood® Microbial Kit + 1,0h zusätzlicher enzymatischer Lyse. EDTA: Ethylendiamintetraacetat; RM: Rohmilch. * $p < 0,05$ und ** $p < 0,01$. Abbildung modifiziert nach Siebert et al. (2021).

Die Auswirkungen der SL auf die DNA-Quantität wurde für jede Behandlung (Pellet/EDTA und RM/EDTA) in Triplikaten getestet. Da ohne SL die Gesamt-DNA Konzentrationen zwischen 15 und 60 ng/µl lagen und nach der Anwendung der SL die Gesamt-DNA Mengen von 2 bis 4 ng/µl reichten, demonstrierte die SL einen zielführenden Abbau der eukaryotischen Zellen durch den enzymatischen Verdau (Abbildung 6B). Während sich die Quantität der Gesamt-DNA ca. um den Faktor 10 verringerte, so kam es gleichzeitig zu einer signifikanten Zunahme des prozentualen Anteiles der bakteriellen DNA (Abbildung 6C). Dies untermauerte schließlich die Sensitivität der eukaryotischen Zellen gegenüber Proteinase K während der selektiven Lyse und einen effizienten Abbau deren DNA (Siebert et al., 2021).

1.2 Vergleich der Lysemethoden zur Extraktion bakterieller DNA

Im Anschluss an die Vorbehandlung der frischen Rohmilch mit EDTA vor der Zentrifugation und einer SL wurde unter Verwendung kommerziell erhältlicher Extraktionskits die Methode der bakteriellen Lyse untersucht. Diese beruhte entweder auf der reinen enzymatischen oder mechanischen Lyse bzw. einer kombinierten Aufschlussmethode (Tabelle 2 in Kapitel II 4.1.3). Beurteilt wurde die Effektivität der Lyse in Bezug auf die Amplikon-Konzentration nach der *library*-PCR sowie deren Einfluss auf die Zusammensetzung des sequenzierten Mikrobioms (Siebert et al., 2021).

1.2.1 DNA-Konzentration nach der *library*-PCR

Die Isolation ausreichender Quantitäten an bakterieller DNA ist für die Generierung von Amplikons in der *library*-PCR und somit für eine erfolgreiche Sequenzierung ausschlaggebend. Aufgrund gewöhnlich geringer Keimzahlen von $<5 \log \text{KbE/ml}$, ist dieser Prozess insbesondere für Rohmilch als Probenmatrix von großer Relevanz.

Untersucht wurden jeweils zwei Rohmilchproben direkt von einem Erzeugerhof und aus dem Stapeltank einer Molkerei mit bakteriellen GKZ, die von 4,3 bis 5,3 $\log \text{KbE/ml}$ reichten (Siebert et al., 2021). Nach der DNA-Extraktion erfolgte die Generierung der Amplikons in der *library*-PCR. Alle DNA-Extraktionsmethoden wurden in Duplikaten oder Triplikaten ausgeführt und im Vergleich zu der kombinierten Methode aus zusätzlicher enzymatischer Lyse (1,0 h) und *bead-beating* des PowerFood Kits bewertet. Insgesamt demonstrierten die detektierten DNA-Konzentrationen starke Schwankungen, sowohl zwischen den Rohmilchproben als auch innerhalb der unterschiedlichen DNA-Extraktionskits (Tabelle 9). Im Schnitt zeigten die Enzym-basierten Kits (PathoProof und Sample Preparation) jeweils bei drei

von vier Milchproben geringere DNA-Ausbeuten. Bei den Proben A und C, deren Keimzahlen um 0,5 - 1,0 log-Stufen niedriger waren, trat dieser Effekt sogar verstärkt auf. Allerdings wurde mit der reinen enzymatischen Lyse eine insgesamt schwache Effizienz in der *library*-PCR ermittelt, die auch durch höhere bakterielle Keimzahlen nicht gesteigert wurde. Für Rohmilchprobe A mit der niedrigsten Ausgangskeimzahl (4,3 log KbE/ml) wurde nach der Enzym-basierten Lyse eine DNA-Ausbeute von 3,7 ng/μl bzw. 0,8 ng/μl erzielt, während sich mit der mechanischen Lyse per *bead-beating* durch Anwendung des PowerFood Kits die höchste DNA-Konzentration äußerte (17,8 ng/ml). Das zweite Kit zur Untersuchung der reinen *bead-beating* Methode (StarPrep Two Kit) hingegen beinhaltet keine Säulenaufreinigung und lieferte für Probe A eine DNA-Konzentration von lediglich 4,2 ng/μl. Nach der Extraktion der Rohmilchproben B-D mit einer um 0,5 bis 1,0 log Stufen höheren bakteriellen Belastung, zeigte das StarPrep Two Kit im Vergleich deutlich höhere DNA-Ausbeuten (Siebert et al., 2021).

Tabelle 9 Effekt der Extraktionsmethode auf die DNA-Konzentrationen nach der *library*-PCR. Analysiert wurden die Rohmilchproben A-D mit GKZ zwischen 4,3 und 5,3 log KbE/ml. Werte resultierten aus Duplikaten oder Triplikaten. woEL: ohne enzymatische Lyse; EL: enzymatische Lyse; n.d.: nicht detektiert. * $p < 0.05$: signifikant niedrigere DNA-Konzentrationen im Vergleich zum DNeasy® PowerFood® Microbial Kit + 1,0 h zusätzliche EL. Tabelle aus Siebert et al. (2021).

Rohmilchprobe		A	B	C	D
Keimzahl (log KbE/ml) der Rohmilch		4,3	5,2	4,8	5,3
Lyse	Extraktions-Kit	DNA-Konzentration (ng/μl)			
Enzyme	PathoProof™ Complete-16 Kit	3,7±0,3	65,5±17,4	17,2±17,0	0,4±0,1
	foodproof® Sample Preparation Kit II	0,8±0,2	3,4±1,3	2,7±2,1	45,9±24,1
<i>Bead-beating</i>	foodproof® StarPrep Two Kit *	4,2±0,8	61,1±2,2	42,8±0,2	57,1±1,7
	DNeasy® PowerFood® Microbial Kit; woEL	17,8±10,1	74,0±4,1	n.d.	n.d.
Enzyme + <i>Bead-beating</i>	DNeasy® PowerFood® Microbial Kit; 0,5 h zusätzliche EL	14,3±0,6	68,7±5,7	n.d.	n,d,
	DNeasy® PowerFood® Microbial Kit; 1,0 h zusätzliche EL	14,8±3,8	89,6±20,1	74,4±14,9	108±9,9

Die vergleichsweise höchsten DNA-Mengen wurden konstant für die getesteten Varianten des PowerFood Kits gemessen. Allerdings hatte der zusätzliche enzymatische Verdau keinen bedeutenden Einfluss auf die resultierenden Amplikon-Konzentrationen. Schließlich erwies sich insgesamt ein mechanischer Aufbruch per *bead-beating* und eine Säulen-basierte Aufreinigung während der bakteriellen Lyse als unverzichtbar, um in der *library*-PCR eine

adäquate Menge an Amplikons zu erzielen. Dies äußerte sich hauptsächlich bei Rohmilchproben mit niedriger Ausgangskeimzahl (Siebert et al., 2021).

1.2.2 Zusammensetzung der Mikrobiota

Neben dem Einfluss des Lyseprotokolls auf die DNA-Quantität, ist eine breite und ausgewogene Abdeckung der detektierten Biodiversität sowie die Vermeidung der Unter- oder Überrepräsentation der relativen Abundanzen einzelner bakterieller Taxa für die Interpretation der Mikrobiomdaten von entscheidender Bedeutung. Um Differenzen im mikrobiellen Profil infolge unterschiedlicher Extraktionsmethoden aufzudecken, wurde eine Amplikon-Sequenzierung von einer frischen Rohmilchprobe eines Erzeugerhofes (RM A, 4,3 log KbE/ml) und von einer Stapeltankprobe einer Molkerei (RM B, 5,3 log KbE/ml) durchgeführt (Siebert et al., 2021). Je RM A und B wurden die untersuchten DNA-Extraktionsmethoden jeweils in Duplikaten oder Triplikaten ausgeführt (Abbildung 4 in Kapitel II 4.1.3).

Obwohl alle Proben vor der Sequenzierung auf eine Amplikon-Konzentration von 12 pmol eingestellt wurden, zeigte RM A nach der Sequenzierung und der Qualitätskontrolle der Rohdaten eine deutlich niedrigere Readzahl als RM B (Tabelle 10) (Siebert et al., 2021). Der Unterschied von ca. 1,0 log-Stufe in der Keimzahl und die damit assoziierte, höhere DNA-Ausbeute nach der *library*-PCR für RM B, könnte einen Effekt auf die resultierenden Readzahlen nach der Sequenzierung gehabt haben. Worauf dieses Phänomen tatsächlich zurückzuführen war, blieb unklar. Jedoch wurde deutlich, dass Rohmilch mit geringer GKZ zu einer fehlerhaften PCR mit unzureichenden DNA-Mengen oder auch zu Artefakten in der Messung von DNA-Quantität führen kann. Die geringen DNA Mengen der *library*-PCR nach der Extraktion mit dem Enzym-basierten Sample Preparation Kit (Tabelle 9) für beide Rohmilchproben A und B spiegelte sich auch in den vergleichsweise niedrigeren Readzahlen nach der Sequenzierung wider (Tabelle 10). Somit wurden insgesamt drei der fünf Extraktionen nach der Prozessierung der Rohdaten und vor der Normalisierung aus dem Datensatz entfernt (Siebert et al., 2021).

Tabelle 10 Readzahlen nach Amplikon-Sequenzierung und Qualitätskontrolle der Rohmilchproben A und B nach Anwendung verschiedener Extraktionsmethoden. OTUs mit einer Abundanz <0,25% wurden in allen Proben entfernt. Aerobe, mesophile GKZ für A: 4,3 log KBE/ml und B: 5,2 log KBE/ml. SP2: foodproof® StarPrep Two Kit; PF: DNeasy® PowerFood® Microbial Kit, woEL: ohne zusätzliche enzymatische Lyse, EL: zusätzliche enzymatische Lyse für 0,5 h bzw. 1,0 h; PP: PathoProof™ Complete-16 Kit; SP: foodproof® Sample Preparation Kit II. DNA-Extraktion und *library*-PCR wurden für jedes Kit in Duplikaten oder Triplikaten durchgeführt. Fett: Replikate, die vor der Normalisierung aus dem Datensatz entfernt wurden. Tabelle modifiziert nach Siebert et al. (2021).

Rohmilch	DNA-Extraktion					
	SP2	PFwoEL	PF0.5EL	PF1.0EL	PP	SP
Rohmilch A	18.064	21.705	25.551	20.144	12.552	295
	22.064	27.278	26.374	31.179	14.600	1.775
	22.254	29.673	32.067	52.954	20.523	9.780
Rohmilch B	56.221	61.027	93.555	107.917	82.174	2.946
	158.668	238.605	115.055	139.525	188.142	27.766
	296.484	352.984	-	243.905	305.905	-

Zum Vergleich der Biodiversität wurde zunächst die Analyse der beta-Diversität durchgeführt. Sie ermöglichte den Vergleich der taxonomischen Zusammensetzung (OTUs) der Proben untereinander, um so den Effekt der Extraktionsmethoden auf das detektierte mikrobielle Profil zu beurteilen. Der *non-metric multidimensional scaling* (NMDS)-Plot veranschaulichte somit die klare Aufspaltung der Proben RM A und RM B in zwei Fraktionen von unten nach oben, beginnend mit der reinen mechanischen Lyse per bead-beating, über die kombinierte Methode (enzymatische + mechanische Lyse) bis hin zum Enzym-basierten, bakteriellen Aufschluss (Abbildung 7). Während die Dauer der zusätzlichen enzymatischen Lyse (0,5 h und 1,0 h EL) keinen Effekt auf die mikrobielle Zusammensetzung aufwies, erfolgte für das PowerFood Kit ohne zusätzliche enzymatische Lyse (PFwoEL_A und PFwoEL_B) eine Verlagerung in Richtung des auf *bead-beating* beruhenden StarPrep Two Kits. Im NMDS-Plot zeigte sich unabhängig von der Probe ein wiederkehrendes Muster mit ähnlichen Unterschieden und Abständen zwischen den getesteten DNA-Isolationsmethoden (Siebert et al., 2021).

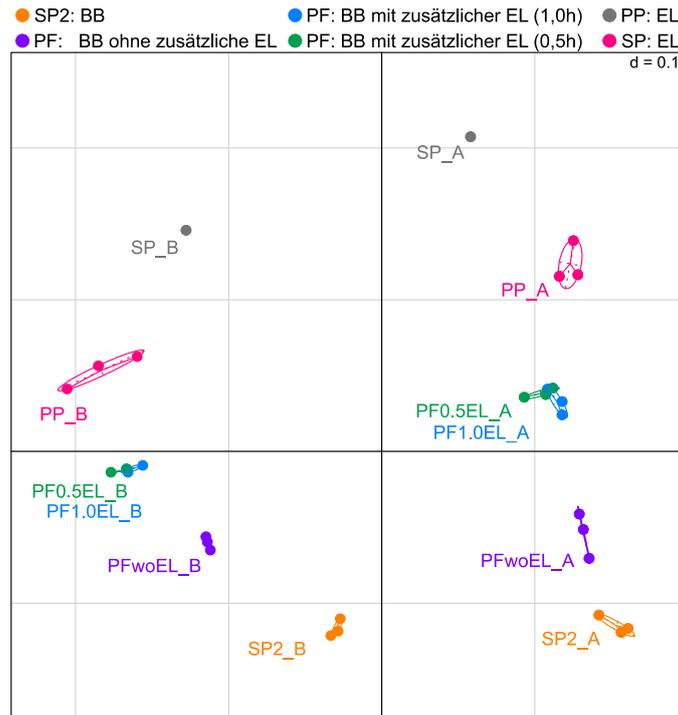


Abbildung 7 NMDS-Plot (generalized UniFrac distance) der Rohmilchproben (RM) A und B nach der Anwendung verschiedener DNA-Extraktionsmethoden. Aerobe, mesophile Keimzahl RM A: 4,3 log KbE/ml und B: 5,2 log KbE/ml. Mechanische Lyse: Star Prep Two Kit (SP2) und DNeasy® PowerFood® Microbial Kit (PFwoEL); kombinierte Lyse (Enzyme + *bead-beating*): DNeasy® PowerFood® Microbial Kit mit zusätzlicher enzymatischer Lyse für 1,0 h (PF1,0EL) bzw. für 0,5 h (PF0,5EL); Enzymatische Lyse: PathoProof™ Complete-16 Kit (PP) und Sample Preparation Kit (SP). DNA-Extraktionen erfolgten in Duplikaten (RM B: SP und PF0,5EL) oder Triplikaten; SP: aufgrund niedriger Readzahlen wurde jeweils nur ein Replikat für die Analyse verwendet. woEL: ohne enzymatische Lyse; EL: enzymatische Lyse. $p=0,001$ (PERMANOVA). Abbildung aus Siebert et al. (2021).

Um Diskrepanzen in dem Diversitätsprofil innerhalb der Extraktionen festzustellen wurde die alpha-Diversität untersucht. Dabei repräsentiert die OTUs Richness die Anzahl der detektierten OTUs, wohingegen der Shannon.Effective Index die Gleichmäßigkeit der Verteilung der Abundanzen innerhalb der taxonomischen Gemeinschaft mitberücksichtigt. Die Richness Werte variierten zwischen den Lysemethoden bei RM B nur minimal, wohingegen bei RM A mit der niedrigeren Keimzahl ein Trend zu höheren Richness Werten unter Anwendung einer enzymatischen Lyse beobachtet wurde (Abbildung 8A+B). Der Shannon.Effective hingegen stieg bei beiden Rohmilchproben nach Enzym-basierter Lyse vergleichsweise deutlich an und eine insgesamt ausgewogenere Verteilung der sequenzierten mikrobiellen Gemeinschaft wurde aufgedeckt (Siebert et al., 2021). Um Unterschiede aufzudecken, wurden auf Gattungsebene alle Taxa mit einer relativen Abundanz $\geq 1\%$ analysiert. Daraufhin wurde deutlich, dass die Methodik der DNA-Isolation die relative Abundanz spezifischer Taxa erheblich beeinflusste (Abbildung 8C, Anhang Tabelle A2, Anhang Tabelle A3).

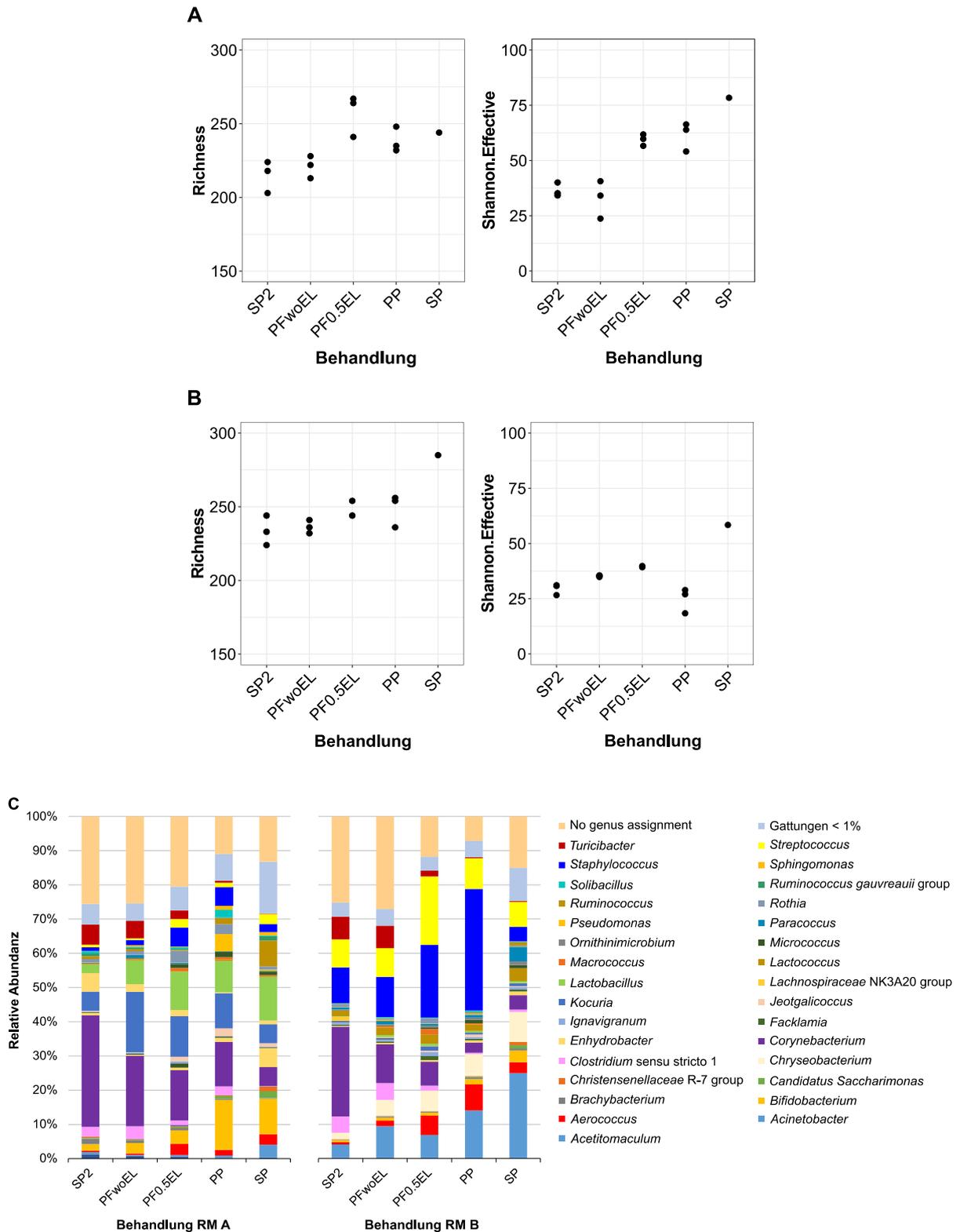


Abbildung 8 Alpha-Diversität mit Richness und Shannon.Effective (A+B) und relative Abundanz (%) auf Gattungsebene (C). Dargestellt sind die Rohmilchproben (RM) A (A+C) und RM B (B+C) nach Anwendung verschiedener Extraktionsmethoden. Aerobe, mesophile Keimzahl RM A: 4,3 log KbE/ml und RMB: 5,2 log KbE/ml. Mechanische Lyse: Star Prep Two Kit (SP2) und DNeasy® PowerFood® Microbial Kit (PFwoEL); kombinierte Lyse (Enzyme + *bead-beating*): DNeasy® PowerFood® Microbial Kit mit zusätzlicher enzymatischer Lyse für 0,5 h (PF0,5EL); Enzymatische Lyse: PathoProof™ Complete-16 Kit (PP) und Sample Preparation Kit (SP). Relative Abundanzen sind Mittelwerte aus (Duplikaten RM B: PF0,5EL) bzw. Triplikaten; SP: aufgrund niedriger Readzahlen wurde jeweils nur ein Replikat für die Analyse verwendet. woEL: ohne enzymatische Lyse; EL: enzymatische Lyse. Abbildung modifiziert nach Siebert et al. (2021).

Das detektierte mikrobielle Muster demonstrierte eine höhere relative Abundanz von *Corynebacterium*, *Clostridium sensu stricto* 1 und *Turicibacter* nach Anwendung von mechanischer Lyse ohne die Zugabe zusätzlicher Enzyme (SP2 and PFwoEL). Gegenätzlich dazu führte die Einbindung eines zusätzlichen Enzymschrittes in den DNA Isolationsprozess zu höheren relativen Abundanzen der Gattungen *Bifidobacterium*, *Staphylococcus* und *Streptococcus* (PF0.5EL, PP und SP). Außerdem fiel auf, dass die enzymatische Lyse zusätzlich die Detektion der in frischer Rohmilch weniger dominanten Gram-negativen Taxa, wie beispielsweise *Acinetobacter* und *Chryseobacterium*, begünstigte. Der vergleichsweise auffällig hohe Anteil der Gattung *Staphylococcus* (Probe B PP) ist höchstwahrscheinlich auf die Verwendung der Extraktionsreagenzien des PathoProof Kits zurückzuführen, welches üblicherweise für die Detektion von mastitisassoziierten Staphylokokken eingesetzt wird (Siebert et al., 2021).

Während *bead-beating* als Lysemethode in Kombination mit einer Säulen-basierten Aufreinigung für RM A und RM B nach der *library*-PCR konstant die höchsten DNA-Quantitäten lieferte, zeigte die Zugabe von Enzymen keinen Effekt (PowerFood Kit) auf die detektierten DNA-Mengen. Die vergleichende Mikrobiomanalyse hingegen verdeutlichte eine unzureichende Abdeckung der sequenzierten Biodiversität mit einer Verzerrung der relativen Abundanzen durch das Ausbleiben einer enzymatischen Lyse. Demnach untermauerte die Amplikon-Sequenzierung die Notwendigkeit des enzymatischen Aufschlusses, um eine adäquate Erfassung der Biodiversität Gram-positiver und Gram-negativer Bakterien aus Rohmilch zu gewährleisten. Unter Berücksichtigung der DNA-Ausbeute nach der *library*-PCR sowie der Sequenzierdaten, scheint die Kombination aus enzymatischer und mechanischer Lyse schließlich eine geeignete Option zu sein (Siebert et al., 2021).

1.3 Einfluss der PCR-Zyklenzahl auf die Biodiversität

Neben der DNA-Extraktion wurde im Rahmen der Methodenoptimierung zur Sequenzierung von Rohmilchproben außerdem der Einfluss der Zyklenzahl in der *library*-PCR auf die resultierende, sequenzierte Mikrobiota und der dadurch bedingte, potentielle Eintrag von Artefakten untersucht. Für die Generierung der Amplikons wurde die *library*-PCR mithilfe eines zweistufigen Verfahrens erstellt. Unterschiedliche Zyklenzahlen wurden dabei im 1. PCR-Schritt evaluiert, wonach 15, 20, 25, 30 oder 35 Zyklen zur Amplifikation der bakteriellen Ziel-DNA angewandt wurden. In die PCR eingesetzt wurden insgesamt zwei frische Rohmilchproben (RM) eines Erzeugerhofes und zwei Tankproben aus einer Molkerei,

deren aerobe, mesophile Keimzahlen zwischen 3,7 und 5,3 log KbE/ml variierten. Aufgrund individueller Barcodes der parallelen Replikate-PCRs für RM 1 sind die Daten für die alpha-Diversität und die relativen Abundanzen Mittelwerte aus Duplikaten (35 Zyklen), Triplikaten (30 Zyklen) oder Quadruplikaten (15, 20 und 25 Zyklen) (Abbildung 5 in Kapitel II 6.1.1). Starke Schwankungen in der Diversität zwischen den analysierten Rohmilchproben wurden anhand der absoluten Richness-Werte sichtbar, die nach der Anwendung von 15 Zyklen im 1. PCR-Schritt zwischen 162 und 236 OTUs lagen (Abbildung 9). Nachdem die Amplifikation der DNA mit 25 Zyklen bei drei der vier Milchproben mit einem leichten Anstieg einherging, reduzierte sich die analysierte Richness mit zunehmender Zyklenzahl (Siebert et al., 2021). Eine Verstärkung dieses Trends ging mit einer leicht höheren Zellzahl $>4,0$ log KbE/ml einher und trat bei drei der vier untersuchten Milchproben auf. Insgesamt wurde die maximale Reduktion bei den Zyklenzahlen 30 und 35 beobachtet, die in einem Rückgang der absoluten Richness-Werte von ca. 40 für die Tankproben RM 3 und RM 4 resultierte. Der Shannon.Effective Index zeigte ein vergleichbares Muster mit einer Abnahme der absoluten Werte zwischen 4-14 von 20 in Richtung der 35 Zyklen. Schließlich zeigte die Analyse der alpha-Diversität signifikante Unterschiede für die Richness nach der Durchführung von 30 Zyklen sowie für den Shannon.Effective mit 30 und 35 Zyklen im Vergleich zu 20 Zyklen im 1. Schritt der *library*-PCR (Siebert et al., 2021).

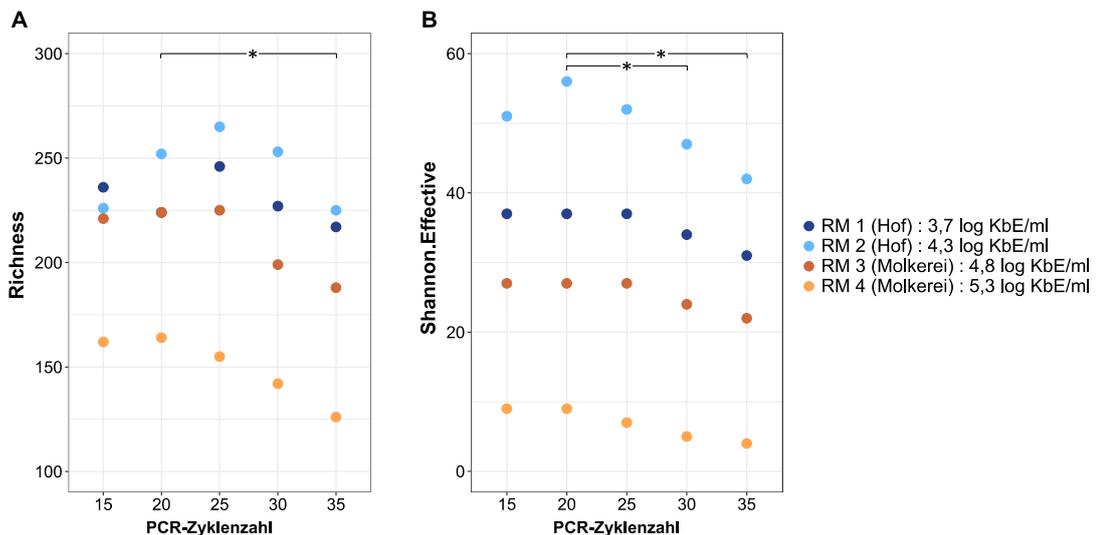


Abbildung 9 OTUs Richness (A) und Shannon.Effective (B) nach Anwendung von 15-35 Zyklen im 1. Schritt der *library*-PCR. Rohmilchproben (RM) stammten entweder direkt vom Erzeugerhof (RM 1 und 2) oder von einer Molkerei (RM 3 und 4). RM 1: Daten ergaben sich aus Mittelwerten von Duplikaten, Triplikaten oder Quadruplikaten. Aerobe, mesophile bakterielle Zellzahl: RM 1: 3,7 log KbE/ml; RM 2: 4,3 log KbE/ml, RM 3: 4,8 log KbE/ml; RM 4: 5,3 log KbE ml. $*p < 0,05$. Abbildung modifiziert nach Siebert et al. (2021).

Die Analyse der relativen Abundanzen sowie der beta-Diversität ließ eine systematische, zunehmende Veränderung in der taxonomischen Zusammensetzung mit steigender Zyklenzahl in der PCR erkennen (Abbildung 10, Anhang Abbildung A1). Um den Effekt der Zyklenzahl auf die Zusammensetzung der Mikrobiota und die Verteilung der Abundanzen der sequenzierten Gattungen aufzudecken, wurden die Sequenzierdaten beispielhaft für eine frische Rohmilchprobe (RM 1) detaillierter aufgeschlüsselt. Aufgrund einer niedrigen Anfangskeimzahl von RM 1 (3,7 log KbE/ml) und der geringen Abundanzen einzelner Gattungen war der Effekt auf die Verteilung der relativen Anteile weniger stark ausgeprägt aber dennoch zu erkennen (Abbildung 10A). Die Erhöhung der Zyklenzahl (15 - 35) resultierte in einer Zunahme der relativen Abundanzen von z.B. *Kocuria* (11.5% - 16.2%), *Bifidobacterium* (4.8% - 7.7%) und *Corynebacterium* (9.4% - 11.5%) und einer gleichzeitigen Abnahme der Abundanzen von *Pseudomonas* (21.1 - 11.2%) oder *Staphylococcus* (6.9% - 3.5%) (Siebert et al., 2021). Demnach demonstrierte die parallele Mikrobiomanalyse mit wenigen Ausnahmen eine Tendenz zur Überrepräsentation abundanter Gattungen mit steigender Zyklenzahl. Durch die Verschiebung der relativen Abundanzen wurden Taxa mit niedrigeren Anteilen am Gesamtmikrobiom dementsprechend höchstwahrscheinlich entweder unterrepräsentiert oder nicht detektiert.

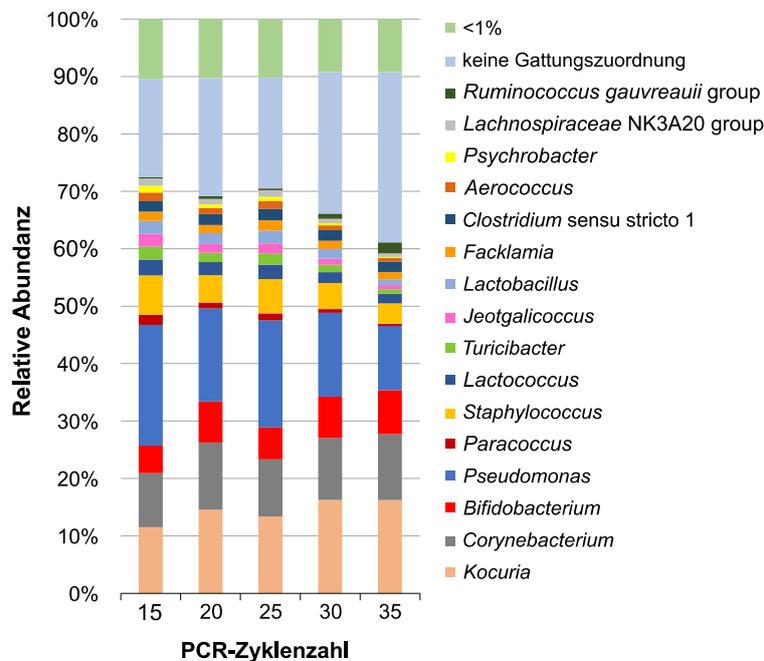


Abbildung 10 Verteilung der relative Abundanz (%) auf Gattungsebene nach der Anwendung von 15-35 Zyklen im 1. Schritt der *library*-PCR. Untersucht wurde RM 1: Hofprobe mit aerober, mesophiler Keimzahl von 3,7 log KbE/ml. Alle Gattungen mit einer relativen Abundanz $\geq 1\%$; dargestellte Abundanzen sind Mittelwerte aus Duplikaten, Triplikaten oder Quadruplikaten (abhängig von PCR-Zyklenzahl). Abbildung modifiziert nach Siebert et al. (2021).

Zusätzlich ermöglichten individuelle Barcodes paralleler PCRs dieser Rohmilchprobe die Analyse des mikrobiellen Profils in der beta-Diversität zwischen den einzelnen PCRs (Abbildung 11). Der NMDS Plot deckte somit eine reduzierte Reproduzierbarkeit des mikrobiellen Profils der Replikat-PCRs auf, die mit der Zunahme der Zyklenzahlen im 1. PCR Schritt verstärkt auftrat (Abbildung 10B). Schließlich wurde ersichtlich, dass eine niedrige Zyklenzahl im 1. Schritt der *library*-PCR unabdingbar ist, um die Verzerrung des mikrobiellen Profils und die Entstehung von Artefakten weitestgehend zu reduzieren und die Biodiversität so präzise wie möglich abzubilden (Siebert et al., 2021).

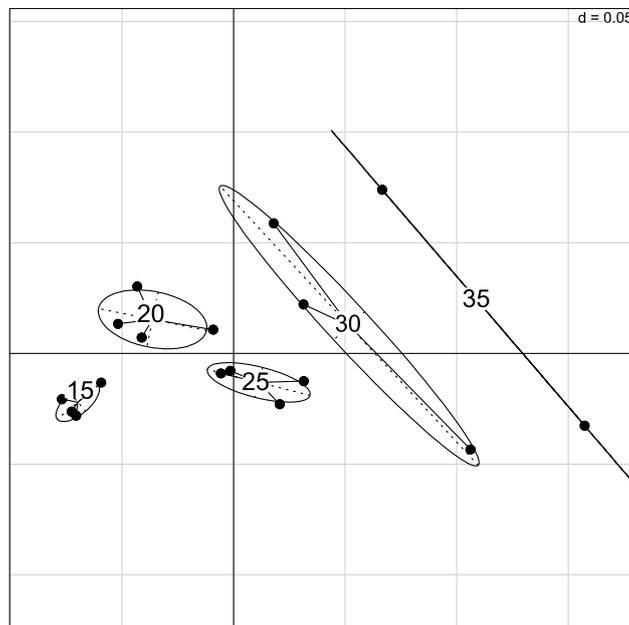


Abbildung 11 NMDS-Plot (generalized UniFrac distance) nach der Anwendung von 15-35 Zyklen im 1. Schritt der *library*-PCR. Untersucht wurde RM 1: Hofprobe mit aerober, mesophiler Keimzahl von $3,7 \log \text{KbE/ml}$. Parallele PCRs wurden in Duplikaten, Triplikaten oder Quadruplikaten (abhängig von PCR-Zyklenzahl) durchgeführt und mit individuellen Barcodes versehen. $p=0,001$ (PERMANOVA). Abbildung modifiziert nach Siebert et al. (2021).

2. Deutschlandweite Analyse von Rohmilchmikrobiota

Um die taxonomische Diversität in Rohmilch deutscher Erzeugerhöfe und den Einfluss potentieller hofseitiger Faktoren auf die Zusammensetzung der Mikrobiota zu analysieren, wurden in Kooperation mit dem MRI in Kiel für einen Zeitraum von einem Jahr deutschlandweit verteilte Milchviehbetriebe beprobt. Das in dieser Arbeit optimierte Protokoll zur Extraktion bakterieller DNA und der Erstellung der *library*-PCR wurde angewandt und per Amplikon-Sequenzierung eine umfassende Mikrobiomdatenbasis von insgesamt 930 Rohmilchproben erhoben.

2.1 Mikrobielle Diversität in Rohmilch

Aus den Sequenzierungen der 930 Rohmilchproben resultierten insgesamt ca. 40,2 Millionen 16S rRNA-Gensequenzen (Reads), die den Qualitätsanforderungen bei der Prozessierung der Daten vor der Normalisierung entsprachen. Dabei enthielt jede Probe mindestens 7.400 Sequenzen, welche die Basis für die Normalisierung der OTUs Tabelle zum Ausgleich der Sequenziertiefe in der Mikrobiomanalyse bildete.

Die Analyse der mikrobiellen Diversität der untersuchten Rohmilch unter Einsatz der V3-V4 Region des 16S rRNA-Gens demonstrierte eine ausgesprochen hohe Diversität, die sich taxonomisch aus 21 detektierten Phyla, 17 Familien und sogar 415 unterschiedlichen Gattungen zusammensetzte (Abbildung 12). Beachtlich dabei war, dass die Spezies der vorwiegend Gram-positiven Phyla *Firmicutes* (60%) und *Actinobacteria* (23%) schon bereits 83% der analysierten Sequenzen ausmachten. Während Vertreter des Phylums *Proteobacteria* und *Bacteroidetes* mit deutlich geringeren Prozentsätzen von 13% bzw. 3% detektiert wurden, so spielten die 17 weiteren Phyla mit einem Anteil von <1% nur eine untergeordnete Rolle. Die höchsten Anteile der auf Gattungsebene klassifizierten OTUs wurden den Taxa *Streptococcus* (14,7%), *Corynebacterium* (12,0%), *Romboutsia* (7,0%), *Lactococcus* (6,5%), *Staphylococcus* (6,1%) und *Pseudomonas* (5,2%) zugeordnet, wohingegen der relative Anteil der Sequenzen für 360 Gattungen lediglich <0,1% entsprach. Somit setzte sich ein Großteil der taxonomischen Diversität aus seltenen Gattungen zusammen, die insgesamt nur in Spuren gefunden wurden und schließlich einen geringeren Anteil zum Gesamtmikrobiom beitrugen.

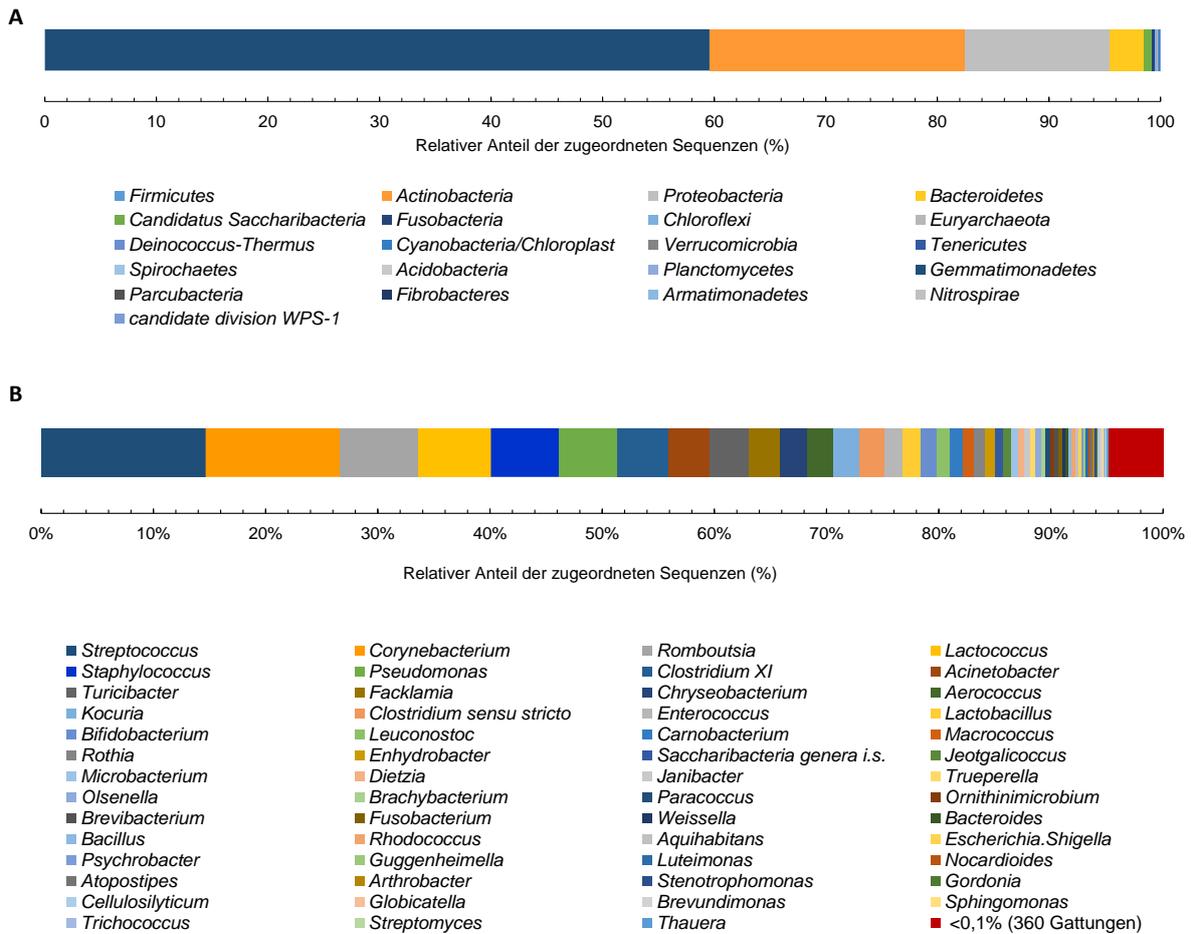


Abbildung 12 Relativer Anteil (%) der zugeordneten 16S rRNA-Gensequenzen auf (A) Phylum- und (B) Gattungsebene. Abgebildet sind alle Gattungen mit einer relativen Abundanz $\geq 0,1\%$.

Die extrem diverse und komplexe bakterielle Zusammensetzung spiegelte sich auch in der heterogenen Verteilung der relativen Abundanzen von einzelnen Taxa in den untersuchten Rohmilchproben wider. Dargestellt wurden die 16 Gattungen, welche in mind. 30% der Proben mit einem relativen Anteil von $\geq 0,5\%$ auftauchten und demnach zu den dominantesten Taxa zählten (Abbildung 13). Unter diesen verdeutlichten hohe Schwankungen der maximalen relativen Anteile mit Werten zwischen $>95\%$ (*Lactococcus*, *Streptococcus* und *Pseudomonas*) und 5% (*Dietzia*) die enorme Variabilität in dem mikrobiellen Profil zwischen den Rohmilchproben. Trotz der sehr breiten Diversität konnte zusätzlich ein Core-Mikrobiom mit insgesamt 15 Taxa identifiziert werden, die auf einem Grenzwert zur OTU-Selektion von $0,25\%$ beruhten. Demnach setzten sich die bakteriellen Gemeinschaften von Rohmilch in $95 - 99\%$ der 930 analysierten Proben aus Spezies der *Firmicutes*, *Actinobacteria* und *Proteobacteria* zusammen. Mit den vergleichsweise höchsten medianen Anteilen zwischen $9,1 - 3,2\%$ zählten Keime der originären Eutermikrobiota wie *Corynebacterium* spp., *Staphylococcus* spp. und

Streptococcus spp. neben Spezies der Gattungen *Romboutsia* und *Clostridium* als Indikatoren von Euterkontaminationen zu den prävalentesten Gattungen (Abbildung 13). Tatsächlich wurden die drei Gattungen *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Corynebacterium* mit wenigen Ausnahmen sogar in jeder einzelnen Probe nachgewiesen.

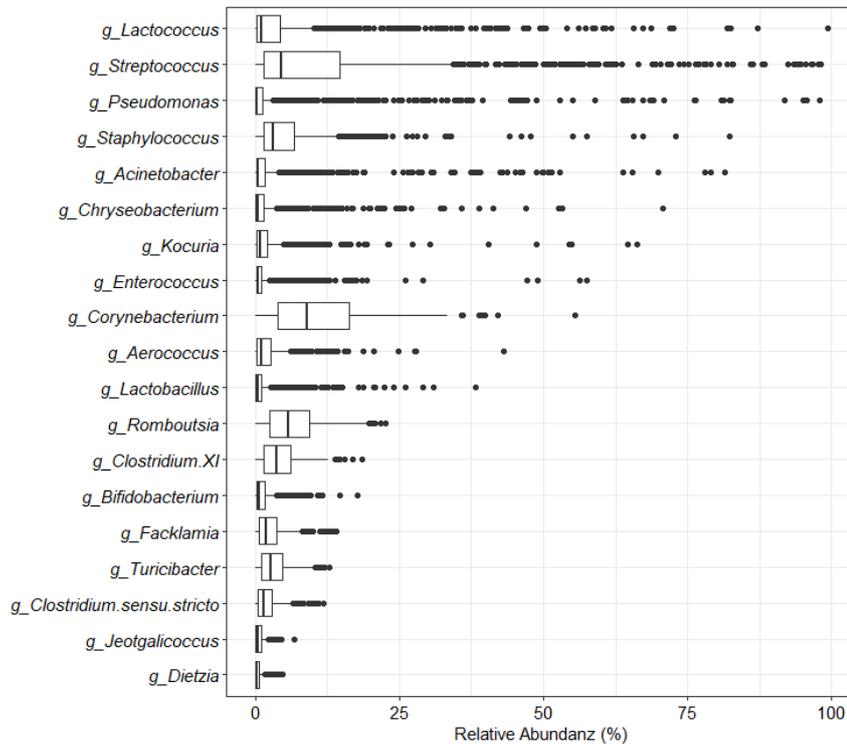


Abbildung 13 Verteilung der relativen Abundanz (%) der vorherrschenden Gattungen (g) detektiert in Rohmilch von deutschlandweit verteilten Erzeugerhöfen. Die Daten repräsentieren alle Gattungen, die in mindestens 30% der Proben mit einer relativen Abundanz $\geq 0,5\%$ vorkamen, n=930.

Vertreten mit gleich 6 Gattungen im Core-Mikrobiom traten die *Lactobacillales* als prominenteste Keimgruppe auf. Zusätzlich zeigten sich aber auch drei Taxa innerhalb der Ordnung *Clostridiales* als Vertreter mit höchster Prävalenz (Tabelle 11). *Pseudomonas*, *Acinetobacter* und *Chryseobacterium* repräsentierten die Gram-negativen Spezies mit der höchsten Abundanz. Obwohl Gram-negative Taxa im Vergleich zu den Gram-positiven Arten insgesamt stark unterrepräsentiert waren und alle drei Gattungen im Median eine sehr geringe prozentuale Häufigkeit (0,2 – 0,5) zeigten, wurde dennoch auch hier eine erstaunlich hohe Variabilität zwischen den untersuchten Rohmilchproben ersichtlich (Abbildung 13). Während für *Pseudomonas* in einigen Proben eine hohe Kontamination mit bedeutenden relativen Anteilen bis >90% festgestellt wurde, so war *Acinetobacter* interessanterweise als einziger Gram-negativer Keim im Core-Mikrobiom vertreten (Abbildung 13, Tabelle 11).

Ergebnisse

Tabelle 11 Zusammensetzung des Core-Rohmilchmikrobioms. Alle Taxa detektiert in 95 - 99% der Rohmilchproben mit der entsprechenden relativen Abundanz (n=930).

Phylum	Klasse	Ordnung	Familie	Gattung	Detektiert in % Proben	Rel. Abundanz (%) (Median)	
<i>Firmicutes</i>	<i>Bacilli</i>	<i>Bacillales</i>	<i>Staphylococcaceae</i>	<i>Staphylococcus</i>	99	3,2	
			<i>Lactobacillales</i>	<i>Streptococcaceae</i>	<i>Streptococcus</i>	99	4,6
					<i>Lactococcus</i>	97	1,1
				<i>Aerococcaceae</i>	<i>Aerococcus</i>	97	1,1
					<i>Facklamia</i>	97	1,9
				<i>Enterococcaceae</i>	<i>Enterococcus</i>	96	0,4
				<i>Lactobacillaceae</i>	<i>Lactobacillus</i>	95	0,4
		<i>Clostridia</i>	<i>Clostridiales</i>	<i>Clostridiaceae</i>	<i>Romboutsia</i>	98	5,8
					<i>Clostridium XI</i>	98	3,7
					<i>Clostridium sensu stricto</i>	98	1,4
	<i>Erysipelotrichia</i>	<i>Erysipelotrichales</i>	<i>Turicibacteraceae</i>	<i>Turicibacter</i>	98	2,7	
<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinomycetales</i>	<i>Corynebacteriaceae</i>	<i>Corynebacterium</i>	99	8,9	
			<i>Micrococcaceae</i>	<i>Kocuria</i>	97	0,8	
		<i>Bifidobacteriales</i>	<i>Bifidobacteriaceae</i>	<i>Bifidobacterium</i>	97	0,6	
<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Pseudomonadales</i>	<i>Moraxellaceae</i>	<i>Acinetobacter</i>	96	0,5	

2.2 Einfluss hofseitiger Faktoren auf Verderbskeime und Hygieneindikatoren

Auf Basis der erhobenen Mikrobiomdaten wurde nachfolgend die Abhängigkeit einzelner hofseitiger Faktoren und deren Effekt auf die Biodiversität sowie die detektierte relative Abundanz von Verderbskeimen und Hygieneindikatoren untersucht. Ein Fragebogen diente der Erfassung von Produktions- und Haltungsbedingungen der entsprechenden Erzeugerhöfe. Im Fokus standen dabei Taxa, die zur originären Mikrobiota der Euterhaut zählen, Kontaminationskeime der Melkhygiene darstellen und mit der Haltungsumgebung oder der Anlagenhygiene bzw. der Lagerung assoziiert sind.

2.2.1 Einfluss der Produktionsart und Tierhaltung

Um zu Beginn potentielle Unterschiede im mikrobiellen Profil in Abhängigkeit der geographischen Lage festzustellen, wurde der Datensatz zunächst in Bezug auf die Herkunft der Rohmilch analysiert. Mit einer immensen Anzahl von insgesamt 390 süddeutschen und 540 norddeutschen Rohmilchproben wurde der Datensatz entzerrt und die untersuchten Rohmilchproben im Norden und Süden in Unterregionen eingeteilt. Weiterhin konnte die Dimensionalität des Datensatzes mithilfe einer Hauptkomponentenanalyse (PCA) reduziert werden, bei der die maximal möglichen Informationen in den ersten beiden Variablen komprimiert sind. Diese Analyse ergab, dass die beiden Gattungen *Streptococcus* (32,4%, Dim 1) und *Pseudomonas* (17,0%, Dim 2) die größte Varianz des Datensatzes auf sich vereinten und somit die ersten beiden Hauptkomponenten bildeten. Die PCA zeigte einerseits erhebliche Überschneidungen zwischen allen Milchproben aber andererseits keine klare Gruppierung in Nord und Süd (Abbildung 14A). Während in den Regionen Nord, NW und Süd-2 zwischen 7,6 - 10% durchschnittlich im Vergleich hohe relative *Pseudomonas* Anteile nachgewiesen wurden, so spielte diese Gattung im Verhältnis insgesamt in NO, SO, Süd-1 und SW (0,6 – 1,4% relative Abundanz) eine eher unbedeutende Rolle (Abbildung 14B, Anhang Tabelle A4). Mit der daraus resultierenden Überlappung der eingeteilten Regionen in der PCA konnte anhand der sequenzierten Proben dieser Arbeit die geographische Lage der Erzeugerhöfe als determinierender Faktoren der Rohmilchmikrobiota ausgeschlossen werden. Um aufgrund der Vielzahl an unterschiedlichen Höfen vergleichbarere Bedingungen zu analysieren, erfolgte im Weiteren eine kleinschrittigere Analyse von hofspezifischen Faktoren, bei der die Mikrobiota unabhängig von der geographischen Lage aufgeschlüsselt wurde.

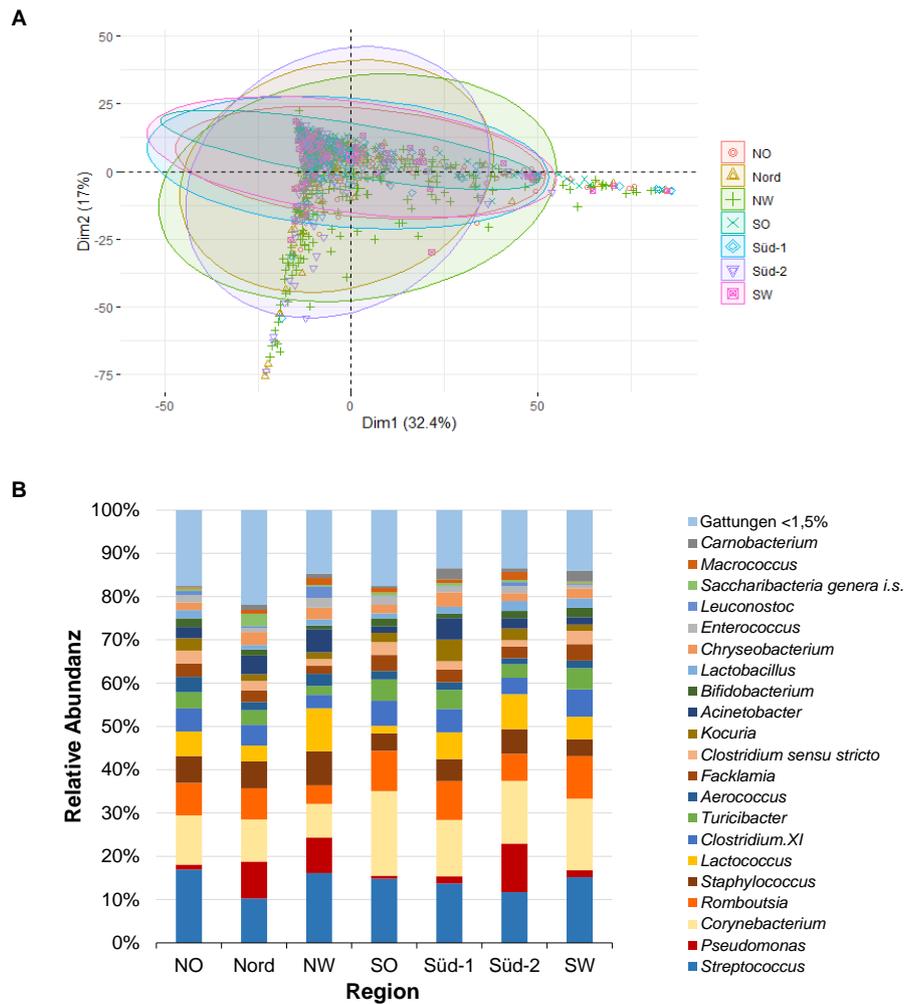


Abbildung 14 Hauptkomponentenanalyse (A) und relative Abundanzen (%) auf Gattungsebene (B) von nord- und süddeutschen Rohmilchproben gruppiert nach Regionen. A: Hauptkomponente 1 (Dim1): 32,4% *Streptococcus* und Hauptkomponente 2 (Dim2): 17,0% *Pseudomonas*. B: alle Gattungen mit einer relativen Abundanz $\geq 1,5\%$. NO: Nord-Ost (n=141); Nord (n=110); NW: Nord-West (n=289); SO: Süd-Ost (n=123); Süd-1 (n=104); Süd-2 (n=78); SW: Süd-West (n=85).

Für die Untersuchung des Einflusses der Art der Milcherzeugung wurden ökologisch und konventionell produzierende Höfe beprobt. Da ökologische Milch in Deutschland mit ca. 4% nur einen Bruchteil der Anlieferungsmilch ausmacht, war die Verfügbarkeit an ökologischen Proben demnach weitaus geringer. Um dennoch belastbare Unterschiede zu ermitteln, wurde beispielhaft ein Unterdatensatz mit allen ökologischen und konventionellen Proben analysiert, bei denen in den Metadaten eine der drei Tierhaltungsformen Laufstall, Laufstall+Weide oder reine Anbindehaltung angegeben wurde. Die Auswahl resultierte schließlich in einer etwas ausgewogeneren Stichprobengröße bestehend aus 431 konventionellen und 197 ökologischen Rohmilchproben. Die absolute Zellzahl der ökologischen Proben war im Median mit 5,0 log IBC/ml gegenüber konventioneller Milch (Median 5,3 log IBC/ml) zwar nur minimal geringer aber dennoch insgesamt signifikant reduziert (Abbildung 15A). Somit zeigte die konventionelle Milch mit einer sehr viel breiten Streuung die höchsten Keimzahlen. Daneben zeigte sich im

Mikrobiom eine signifikante Erhöhung der alpha-Diversitätsindizes Richness (Observed OTUs) und Shannon mit einer moderaten und somit relevanten Effektgröße (Abbildung 15B). Unabhängig von dem Landwirtschaftssystem verdeutlichte der Richness Index, als Maß der Biodiversität innerhalb einer Probe, mit Werten zwischen 36 und >827 die sehr hohe Variabilität in der OTU-Zusammensetzung und die damit verbundenen Schwankungen in der mikrobiologischen Rohmilchqualität.

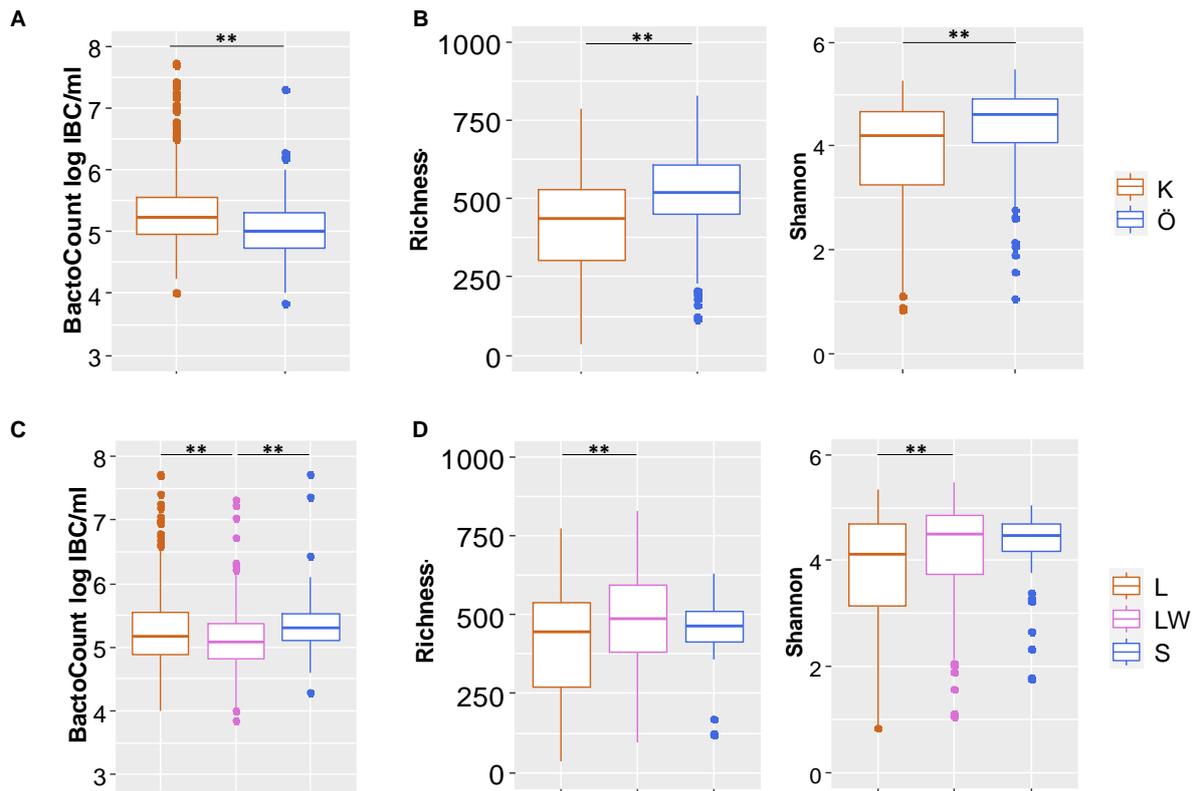


Abbildung 15 Verteilung der absoluten Zellzahlen (A+C) und alpha-Diversität mit Richness (Observed OTUs) und Shannon Index (B+D) in Rohmilch gruppiert nach Produktionsart und Tierhaltung. A+B: Produktionsart mit K (konventionell, n=431) und Ö (ökologisch, n=197); C+D: Tierhaltung mit L (Laufstall, n=287), LW (Laufstall + Weidehaltung, n=280) und S (Anbindestall, n=61); Zellzahlen wurden per Durchflusszytometrie (BactoCount) bestimmt (IBC: *Individual Bacterial Count*); OTU: *operational taxonomic unit*. ** $p < 0,01$.

Nachdem Unterschiede in der Biodiversität aufgedeckt wurden, war die Verteilung der relativen Abundanzen repräsentativer Hygieneindikatoren von besonderem Interesse. Diese dienen dazu, um von potentiellen Veränderungen in der taxonomischen Zusammensetzung der Mikrobiota Rückschlüsse auf mögliche Einflüsse der Produktionsart ziehen zu können. Die höhere alpha-Diversität äußerte sich folglich auch in durchschnittlichen höheren Anteilen der Taxa mit einer relativen Abundanz <0,5% in ökologischer Rohmilch (Anhang Tabelle A5). Unter den abundantesten Vertretern in Rohmilch von deutschen Höfen zeigten

Corynebacterium, *Clostridium XI* und *Turicibacter* einen signifikant höheren Median bei den ökologischen Proben, wohingegen die Gram-negative Gattung *Pseudomonas* in konventioneller Milch dominanter auftrat (Abbildung 16). Mit einer Fraktion von 7,5% und 4,5% für *Pseudomonas* bzw. *Acinetobacter* wurden im Schnitt somit auch insgesamt höhere kumulative Abundanzen typischer Gram-negativer Taxa in konventioneller im Vergleich zu ökologischer Milch (1,7% und 3,0%) ermittelt (Anhang Tabelle A5). Unabhängig von der Art der Milcherzeugung wurden äußerst geringe relative Anteile der *Enterobacteriaceae* detektiert, mit den höchsten Ausreißern in konventioneller Milch. Andere Gram-negative Taxa wie *Rhizobium* oder *Stenotrophomonas* aus umweltassoziierten Habitaten äußerten sich mit höheren Anteilen in ökologischer Milch (Abbildung 16).

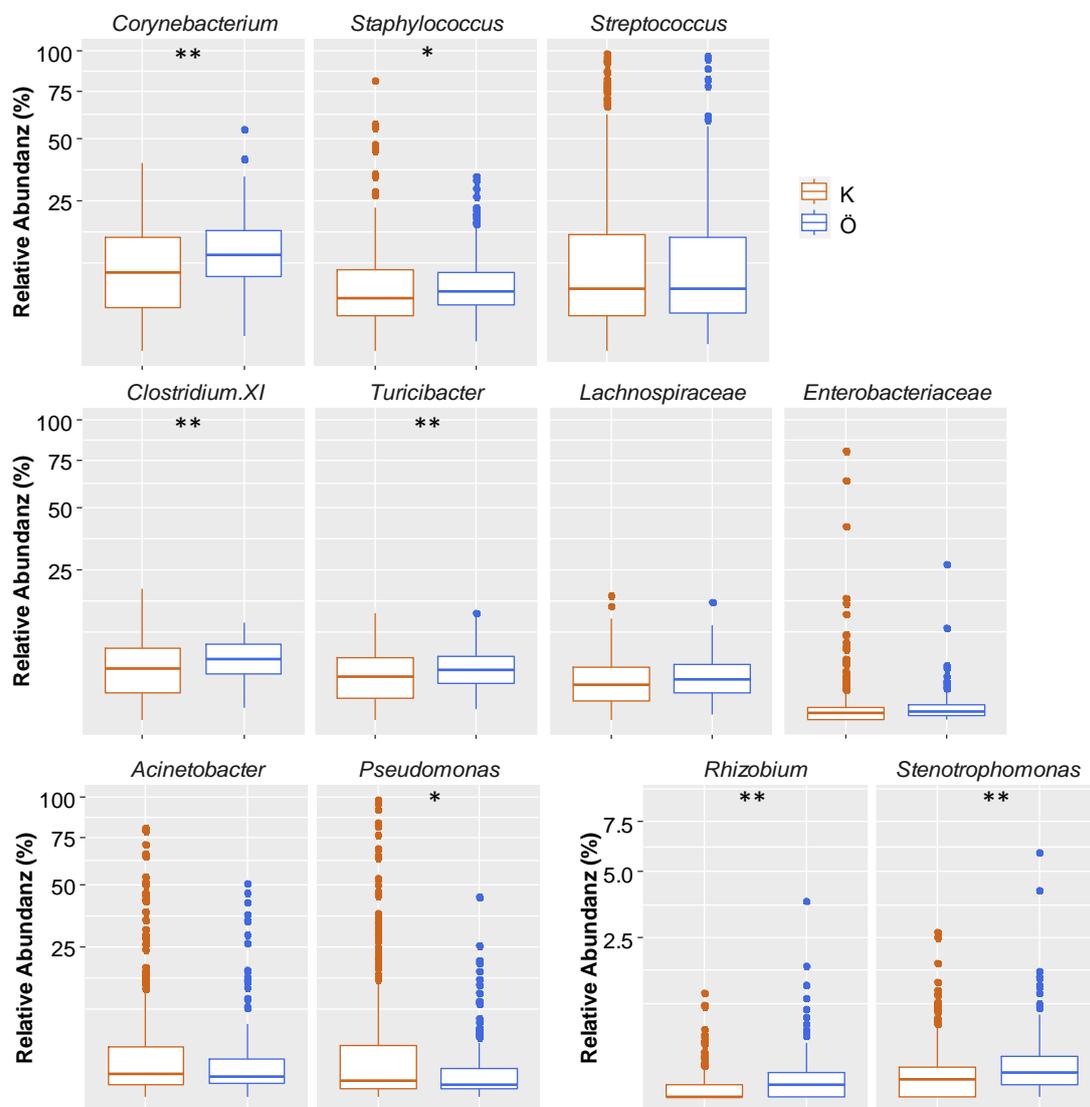


Abbildung 16 Verteilung relativer Abundanzen (%) in Rohmilch gruppiert nach Produktionsart. K: konventionelle Milcherzeugung (n=431) und Ö: ökologische Milcherzeugung (n=197). Dargestellte Taxa (Gattung und Familie) dienen als Indikatorkeime für Melk- und Analgenhygiene sowie Haltungsbedingungen. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Anhand der Metadaten wurden teilweise große Unterschiede bei den hofspezifischen Bedingungen innerhalb konventioneller aber auch ökologischer Produktion ersichtlich, die keine eindeutige Separation zuließen und möglicherweise Effekte überdeckten. Aus diesem Grund erfolgte eine Aufspaltung in einzelne hofseitige Parameter, bei denen in Hinblick auf die Erzeugung die Tierhaltung einen wesentlichen Faktor darstellt und hauptsächlich bei konventioneller Haltung gespalten ausfiel.

Insgesamt konnten 628 Rohmilchproben den drei in Deutschland gängigen Haltungsformen Laufstall (L, 287 Proben), Laufstall mit Weidehaltung (LW, 280 Proben) und Stall- / Anbindehaltung (S, 61 Proben) zugeordnet werden. Somit werden Milchkühe in Deutschland vorwiegend in Boxenlaufställen gehalten, mit dem Vorteil, dass die Funktionsbereiche Fressen, Liegen und vor allem Melken klar voneinander getrennt sind.

Während in dem ausgewählten Datensatz der Anteil der Laufstallproben aus konventioneller Produktion bei 97% lag, so stammten 2/3 der Proben aus Weidehaltung von ökologischen Betrieben. Die reine Anbindehaltung hingegen wurde ausschließlich bei konventionellen, vorwiegend kleinen, süddeutschen Betrieben mit einer Liefermenge <500.000 Liter/Jahr festgestellt (Tabelle 1). Aus der Weidehaltung resultierten die signifikant geringsten Keimzahlen mit einem medianen Wert von 5,1 log IBC/ml, wohingegen die Laufstallproben die höchsten Keimzahlen mit Ausreißern zwischen 6,5 bis >7,5 log IBC/ml demonstrierten (Abbildung 15C). Neben der absoluten Keimzahl bewirkte die Weidehaltung, analog zu den Ergebnissen aus ökologischer Haltung, eine signifikant erhöhte Diversität der Rohmilch, die zudem mit einer insgesamt ausgewogeneren Verteilung der Taxa (Shannon Index) einherging (Abbildung 15D). Zusätzlich zur Biodiversitätsanalyse innerhalb der einzelnen Proben, ermöglichte die beta-Diversität den Vergleich der phylogenetischen Distanz der OTUs und somit der mikrobiellen Gemeinschaften zwischen den Gruppierungen. Dabei zeigte der NMDS Plot eindeutige Überschneidungen aller Milchproben, die sich jedoch entsprechend den drei Tierhaltungskategorien L, LW und S bündelten (Abbildung 17A). Aus dem paarweisen Vergleich (Permanova, Rhea) resultierten signifikante Unterschiede in der Mikrobiota, welche die aufgedeckten Differenzen in der Zellzahl und der Biodiversität bekräftigten.

Um aufzuschlüsseln, welche Taxa die Unterschiede in der Zusammensetzung der Mikrobiota begünstigten, wurden die Unterschiede der sequenzierten Abundanzen auf Gattungsebene betrachtet. Unter den prävalentesten Gram-positiven Taxa mit relativen Anteilen von bis zu fast 100% (Ausreißer) befanden sich MSB wie *Streptococcus* (und z.B. *Lactococcus*) aber auch Staphylokokken, die lediglich bei Anbindehaltung signifikant reduziert auftraten (Abbildung 17B, Anhang Tabelle A6). Äquivalent dazu zeigte auch die Gattung *Pseudomonas* als prominentestes Gram-negatives Taxon in der Gesamtheit eine eher inhomogene Verteilung mit einer sehr breiten Streuung, die bei den Laufstallproben gegenüber jenen aus Weidehaltung signifikant erhöht war und im Schnitt den höchsten Anteil ausmachte. Ein dazu gespiegeltes Bild demonstrierte interessanterweise *Corynebacterium* als weiteren Vertreter der Eutermikrobiota mit einem verhältnismäßig hohen Median von 16,1% bei Proben aus Anbindehaltung, allerdings mit einer auffällig geringen Streubreite. Vergleichbar war dies für weitere mesophile Keime, wie z.B. *Clostridium* XI, *Turicibacter* und Vertreter der *Lachnospiraceae* als charakteristische Indikatorkeime von Euter- und Fäkalkontaminationen. Mit einer maximalen Fraktion von 18% (*Clostridium* XI), schwankten sie in ihrer Verteilung über die Rohmilchproben insgesamt weniger stark und zeigten nach Anbindehaltung die signifikant höchste mediane Abundanz. Äquivalent zur ökologischen Milcherzeugung machten Gattungen aus bodenassoziierten Habitaten wie z.B. *Rhizobium* und *Stenotrophomonas* bei den Weidehaltungsproben gegenüber den anderen Tierhaltungsbedingungen (L und S) im Median die höheren Fraktionen am Milchmikrobiom aus. Schließlich konnte gezeigt werden, dass sowohl in der Keimzahl, als auch in der taxonomischen Diversität Parallelen zwischen ökologischer Milcherzeugung und Weidehaltung gefunden wurde.

2.2.2 Einfluss des Melkprozesses

Aus hygienischer Sicht ist das Melken ein maßgeblicher Faktor für den Keimantrag und somit bedeutend für die mikrobiologische Diversität von Rohmilch. Aus dem Datensatz konnten insgesamt 817 Rohmilchproben jeweils einem der drei geläufigen Melksysteme in Deutschland zugeordnet werden: automatisches Melksystem / Melkroboter (AMS, 153 Proben), Melkstand (MS, 532 Proben) und Rohrmelkanlage (R, 120 Proben). Betrachtet man die Zellzahlen im Zusammenhang mit den Melksystemen, wurden zwar für alle drei Melkvarianten gleichermaßen Ausreißer von $>6,5$ log Zellen/ml dokumentiert, jedoch ergab sich bei dem klassischen Melkstand die signifikant niedrigste bakterielle Zellzahl. Rohmilchproben aus dem Melkroboter und der Anbindehaltung zeigten übereinstimmende höhere mediane Werte (Abbildung 18A).

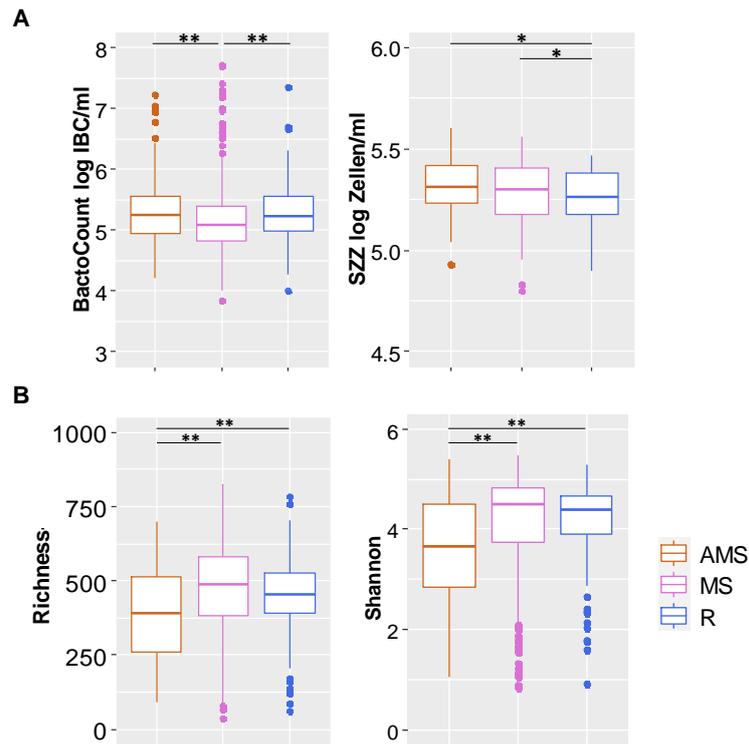


Abbildung 18 Verteilung der absoluten bakteriellen und somatischen Zellzahlen (A) sowie der alpha-Diversität mit Richness (Observed OTUs) und Shannon Index (B) in Rohmilch gruppiert nach Melksystem. AMS: automatisches Melksystem (n=153); MS: Melkstand (n=532); R: Rohmelkanlage (n=120). Zellzahlen wurden per Durchflusszytometrie (BactoCount) bestimmt (IBC: *Individual Bacterial Count*). SZZ: somatische Zellzahlen ergaben sich aus durchflusszytometrisch bestimmten Jahresdurchschnittswerten der Erzeugerhöfe und wurden den Metadaten entnommen. OTU: *operational taxonomic unit*. * $p < 0,05$ und ** $p < 0,01$.

Neben der bakteriellen Zellzahl gilt die somatische Zellzahl (SZZ) als einer der wichtigsten Qualitätsparameter zur Beurteilung der Eutergesundheit auf Herdenebene. Die SZZ wurde in der vorliegenden Arbeit nicht detektiert, wodurch lediglich Jahresdurchschnittswerte der der Rohmilchprobe zugehörigen Erzeugerhöfe zur Verfügung standen (durchflusszytometrisch bestimmt). Die Auswertungen der Metadaten zeigten, dass die AMS Proben tatsächlich die höchsten medianen SZZ aufwiesen (Abbildung 18A). Allerdings lagen nur 3 Betriebe mit >400.000 Zellen/ml ($>5,6$ log Zellen/ml) über dem zulässigen Grenzwert der EU. Schließlich wurde dieser Parameter vernachlässigt und zeigte lediglich den Trend einer signifikant reduzierten SZZ bei Anbindehaltung auf, die vorwiegend mit kleinen Betrieben assoziiert wurde. Äquivalent zu den vorherigen Untersuchungen bestätigten die durchflusszytometrischen Messungen der bakteriellen Zellzahl, dass eine erhöhte Keimzahl mit einer mäßigen Biodiversität einherging (Abbildung 18B). So war die per Melkroboter gewonnene Rohmilch mit einem medianen Richness-Wert (Observed OTUs) von 390 in der Gesamtheit signifikant weniger divers (MS mit 486 und R mit 456), was sich gleichzeitig in einer ebenso signifikant unausgewogeneren Verteilung der beteiligten Taxa äußerte.

Auf Familienebene bewirkten die *Streptococcaceae* die höchste Varianz (Dim 1, 40,6%) im untersuchten Datensatz und bildeten in der PCA die erste Hauptkomponente mit der größten Abweichung durch den Melkroboter (Abbildung 19A).

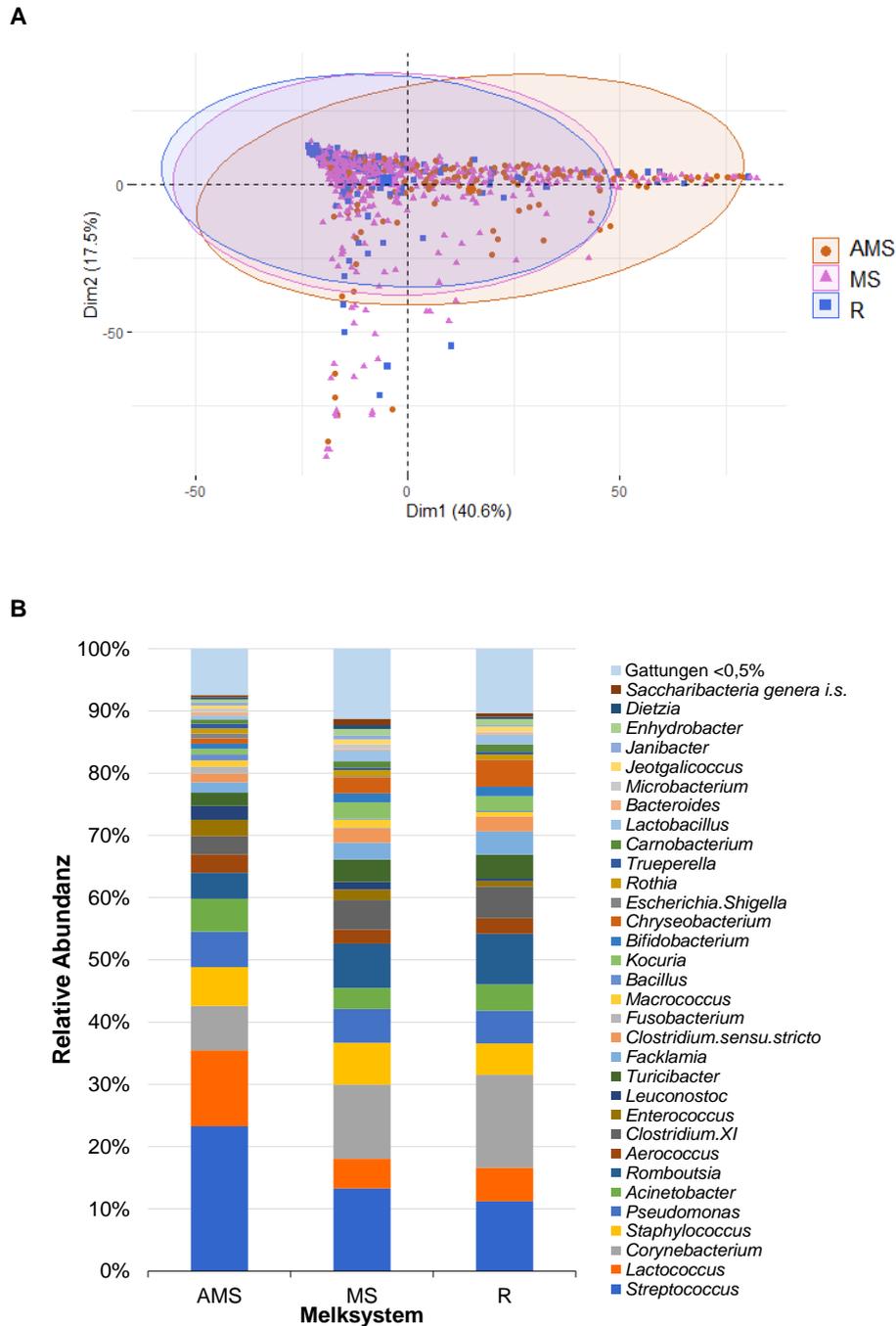


Abbildung 19 Hauptkomponentenanalyse auf Familienebene (A) und relative Abundanzen (%) (B) auf Gattungsebene von Rohmilch gruppiert nach Melksystem. A: Hauptkomponente 1 (Dim 1): 40,6% *Streptococcaceae* und Hauptkomponente 2 (Dim 2): 17,5% *Pseudomonadaeaceae*. B: Dargestellt sind alle Gattungen mit einer relativen Abundanz $\geq 0,5\%$. AMS: automatisches Melksystem (n=153); MS: Melkstand (n=532); R: Rohmelkanlage (n=120).

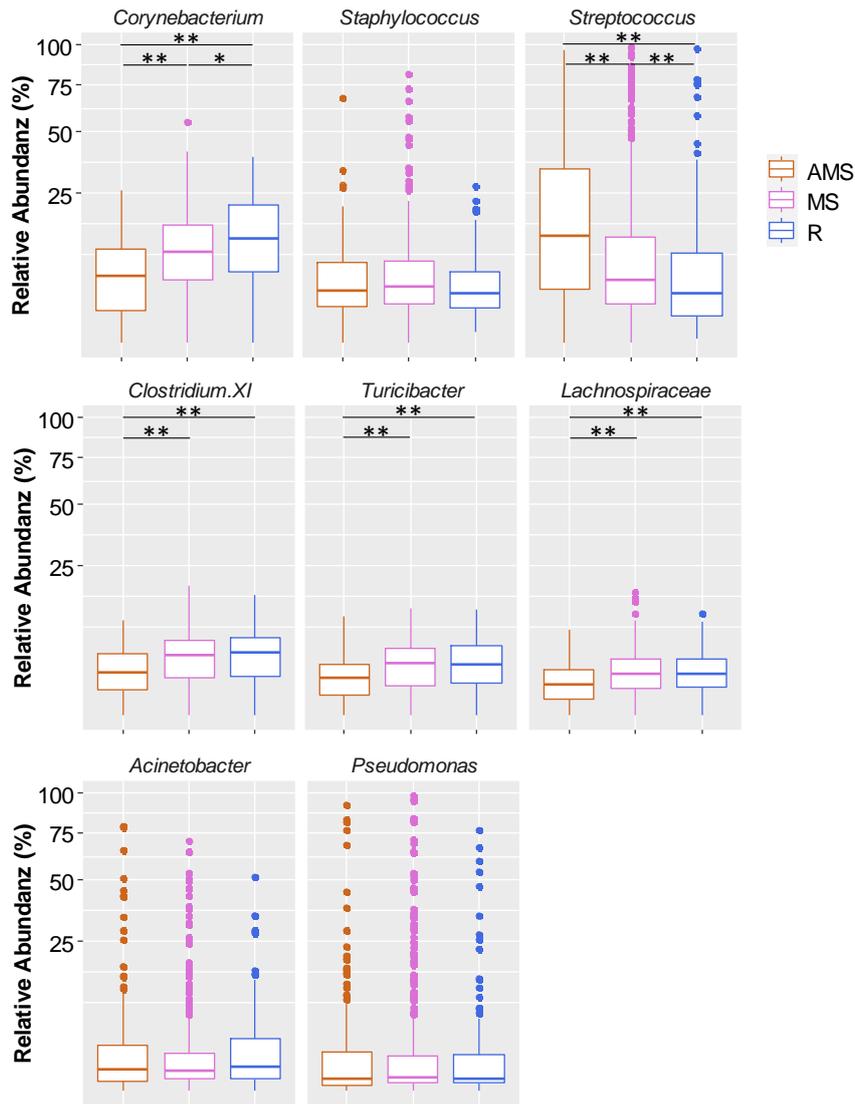


Abbildung 20 Verteilung relativer Abundanzen (%) in Rohmilch gruppiert nach Melksystem. AMS: automatisches Melksystem (n=153); MS: Melkstand (n=532); R: Rohmelkanlage (n=120). Dargestellte Taxa dienen als Indikatorkeime für Melk- und Analgenhygiene. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Durch die Aufschlüsselung der relativen Abundanzen auf Gattungsebene zeigte sich, dass der signifikante Eintrag von MSB durch die Taxa *Streptococcus* und *Lactococcus* dominiert wurde (Abbildung 19B, Abbildung 20, Anhang Tabelle A7). Diese umfassten mit fast einem Drittel die weitaus größte Fraktion des Gesamtmikrobioms der AMS Rohmilchproben. Simultan dazu war die Abundanz typischer Indikatorkeime von Euterkontaminationen wie z.B. die Gattungen *Clostridium XI*, *Turicibacter* und Vertreter der Familie der *Lachnospiraceae* mit dem Melkroboter konstant signifikant verringert (Abbildung 20). Neben dem Melkvorgang und der entsprechenden Euterreinigung per se ist die Analgenhygiene ein nennenswerter Faktor für die primäre, mikrobiologische Qualität der Hofmilch. Psychrotolerante, Gram-negative Kontaminationskeime sind in diesem Zusammenhang von enormer Bedeutung. Allerdings

zeigten anhand der sequenzierten Anteile die vorherrschenden Gram-negativen Spezies der Taxa *Acinetobacter* und *Pseudomonas* keine eindeutigen Diskrepanzen in Hinblick auf das Melksystem (Abbildung 20, Anhang Tabelle A7).

Die Arten der Gattung *Streptococcus* sind einerseits mit der Euterentzündung Mastitis assoziiert, stellen jedoch andererseits Kommensale einer gesunden Eutermikrobiota dar. Im Mikrobiom der 930 untersuchten Rohmilchproben wurden insgesamt 44 OTUs (relative Abundanz von mind. 0,25%) der Gattung *Streptococcus* zugeordnet, die mit den verfügbaren 16S rDNA-Sequenzen der öffentlichen Datenbank EzBioCloud abgeglichen wurden. Obwohl mit einer Fragmentlänge von 445 Bp pro OTU nur ca. 30% der 16S rDNA-Sequenz verglichen wurde, ließen sich daraus dennoch Sequenzidentitäten zu Typstammsequenzen oberhalb der Artgrenze ermitteln. Als dominanteste Spezies mit den höchsten relativen Abundanzen konnten die vier Arten *S. thermophilus* / *salivarius* / *vestibularis*, *S. porcinus* / *uberis*, *S. dysgalactiae* und *S. parauberis* detektiert werden (Abbildung 21). Beachtlich dabei war, dass *S. porcinus* / *uberis* und *S. dysgalactiae* bei den AMS- und MS-Proben gegenüber der Rohmelkanlage und gleichzeitig in Betrieben mit einer größeren Milchliefermenge signifikant abundanter auftraten. Dies deckte sich mit der signifikant höheren Abundanz der Gattung *Streptococcus* bei großen Erzeugerhöfen, die im Jahr >500.000 Liter Rohmilch an die Molkereien liefern (Anhang Abbildung A2). Während *S. porcinus* / *uberis* bei den AMS- und MS-Rohmilchproben mit einer relativen medianen Abundanz von 1,3 und 1,7% in einer annähernd vergleichbaren Verteilung vorkam, so zeigte sich *S. thermophilus* / *salivarius* / *vestibularis* mit einer relativen Abundanz >1% in 50% der AMS-Proben und nur in 16% der MS-Proben.

Ergebnisse

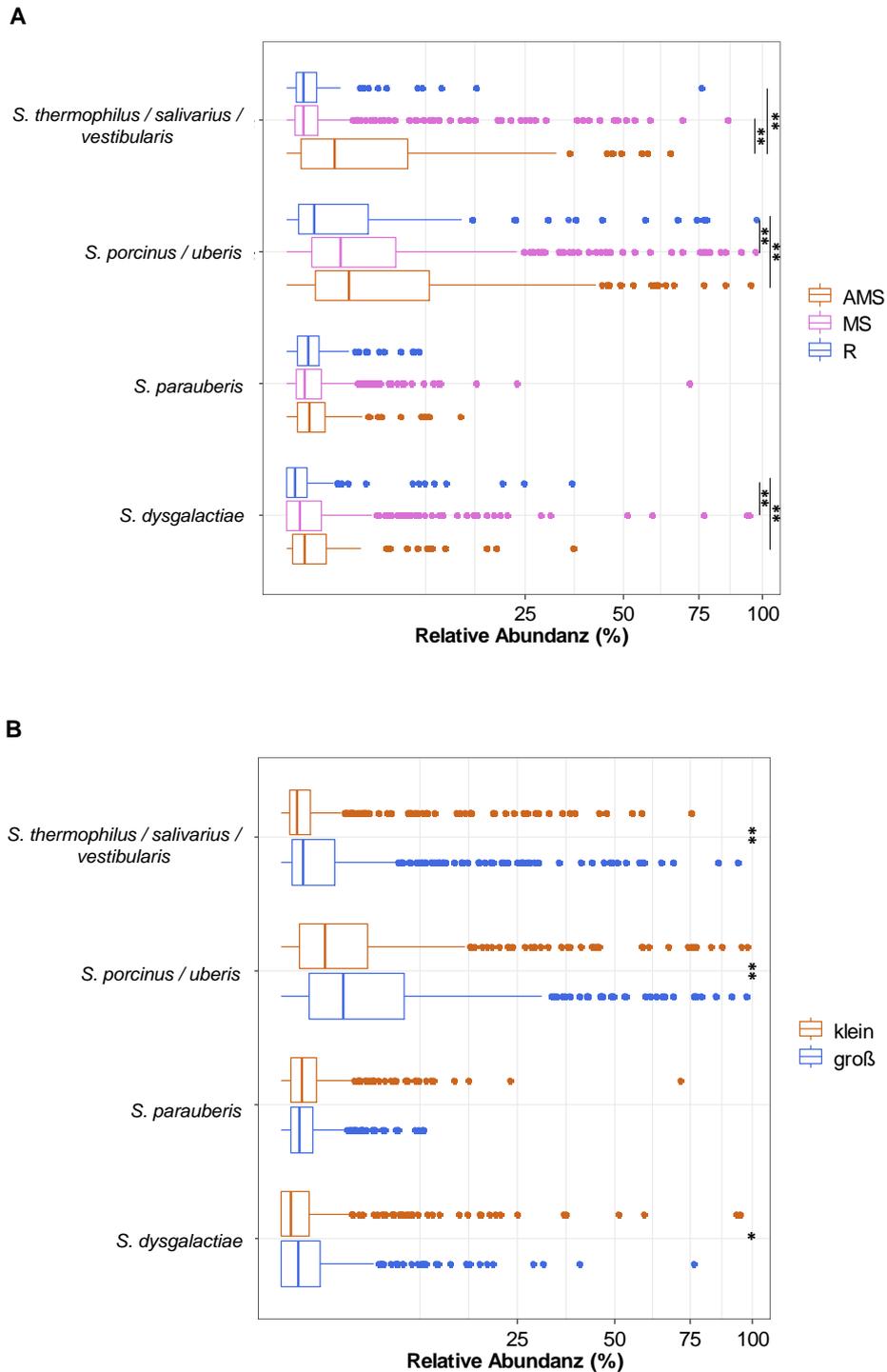


Abbildung 21 Verteilung der abundantesten OTUs der Gattung *Streptococcus* detektiert in Rohmilch. A: Gruppiert nach Melksystem mit AMS: automatisches Melksystem (n=153); MS: Melkstand (n=532); R: Rohmelkanlage (n=120). B: Gruppiert nach Milchlieferungsmenge pro Jahr mit kleinen (<500.000 Liter pro Jahr, n=447) und großen Erzeugerhöfen (>500.000 Liter, n=415). Die Datenbank EzBioCloud diente zum Abgleich der 16S rRNA-Sequenz (OTU) auf Basis von ca. 445 Bp. S.: *Streptococcus*; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

2.2.3 Einfluss der Kühlung und Lagerung

Um eine adäquate mikrobiologische Milchqualität an die Molkereien abzuliefern, ist die Kühlung von Rohmilch im Anschluss an den Melkprozess eine weitere wichtige Schlüsselstelle, um bereits auf dem Erzeugerhof die Kontaminationen gering zu halten. Anhand des Fragebogens wurden hierbei die Tankkühlung (T) mit 571 Proben und die Durchlaufkühlung/Vorlaufkühlung (D) mit 221 Proben als häufigste Kühlsysteme erfasst. Damit assoziiert ist auch die Lagerzeit der Rohmilch vom Melkprozess bis zur Abholung durch die Molkerei. Am weitesten verbreitet war dabei die 2-tägige Abholung (692 Proben), gefolgt von dem 1-tägigen Abholungsintervall (111 Proben). Obwohl signifikante Unterschiede ermittelt wurden, so waren die Mediane der absoluten bakteriellen Zellzahlen bei den zwei Kühlungsvarianten mit Werten von 5,2 (D) und 5,1 (T) log IBC/ml vergleichbar (Abbildung 22). Nicht überraschend war die etwas breitere Streuung mit den höchsten Ausreißern bei der Milchabholung in einem Zwei-Tages-Rhythmus.

Die im Schnitt etwas höhere bakterielle Belastung unter Einsatz einer Durchlauf-/ Vorlaufkühlung ging in der Summe mit einer höheren Abundanz der Gattungen *Streptococcus*, *Staphylococcus* aber auch mit höheren relativen Anteilen von Gram-negativen Spezies der Gattungen *Acinetobacter* und *Pseudomonas* einher (Abbildung 23A). Bei den Gram-positiven Vertretern ist jedoch zu beachten, dass mehr als drei Viertel der Proben mit Durchlaufkühlung von großen Höfen kamen und eine Assoziation zwischen Hofgröße und der Abundanz von *Staphylococcus* und *Streptococcus* detektiert wurde (Anhang Abbildung A2). Obwohl in den Medianen der Sequenziererergebnisse nur minimale Verschiebungen festgestellt wurden, konnte dennoch eine signifikante Veränderung von ein- zu zweitägiger Milchabholung mit einer insgesamt größeren Streubreite für kältetolerante Gram-negative Gattungen wie z.B. *Acinetobacter*, *Chryseobacterium* und *Pseudomonas* festgestellt werden (Abbildung 23B). Signifikant erhöht war der Median der relativen Abundanz von *Streptococcus* bei der eintägigen (6,4%) gegenüber der zweitägigen (4,3%) Abholung. Auch hier muss jedoch berücksichtigt werden, dass 75% der untersuchten Rohmilchproben von sehr großen Betrieben mit einer jährlichen Milchliefermenge >1.000.000 Liter stammten.

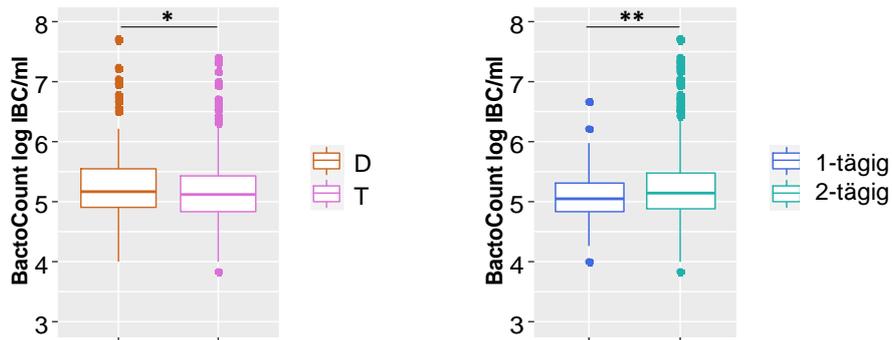


Abbildung 22 Verteilung der absoluten bakteriellen Zellzahlen in Rohmilch gruppiert nach Kühlungsmethode und Intervall der Milchabholung. A: Kühlung mit zusätzlicher Durchlaufkühlung / Vorlaufkühlung (D, n=221) und reiner Tankkühlung (T, n=571). B: Milchabholung in einem Abstand von einem (1-tägig, n=111) oder zwei Tagen (2-tägig, n=692). Zellzahlen wurden per Durchflusszytometrie bestimmt (IBC: *Individual Bacterial Count*). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

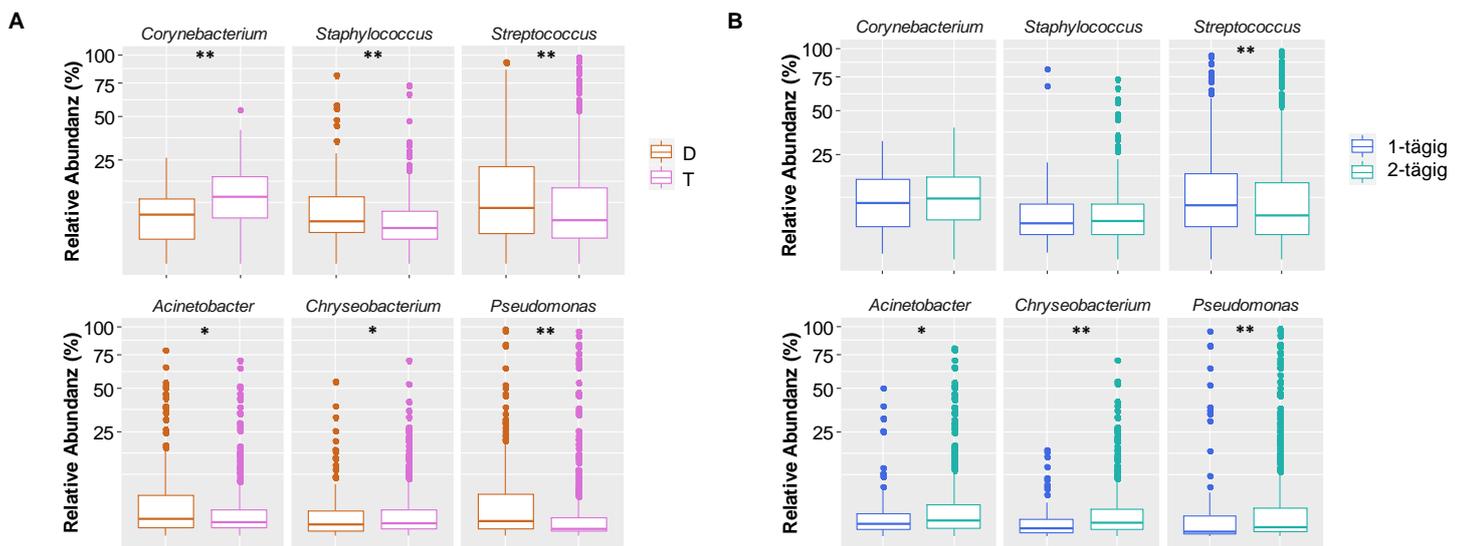


Abbildung 23 Verteilung relativer Abundanzen auf (%) in Rohmilch gruppiert nach Kühlungsmethode und Intervall der Milchabholung. A: Kühlung mit zusätzlicher Durchlaufkühlung / Vorlaufkühlung (D, n=221) und reiner Tankkühlung (T, n=571). B: Milchabholung in einem Abstand von einem (1-tägig, n=111) oder zwei Tagen (2-tägig, n=692). Dargestellte Taxa dienen als Indikatorkeime für Melk- und Analgenhygiene. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

3. Charakterisierung der Gattung *Fundicoccus ignavus* gen. nov., sp. nov.

Bei der Untersuchung der aeroben, mesophilen Mikrobiota von Rohmilch wurden im Zuge einer vorangegangenen, kulturabhängigen Studie die drei Isolate WS4937^T, WS4759 und WS5303 der gleichen Art aus Tankproben isoliert. Anhand ihrer partiellen 16S rDNA-Sequenz konnten sie weder einer valide beschriebenen Spezies, noch einer Gattung zugeordnet werden. Die Charakterisierung mithilfe eines polyphasischen Ansatzes erfolgte im Rahmen dieser Arbeit, woraus die Beschreibung der neuen Gattung *Fundicoccus ignavus* gen. nov., sp. nov. der Familie *Aerococcaceae* resultierte. Die in diesem Kapitel präsentierten Ergebnisse wurden bereits in Siebert et al. (2020) publiziert.

3.1 Genetische Charakterisierung

3.1.1 Phylogenetische Einordnung

Die fast-vollständige 16S rRNA ist ein klassischer phylogenetischer Marker, der zum Abgleich der Sequenzidentitäten und somit zur Determinierung des am nächsten verwandten Typstammes herangezogen wurde. Zunächst wurde die Sequenzähnlichkeit des fast-vollständigen 16S rRNA-Genabschnittes (1478-1493 nt) der drei aus Rohmilch isolierten, unbekanntem Stämme WS4939^T, WS4759 und WS5303 untereinander ermittelt. Nachdem der paarweise Sequenzabgleich eine Identität von 99,6%-99,7% zeigte, wurde der Typstammsequenz WS4939^T mit den Sequenzen aller valide beschriebenen Typstämme auf EzBioCloud verglichen, um schließlich die phylogenetische Position des neuen Taxons zu bestimmen. Unter den gültigen Typstämmen zeigte die Spezies *Facklamia miroungae* ATCC BAA-466^T aus der Familie *Aerococcaceae* mit 94,3% die höchste 16S rRNA-Ähnlichkeit zu WS4939^T. Weitere Treffer zeigten Übereinstimmungen von 94,1% mit *Facklamia tabacinasalis* CCUG 30090^T und 93,7% mit *Facklamia languida* CCUG 37842^T. Bei der weiteren Überprüfung der Datenbank, ausschließlich unter Einbezug aller Typspezies, demonstrierten auch hier Gattungen der Familie *Aerococcaceae* die höchste Übereinstimmung der 16S rRNA-Gensequenz zu WS4939^T. Diese waren mit 93,7% *Facklamia hominis* CCUG 36813^T und mit 93,5% *Eremococcus coleocola* M1831/95/2^T (Siebert et al., 2020).

Um die phylogenetische Einordnung der neuen Stämme aufzudecken, erfolgte die Berechnung eines ML-Baumes auf Basis der fast vollständigen Sequenz des 16S rRNA-Gens. Dieser basierte auf 1261 Nukleotidpositionen, die sich aus einem Alignment mit den drei unbekanntem

Isolaten, den 8 Typspezies und den 13 Typstämmen der Familie *Aerococcaceae* (Stand März 2021) sowie *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* als *Outgroup* ergaben (Abbildung 24). Die Topologie des Baumes demonstrierte die eindeutige Abspaltung des Genus *F. ignavus* gen. nov., sp. nov. mit den Isolaten WS4939^T, WS4759 und WS5303 in einer monophyletischen Linie mit einer maximalen Bootstrap Unterstützung von 100%. Weiterhin gingen aus der phylogenetischen Position der neuen Stämme *F. hominis* CCUG 36813^T und *E. colecola* M1831/95/2^T als nächst verwandte Typspezies hervor. Diese Ergebnisse deckten sich schließlich mit den Ergebnissen der Sequenzidentitäten aus der 16S rRNA-Einzelgenanalyse (Siebert et al., 2020).

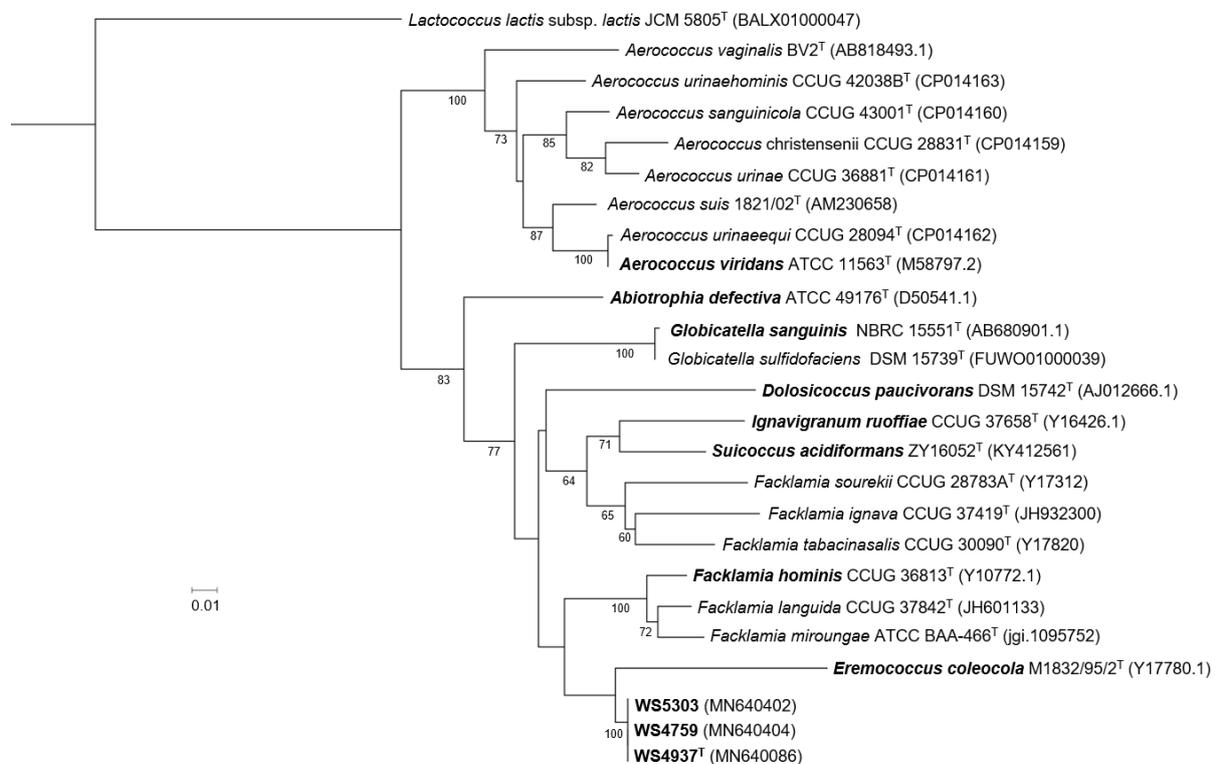


Abbildung 24 16S rRNA Maximum-Likelihood Baum mit den drei Stämme WS4939^T, WS4753, WS5303 und allen valide beschriebenen Typspezies und Typstämmen der *Aerococcaceae*. Alle partiellen 16S rRNA-Gensequenzen stammten von der Datenbank EzBio Cloud. Die Typspezies sind hervorgehoben und als *Outgroup* diente *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. Die Berechnung des Baumes erfolgte in MEGA X und basierte auf dem Tamura-Nei Model mit 500 Wiederholungen. Bootstrap Werte >50% sind an den Astknoten des Baumes angegeben. Balken: 0,01 Substitutionen pro Nukleotid Position. Abbildung aus Siebert et al. (2020).

3.2.2 Genomische Charakterisierung

Die Genom-Assemblierung der drei Stämme WS4939^T, WS4753, WS5303 diente der Aufdeckung genomischer Eigenschaften sowie der phylogenomischen Einordnung von *Fundicoccus ignavus* gen. nov., sp. nov.. Aus der Genomrekonstruktion ergab sich eine Genomgröße von ~ 3,0 mb und ein G+C Gehalt von 37,4mol% (Anhang Tabelle A8) (Siebert et al., 2020).

3.2.2.1 Phylogenomische Einordnung

Um die Taxonomie mit noch höherer Auflösung zu betrachten wurden phylogenomische Analysen durchgeführt, die auf einem multiplen Sequenzalignment von 92 *housekeeping* Genen basierten. Der daraus errechnete UBCG-Baum zeigte die phylogenomische Einordnung der drei neuen Stämme innerhalb der Familie *Aerococcaceae* mit den bisher 8 valide charakterisierten Typspezies sowie *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* als *Outgroup* (Abbildung 25). Daraus wurde eine deutliche Abgrenzung der Stämme WS4939^T, WS4753, WS5303 in einer eigenständigen, monophyletischen Gruppe ersichtlich. Gegensätzlich zu den Ergebnissen aus der 16S rRNA-Phylogenie geht *Globicatella sanguinis* NBRC 15551^T mit einer maximalen Bootstrap Unterstützung (100%) als nächst verwandte Typspezies hervor (Siebert et al., 2020).

Eine weitere *in silico* Analyse bestand darin, über den AAI-Index Ähnlichkeiten zwischen zwei Typspezies Genomen zu kalkulieren und Verwandtschaftsgrade abzuleiten. Dafür wurden jeweils zwei Typspezies der *Aerococcaceae* miteinander bzw. der Typstamm WS4939^T jeweils mit einer der 8 gültigen Typspezies abgeglichen. Beim paarweisen Vergleich zwischen *F. ignavus* gen. nov., sp. nov. WS4939^T und jeweils einer der *Aerococcaceae* Typspezies wurden Werte zwischen 56,2% und 62,1% festgestellt. Dazu ähnliche Werte zwischen 53,5-61,4% ergaben sich aus den paarweisen Vergleichen der bereits valide beschriebenen Typspezies innerhalb der *Aerococcaceae* (Siebert et al., 2020).

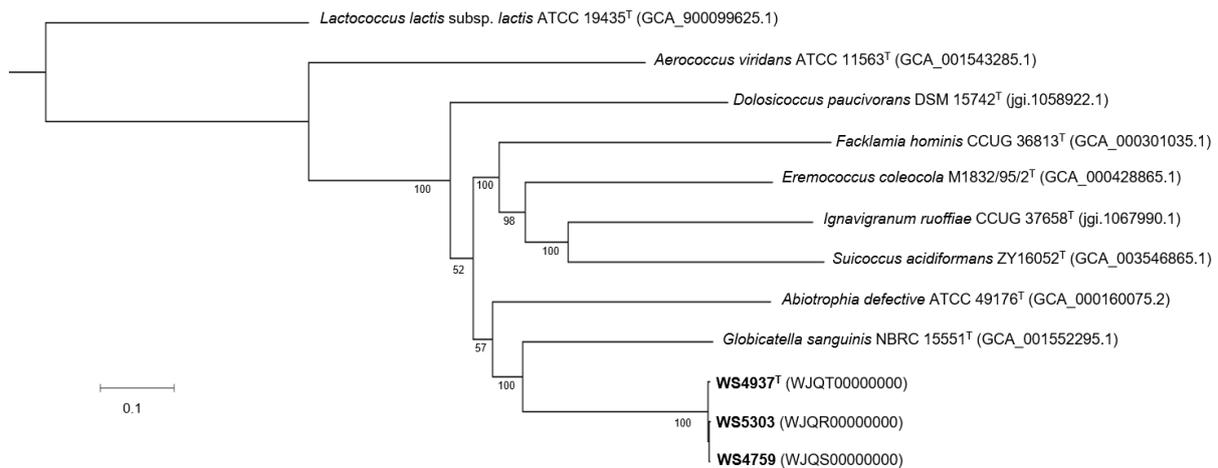


Abbildung 25 UBCG-Baum auf Basis eines multigenen Alignments von 92 *housekeeping* Genen. Der Baum wurde mit den Genomsequenzen aller Typspezies der Familie *Aerococcaceae* (EzBio Cloud) in MEGA X, basierend auf dem Tamura-Nei Model mit 200 Wiederholungen gerechnet. *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* diente als *Outgroup*. Bootstrap Werte >50% sind an den Astknoten des Baumes angegeben. Balken: 0,1 Substitutionen pro Nukleotid Position. Abbildung aus Siebert et al. (2020).

3.2.2.2 Charakterisierung des Aminosäuremetabolismus per KEGG-Datenbank

In Ergänzung zu den phänotypischen Daten aus dem API ID32 STREP erfolgte unter Verwendung der KEGG Datenbank eine genom-basierte Analyse von Enzymaktivitäten, die mit dem Aminosäurestoffwechsel assoziiert sind.

Das Programm Prodigal annotierte insgesamt 2661 proteincodierende Gene für den Stamm WS4939^T (Anhang Tabelle A8). Von diesen konnten durch KEGG *Mapper* insgesamt 1611 und damit ein Anteil von 60,5% den orthologen Sequenzen aus dem KEGG-Netzwerk zugeordnet werden. Sogar 95 der zugeordneten, proteincodierenden Gene entsprachen Bestandteilen des Aminosäuremetabolismus der KEGG Datenbank. Die Rekonstruktion der Signalwege bestätigte die Anwesenheit von Enzymen die in den Katabolismus der Aminosäuren Arginin, Aspartat, Glutamat, und Cystein involviert sind. Während zusätzlich vorhergesagte Enzyme in Zusammenhang mit der Substratproduktion für den Citrat-Zyklus gebracht wurden, waren die Signalwege für Prolin und Tryptophan sowie alle übrigen Aminosäuren unvollständig oder nicht feststellbar. Unter Einsatz des API ID 32 STREP zeigte WS4937^T keine Aktivität für die getestete alkalische Phosphatase, wohingegen BlastKOALA eine orthologe Sequenz für dieses Enzym im Genom von WS4939^T annotierte. Insgesamt stütze jedoch die genom-basierte Rekonstruktion molekularer Signalwege die im API ID 32 STREP beobachteten Enzymaktivitäten (Siebert et al., 2020).

3.2 Phänotypische Charakterisierung

Um die neue Typspezies *Fundicoccus ignavus* gen. nov., sp. nov. weiterhin von Taxa der Familie *Aerococcaceae* abzugrenzen wurden die Stämme WS4939^T, WS4753, WS5303 morphologisch, physiologisch und biochemisch charakterisiert. Diskriminative phänotypische Merkmale, die zur Unterscheidung der Taxa innerhalb der Familie dienen, wurden zwischen WS4939^T und den Literaturangaben von allen 8 beschriebenen Typspezies der Familie verglichen (Tabelle 12).

Bei den drei *F. ignavus* gen. nov., sp. nov. Stämmen wurde in der mikroskopischen Untersuchung eine kokkoide Zellform mit einer durchschnittlichen Zellgröße von 1,3 µm beobachtet. Die Phasenkontrastaufnahme zeigte die Zellen einzeln, als Diplokokken oder in kurzen Ketten angeordnet und ist für das Typstammisolat WS4939^T dargestellt (Abbildung 26). Die Fähigkeit zur Bildung von Endosporen sowie Motilität der Stämme wurde nicht festgestellt.

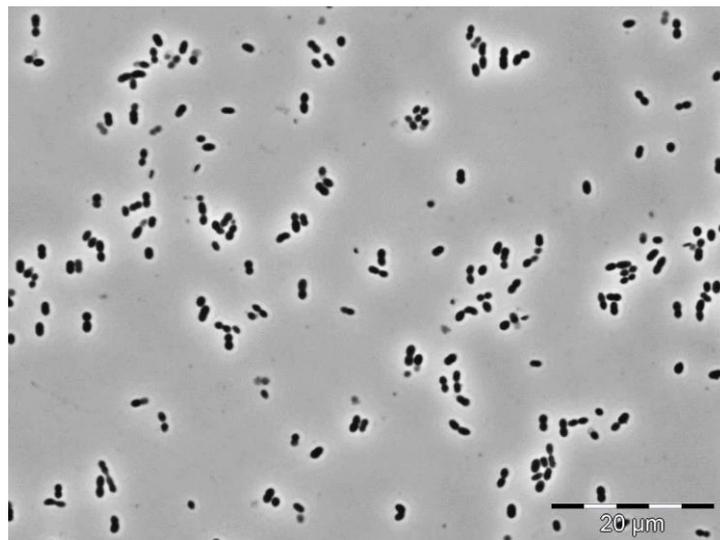


Abbildung 26 Phasenkontrastaufnahme der Zellmorphologie von *Fundicoccus ignavus* gen. nov., sp. nov. WS4937^T. Fluoreszenzmikroskop (100-fach) nach der Kultivierung der Zellen auf TSA bei 30 °C für 48 h. Der Messbalken entspricht einer Größe von 20 µm.

Bei den drei fakultativ anaeroben Isolaten lag in TSB das Temperaturoptimum zwischen 29-30 °C und die untere Wachstumsgrenze bei 12 °C. Während die maximale Wachstumstemperatur von Stamm WS5303 bei 37 °C lag, wurde für die beiden Isolate WS4939^T und WS4753 ein Temperaturmaximum von 39 °C ermittelt. Ein in der Familie der *Aerococcaceae* weit verbreitetes Charakteristikum ist die fehlende Proliferation bei 10 °C und

45 °C, welches ebenso bei *F. ignavus* gen. nov., sp. nov. WS4939^T, WS4753, WS5303 ausblieb. Die Wachstumsoptima lagen für alle drei Stämme bei 0,5%- 1% (w/v) NaCl und pH 7,5 – 8,0 mit einem Toleranzbereich von pH 6,5 – 9,5. Für Stamm WS5303 wurde Wachstum bis 6,0% (w/v) NaCl beobachtet, wohingegen der Wachstumsbereich bis 6,5% (w/v) NaCl bei den Stämmen WS4939^T und WS4753 minimal erweitert war (Siebert et al., 2020).

Tabelle 12 Charakteristische Eigenschaften des Typstammes WS4939^T im Vergleich zu allen valide beschriebenen Typspezies der Familie *Aerococcaceae*. Stämme: 1: WS4937^T (Daten aus dieser Arbeit); 2: *Facklamia hominis* CCUG 36813^T (Collins et al., 1997; Hoyles, 2014); 3: *Eremococcus coleocola* M1832/95/2^T (Collins et al., 1999b); 4: *Globicatella sanguinis* NBRC 15551^T (Collins et al., 1992; Ludwig et al., 2009); 5: *Aerococcus viridans* ATCC 11563^T (Ludwig et al., 2009; Lawson, 2014a); 6: *Abiotrophia defectiva* ATCC 49176^T (Ludwig et al., 2009); 7: *Ignavigranum ruoffiae* CCUG 37658^T (Collins et al., 1999c; Ludwig et al., 2009; Huch et al., 2014); 8: *Dolosicoccus paucivorans* DSM 15742^T (Collins et al., 1999a); 9: *Suicoccus acidiformans* ZY16052^T (Li et al., 2019). + positiv; +(s): schwach positiv; – negativ; n.a.: für den Typstamm nicht angegeben. Tabelle modifiziert nach Siebert et al. (2020).

Eigenschaft	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Wachstum bei 10 °C	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Wachstum bei 45 °C	-	-	n.a. ¹	-	-	-	+	-	+
Wachstum in 6.5% (w/v) NaCl	+	+	+(s)	+	+	-	+	-	+
Säurebildung:									
Glukose	-	-	+	+	+	+	+(s)	+(s)	n.a.
Glykogen	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Laktose	-	-	-	+	+	-	-	+(s)	-
Mannitol	-	-	-	+	+	n.a.	n.a.	+(s)	+
Melibiose	-	-	-	+	-	-	-	-	+
Raffinose	-	-	-	+	-	+	-	-	+
Ribose	-	-	-	+	+(s)	-	-	-	-
Saccharose	-	-	-	+	+	+	-	-	+
Trehalose	-	-	-	+	-	+	-	-	+
Hyrolyse von:									
Eskulin	-	-	-	+	+	n.a.	-	-	n.a.
Hippurat	+	+	+	+	+(s)	-	-	-	+
Stärke	-	+	-	+	n.a.	+	-	-	n.a.
Produktion von:									
Arginin-Dihydrolase	+	+	+	-	-	-	+	-	-
α-Galaktosidase	+(s)	+	-	+	-	+	-	-	+
β-Galaktosidase	+	+	-	+	-	+	-	-	-
β-Glukosidase	+	-	-	+	-	-	-	-	-
Pyroglutamat-Arylamidase	-	n.a.	+	+	+(s)	+	+	+	+
Urease	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Katalase	-	-	-	-	-	-	-	-	+

¹ Wachstum bei 42 °C

Die Gram-positiven Stämme der neuen Typspezies zeigten negative Ergebnisse im Test auf Cytochromoxidase C und Katalase. Eine starke α -Hämolyse wurde beobachtet, jedoch war keiner der Stämme positiv für die Spaltung von Stärke oder Gelatine. Die Isolate waren negativ im Voges-Proskauer Test sowie in der Untersuchung auf Indolproduktion. Sie reduzierten kein Nitrat und H_2S wurde nicht detektiert. Bei der Untersuchung von Enzymaktivitäten im API ID32 STREP hydrolysierten alle drei Stämme der neuen Gattung Hippurat und waren positiv für die Enzyme Arginindihydrolase und β -Glaktosidase unter Verwendung des Substrats Resourfin β -D-Galaktopyranosid. Während für die Enzyme Alanin-Phenylalanyl-Prolin-Arylamidase, alkalische Phosphatase, β -Glukoronidase, β -Mannosidase, Glycyl-Tryptophan-Arylamidase, N-acetyl- β -Glukosaminidase, Pyroglutamat Arylamidase sowie Urease keine Aktivität beobachtet wurde, war die α -Galaktosidase schwach positiv für den Typstamm WS4939^T. Im API 50 CH Testsystem waren alle drei Stämme negativ für die Umsetzung von 47 verschiedenen Kohlenhydraten unter Säurebildung, was sich durch einen ausbleibenden Farbumschlag des pH Indikators äußerte (Siebert et al., 2020).

3.3 Chemotaxonomische Charakterisierung

Zur genauen Charakterisierung und Aufdeckung chemotaxonomischer Differenzen wurde die Peptidoglykanstruktur und die Zusammensetzung der polaren Lipide für den Typstamm WS4939^T analysiert. Weiterhin erfolgte die Untersuchung des Fettsäureprofils der Stämme WS4939^T, WS4753, WS5303 und *Globicatella sanguinis* NBRC 15551^T. Durchgeführt wurden alle Analysen bei der DSMZ.

Mit der Analyse des Totalhydrolysates von *F. ignavus* gen. nov., sp. nov. WS4939^T per DC wurden die Aminosäuren Alanin (Ala), Glycin (Gly), Glutaminsäure (Glu) und Lysin (Lys) nachgewiesen. Nach Quantifizierung per Gaschromatografie ergab sich ein Verhältnis der Aminosäuren von 1.3 Ala: 1.3 Glu: 1.0 Lys. Durch weitere Analysen des hydrolysierten Peptidoglykans wurden neben den Aminosäuren die Dipeptide L-Ala-D-Glu und L-Lys-D-Ala detektiert. Somit ließ sich aus den erhobenen Daten für die Typspezies WS4939^T der Peptidoglykantyp A1 α L-Lys-direkt ableiten. Bei der Untersuchung des polaren Lipidprofils von Stamm WS4939^T bildeten insgesamt drei Glykolipide, jeweils ein Phospholipid, Phosphatidylglycerol, Phosphoglykolipid und Diphosphatidylglycerol die Hauptbestandteile (Abbildung 27) (Siebert et al., 2020).

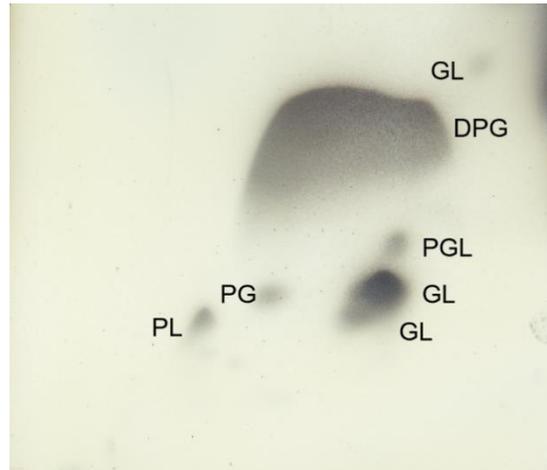


Abbildung 27 Zusammensetzung der polaren Lipide von *Fundicoccus ignavus* gen. nov., sp. nov. WS4937^T nach Analyse per zweidimensionaler DC. GL: Glykolipid; PL: Phospholipid; PG: Phosphatidylglycerol; PGL: Phosphoglycolipid; DPG: Diphosphatidylglycerol. Abbildung aus Siebert et al. (2020).

Im Profil der zellulären Fettsäuren des Typstamms WS4937^T dominierte die ungesättigte Fettsäure C_{16:1}ω₉c mit einem Anteil von 27,6%, gefolgt von zwei weiteren Hauptkomponenten C_{16:0} und C_{18:1}ω₉c, die eine Fraktion von 23,5% und 17,6% ausmachten. Insgesamt wurden 12 weitere Fettsäuren in Anteilen <7% detektiert, die teilweise sogar nur in Spuren (<1%) nachgewiesen wurden. Obwohl für alle drei Stämme WS4939^T, WS4753, WS5303 die Hauptbestandteile des Fettsäureprofils übereinstimmten, so gab es dennoch intraspezifische Unterschiede mit Werten die beispielsweise für die Fettsäure C_{16:1}ω₉c zwischen 23% und 12% schwankten oder für C_{18:1}ω₉c zwischen 18% und 37% lag (Anhang Tabelle A9). Zur Abgrenzung der neuen Typspezies *F. ignavus* gen. nov., sp. nov. erfolgte der Vergleich des Typstammes WS4939^T mit den Literaturdaten der 8 beschriebenen Typspezies der Familie *Aerococcaceae* (Tabelle 13). Bei der unter gleichen Bedingungen, parallel erfolgten Fettsäureanalyse wurde für die in *F. ignavus* gen. nov., sp. nov. WS4939^T vorherrschende Fettsäure C_{16:1}ω₉c bei *G. sanguinis* NBRC 15551^T ein wesentlich geringerer Anteil von 4,3% detektiert. Daneben beinhaltete das Fettsäureprofil der drei evolutionär am nächsten verwandten Typspezies *F. hominis*, *E. coleocola* und *G. sanguinis* die Fettsäure *Summed feature 5* mit Fraktionen zwischen 12-16%, während sie in *F. ignavus* gen. nov., sp. nov. WS4939^T mit einem Anteil von 5,6% keine Hauptkomponente darstellte (Siebert et al., 2020).

Tabelle 13 Zelluläre Fettsäuren des Typstammes WS4939^T und aller valide beschriebenen Typspezies der Familie *Aerococcaceae*. Stämme: 1: WS4937^T (Daten aus dieser Arbeit); 2: *Facklamia hominis* CCUG 36813^T; 3: *Eremococcus coleocola* M1832/95/2^T; 4: *Globicatella sanguinis* NBRC 15551^T (Daten aus dieser Arbeit); 5: *Aerococcus viridans* ATCC 11563^T; 6: *Abiotrophia defectiva* ATCC 49176^T; 7: *Ignavigranum ruoffiae* CCUG 37658^T; 8: *Dolosicoccus paucivorans* DSM 15742^T; 9: *Suicoccus acidiformans* ZY16052^T. Fett: Hauptfettsäuren >10%; –: nicht detektiert; n.a.: nicht angegeben. ⁺Daten aus Li et al. (2019). Tabelle modifiziert nach Siebert et al. (2020).

Fettsäure	1	2⁺	3⁺	4	5⁺	6⁺	7⁺	8⁺	9⁺
Gesättigt									
C _{10:0}	0,7	n.a.	n.a.	0,5	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
C _{12:0}	0,5	0,5	0,5	1,0	0,4	1,2	0,5	0,5	1,3
C _{14:0}	4,2	6,1	6,3	8,6	4,1	9,0	7,0	4,0	10,6
C _{15:0 anteiso}	-	0,4	4,2	-	0,3	-	1,0	0,5	0,2
C _{16:0}	23,5	52,9	52,0	30,2	25,4	33,4	56,8	44,1	38,1
C _{17:0}	-	n.a.	n.a.	0,5	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
C _{18:0}	6,5	5,0	3,9	11,9	13,8	4,8	3,1	5,8	2,4
C _{19:1 iso I}	1,1	-	-	-	-	1,1	-	1,8	0,2
Ungesättigt									
C _{16:1 ω9c}	27,6	-	-	4,3	15,3	18,1	-	7,9	18,4
C _{17:1 iso ω5c}	0,5	0,9	0,6	0,7	0,3	2,2	0,8	3,4	0,5
C _{18:1 ω9c}	17,6	11,8	9,3	17,0	9,3	12,1	10,0	10,1	12,7
C _{20:1 ω9c}	0,4	-	-	-	7,2	-	-	-	-
C _{20:2 ω6,9c}	0,5	n.a.	n.a.	-	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
C _{20:4 ω6,9,12,15c}	-	n.a.	n.a.	0,6	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Hydroxy									
C _{13:0 2-OH}	-	-	-	-	-	-	-	0,6	-
C _{15:0 2-OH}	-	-	-	-	-	-	-	0,9	-
Summed feature									
3 (C _{16:1 ω7c} /C _{16:1 ω6c})	6,0	2,9	2,5	4,5	1,4	5,6	2,8	3,1	2,1
5 (C _{18:2 ω6,9c} /C _{18:0 ante})	5,6	15,9	12,2	16,4	1,6	5,6	13,3	9,4	9,6
7 (<i>unknown</i> 18.85/C _{19:1 ω6c})	-	-	-	-	16,3	-	-	-	-
8 (C _{18:1 ω7c} /C _{18:1 ω6c})	4,1	1,2	1,1	2,9	1,7	3,8	1,2	1,9	0,8
9 (C _{17:1 iso ω9c} /C _{16:0 10-methyl})	1,2	-	-	0,9	0,5	1,7	-	-	1,0

4. Charakterisierung einer neuen Spezies *Raineyella* sp. nov

Bei einer kulturellen Analyse der aeroben, mesophilen Mikrobiota von Rohmilch wurden die zwei Stämme WS4898^T und WS4899 isoliert und über die partielle 16S rRNA-Gensequenzen mit bereits valide beschriebenen Taxa abgeglichen. Beim Sequenzabgleich des fast vollständigen 16S rRNA-Genabschnittes der beiden Isolate ergab sich eine Identität von 100%, allerdings konnten diese nicht einer bekannten Spezies zugeordnet werden und dienten der

Beschreibung einer neuen Art. Die Charakterisierung erfolgte unter Anwendung eines polyphasischen Ansatzes.

4.1 Genetische Charakterisierung

4.1.1 Phylogenetische Einordnung

Die fast vollständigen 16S rRNA-Gensequenzen der Stämme WS4898^T und WS4899 ermöglichten die taxonomische und phylogenetische Einordnung. Durch den Sequenzvergleich mit dem auf EzBioCloud verfügbaren Datensatzes wurden die am nächsten verwandten Typstämme ermittelt. Der erste Treffer mit der höchsten Übereinstimmung zur partiellen 16S rRNA-Sequenz einer valide publizierten Art ergab eine Ähnlichkeit von 96,29% zu der Typspezies *Raineyella antarctica* DSM 100494^T der Familie *Propionibacteriaceae*, gefolgt von dem zweiten beschriebenen Typstamm dieser Gattung *Raineyella fluvialis* DSM 110288^T mit 96,22%. Weitere Sequenzübereinstimmungen zu anderen Gattungen waren gering und lagen weit unter 96%. Dabei stimmten die ähnlichsten Typstämme *Auraticoccus monumenti* MON 2.2^T und *Mariniluteicoccus endophyticus* YIM2617^T nur zu 93,47% und 93,45% überein.

Um die phylogenetische Position der neuen Spezies innerhalb der *Raineyella* und der *Propionibacteriaceae* zu analysieren, wurde ein ML-Baum erstellt. Dessen Berechnung basierte auf 1306 Nukleotidpositionen, die aus dem Alignment unter Einbezug der beiden publizierten Referenzspezies der Gattung *Raineyella*, der ersten 18 Treffer (verfügbar auf EzBioCloud) mit der höchsten 16S rDNA-Sequenzidentität zu *Raineyella* sp. nov. WS4898^T sowie *Kribella flavida* DSM 17836 als *Outgroup* hervorgingen (Abbildung 28). Aus der topologischen Struktur des Baumes wurde ersichtlich, dass die Gattung *Raineyella* innerhalb der *Propionibacteriaceae* ein klar abgegrenztes, eigenständiges Cluster bildete. Innerhalb dieses Clusters zeigte sich mit einer Bootstrap Unterstützung von 99% eine deutliche, monophyletische Abspaltung der beiden Stämme *Raineyella* sp. nov. WS4898^T und WS4899 zu den beiden Typstämmen *R. antarctica* LZ-22 und *R. fluvialis* CBA3103^T. Für alle phänotypischen und chemotaxonomischen Untersuchungen wurde *R. antarctica* DSM 100494 (Pikuta et al., 2016) als Referenz herangezogen. Die Neubeschreibung von *R. fluvialis* (Kim et al., 2020) wurde erst nach Abschluss der in dieser Arbeit durchgeführten experimentellen Versuche publiziert und konnte demnach nicht als Referenz mitgezogen werden.

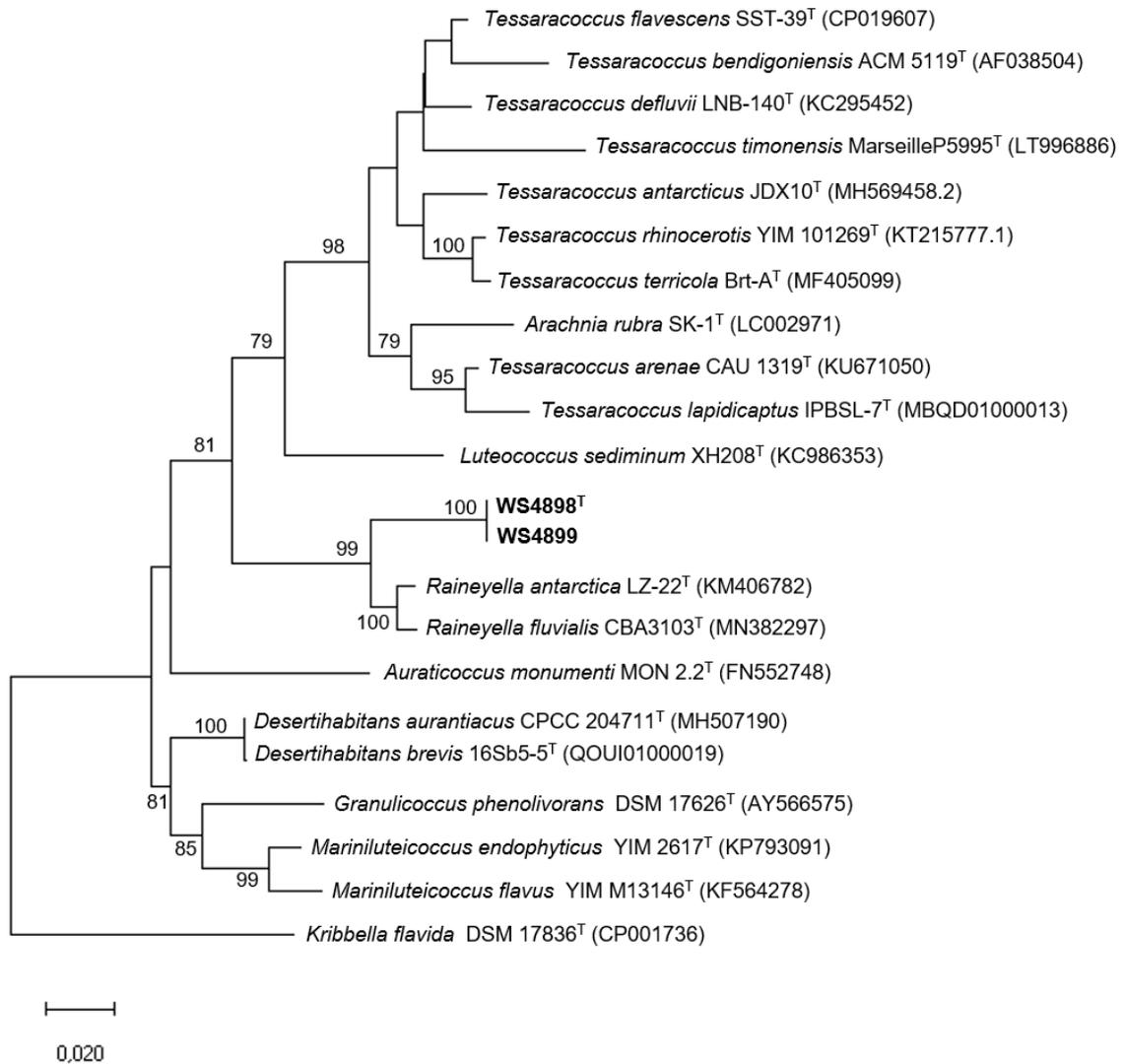


Abbildung 28 16S rRNA Maximum-Likelihood Baum von *Raineyella* sp. nov. WS4898^T und WS4899 und den ersten 20 Treffern mit der höchsten 16S rRNA-Identität auf EzBioCloud. Als *Outgroup* wurde *Kribbella flavida* DSM 17836 verwendet. Die Berechnung des Baumes erfolgte in MEGA X und basierte auf dem Tamura-Nei Model mit 1000 Wiederholungen. Bootstrap Werte >50% sind an den Astknoten des Baumes angegeben. Balken: 0,02 Substitutionen pro Nukleotid Position.

4.1.2 Genomische Charakterisierung

Um typische genomische Charakteristika aufzudecken, wurden alle *Raineyella* sp. nov. Stämme WS4898^T und WS4899 sequenziert und das Genom rekonstruiert. Aus der Assemblierung der Genome ergab sich für die Stämme der neuen Art eine Genomgröße von ca. 3,0 Mb und ein G+C Gehalt von 69,4mol% (Anhang Tabelle A10).

Um die Ähnlichkeit zwischen zwei Stämmen zusätzlich auf Genomebene zu vergleichen wurde *in silico* der dDDH Index berechnet. Dabei wurden die Werte aus dem paarweisen Vergleich der Stämme WS4898^T und WS4899 jeweils mit der Typspezies *R. antarctica* DSM 100494 und dem Typstamm *R. fluvialis* DSM 26521 bestimmt. Während der intraspezifische dDDH Wert

der neuen Spezies bei 87,3 lag, so wurde beim paarweisen Vergleich der beiden Stämme WS4898^T und WS4899 jeweils mit *R. antarctica* DSM 100494 oder *R. fluvialis* DSM 26521 ein Wert <20 ermittelt (Tabelle 14).

Tabelle 14 Digitale DDH Werte der *Raineyella* sp. nov. Stämme und den zwei Typstämmen der Gattung *Raineyella*. Fett: intraspezifischer dDDH-Wert.

Stamm	dDDH mit entsprechendem Stamm		
	2	3	4
1 <i>Raineyella</i> sp. nov. WS4998 ^T	87,3	18,6	17,1
2 <i>Raineyella</i> sp. nov. WS4999	-	18,6	17,0
3 <i>R. antarctica</i> DSM 100494	-	-	28,0
4 <i>R. fluvialis</i> DSM 26521 ^T	-	-	-

4.2 Phänotypische Charakterisierung

Im Zuge der phänotypischen Charakterisierung wurden die morphologischen Eigenschaften der zwei *Raineyella* sp. nov. Stämme WS4898^T und WS4899 analysiert. Daneben wurden physiologische und biochemische Merkmale charakterisiert, um die Stämme der neuen Art phänotypisch von der Typspezies *R. antarctica* abzugrenzen, die als Vergleichsstamm für die Untersuchungen mitgezogen wurde.

Die stäbchenförmigen Zellen von *Raineyella* sp. nov. WS4898^T und WS4899 zeigten sich nach einer Kultivierung von 48 h auf TSA mit einer durchschnittlichen Zellgröße von 0,9 µm x 1,9 µm. Abbildung 29 stellt die mikroskopische Aufnahme für den Typstamm WS4898^T dar. Für beide Isolate wurde weder die Bildung von Endosporen beobachtet noch Motilität nachgewiesen.

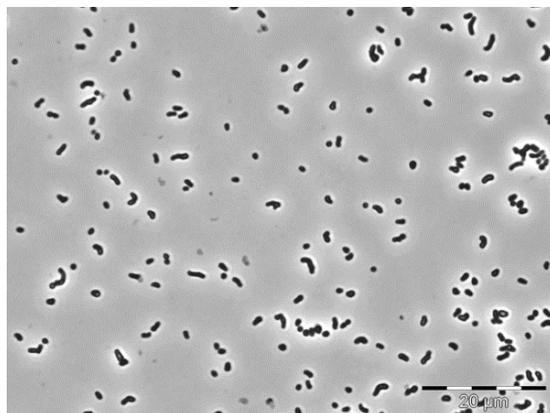


Abbildung 29 Phasenkontrastaufnahme der Zellmorphologie von *Raineyella* sp. nov. WS4898^T. Die Aufnahme erfolgte bei einer 100-fachen Vergrößerung nach der Kultivierung der Zellen auf TSA bei 30 °C für 48 h. Der Messbalken entspricht einer Größe von 20 µm.

Intraspezifische Unterschiede der beiden fakultativ anaeroben *Raineyella* sp. nov. WS4898^T und WS4899 Stämme wurden im Temperaturoptimum festgestellt. Während Isolat WS4898^T ein Temperaturoptimum von 30-32 °C aufwies, erreichte Stamm WS4899 das optimale Wachstum in einem Temperaturbereich von 25-27 °C. Die Stämme zeigten optimale Wachstumsbedingungen bei 2% (WS4898^T) bzw. 1%-3% (WS4899) (w/v) NaCl und pH 7,5 – 8 für Typstamm WS4898^T bzw. pH 8 für Stamm WS4899. Während die sichtbare untere Temperaturgrenze von *Raineyella* sp. nov. bei 8 °C lag, so wurde Zellproliferation für beide Stämme der neuen Art bis 34 °C ermittelt. Zusätzlich tolerierten die Stämme NaCl-Konzentrationen von 0% - 10% (w/v) (WS4898^T) bzw. 1% - 9% (w/v) (WS4899) und pH 6,5 – 9.

Raineyella sp. nov. ist eine Gram-positive, Katalase positive und Oxidase negative Spezies. Der Phänotyp beider Stämme war im Test auf α -Hämolyse negativ. Weiterhin zeigten WS4898^T und WS4899 keine Spaltung von Gelatine oder Casein, hydrolysierten allerdings Stärke. Die Reduktion von Nitrat wurde ausschließlich für den Stamm WS4899 sichtbar und die Bildung von Indol blieb für beide Stämme aus. Die im API 20 NE getesteten Enzymreaktionen waren positiv für Urease und nur schwach positiv für β -Galaktosidase. Die zwei untersuchten Stämme bildeten Säure nach der Verwertung folgender Kohlenhydrate: D-Ribose, D-Xylose, D-Galaktose, D-Glukose, D-Fruktose, D-Maltose, D-Laktose, D-Saccharose, D-Trehalose, Harnstoff, D-Turanose. Zusätzlich war WS4898^T positiv für das Substrat D-Mannose und zeigte eine schwache Reaktion bei Glycerol und Methyl α -D-Glukosid, wohingegen lediglich Stamm WS4899 Säureproduktion durch die Verwertung von N-Acetylglukosamin aufzeigte. Keine Säure wurde aus den Kohlenhydraten Erythritol, D-Arabinose, L-Arabinose, L-Xylose, D-Adonitol, Methyl-beta-D-Xylopyranose, L-Sorbose, L-Rhamnose, Dulcitol, Inositol, D-Mannitol, D-Sorbitol, Methyl- α -D-Mannosid, Amygdalin, Arbutin, Eskulin, Salicin, D-Cellobiose, D-Melibiose, Inulin, D-Melezitose, D-Raffinose, Glycogen, Xylit, Gentiobiose, D-Lyxose, D-Tagatose, D-Fucose, L-Fucose, D-Arabitol, L-Arabitol und Kalium-Glukonat gebildet. Phänotypische Merkmale des Typstammes WS4898^T die zur Abgrenzung von den beschriebenen Typstämmen *R. antarctica* DSM 100494 und *R. fluvialis* CBA3103^T (Literaturdaten) herangezogen wurden sind in Tabelle 15 zusammengefasst.

Ergebnisse

Tabelle 15 Differenzierende phänotypische Eigenschaften der *Raineyella* sp. nov. Stämme im Vergleich zu den zwei Typstämmen der Gattung *Raineyella*. 1: *Raineyella* sp. nov. WS4898^T (Daten aus dieser Arbeit); 2: *Raineyella* sp. nov. WS4899 (Daten aus dieser Arbeit); 3: *Raineyella antarctica* DSM 100494 (Daten aus dieser Arbeit); 4: *Raineyella fluvialis* DSM 110288^T (Kim et al., 2020). +: positiv; +(s): schwach positiv; -: negativ; n.a.: nicht angegeben.

Eigenschaft	1	2	3	4
Temperatur				
Optimum (°C)	30 – 32	25 – 27	24 – 28 ¹	35
Wachstumsbereich (°C)	8 – 34	8 – 34	3 – 42 ²	15 – 40
NaCl (%) Wachstumsbereich	0 – 10	1 – 9	0 – 7	0 – 2
pH Wachstumsbereich	6,5 – 9	6,5 – 9	6 – 8,5	6 – 7
Säurebildung:				
Glycerol	+(s)	-	-	+
Erythritol	-	-	-	+
L-Arabinose	-	-	-	+
D-Xylose	+	+	-	+
D-Adonitol	-	-	-	+
D-Galaktose	+	+	+	-
D-Glukose	+	+	+	-
D-Fruktose	+	+	+	-
D-Mannose	+	-	-	+
L-Rhamnose	-	-	+	-
Inositol	-	-	+(s)	+
D-Mannitol	-	-	+(s)	+
D-Sorbitol	-	-	-	+
N-Acetylglukosamin	-	+	-	+
D-Salicin	-	-	+	+
D-Maltose	+	+	+	-
D-Laktose	+	+	+	-
D-Saccharose	+	+	+	-
D-Trehalose	+	+	+	-
D-Turanose	+	+	+	-
L-Arabitol	-	-	-	+
Produktion von:				
β -Galakosidase	+(s)	+(s)	+(s)	-
Katalase	+	+	+	+
Oxidase	-	-	-	+
Urease	+	+	-	n.a.
Stärkehydrolyse	+	+	+	+

¹ Daten aus Pikuta et al. (2016)

² schwaches Wachstum bei 42 °C

4.3 Chemotaxonomische Charakterisierung

Die Determinierung der zellulären Fettsäuren erfolgte als Teil der chemotaxonomischen Charakterisierung von *Raineyella* sp. nov. WS4898^T und WS4899 und wurde zusammen mit der Analyse für den Referenzstamm *R. antarctica* DSM 100494 bei der DSMZ ausgeführt.

Das Profil der zellulären Fettsäuren von *Raineyella* sp. nov. ist für die beiden Stämme WS4898^T, WS4899 und den Referenzstamm *R. antarctica* DSM 100494^T dargestellt (Tabelle 16). Mit einer Fraktion von 54,1% (WS4898^T) bzw. 53,8% (WS4899) bildet die gesättigte Fettsäure C_{15:0}anteiso mit übereinstimmenden Anteilen in beiden Stämmen die Hauptkomponente, gefolgt von einer weiteren gesättigten Fettsäure C_{14:0} iso, die mit Anteilen zwischen 13-19% für WS4898^T und WS4899 vertreten war. *Summed feature 2* wurde allerdings ausschließlich für den Typstamm WS4898^T detektiert, bei dem sie mit einer Fraktion von 11,3% eine Hauptfettsäure bildete. Alle weiteren, analysierten Fettsäuren wurden mit einem geringen Anteil von <7% bzw. in Spuren (<1%) detektiert. In Bezug auf die Abgrenzung der Fettsäurezusammensetzung des Typstamms WS4898^T von der Typspezies *R. antarctica* DSM 100494^T zeigte sich, dass die Hauptfettsäure C_{15:0}anteiso mit 60% vergleichsweise nur minimal erhöht war, jedoch die Fettsäure C_{14:0} lediglich als Hauptkomponente bei *Raineyella* sp. nov. und *Summed feature 2* nur bei *Raineyella* sp. nov. WS4939^T detektiert wurde.

Ergebnisse

Tabelle 16 Zelluläre Fettsäuren von *Raineyella* sp. nov. WS4898^T und WS4899 im Vergleich zu *Raineyella antarctica* DSM 100494. Dargestellt sind Fettsäuren mit >1% in mindestens einem Isolat. Fett: Hauptfettsäuren >10%. Alle Daten stammen aus dieser Arbeit.

Fettsäure	WS4898^T	WS4899	DSM 100494^T
Gesättigt			
C _{12:0}	-	0,2	1,7
C _{12:0} iso	0,8	1,2	0,4
C _{13:0}	1,6	0,1	-
C _{13:0} anteiso	6,7	3,3	3,8
C _{14:0}	0,8	0,6	2,6
C _{14:0} iso	13,0	19,0	9,7
C _{15:0} anteiso	54,1	53,8	60,0
C _{15:0} iso	1,0	1,8	1,5
C _{16:0}	0,9	0,8	5,0
C _{16:0} iso	0,6	2,2	2,2
C _{17:0}	-	1,1	1,0
Ungesättigt			
C _{14:1} ω5c	-	-	1,0
C _{16:1} iso H	-	-	1,6
C _{17:1} ω8c	0,3	1,1	-
C _{18:1} iso H	-	1,2	-
Hydroxy			
C _{14:0} 2-OH	-	-	2,7
Summed feature			
2 (C _{12:0} aldehyde/unknown 10,928)	11,3	5,5	-
3 (C _{16:1} ω7c/C _{16:1} ω6c)	0,3	0,2	4,4
4 (C _{17:1} iso I/anteiso B)	0,8	3,3	0,1

IV. DISKUSSION

1. Probenaufbereitung zur Mikrobiomanalyse von Rohmilch

Die Amplikon-Sequenzierung von Rohmilch ermöglicht eine eingehende Analyse der detektierten taxonomischen Diversität innerhalb mikrobieller Strukturen. Allerdings ist die Beschaffenheit der Rohmilchmatrix hochkomplex, was die Anwendung der 16S rRNA (Amplikon)-Sequenzierung erschwert. Mit dem Ziel für die Sequenzierung ausreichende DNA-Mengen zu erzielen und den Eintrag von Artefakten in die analysierte Biodiversität möglichst gering zu halten, wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Protokoll für die Aufbereitung von Rohmilch zur Sequenzierung der Mikrobiota optimiert. Evaluiert wurde hierbei die Extraktion der bakteriellen DNA aber auch der Einfluss der Zyklenzahl in der *library*-PCR. Dieser Teil der Arbeit wurde bereits in Siebert et al. (2021) publiziert.

1.1 Isolation bakterieller DNA aus Rohmilch

Die Keimbelastung der Rohmilchproben in der Methodenoptimierung schwankte zwischen 3,7 und 5,3 log KbE/ml und bildete für Rohmilch gewöhnliche Werte ab (Fricker et al., 2011; Mallet et al., 2012; von Neubeck et al., 2015; Fretin et al., 2018; Skeie et al., 2019). Diese Tatsache stellt eine der Hauptschwierigkeiten für die Amplikon-basierte Hochdurchsatzsequenzierung dieser Proben dar. In Kombination mit der quantitativen Dominanz der eukaryotischen DNA aus den Immunzellen der Kuh ergibt sich dadurch ein massives Ungleichgewicht zwischen eukaryotischer und bakterieller DNA. Im Vergleich dazu, erfolgt beispielsweise im Bereich des intestinalen Mikrobioms die DNA-Extraktion aus Stuhlproben mit bakteriellen Keimzahlen zwischen 10 und 11 log KbE/ml (Whitman et al., 1998; Hopkins et al., 2001). Aufgrund der exorbitanten bakteriellen Masse ist der Anteil an eukaryotischer DNA bei dieser Probenmatrix unproblematisch, wodurch häufig geringe Probevolumina von <1g genügen (Claassen et al., 2013; Wagner Mackenzie et al., 2015; Kampmann et al., 2016), um eine ausreichend hohe Amplikon-Konzentration zu generieren. Somit ist der DNA-Isolationsprozess für Proben mit hohen Ausgangskeimzahlen eine weitgehend weniger komplexe und gut etablierte Methodik (Siebert et al., 2021).

In dieser Arbeit lag der Fokus im ersten Schritt der Protokolloptimierung für die bakterielle DNA-Extraktion aus Rohmilch bereits auf der Separation der Bakterienzellen aus der Milchmatrix. Zur Konzentration der prokaryotischen Zellen wurde eine initiale Zentrifugation gewählt, gefolgt von der spezifischen Reduktion der eukaryotischen Begleit-DNA (selektive

Lyse). Bereits Murphy et al. (2002) setzten in Versuchen zur Extraktion von genomischer DNA aus Milch EDTA ein, welches als Chelatbildner fungierte und somit durch das Binden der Kalzium Ionen die Aufspaltung der Casein-Mizellen herbeiführte (Owen und Andrews, 1984). Während Murphy et al. (2002) das durch Zentrifugation abgetrennte Pellet behandelten, so erwies sich unter den zwei getesteten EDTA-Varianten (RM/EDTA sowie Pellet/EDTA) in dieser Arbeit die direkte Zugabe zur Rohmilch als effizientere Methode. So zeigte die EDTA-behandelte Rohmilch signifikant niedrigere Ct-Werte, die mit einer höheren DNA Ausbeute assoziiert waren. Eine reduzierte Interferenz der Casein-Mizellen mit den Enzymen Proteinase K und DNase I (Murphy et al., 2002) während der selektiven Abreicherung der eukaryotischen Zellen und eine daraus resultierende wirkungsvollere PCR könnte eine Erklärung dafür sein. Ob die EDTA-behandelte Rohmilch eine verbesserte Abtrennung der Bakterienzellen bewirkte, die PCR-Effizienz steigerte oder die höhere DNA-Ausbeute ein Resultat aus der Kombination beider Faktoren war, konnte nicht eindeutig bestimmt werden. Durch die EDTA-Behandlung und den resultierenden Zerfall des Caseins, reduzierte sich zusätzlich der Anteil des sedimentierten Milchproteins. Ein großer Vorteil davon war, dass dadurch die Weiterverarbeitung des entstandenen, zähflüssigen Pellets um ein Vielfaches vereinfacht und sehr wahrscheinlich der Verlust von Zellmaterial vermindert wurde (Siebert et al., 2021). Eine weitere Methode zur Behandlung der Rohmilch vor der eigentlichen, bakteriellen Lyse war die selektive Lyse der somatischen Zellen zur Reduktion der Anteile an eukaryotischer DNA am Gesamt-DNA Extrakt, der eine Mischung aus eukaryotischer und bakterieller DNA darstellt. Insgesamt demonstrierte die Messung der DNA-Konzentration eine Abnahme der Gesamt-DNA um ca. 90% nach Anwendung der selektiven Lyse. Ein gleichzeitiger Anstieg des prozentualen Anteils der bakteriellen Ziel-DNA in der real-time PCR könnte durch eine effizientere PCR infolge des Abbaus der eukaryotischen DNA bedingt gewesen sein (Siebert et al., 2021). Insbesondere für Rohmilchproben mit geringer bakterieller Belastung ist eine erfolgreiche DNA-Extraktion die zentrale Grundlage für den Erfolg der anschließenden Amplifikation des 16S rRNA-Genabschnittes. Die Problematik von hohen Ausfallraten in der Sequenzierung aufgrund fehlerhafter *library*-PCRs lässt sich auch aus den Ergebnissen früheren Studien schlussfolgern. Bei der Analyse verschiedener Probenahmetechniken zur Mikrobiomanalyse von Rohmilch wendeten beispielsweise Metzger et al. (2018) 40 Zyklen in der *library*-PCR an, jedoch verdeutlichte eine Ausfallrate von 60%, 55% bzw. 17% die verhältnismäßig hohe Wahrscheinlichkeit einer ineffizienten PCR. Weiterhin postulierten Lima et al. (2018) ein Verlust von ca. 18% der zu untersuchenden Rohmilchproben infolge misslungener PCR Reaktionen, welcher bei Proben mit geringer

Keimzahl aus gesunden Herden im Vergleich zu jenen mit klinischer Mastitis verstärkt auftrat. Ähnlich dazu wurde in Studien zur Sequenzierung von Muttermilch, die eine zu frischer Kuhmilch vergleichbar geringe bakterielle Belastung von 2 – 6 log KbE/ml aufweist (Jost et al., 2013; Cacho et al., 2017), über nicht ausreichende Mengen an Amplifikat nach der *library*-PCR berichtet (Sakwinska et al., 2016; Schwab et al., 2019). Die Daten aus den untersuchten Rohmilchproben in dieser Arbeit demonstrierten schließlich das dringende Erfordernis der Reduktion eukaryotischer DNA durch Enzym-basierte, selektive Abreicherung, um einen verhältnismäßig höheren Anteil an Bakterien DNA zu erzielen bzw. um eine effiziente und verlässliche *library*-PCR dieser Proben durchführen zu können (Siebert et al., 2021).

Sowohl mit der Methodenoptimierung, als auch der deskriptiven Analyse deutscher Rohmilch bestätigten die Mikrobiomdaten dieser Arbeit die Dominanz Gram-positiver Bakterien (Delbes et al., 2007; Fricker et al., 2011; Lima et al., 2018). Folglich ist der Lyseschritt ausschlaggebend, um die vorhandenen Keimgruppen der äußerst diversen Rohmilchmikrobiota (z.B. Raats et al., 2011; Mallet et al., 2012; Kable et al., 2016; Li et al., 2018) so adäquat wie möglich abzubilden. Mit der Verwendung kommerziell verfügbarer Extraktionskits erfolgte eine vergleichende Analyse zwischen verschiedenen Rohmilchproben mit unterschiedlichen Ausgangskeimzahlen. Nach Erstellung der *library*-PCR zeigte die mechanische (*bead-beating*) gegenüber der reinen enzymatischen Lyse eine deutliche Überlegenheit in Hinblick auf die Amplikon-Quantität, die durch eine zusätzlich Aufreinigung per Säule signifikant erhöht war (Siebert et al., 2021). Unter allen getesteten Extraktionsvarianten wurden die geringsten DNA-Konzentrationen bei den Rohmilchproben mit niedriger initialer Keimzahl festgestellt. Auch Quigley et al. (2012) testeten zuvor diverse methodische Herangehensweisen, um DNA aus Rohmilch und Käse zu isolieren, wobei ein zusätzlicher Hitze- sowie Enzymschritt (Lysozym, Mutanolysin und Proteinase K) für den bakteriellen Aufschluss innerhalb des PowerFood Kits zur signifikanten Erhöhung der DNA-Ausbeute führte. Während *bead-beating* für die Erhöhung der DNA-Ausbeute unerlässlich ist, demonstrierte die vergleichende Mikrobiomanalyse auch in dieser Arbeit das Erfordernis einer Enzym-basierten Lyse. Dies betraf insbesondere die Gattungen *Staphylococcus* und *Streptococcus*, die als Kommensale der Eutermikrobiota sehr häufig in Rohmilch vorkommen (Derakhshani et al., 2018a) und mit vergleichsweise höheren relativen Abundanzen auftraten, nachdem die DNA Isolation mit kombinierter (Enzyme + *bead-beating*) Lyse erfolgte (Siebert et al., 2021). Äquivalent dazu wurden durch den Verdau mit Mutanolysin in Kombination mit *bead-beating* zuvor bei der DNA Isolation human-assoziiertes Spezies ebenfalls höhere relative Anteile von *Staphylococcus* und *Streptococcus* detektiert (Yuan et al., 2012). Weiterhin beobachteten

Dahlberg et al. (2019) und Doyle et al. (2017a) eine Unterrepräsentation von Milchsäurebakterien bzw. Gram-positiven Taxa in Milchproben infolge einer fehlenden enzymatischen Lyse. Ohne den Einsatz einer mechanischen Lyse hingegen, wurden methodische Verzerrungen von Gram-positiven Keimen der beiden Phyla *Actinobacteria* und *Firmicutes* festgestellt (Biesbroek et al., 2012; Lazarevic et al., 2013; Breitenwieser et al., 2020; Siebert et al., 2021).

Mit der vergleichenden Evaluierung verschiedener Prinzipien zur Extraktion von bakterieller DNA aus Rohmilch konnte schließlich gezeigt werden, dass die Methode das detektierte mikrobielle Profil erheblich beeinflusst und somit die Mikrobiomanalyse verfälschen kann. Mit dem Ziel für eine erfolgreiche Sequenzierung ausreichend DNA-Mengen zu isolieren und gleichzeitig die Effizienz in der *library*-PCR zu steigern, sind im Rahmen dieser Optimierung zwei Vorbehandlungsschritte hervorgegangen: (i) Separation der Bakterienzellen: EDTA-Behandlung der Rohmilch vor der initialen Zentrifugation; (ii) Reduktion der eukaryotischen DNA: enzymatische, selektive Lyse per Proteinase K und DNase I. Um höhere DNA-Ausbeuten zu bewirken aber auch um die Diversität von Rohmilchmikrobiota möglichst breit, ausgeglichen und akkurat abzudecken, erwies sich die Kombination aus enzymatischer Lyse (Lysozym, Mutanolysin und Proteinase K für 0,5 h) und mechanischem Verdau per *bead-beating* (6 x 6.5 m/s, FastPrep-24TM) unter Verwendung des PowerFood Kits bei den untersuchten Rohmilchproben als geeignet (Siebert et al., 2021).

1.2 Zyklenzahl in der *library*-PCR zur Erstellung der Sequenzierbibliothek

Im Anschluss an die DNA-Extraktion ist die Vervielfältigung der Ziel-DNA zur Erstellung der Sequenzierbibliothek ein unverzichtbarer Bestandteil der Amplikon-Sequenzierung. Die Erhöhung der Zyklen für die Amplifikation des 16S rRNA-Gens im ersten Schritt der Zwei-Stufen basierten *library*-PCR resultierte in einer deutlichen Verzerrung der analysierten Biodiversität sowie der Verteilung der relativen Anteile der einzelnen Taxa (Siebert et al., 2021).

Die steigende Zyklenzahl im ersten PCR Schritt ging mit einer stetigen Abnahme der alpha-Diversität und einer signifikanten Reduktion mit ≥ 30 Zyklen einher, äußerte sich in einer verminderten Reproduzierbarkeit der technischen PCR-Replikate und zeigte eine Verschiebung der detektierten Biodiversitätsmuster (Siebert et al., 2021). Die Verzerrung des mikrobiellen Profils in der PCR könnte die Folge aus Unterschieden in der Amplifikationseffizienz der Ziel-DNA taxonomischer Spezies, den variierenden Anteilen innerhalb einer artenreichen

Mikrobiota oder Zusammenspiel dieser Faktoren sein (Polz und Cavanaugh, 1998; Gonzalez et al., 2012; Gohl et al., 2016). So nahmen Gonzalez et al. (2012) an, dass mit der PCR einer komplexen bakteriellen Gemeinschaft die Amplifikation hochfrequenter Spezies begünstigt wird und parallel dazu eine Unterrepräsentation weniger prävalenter Gattungen erfolgt (Siebert et al., 2021). Es ist nicht unwahrscheinlich, dass dieser Effekt durch eine hohe Anzahl an PCR-Zyklen potentiell verstärkt wird, der auch in den vorliegenden Mikrobiomanalysen beobachtet wurde. Bei einem Vergleich der relativen Abundanzen der sequenzierten Gattungen zeigte *Pseudomonas* in der untersuchten Rohmilchprobe eine Abnahme um ca. 10% durch die Erhöhung der Zyklenzahl von 15 auf 35 (Siebert et al., 2021). Mit Erhöhung der DNA Konzentration und PCR-Zyklenzahl stellten Gohl et al. (2016) ebenso eine Abnahme der Spezies *Pseudomonas aeruginosa* fest, ermittelte jedoch auch eine Zunahme der relativen Abundanzen von *Bacteroides vulgatus* und konstant bleibende Anteile von *Escherichia coli*, was insgesamt die speziesspezifischen Unterschiede deutlich macht. McGovern et al. (2018) untersuchten die Veränderung der relativen Zusammensetzung einer Mock Community bestehend aus pansenassoziierten Spezies und beobachtete eine Zunahme des unspezifischen Hintergrundes mit 28 Zyklen im Vergleich zu 20 Zyklen. Dadurch konnte die niedrigere Zyklenzahl als ausreichend nachgewiesen werden, um die Spezies per Amplikon-Sequenzierung zu detektieren und möglichst realistisch abzubilden. Darüber hinaus können Sequenzierfehler auftreten oder zur Bildung und chimären Sequenzen kommen (Wang und Wang, 1997; Sze und Schloss, 2019), was durch hohe Zyklenzahlen mit vielen Amplifikationsrunden in der *library*-PCR tendenziell eher verstärkt sein könnte (Siebert et al., 2021).

Die Herausforderung bei der Optimierung der *library*-PCR bestand darin, einerseits ausreichende Amplikon-Mengen zu generieren, andererseits aber auch dem Verlust an Biodiversität und der PCR-Selektion einzelner Taxa bestmöglich vorzubeugen. Die Daten zeigten, dass die Durchführung von 20 Zyklen in der 1. PCR und 10 Zyklen in der 2. PCR eine angemessene Option darstellt. Schließlich wurde weiterhin abgeleitet, dass das Poolen paralleler PCRs ein effektiver Weg ist, um die DNA Ausbeute für die Sequenzierung zu erhöhen und die Variation durch den Amplifikationsprozess zu verringern (Siebert et al., 2021).

2. Die Mikrobiota von Rohmilch deutscher Erzeugerhöfe

Komplexe bakterielle Gemeinschaften haben einen entscheidenden Einfluss auf die mikrobiologische Qualität und Hygiene von Rohmilch. In der Wertschöpfungskette von Milch

und Milchprodukten beginnt der Eintrag bakterieller Kontaminationen in der Primärproduktion auf Ebene des Erzeugerhofes. Zur Mikrobiota von Rohmilch deutscher Erzeugerhöfe gibt es jedoch keine umfassende Studie. Daher wurde in diesem Teil der Arbeit zunächst der Status quo der Rohmilchmikrobiota von Milchviehbetrieben in Nord- und Süddeutschland per Amplikon-Sequenzierung erfasst. Basierend auf den erhobenen Mikrobiomdaten wurde anschließend analysiert, inwiefern hofseitige Faktoren die bakterielle Zusammensetzung der Rohmilch determinieren.

2.1 Zusammensetzung der Rohmilchmikrobiota

Das detektierte Rohmilchmikrobiom, welches aus der Analyse von insgesamt 930 Rohmilchproben hervorging, zeigte eine außerordentlich breite und heterogene Biodiversität. Ein Großteil der Taxa trat mit einer relativen Abundanz <1% nur in Spuren auf, was die Beobachtungen vorausgegangener Studien zur Rohmilchmikrobiota untermauerte (Quigley et al., 2013b; Kable et al., 2016; Li et al., 2018). Die Hauptfraktionen bildeten die vier Phyla *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria* und *Bacteroidetes*, eine taxonomische Zusammensetzung, die in der Vergangenheit bereits vielfach beschrieben wurde (Raats et al., 2011; Ganda et al., 2016; Taponen et al., 2019; Breitenwieser et al., 2020). Demnach sind neben den sehr spezifischen, studienabhängigen Analysen einzelner Taxa im Core-Mikrobiom in Milch bestimmte Strukturen auf verschiedenen taxonomischen Ebenen immer wieder zu finden. Dabei bilden die Gram-positiven *Firmicutes* in frisch ermolmener Milch das mit Abstand prävalenteste Phylum. Ein wesentlicher Grund dafür ist die Mikrobiota verschiedener Nischen des Euters (Strichkanal, Zitze, Euter- und Zitzenhaut), die durch Vertreter dieses Taxons dominiert wird (Derakhshani et al., 2018a; Fretin et al., 2018; Falardeau et al., 2019). Da zur originären Eutermikrobiota auch *Corynebacterium* spp. zählen (Porcellato et al., 2020), war deren Dominanz mit der höchsten relativen Abundanz nicht verwunderlich. In vorangegangenen, kombinierten kulturabhängigen und -unabhängigen Untersuchungen von frischer Hofmilch wurde außerdem eine stabile Hintergrundmikrobiota aus vorwiegend Gram-positiven Gattungen mit einem hohen G+C Gehalt wie beispielsweise *Corynebacterium* sowie Taxa der Ordnung *Lactobacillales* nachgewiesen (Delbes et al., 2007; Fricker et al., 2011). Die Milchsäurebakterien waren auch in dieser Arbeit stark vertreten, wobei unter den 6 detektierten Gattungen der MSB im Core-Mikrobiom *Streptococcus* insgesamt mit der höchsten Abundanz und der größten Streubreite das dominanteste Taxon der Rohmilchmikrobiota darstellte. Früheren Berichten zufolge, wurden die Gattungen *Streptococcus*, *Enterococcus* oder auch *Lactococcus* in roher Kuhmilch bereits mehrfach als

abundanteste Milchsäurebakterien nachgewiesen (Vacheyrou et al., 2011; Kable et al., 2016; Skeie et al., 2019). Vergleichsweise höchst prävalent waren auch die Staphylokokken, die in der Literatur nicht nur als abundante Keimgruppe in boviner Rohmilch beschrieben, sondern auch als vorherrschendes Taxon in humaner Muttermilch detektiert wurden (Heikkila und Saris, 2003; Jost et al., 2013). Während in dieser Studie ca. 50% der OTUs den sechs Gattungen *Streptococcus*, *Corynebacterium*, *Romboutisa*, *Lactococcus*, *Staphylococcus* und *Pseudomonas* zugeordnet wurden, so machten gegensätzlich dazu bei Li et al. (2018) *Bacillus*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas* und *Lactococcus* mehr als die Hälfte der detektierten 16S rRNA-Gensequenzen aus. Darüber hinaus definierten Li et al. (2018) interessanterweise ein minimales Core-Mikrobiom bestehend aus nur zwei Gram-negativen Gattungen: *Pseudomonas* und *Acinetobacter*. Obwohl *Pseudomonas* zu den 6 abundantesten Keimgruppen des Gesamtmikrobioms zählte, so wurde dennoch in dieser Arbeit, gegensätzlich zu den Daten von Li et al. (2018), eine insgesamt niedrige, relative mediane Abundanz und ein Ausbleiben dieses Taxons im Core-Mikrobiom ermittelt. Kritische Faktoren sind die Lagerdauer der Rohmilch im Hoftank vom Melken bis zur Probenahme sowie die Zeitspanne bis zur Bearbeitung der Proben, da eine längerfristige Kühlung von Rohmilch zu einer Verschiebung der Mikrobiota und einer höheren Abundanz der Gram-negativen Taxa führen kann (Rasolofo et al., 2010; Fricker et al., 2011). Da Li et al. (2018) darüber keine Angabe machten, könnte das eine der Ursachen für die beobachtete Diskrepanz sein. Obgleich *Pseudomonas* in der untersuchten Rohmilch nicht im Core-Mikrobiom vertreten war, so verdeutlichte deren, zu den Gram-positiven Keimen analoge, breite Streuung die hohe Variabilität, was mit den Ergebnissen von Kable et al. (2016) übereinstimmte. Schließlich geht diese Beobachtungen mit hohen Schwankungen der mikrobiologischen Rohstoffqualität einher was aufgrund des späteren enzymatischen Produktverderbs (von Neubeck et al., 2015; Stoeckel et al., 2016) von enormer wirtschaftlicher Bedeutung für milchverarbeitende Unternehmen ist.

Obwohl die sequenzierten Rohmilchproben von Höfen aus den unterschiedlichsten Regionen Deutschlands stammten und diversen Produktions- und Haltungsbedingungen unterlagen, so konnte dennoch ein Core-Mikrobiom mit 15 Gattungen in 95-99% der Proben definiert werden. Die prävalentesten Taxa des Core-Mikrobioms von Rohmilch aus deutschen Höfen umfassten 3 Phyla und 11 Familien mit insgesamt 15 verschiedenen Gattungen. Bei der Untersuchung von knapp 900 Anlieferungsmilchproben im Rahmen einer amerikanischen Studie definierten Kable et al. (2016) ein Core-Mikrobiom bestehend aus 29 Taxa auf Gattungsebene. Nur etwa 50% dieser klassifizierten Familien wurden im Core-Mikrobiom der vorliegenden Mikrobiomdaten wiedergefunden. Ein entscheidender Parameter zum Vergleich von

Rohmilchmikrobiom Daten verschiedener Studien ist die Auswahl der OTUs und damit der Umfang und die Tiefe der analysierten Biodiversität. Während der Wert zur OTU-Selektion in der vorliegenden Arbeit auf 0,25% gesetzt wurde, so lag dieser in der Analyse durch Kable et al. (2016) bei 0,005% und höchstwahrscheinlich die bei Weitem größere, detektierte Vielfalt begründet. Natürlich können darüber hinaus methodisch bedingte Unterschiede wie z.B. die DNA-Extraktion, die Auswahl der V-Regionen des 16S rRNA-Gens für die Sequenzierung oder auch die Datenanalyse einen massiven Einfluss auf Resultate der Mikrobiomanalyse haben (Abellan-Schneyder et al., 2021; Siebert et al., 2021). Somit ist ein detaillierter Vergleich der Rohmilchmikrobiota zwischen verschiedenen Studien prinzipiell erschwert und muss berücksichtigt werden.

Schließlich bestätigt das detektierte deutsche Rohmilchmikrobiom eine ausgesprochen breite Biodiversität. Die Aufschlüsselung der Zusammensetzung der bakteriellen Gemeinschaften zeigte starke Unterschiede zwischen der Mikrobiota von Milchproben die eindeutig von einer Gattung dominiert wurden und anderen mit einem ausgewogeneren Profil. Dies verdeutlichte erhebliche Schwankungen in der mikrobiologischen Qualität frischer Rohmilch, die maßgeblich durch den mikrobiellen Transfer von der Melkumgebung in die Milch bestimmt wird.

2.2 Einfluss hofseitiger Faktoren auf Indikatorkeime der Rohmilchhygiene

Um die determinierenden Faktoren für die Zusammensetzung der Rohmilchmikrobiota zu bestimmen, wurden potentielle Einflussfaktoren aus dem Umfeld der Milcherzeugung untersucht. Im Fokus stand zum einen der Nord-/Süd-Vergleich sowie der Effekt von Produktionsart, Tierhaltung, Melksystem und Kühlung / Lagerung auf die sequenzierte Biodiversität sowie die relative Abundanz von Taxa, die mit dem Milchverderb assoziiert sind und relevante Keime der Melk- und Anlagenhygiene darstellen.

Nach der Einteilung des gesamtdeutschen Datensatzes in kleinere Regionen wurden keine eindeutigen Unterschiede in der mikrobiellen Komposition zwischen Rohmilch aus nord- und süddeutschland festgestellt, die rein aus der geographischen Lage resultierten. Dies ist in Übereinstimmung mit Literaturdaten von Fricker et al. (2011), die sowohl Hof- als, auch Molkereimilch aus Deutschland und Norwegen untersuchten und keine Gruppierung der Proben aufgrund ihrer Herkunft ableiten konnten. Trotz des Vorhandenseins eines Core-Mikrobioms erschien die taxonomische Diversität dennoch sehr dynamisch. Unterschiede in der Balance der Gattungen *Streptococcus* und *Pseudomonas*, welche die größte Varianz im

Datensatz auf sich vereinten, demonstrierten vielmehr regionale und damit auch molkereichspezifische Unterschiede. Die Mikrobiota innerhalb eines Hofes und damit einer Herde erschien bei Mikrobiomanalysen in der Vergangenheit weitestgehend konstant und unterliegt Veränderungen z.B. durch die Dysbiose der Eutermikrobiota aufgrund einer Mastitis-Infektion in der Herde (Albonico et al., 2020; Porcellato et al., 2021). Gegensätzlich zu den Ergebnissen dieser Studie postulierten Skeie et al. (2019) zwar geographische Unterschiede, jedoch basierte die Hypothese auf der Analyse von 45 Erzeugerhöfen aus zwei verschiedenen Molkereien. Im Vergleich dazu umfasste der Datensatz der erhobenen Mikrobiomdaten in der vorliegenden Arbeit Rohmilchproben von 313 verschiedenen Milchviehbetrieben, die deutschlandweit an insgesamt 14 Molkereien geliefert wurden. Dies veranschaulicht die Vielschichtigkeit und überaus hohe Komplexität dieser Daten, die sich aus der Summe aller beeinflussender Faktoren auf verschiedenen Ebenen der Milcherzeugung ergab. Um hofseitige Einflussfaktoren zu charakterisieren und die Überlagerung verschiedener Faktoren im Datensatz zu reduzieren, wurde dieser im Folgenden aufgespalten. Schließlich wurden hofseitige Faktoren der Haltungs- und Produktionsbedingungen untersucht, die eine bessere Vergleichbarkeit zwischen den diversen Erzeugerhöfen ermöglichten.

2.2.1 Produktionsart und Tierhaltung als Einflussfaktoren

Das System der ökologischen Milcherzeugung und der Konsum daraus resultierender Milchprodukte gewann in den letzten Jahren zunehmend an Popularität. In diesem Zusammenhang ist die Tierhaltung ein wichtiger Aspekt im Vergleich zwischen dem konventionellen und ökologischen Hofmanagement. Somit wurden neben der Produktionsart die drei häufigsten Haltungsformen Laufstall, Laufstall+Weide und Anbindehaltung verglichen. Analysiert wurden Assoziationen zwischen diesen Faktoren und deren Auswirkungen auf die bakteriellen Gemeinschaften der Rohmilchmikrobiota.

Obwohl damit die mikrobielle Zusammensetzung weitgehend unbekannt bleibt, ist die bakterielle Gesamtkeimzahl von Anlieferungsmilch einer der wichtigsten Qualitätsindikatoren, der direkt mit dem Milchpreis korreliert. Bei der Detektion der absoluten Zellzahl per Durchflusszytometrie (IBC/ml) wurden auch die anaeroben und nicht kultivierbaren Keime gemessen, weshalb die Werte in dieser Arbeit deutlich über dem gültigen Grenzwert der aeroben, mesophilen Keimzahl für deutsche Anlieferungsmilch von $\leq 5 \log \text{KbE/ml}$ (EU-Verordnung, 2004) lagen. Ein Unterschied von vier log-Stufen zwischen minimaler und maximaler Zellzahl demonstrierte immense Unterschiede in der bakteriellen Rohmilchzusammensetzung und deckte sich mit der Beobachtung zu der taxonomischen

Diversität, die mit Zunahme der Keimzahl abnahm. Eine vergleichbare Heterogenität in der absoluten Zellzahl wurde in einer norwegischen Studie gezeigt (Porcellato et al., 2021). Daneben wurde dies in einer Vielzahl weiterer Analysen beobachtet, die sich zwar auf die gängige aerobe, mesophile GKZ bezogen aber dennoch die Variabilität in der mikrobiologischen Rohmilchqualität sichtbar machten (Fricker et al., 2011; Mallet et al., 2012; Skeie et al., 2019). Eine hochsignifikant reduzierte Keimzahl, die gleichzeitig mit einer ebenso signifikanten breiteren alpha-Diversität einherging, äußerte sich einerseits bei ökologischer Rohmilch und andererseits bei Rohmilch aus Weidehaltung gegenüber jenen aus Laufstall oder Anbindehaltung. Die Haltungsumgebung als primärer Einflussfaktor auf die Zusammensetzung der Rohmilchmikrobiota und eine Erhöhung der alpha-Diversität durch Weidehaltung wurde bereits in früheren Untersuchungen publiziert (Doyle et al., 2017a; Carafa et al., 2020). Bei Analysen von Doyle et al. (2017a) resultierte die Freilandhaltung in einer Erhöhung der Biodiversität des Eutermikrobioms, wohingegen, jedoch ohne vorherige Euterreinigung, eine Erhöhung der bakteriellen GKZ bei Rohmilch aus Stallhaltung detektiert wurde. Bei dem Melkprozess stellt die Zitzen- und Euterhaut erwiesenermaßen die erste Hauptquelle bakterieller Kontaminationen von Rohmilch dar (Rainard, 2017; Derakhshani et al., 2018a). Durch die Grünflächen der Weidehaltung sind Kühe im Vergleich zur Stallhaltung einer größeren Vielfalt an verschiedenen Habitaten mit einer zweifelsohne höheren Biodiversität ausgesetzt. Demzufolge ist die Transmission einer dadurch bedingten diverseren Eutermikrobiota in die Rohmilch durchaus eine Erklärung für die Diskrepanz in der Biodiversität. Insgesamt lagen Gram-positive Gattungen wie *Lactococcus*, *Streptococcus* und *Staphylococcus* sowie *Pseudomonas* als dominantestes Gram-negatives Taxon in den Laufstallproben weitaus abundanter vor. Äquivalent dazu war die Beobachtung von Carafa et al. (2020), bei der eine Dominanz von *Staphylococcus* und *Pseudomonas* als Folge des permanenten Stallaufenthalt erklärt wurde, nachdem diese in früheren Studien zu den abundanten Gattungen zählten, die aus Staubproben von Milchviehbetrieben isoliert und in Aerosolen detektiert wurden (Dungan, 2012; Pfister et al., 2017). Neben einem Trend zu höheren bakteriellen Zellzahlen, resultierte eine durchgehende Anbindehaltung in einem höheren relativen Anteil von *Corynebacterium* sowie Taxa die typischerweise mit dem Rumen der Kuh (*Lachnospiraceae*), dem Gastrointestinaltrakt (*Turicibacter*) oder Silage als Futtermittel (*Clostridium* XI) assoziiert sind. Die detektierten Vertreter der *Enterobacteriaceae* hingegen waren zwar durch geringe relative Abundanzen in der Gesamtheit eher unbedeutend, zeigten jedoch im Schnitt den höchsten Anteil in Rohmilch aus Anbindehaltung. Die signifikante Erhöhung von *Corynebacterium* in Rohmilch aus Anbindehaltung und die parallel

dazu gespiegelte Reduktion von *Staphylococcus* könnte das Resultat einer negativen Korrelation dieser Gattungen sein (Porcellato et al., 2020). Verstärkte Fäkalkontamination bei Anbindehaltung hingegen ist sehr wahrscheinlich auf die fehlende räumliche Trennung in die Funktionsbereiche Fressen, Liegen und Melken zurückzuführen. Konsistent mit den detektierten Keimzahlen ist das Resultat einer Studie von Vacheyrou et al. (2011), bei der aus Anbindehaltung eine generell verstärkte Kontamination der Milch hervorging. Erstaunlicherweise zeigten die Indikatorkeime für fäkale Melkverunreinigungen in Rohmilch aus reiner Laufstallhaltung die niedrigsten Abundanzen. Ein möglicher Grund für höhere Anteile dieser Keime aus Weidehaltung und ökologischer Erzeugung könnten die kumulativen, relativen Anteile als Resultat der Sequenzierung sein. Mit einem sequenzierten Maximum von 100% pro Probe bedingen hohe Abundanzen einzelner Taxa zwangsweise die Reduktion weniger abundanter Taxa. Die insgesamt ausgewogenere Verteilung der Biodiversität mit weniger starken Ausreißern (Ö und LW), könnte im Umkehrschluss zu höheren Anteilen einzelner Taxa am Gesamtmikrobiom geführt haben. Eine signifikant höhere Transmission von bodentypischen Bakteriengattungen wie *Rhizobium* oder *Stenotrophomonas* erfolgte hingegen entsprechend den Daten aus Doyle et al. (2017a) durch Freilandhaltung. Unterschiede, welche den signifikanten Effekt zwischen ökologischer und konventioneller Erzeugung ausmachten sind sehr wahrscheinlich auch in den weniger abundanten Taxa (<0,5%) zu finden, deren Anteil bei ökologisch produzierter Milch um ca. 4% höher war.

Schließlich kann ein Zusammenhang zwischen Biodiversität und ökologischer Produktion bzw. Weidehaltung abgeleitet werden. Allerdings stammten ca. ein Drittel der konventionellen Proben ebenso aus Weidehaltung, was vermuten lässt, dass sehr wahrscheinlich eine Vielzahl weiterer extrinsischer aber auch intrinsischer Faktoren, die im Rahmen dieser Studie nicht erfasst werden konnten, zu den detektierten Unterschieden in der Erzeugung beitrugen. Darunter beispielsweise die Tatsache, dass Eigenschaften der Milch und insbesondere der Milchfettanteil indirekt zur Variation der mikrobiellen Zusammensetzung von Rohmilch beitragen (Albonico et al., 2020; Gomes et al., 2020). Ob dies mit der Haltungsform zusammenhängt, konnte demnach in dieser Studie nicht untersucht werden. Andere Autoren stellten fest, dass die Gabe von Kraftfutter und Interventionen mit Antibiotika in konventionellen Betrieben die rumen- und darmassoziierte Biodiversität negativ beeinflussten (Thomas et al., 2017; Zhang et al., 2017), was sich folglich auch in den Kontaminationskeimen widerspiegeln könnte. Allerdings wiesen Gomes et al. (2020) bei einem Vergleich der beiden Landwirtschaftssysteme lediglich eine signifikant höhere Biodiversität im Fäzes der Kuh aus ökologischer Haltung nach, nicht aber bei der entsprechenden Rohmilch. Gegensätzlich dazu,

kann anhand der Ergebnisse aus dieser Studie angenommen werden, dass die bakterielle Keimzahl, die Biodiversität und die relativen Abundanzen einzelner Taxa durch Produktionsart (ökologisch vs. konventionell) modifiziert werden und ein Zusammenhang mit der Tierhaltungsform besteht.

2.2.2 Melksystem und der Kühlung als Einflussfaktoren

Der Melkvorgang ist ein komplexes Geschehen, der aus hygienischer Sicht zum Ziel hat, die Einflussfaktoren möglichst gering zu halten, um mikrobielle Kontaminationen zu vermeiden und die Eutergesundheit nicht zu gefährden. Die mikrobiellen Reservoirs des Strichkanals, der Zitze und der Euterhaut stehen beim Melkvorgang im direkten Kontakt mit der Rohmilch und sind demnach maßgeblich an der bakteriellen Zusammensetzung der Rohmilchmikrobiota beteiligt (Derakhshani et al., 2018a; Fretin et al., 2018). Folglich ist neben der Umfeldhygiene vor allem die Melkhygiene ein entscheidender Faktor, um das Übertragungsrisiko von Keimen in die Rohmilch zu reduzieren. Deshalb wurden die bakteriellen Keimzahlen sowie die Biodiversität der drei gängigen Melksystemen in Deutschland verglichen: automatisches Melksystem (AMS), Melkstand (MS) und Rohmelkanlage (R).

Unter den beiden Hauptmelksystemen zeigte Rohmilch von Höfen mit AMS gegenüber des MS signifikant höhere absolute Gesamtkeimzahlen. Gleichzeitig wurde eine minimale Erhöhung der durchschnittlichen somatischen Zellzahl detektiert, bei der jedoch nur einzelne Höfe nicht dem zulässigen Grenzwert der gesetzlichen Regularien mit ≤ 400.000 somatischen Zellen/ml (EU-Verordnung, 2004) entsprachen. Ein Trend zu leicht erhöhten bakteriellen Zellzahlen unter Einsatz eines Melkroboters (Klungel et al., 2000; de Koning et al., 2003; Skeie et al., 2019) ist höchstwahrscheinlich primär auf Probleme im automatisierten Reinigungsprozess zurückzuführen. Es bedeutet, dass keine Anpassung an die Anforderung des Verschmutzungsgrades des Euters erfolgt und eine visuelle Begutachtung des Euters vor dem Melkverfahren ausbleibt (Jacobs und Siegford, 2012; Hogenboom et al., 2019). Da bei einem AMS die Kühe nicht an feste Melkzeiten gebunden sind, kann ein anderer Grund der kontinuierliche Zufluss von warmer Milch in den Lagertank sein, was in der Kombination von mehreren Faktoren die bakterielle Proliferation begünstigen kann (Hogenboom et al., 2019). Im Mikrobiom erzielte die Familie der *Streptococcaceae* die höchste Varianz innerhalb der betrachteten Rohmilchproben. Höchste Abundanzen erreichten die Gattungen *Lactococcus* und *Streptococcus*, was aufgrund von Beobachtungen in früheren Studien nicht überraschend war (Quigley et al., 2013a; Derakhshani et al., 2018a; Fretin et al., 2018). Quantitativ von Bedeutung war dabei die Gattung *Streptococcus* bei den AMS-Proben, die mit dem signifikant

höchsten Median von 13% und einem relativen Anteil von insgesamt >20% mit Abstand die größte Fraktion ausmachte. Als Teil der Core-Mikrobiota wurde *Streptococcus* spp. in nahezu jeder Probe detektiert und zeigte mit 44 verschiedenen OTUs eine breite gattungsinterne Artenvielfalt. Dies könnte die Folge verschiedenster Kontaminationsquellen im Umfeld der Milchgewinnung sein, was zu einer immensen Komplexität der mikrobiellen Gemeinschaften führt (Skeie et al., 2019). Nach der Hypothese von Skeie et al. (2019) erweitert die individuelle Mikrobiota eines jeden Individuums innerhalb einer Herde die Vielfalt der detektierten OTUs. Andere Autoren berichteten, dass die Mikrobiota des Kuheuters erheblich variierte, unabhängig von dessen Entzündungsstatus (Kuehn et al., 2013; Oikonomou et al., 2014; Derakhshani et al., 2018b). Daraus kann ein möglicher kausaler Zusammenhang zwischen der Zunahme des Tierbestandes und der Erhöhung der intraspezifischen Diversität abgeleitet werden, wodurch auch höhere Anteile einzelner Taxa resultieren könnten. Zwei Drittel der AMS-Proben dieser Arbeit stammte von großen Erzeugerhöfen mit einer Liefermenge >500.000 Liter/Jahr, weshalb das automatische Melksystem durchaus mit einem größeren Tierbestand assoziiert werden kann und die Überschneidung der signifikant höheren relativen Anteile von *Streptococcus* spp. begründet.

Das Taxon *Streptococcus* enthält kommensale aber auch pathogene Spezies, die verschiedene Nischen im Produktionsumfeld der Molkerei und hauptsächlich auf dem Kuheuter besiedeln (Facklam, 2002; TRBA 466, 2015; Derakhshani et al., 2018a). Signifikante Unterschiede zwischen den AMS Proben im Vergleich zu den beiden anderen Melksystemen ergaben sich bei einer detaillierteren Analyse der OTUs. Die Sequenzen der abundantesten OTUs wurden der Art *S. thermophilus/salivaris/vestibularis* zugeordnet. *S. thermophilus* ist ein klassischer Kulturkeim der Milchindustrie (Quigley et al., 2013b), welcher in der Vergangenheit immer wieder aus Rohmilch isoliert wurde (Delbes et al., 2007; Giannino et al., 2009; Raats et al., 2011). Da aus der Sequenzierung der V3+V4 Region eine verwertbare Sequenzlänge von nur 445 Bp resultierte, konnte lediglich ein Bruchteil der ca. 1.500 Bp langen 16S rRNA-Gensequenz (Janda und Abbott, 2007) abgeglichen werden. Demnach erfolgte zwar keine valide Klassifizierung, jedoch konnte eine Tendenz gefolgert werden. Der technische Erfolg der Euterhygiene ist eine der größten Herausforderungen im AMS (Jacobs und Siegford, 2012; Hogenboom et al., 2019) und ist möglicherweise ein bedeutender Aspekt, der den insgesamt höheren Eintrag von *Streptococcus* Spezies in die Rohmilch begünstigte. So beobachteten z.B. Jago et al. (2006) bei 130 Reinigungsperioden im AMS einen Misserfolg von >30%. Auch in anderen Studien zur Charakterisierung des Milchmikrobioms brachte *S. thermophilus* die höchsten relativen Abundanzen hervor, die sich jedoch in Abhängigkeit der

Rinderrasse stark unterschieden (Cremonesi et al., 2018; Curone et al., 2018). Demzufolge ist die Rasse der Milchviehherde ein weiterer potentieller Einflussfaktor auf die Verteilung der *Streptococcus* Spezies, der im Rahmen dieser Arbeit nicht erhoben wurde.

Durch die Kategorisierung der Rohmilchproben nach Hofgröße hingegen wurden die Abundanzen der OTUs beeinflusst, deren Sequenzen beim Datenbankabgleich mit zwei umwelt- und kuhassoziierten Mastitiserregern *S. porcinus/uberis* und *S. dysgalactiae* übereinstimmten. Bakterielle Kreuzkontaminationen über das Melkgeschirr sowohl bei dem automatisierten Melksystem (Hogenboom et al., 2019), als auch bei dem konventionellen Melkstand sind dabei denkbar. Bei Anbindehaltung mit Rohrmelkanalge, vorwiegend in kleinen Betrieben, können die Tiere keinem Sozial- und Komfortverhalten nachgehen und besitzen einen festen Melkplatz. Dadurch ist die Wahrscheinlichkeit der direkten Übertragung vermindert, was bei den Proben dieser Arbeit jedoch mit entsprechend höheren Anteilen von rumen- und fäzesassoziierten Keimen einherging. Obwohl *S. uberis* als potentiell pathogener Keim auch schon mit einer hohen Prävalenz in nicht infizierten Herden gefunden wurde (Oikonomou et al., 2014), so lassen die Ergebnisse vermuten, dass mit zunehmender Herdengröße und die dadurch bedingten, charakteristischen hofseitigen Bedingungen, nicht nur die Prävalenz der originären Euterkeime zunimmt sondern auch die Dynamik, die Wahrscheinlichkeit der Verbreitung und der Invasionsdruck von Mastitiserregern in einer Herde steigt.

Während die Art des Melksystems keine Unterschiede in der Prävalenz der Gram-negativen Gattungen *Pseudomonas* und *Acinetobacter* als abundanteste Vertreter der *Proteobacteria* hervorbrachte, so erhöhte die Anwendung eines Durchlaufkühlers im Vergleich zur Tankkühlung deren Abundanz signifikant. Um schneller die Lagertemperaturen von Rohmilch zu erreichen, erfolgt die Vorkühlung mithilfe eines Plattenwärmetauschers, der durch eine große Oberfläche Ablagerungen aus dem Milchstrom begünstigt. Psychrotolerante Vertreter beider Gattungen wurden bereits aus Biofilmen von Melkmaschinen oder dem Molkereiumfeld isoliert und sind grundsätzlich in der Lage Stahloberflächen zu kolonisieren (Teh et al., 2012; Weber et al., 2019). Durch erschwerte Reinigungsbedingungen einer vielschichtigen Plattenkonstruktion ist die Bildung von Fouling-Schichten vorstellbar. Obwohl Elmoslemany et al. (2010) lediglich eine positive Assoziation zwischen Plattenkühler und der Labor-Pasteurisierungszahl fanden, so ist das ein Hinweis auf mögliche Schwächen dieses Kühlungsprinzips und könnte die insgesamt höheren Keimzahlen in dieser Studie erklären. Da 81% der untersuchten Rohmilchproben von Höfen mit Durchlaufkühler aus großen Betrieben (Liefermenge von >500.000 Liter/Jahr) stammten, sind die signifikant höheren prozentualen

Anteile von *Staphylococcus* und *Streptococcus* sehr wahrscheinlich auf die Summe der charakteristischen Einflussfaktoren zurückzuführen, die zu Auffälligkeiten bei großen Höfen führen. Dies bezieht sich auch auf die Milcherfassung durch die Molkereien, bei dem durch eine zweitägige gegenüber einer eintägigen Abholung eine signifikante Erhöhung der Streptokokken beobachtet wurde. Dagegen war zu erwarten, dass die relativen Anteile einzelner psychrotoleranter Taxa durch eine verstärkte Proliferation infolge einer längeren Kühlagerung zunimmt (Rasolofo et al., 2010; Fricker et al., 2011). Entgegen der Annahme, dass eine frühestmögliche Kühlung die taxonomische Diversität reduziert, zeigte sich bei der Untersuchung der Rohmilch von deutschen Erzeugerhöfen in dieser Studie die zwischengeschaltete Durchlaufkühlung als mögliches Reservoir für den Eintrag psychrotoleranter Taxa.

3. Neubeschreibung bakterieller Taxa

Zur validen Abgrenzung neuer bakterieller Taxa bedarf es der Analyse genomischer, phänotypischer sowie chemotaxonomischer Charakteristika, woraus eine eindeutige Kohärenz der unbekanntenen Isolate hervorgeht, die eine Abgrenzung von den nächsten verwandten, bereits publizierten Taxa begründet. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde sowohl eine neue Gattung (Siebert et al., 2020), als auch eine neue Spezies beschrieben. Die bis dato unbekanntenen Isolate wurden in einer vorangegangenen kulturabhängigen Studie aus Rohmilch-Tankproben isoliert.

3.1 Beschreibung der neuen Gattung *Fundicoccus ignavus* gen. nov., sp. nov.

Zu Beginn der Neubeschreibung der isolierten Stämme WS4937^T, WS4759 und WS5303 erfolgte die phylogenetische Klassifizierung auf Basis der fast vollständigen Sequenz des 16S rRNA-Gens, die bis heute aufgrund der evolutionär hoch konservierten Regionen ein fundamentales Element der prokaryotischen Taxonomie darstellt (Ludwig und Klenk, 2001; Tindall et al., 2010). Während die Einzelgenanalyse die Zugehörigkeit der drei Stämme zu einer Spezies nachwies, so lag die höchste Sequenzidentität von WS4937^T zu den am nächsten verwandten Typspezies *E. coleocola* und *F. hominis* bei <94%, wodurch der Gattungsgrenzwert um mehr als 1% unterschritten wurde (Siebert et al., 2020). Detaillierte Angaben zur Gattungsdemarkation erfolgten durch eine Gruppe um Yarza et al. (2008), die im Zuge des umfassenden Projektes *The All-Species Living Tree* für die Gattungsabgrenzung einen Wert von 94,9% ± 0,4 definierte (Yarza et al., 2008). Diese Analyse basierte auf knapp 7000

geprüften, hochqualitativen 16S rDNA-Typstammsequenzen, welche die Rekonstruktion der prokaryotischen, phylogenetischen Beziehungen ermöglichte. Yarza et al. (2008) untermauerten somit den zuvor postulierten Grenzwert von 95,0% (Ludwig et al., 1998) der weiterhin als gängiger minimaler Identitätswert zur Gattungsabgrenzung in der Literatur beschrieben wird (Tindall et al., 2010; Kim et al., 2014). Die Sequenzidentität lag aber auch über $87,5\% \pm 1,3$ (Yarza et al., 2008) und somit weit oberhalb der Familiengrenze. Während die Auflösungskraft der 16S rRNA als valider phylogenetischer Marker zur Speziesabgrenzung in der Literatur diskutiert wird, führen Grenzwerte insbesondere für niedrigere taxonomische Ebenen zu einer zuverlässigen taxonomischen Einordnung (Rosselló-Mora und Amann, 2001; Yarza et al., 2008). Da Grenzwerte notwendig aber nicht ausreichend für die Klassifizierung neuer Taxa sind (Tindall et al., 2010), erfolgte eine phylogenetische Analyse mithilfe eines Maximum-Likelihood-Baumes. Die drei Stämme präsentierten sich mit einer maximalen Bootstrap Unterstützung von 100% ganz klar als robustes Monophylum, auch hier mit *E. coleocola* und *F. hominis* als nächste verwandte Typspezies (Siebert et al., 2020). Mit der Zunahme öffentlich zugänglicher Typstamm- und Typspeziessequenzen gewinnt das Genom aufgrund der hohen Auflösungskraft für die prokaryotische Taxonomie an Bedeutung und rückt immer mehr ins Zentrum von Neubeschreibungen (Whitman, 2015). Demzufolge waren auch alle Typspeziesgenome der *Aerococcaceae* auf NCBI (Federhen, 2012) verfügbar, was die geforderte phylogenomische Einordnung ermöglichte (Chun et al., 2018). Analog zu der phylogenetischen Position, untermauerte die Topologie des UBCG-Baumes unter Einbezug von 92 *housekeeping* Genen die deutliche evolutionäre Abgrenzung von *F. ignavus* gen. nov., sp. nov. als monophyletische Linie und damit die Gattungsdemarkation (Siebert et al., 2020). Gegensätzlich zur ML-Topologie ging aus der phylogenomischen Analyse *G. sanguinis* als nächste verwandte Typezies hervor. Prokaryoten, die auf Ebene des 16S rRNA-Gens einen hohen evolutionären Verwandtschaftsgrad besitzen, können auf Genomebene mit einer insgesamt tieferen Auflösung der evolutionären Prozesse durchaus stärker divergieren und die beobachteten Unterschiede erklären (Ludwig und Klenk, 2001; Whitman, 2015). Daneben erfolgte mithilfe der öffentlichen Datenbank KEGG aus den annotierten Proteinen des Typstammgenoms WS4937^T die Rekonstruktion der Signalwege des Aminosäurekatabolismus, wodurch der zugrundeliegende Phänotyp größtenteils bestätigt wurde. Schließlich eröffnet die Genomsequenz neue Möglichkeiten zur tiefgründigen Analyse biologischer Prozesse (Whitman, 2015) und zur Vorhersage von Biosynthesewegen, wodurch zunehmend die phänotypischen Daten unterstützt bzw. ersetzt werden (Kim et al., 2020; Kulichevskaya et al., 2020; Zhang et al., 2020).

Die paraphyletische Aufspaltung der *Aerococcaceae*, die nach phylogenetischer und phylogenomischer Rekonstruktion mit der neuen Gattung weiterhin bestehen bleibt, spiegelt sich auch in der Morphologie der kokkoiden Zellen wider. Während die Gattung *Aerococcus* zur Teilung in zwei Ebenen befähigt ist und Tetraden bildet, erscheinen die Gen. nov., sp. nov. Stämme sowie alle weiteren Typspezies der Familie mikroskopisch als Einzelzellen, Diplokokken, in kurzen Ketten oder in Gruppen (Williams et al., 1953; Lawson, 2014b; Siebert et al., 2020). Die Aufdeckung phänotypischer Eigenschaften ist für die Abgrenzung einer neuen Art unverzichtbar und in Minimalstandards gefordert (Rosselló-Mora und Amann, 2001; Mattarelli et al., 2014), wohingegen die Auflösungskraft bei höheren taxonomischen Ebenen nachlässt und weniger bedeutend ist. Bei der Beschreibung des Phänotyps wurde für alle drei neuen Stämme kein Wachstum bei 10 °C und 45 °C und kein Umsatz der 47 getesteten Kohlenhydrate unter Säurebildung beobachtet (Siebert et al., 2020). Diese Eigenschaften sind zwar ein variables aber dennoch weit verbreitetes Charakteristikum innerhalb der *Aerococcaceae*, welches auch bei den evolutionär nahe Verwandten *E. colecola* und *F. hominis* beobachtet wurde (Ludwig et al., 2009; Lawson, 2014b). Da die phänotypischen Daten der Typspezies der *Aerococcaceae* hoch variabel sind, zeigten sich Differenzen in diversen Enzymaktivitäten immer zu mindestens einem der nächst verwandten Typstämme. Schließlich untermauerten die phänotypischen Daten einerseits die taxonomische Spezifität und die phylogenetische Einordnung als neue Gattung in die *Aerococcaceae* und ermöglichten andererseits dennoch die Abgrenzung von den am nächsten verwandten Typspezies (Siebert et al., 2020).

Die Einführung chemotaxonomischer Analysen war einer der wesentlichen Meilensteine in der prokaryotischen Taxonomie und ist ein essentieller Bestandteil zur Abgrenzung neuer Taxa innerhalb der Familie *Aerococcaceae* (Rosselló-Mora und Amann, 2001; Mattarelli et al., 2014). Die Analyse des Mureintyps von WS4937^T (A1 α L-Lys-direct) ermöglichte hierbei die Abgrenzung zu der am nächsten verwandten Gattung *Facklamia*, die mit der Mureinstruktur A4 α ein Alleinstellungsmerkmal innerhalb der *Aerococcaceae* aufweist (Ludwig et al., 2009; Lawson, 2014b; Siebert et al., 2020). Als Teil der Chemotaxonomie stellt die Peptidoglykanstruktur ein entschiedenes Merkmal zur Diskriminierung Gram-positiver Taxa dar (Schleifer und Kandler, 1972; Tindall et al., 2010). Das ist insbesondere für eine Gattungsneubeschreibung relevant, da die Übereinstimmung des Peptidoglykanprofil aller Arten einer Gattung notwendig ist, wohingegen dessen Interpeptidbrücken zur Speziesdemarkation genutzt werden kann (Tindall et al., 2010). Als weiteres chemotaxonomisches Abgrenzungsmerkmal zeigte WS4937^T im Vergleich zu den Typspezies

der *Aerococcaceae* lediglich eine Übereinstimmung mit dem polaren Lipid Phosphatidylglycerol. Dadurch unterschied sich die neue Gattung im Lipidprofil sogar klar von allen phylogenetisch am engsten verwandten Spezies (Siebert et al., 2020). Allerdings waren in der Literatur nur Referenzdaten aus der Publikation der neuen Gattung *Suicoccus* (Li et al., 2019) verfügbar. Dies ist darauf zurückzuführen, dass die Zusammensetzung der polaren Lipide für die Neubeschreibung von Taxa der *Aerococcaceae* gemäß Minimalanforderungen (Matarelli et al., 2014) nicht zwingend erforderlich ist und somit eine geringere Unterscheidungskraft aufweist. Die Aussagekraft der Fettsäuren war dagegen sehr viel höher. Während die Fettsäure C_{16:1ω9c} bei WS4937^T den höchsten Anteil hervorbrachte, so wurde diese nur in weiteren drei der acht Typspezies als Hauptkomponente detektiert (Li et al., 2019) und sogar in den nächst verwandten Typspezies entweder in einem geringen Anteil oder gar nicht nachgewiesen. Auch die Hauptfettsäure *Summed feature 5* (C_{18:2ω6,9c}/C_{18:0} ante) von *E. coleocola*, *F. hominis* und *G. sanguinis* zeigte sich als Abgrenzungsmerkmal zu WS4937^T (Li et al., 2019; Siebert et al., 2020). Da die Fettsäureanalyse der *F. ignavus gen. nov., sp. nov.* und der Referenzspezies unter einheitlichen Kultivierungs- und Analysebedingungen erfolgte, erfüllte diese eine essentielle Voraussetzung (Tindall et al., 2010) und war für die Neubeschreibung von *F. ignavus gen. nov., sp. nov.* ein wertvoller chemotaxonomischer Marker.

Schließlich demonstrierten phylogenetische, genomische, phänotypische sowie chemotaxonomische Analysen, dass die Stämme WS4937^T, WS4759 und WS5303 eine eindeutig separierte, monophyletische, kohärente Gruppe bilden, die eine Abgrenzung von den bereits beschriebenen Typspezies begründet. In Anlehnung an die kokkoide Zellform und die Isolationsquelle (frische Rohmilch eines Erzeugerhofes) erhielt die Typspezies den Gattungsnamen *Fundicoccus* (Fun. di. coc'us. L. masc. n. fundus farm; N.L. masc. n. *coccus* (von Gr. masc. n. *kokkos*)) und den Speziesnamen *ignavus* (ig. na'vus. L. masc. adj. *ignavus* inaktiv), der sich auf das Ausbleiben der Säureproduktion aus der Umsetzung von Kohlenhydraten bezieht. WS4937^T ist dabei die Typspezies der neuen Gattung *Fundicoccus ignavus gen. nov., sp. nov.* der Familie *Aerococcaceae* (Siebert et al., 2020).

3.2 Beschreibung einer neuen Spezies *Raineyella sp. nov.*

Das 16S rRNA-Gen ermöglicht die Abgrenzung neuer Taxa von bereits valide beschriebenen Typstämmen und bildet für phylogenomische Analysen bis heute das Grundgerüst der prokaryotischen Taxonomie (Rosselló-Mora und Amann, 2001). Somit wurden auch die

Stämme WS4898^T und WS4899 durch den Sequenzabgleich mit der EzBioCloud Referenzdatenbank zunächst taxonomisch eingeordnet. Mit der höchsten Übereinstimmung des Typstammes WS4898^T zu *Raineyella antarctica* DSM 100494^T lag die 16S rDNA-Identität mit >2% unterhalb der gültigen Speziesgrenze und andererseits oberhalb des Gattungsgrenzwertes (94,5 – 95,0%) (Ludwig et al., 1998; Yarza et al., 2008; Tindall et al., 2010; Yarza et al., 2014). In der Literatur werden zur Speziesdemarkation valide Grenzwerte zwischen 98,7 – 99,0% (Stackebrandt und Ebers, 2006) und 98,65% (Kim et al., 2014) beschrieben. Allerdings wird das Auflösungsvermögen der 16S rRNA-Gensequenz zur taxonomischen Klassifizierung in der Literatur diskutiert und teilweise als nicht zuverlässig angesehen (Ludwig und Klenk, 2001; Rosselló-Mora und Amann, 2001). Da Prokaryoten mehrere 16S rRNA-Kopien enthalten können, ist z.B. ein genannter Grund die mögliche Sequenzdivergenz zwischen mehreren homologen Genen innerhalb eines prokaryotischen Genoms, die nur schwer aufgedeckt werden kann (Ludwig und Klenk, 2001). Dennoch gilt die Sequenz des 16S rRNA-Gens als valider phylogenetischer Marker, um einen ersten Hinweis auf die taxonomische Einordnung eines Stammes zu erhalten (Tindall et al., 2010). Unterstützt wurde die taxonomische Klassifizierung durch die Rekonstruktion der phylogenetischen Verwandtschaft mithilfe eines Maximum-Likelihood-Baumes. Unter Einbezug der 18 am nächsten verwandten Typstämme bzw. Typspezies gingen die Sp. nov. Stämme als eine eindeutig isolierte und robuste, monophyletische Abstammungslinie hervor. Auf Basis der phylogenetischen Position von WS4898^T und WS4899 wurde die Typspezies *R. antarctica* (Pikuta et al., 2016) für alle phänotypischen und chemotaxonomischen Analysen mitgezogen, während die Spezies *R. fluvialis* erst nach Abschluss der experimentellen Versuche publiziert wurde (Kim et al., 2020). Mit einer sehr viel stärkeren Auflösungskraft auf Genomebene ermöglichte eine *in silico* Analyse die Determinierung des digitalen DDH Wertes über online Plattformen, wie z.B. TYGS (Meier-Kolthoff und Goker, 2019), bei der auf eine umfassende Datenbank mit einer immensen Anzahl an Genomsequenzen von valide beschriebenen Typstämmen zurückgegriffen wird. Dabei demonstrierte ein digitaler DNA-DNA Reassoziierungsgrad <70% zwischen dem Typstamm WS4898^T im paarweisen Vergleich mit jeweils einem der beiden *Raineyella* Typstämmen eine deutliche Abgrenzung der neuen Spezies auf Genomebene.

Dennoch sind insbesondere auf Speziesebene differenzierende, phänotypische Merkmale wertvoll für die Unterstützung der Speziesabgrenzung (Rosselló-Mora und Amann, 2001; Tindall et al., 2010). Obwohl die Methoden zur Reproduktion des zugrundeliegenden Phänotyps stark abhängig von der Kultivierung sind (Moore et al., 2010), zeigte *Raineyella sp. nov.* WS4898^T im Zuge der phänotypischen Charakterisierung bei keiner der getesteten

biochemischen Reaktionen ein speziesspezifisches Alleinstellungsmerkmal. Allerdings unterschied sich WS4898^T in der Säurebildung aus der Umsetzung von Kohlenhydraten immer zu einem der beiden Typspezies. Beim Vergleich der beiden Stämme WS4898^T und WS4899 wurden bei den Wachstumsbedingungen, der Nitratverwertung sowie bei der Umsetzung einzelner Kohlenhydrate unter Säurebildung intraspezifische Differenzen beobachtet. Heterogene Ergebnisse bei der Untersuchung zweier Stämme einer Art stellten auch Pikuta et al. (2016) bei der Typspezies *R. antarctica* DSM 100494^T fest. Eine phänotypische Heterogenität zwischen Stämmen einer Art wurde bei Neubeschreibungen in der Vergangenheit immer wieder aufgedeckt (Collins et al., 1997; von Neubeck et al., 2016) und verdeutlicht, dass die Beschreibung eines Taxons durch mehr als einen Stamm definiert sein sollte (Rosselló-Mora und Amann, 2001). Somit können sich die charakteristischen metabolischen Eigenschaften eines Taxons durch die Aufnahme neuer Stämme prinzipiell noch erweitern.

Aus der Analyse der Fettsäurezusammensetzung als chemotaxonomisches Merkmal ging C_{15:0}anteiso einheitlich für beide Stämme WS4898^T und WS4899 als dominante Fettsäure hervor und stimmte mit dem Ergebnis des Referenzstammes *R. antarctica* und den Literaturangaben für *R. fluvialis* (Kim et al., 2020) überein. Jedoch zeigten die *Raineyella* sp. nov. Stämme für diese Fettsäure mit 23% einen enormen Unterschied zum Typstamm *R. fluvialis*. Während die Fettsäure *Summed feature 2* mit 11,3 % jedoch eine Hauptfraktion in Typstamm WS4898^T darstellte, wurde diese bei keiner der beiden beschriebenen *Raineyella* Arten detektiert (Kim et al., 2020). Allerdings waren keine einheitlichen Kultivierungsbedingungen mit *R. fluvialis* gegeben, was eine Vergleichbarkeit erschwert und zu Diskrepanzen im Fettsäureprofil führen kann (Tindall et al., 2010). Dennoch demonstriert die Familie *Propionibacteriaceae* ein eher homogenes Fettsäureprofil, bei dem C_{15:0}anteiso als prävalente Fettsäure weit verbreitet ist und die Daten dieser Studie stützt (Stackebrandt und Schaal, 2006; Jung et al., 2007; Alonso-Vega et al., 2011; Wenning et al., 2020).

Zusammenfassend ermöglichte die Datenbasis aus phylogenetischen, genomischen, phänotypischen und chemotaxonomischen Analysen eine kohärente Abgrenzung der aus Rohmilch isolierten Stämme WS4898^T und WS4899. Diese repräsentieren schließlich einen neuen Typstamm der Gattung *Raineyella* (*Raineyella* sp. nov.) aus der Familie der *Propionibacteriaceae*.

V. SCHLUSSFOLGERUNG

Die Optimierung der Vorbereitung von Rohmilchproben für die 16S rRNA-Mikrobiomanalyse verdeutlichte, dass sowohl die DNA-Extraktion, als auch die Zyklenzahl in der *library*-PCR die detektierte Biodiversität und die relativen Abundanzen der Taxa erheblich beeinflusst. Demnach kann es möglicherweise zur Fehlinterpretation der Rohmilchmikrobiota, verursacht durch einen Verlust an detektierter Biodiversität kommen. Als Teil der Vorbehandlung der DNA-Extraktion reduzierte die Enzym-basierte selektive Lyse die somatischen Zellen der Kuh und die eukaryotische DNA, was in einer höheren PCR-Effizienz resultierte. Aufgrund der Dominanz Gram-positiver Taxa in frischer Rohmilch, ist eine Kombination aus enzymatischer und mechanischer Lyse dringend erforderlich, um in der *library*-PCR ausreichend hohe Amplikon-Konzentrationen zu erzielen und die Mikrobiota möglichst breit und ausgewogen abzubilden. Die Anwendung hoher Zyklenzahlen im ersten Schritt der *library*-PCR kann zur Verzerrung des erfassten mikrobiellen Profils führen und sollte vermieden werden, um die Biodiversität bestmöglich zu erhalten. Schließlich gewährleistet die optimierte Methode eine Steigerung der erfolgreichen Amplikon-Sequenzierungen von Rohmilch und vermindert den Eintrag von Artefakten.

Die deskriptive Analyse der Mikrobiota frischer Rohmilch von Erzeugerhöfen aus ganz Deutschland zeigte, dass über das Core-Mikrobiom hinaus die bakterielle Zellzahl, die Biodiversität und die relativen Abundanzen einzelner Taxa auf verschiedenen Ebenen der Milcherzeugung durch Haltungsform und Melk- und Lagerbedingungen beeinflusst werden. Ökologische Produktion sowie Weidehaltung führten zu einer enormen Steigerung der Biodiversität mit gleichzeitig niedrigeren Keimzahlen und einem höheren Eintrag umweltassoziiertes Keime. Die Abundanz von *Streptococcus* als dominierende Gattung der Mikrobiota und Vertreter der Eutermikrobiota wurde erheblich durch Laufstall und Melkroboter gesteigert. Unabhängig vom Melksystem kann am Beispiel von *Streptococcus* spp. jedoch abgeleitet werden, dass mit Zunahme der Betriebsgröße die Wahrscheinlichkeit einer Mastitis steigt. Während erhöhte sequenzierte Abundanzen der Indikatorkeime für Fäkal- und Euterkontaminationen mit Anbindehaltung assoziiert wurden, war der psychrotolerante Anteil der Mikrobiota hauptsächlich von Kühl- und Lieferbedingungen auf dem Milchviehbetrieb abhängig und zeigte höhere Abundanzen in konventionellen Betrieben.

Durch die Erfassung der kumulativen Anteile in der Sequenzierung unterliegt die qualitative Mikrobiomanalyse Limitierungen, weil die Abundanz einzelner Taxa von der Zunahme bzw. Abnahme anderer Taxa abhängig ist. Die absolute Zellzahl kann jedoch entscheidend für die Gewichtung der sequenzierten relativen Abundanzen sein. Allerdings bedarf es für die absolute Quantifizierung des Mikrobioms aufwändige bioinformatische Berechnungen unter Berücksichtigung der 16S rRNA-Kopienzahl aller Taxa der Gemeinschaft. Angesichts eingeschränkter bioinformatischer Möglichkeiten, konnte dies in der vorliegenden Arbeit nicht durchgeführt werden und ist ein Ansatzpunkt für weitere Auswertungen dieses Datensatzes.

ANHANG

Tabelle A1 DNA-Konzentration nach dem Test auf selektive Lyse von ausgewählten Gram-negativen und Gram-positiven Bakterien. Alle Versuche wurden in Triplikaten ausgeführt und die Mittelwerte gebildet. %: prozentualer Anteil der DNA-Konzentration im Vergleich zur Negativkontrolle. Stamm-Nr.: Stämme aus dem Glycerinstock des Lehrstuhls für Mikrobielle Ökologie (TUM, Freising); NK: Negativkontrolle.

Stamm-Nr.	Spezies	DNA-1	DNA-2	Mittelwert Replikat	Mittelwert Duplikat	%
5124	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	30,4	30,6	30,5	34,5	
		37,6	39,2	38,4		
5124-NK		30,2	30,4	30,3	35	98
		39,8	39,6	39,7		
7131	<i>Aeromonas ichthiosmia</i>	84	80,2	82,1	83,4	
		85,8	83,6	84,7		
7131-NK		59,8	58,6	59,2	58,2	143
		56,6	57,6	57,1		
7082	<i>Chryseobacterium bovis</i>	69,6	67	68,3	71,3	
		75,6	72,8	74,2		
7082-NK		49,4	48,6	49	46,1	155
		43,6	42,8	43,2		
7130	<i>Citrobacter freundii</i>	110	104	107	103,9	
		102	99,4	100,7		
7130-NK		98,2	100	99,1	90,5	115
		82	81,8	81,9		
4701	<i>Enterobacter cloacae</i>	110	116	113	113,0	
		112	114	113		
4701-NK		100	99,2	99,6	120,8	94
		122	162	142		
8985	<i>Escherichia coli</i>	86	93,4	89,7	91,0	
		90,4	94,2	92,3		
8985-NK		104	100	102	100,5	91
		100	97,8	98,9		
1972	<i>Hafnia paralvei</i>	124	122	123	124,0	
		122	128	125		
1972-NK		137	138	137,5	137,5	90
		139	136	137,5		
4694	<i>Aerococcus viridans</i>	23	20	21,5	21,2	
		20,6	21	20,8		
4694-NK		32,2	31,4	31,8	30,4	70
		28,2	29,6	28,9		
5516	<i>Brachybacterium paraconglomeratum / sacelli</i>	13,5	13,4	13,45	15,5	
		17,3	17,70	17,5		
5516-NK		20,2	19,9	20,05	18,8	82
		17,8	17,4	17,6		

Anhang

Stamm-Nr.	Spezies	DNA-1	DNA-2	Mittelwert Replikat	Mittelwert Duplikate	%
6832	<i>Carnobacterium maltaromaticum</i>	25,8	25,8	25,8	27,2	
6832-NK		28,4	28,6	28,5		
		29,4	28,8	29,1	27,1	100
		25	25,2	25,1		
7080	<i>Corynebacterium camporealensis</i>	54,2	50	52,1	48,7	
7080-NK		45,6	44,8	45,2		
		26,00	25,60	25,8	30,8	158
		36,8	34,6	35,7		
7936	<i>Kocuria kristinae</i>	8,44	8,34	8,39	12,0	
7936-NK		14,8	16,4	15,6		
		9,08	9,24	9,16	12,5	96
		15,5	16,2	15,85		
7976	<i>Lactococcus lactis</i>	65,8	65,8	65,8	66,0	
7976-NK		66,6	65,8	66,2		
		58	56,6	57,3	60,6	109
		65	62,8	63,9		
1476	<i>Listeria monocytogenes</i>	27,2	27	27,1	26,1	
1476-NK		25,4	24,6	25		
		22,2	21,8	22	20,2	129
		19,3	17,3	18,3		

Anhang

Tabelle A2 Relative Abundanzen auf Gattungsebene (%) nach Anwendung verschiedener Extraktionsmethoden bei Rohmilchprobe A. Aufgelistet sind alle Gattungen, die mind. bei einer Extraktionsmethode eine relative Abundanz $\geq 1\%$ aufzeigten. Werte sind Mittelwerte aus Triplikaten; SP: aufgrund niedriger Readzahlen wurden zwei Replikate vor der Analyse aus dem Datensatz entfernt. SP2: foodproof® StarPrep Two Kit; PF: DNeasy® PowerFood® Microbial Kit, woEL: ohne zusätzliche enzymatische Lyse, EL: zusätzliche enzymatische Lyse für 0.5 h oder 1.0 h; PP: PathoProof™ Complete-16 Kit; SP: foodproof® Sample Preparation Kit II. KbE: koloniebildende Einheit. Tabelle aus Siebert et al. (2021).

Gattungen	Rohmilchprobe A (4.3 log KbE/ml)					
	Extraktionsmethode					
	<i>Bead-beating</i>		Enzyme + <i>Bead-beating</i>		Enzyme	
	SP2	PFwoEL	PF0.5EL	PF1.0EL	PP	SP
<i>Acetivomaculum</i>	1,3	0,7	0,5	0,5	0,1	0,2
<i>Acinetobacter</i>	0,6	0,4	0,5	0,4	0,8	3,8
<i>Aerococcus</i>	0,4	0,4	3,2	2,9	1,7	3,0
<i>Bifidobacterium</i>	1,9	3,0	3,9	3,9	14,5	10,3
<i>Brachybacterium</i>	1,6	0,7	0,6	0,6	0,3	0,2
<i>Candidatus Saccharimonas</i>	0,3	0,2	0,3	0,2	0,8	1,9
<i>Christensenellaceae R-7 group</i>	0,3	0,2	0,3	0,3	0,2	1,4
<i>Clostridium sensu stricto 1</i>	2,8	3,6	1,3	1,6	2,6	0,1
<i>Corynebacterium</i>	32,5	20,4	14,5	18,6	12,9	5,5
<i>Enhydrobacter</i>	0,7	0,3	0,8	0,7	1,2	5,6
<i>Facklamia</i>	0,2	0,3	1,2	1,4	0,3	0,2
<i>Jeotgalicoccus</i>	0,2	0,2	1,3	1,6	2,2	1,0
<i>Kocuria</i>	5,6	17,5	11,7	10,4	10,2	5,5
<i>Lachnospiraceae NK3A20 group</i>	5,4	2,2	1,8	1,6	0,3	1,0
<i>Lactobacillus</i>	2,5	6,9	11,0	7,9	9,1	12,7
<i>Micrococcus</i>	0,1	0,3	1,1	1,2	1,6	1,0
<i>Pseudomonas</i>	0,1	0,0	0,1	0,1	4,9	0,4
<i>Rothia</i>	1,0	1,0	3,4	3,2	2,9	0,9
<i>Ruminococcus</i>	0,9	0,7	0,3	0,3	1,7	7,5
<i>Ruminococcus gauvreauii group</i>	0,8	0,2	0,3	0,4	0,2	1,2
<i>Solibacillus</i>	0,7	0,4	0,5	0,5	2,2	0,2
<i>Sphingomonas</i>	0,1	0,5	0,2	0,3	1,2	1,0
<i>Staphylococcus</i>	1,1	1,6	5,5	4,3	5,4	2,3
<i>Streptococcus</i>	0,7	0,4	2,4	1,6	1,4	2,9
<i>Turicibacter</i>	5,9	5,1	2,5	2,5	0,6	0,1
Gattungen <1%	6,0	5,1	6,9	7,4	7,7	15,0
Keine Gattungszuordnung	25,5	25,2	20,3	21,7	11,0	13,2

Tabelle A3 Relative Abundanzen auf Gattungsebene (%) nach Anwendung verschiedener Extraktionsmethoden bei Rohmilchprobe B. Aufgelistet sind alle Gattungen, die mind. bei einer Extraktionsmethode eine relative Abundanz $\geq 1\%$ aufzeigten. Werte sind Mittelwerte aus Duplikaten (PF0.5EL and SP) oder Triplikaten; SP: aufgrund niedriger Readzahlen wurde ein Replikat vor der Analyse aus dem Datensatz entfernt. SP2: foodproof® StarPrep Two Kit; PF: DNeasy® PowerFood® Microbial Kit, woEL: ohne zusätzliche enzymatische Lyse, EL: zusätzliche enzymatische Lyse für 0.5 h oder 1.0 h; PP: PathoProof™ Complete-16 Kit; SP: foodproof® Sample Preparation Kit II. KBE: koloniebildende Einheit. Tabelle aus Siebert et al. (2021).

Gattungen	Rohmilchprobe B (5.2 log KBE/ml)					
	Extraktionsmethode					
	Bead-beating		Enzymes + Bead-beating		Enzymes	
	SP2	PFwoEL	PF0.5EL	PF1.0EL	PP	SP
<i>Acinetobacter</i>	3,9	9,4	6,8	6,3	14,0	24,8
<i>Aerococcus</i>	0,6	1,6	5,7	5,3	7,6	3,2
<i>Bifidobacterium</i>	0,6	0,8	0,8	0,9	1,5	3,4
<i>Christensenellaceae</i> R-7 group	0,2	0,1	0,1	0,1	0,2	1,0
<i>Chryseobacterium</i>	1,9	4,7	6,0	5,9	6,4	8,7
<i>Clostridium sensu stricto</i> 1	4,8	4,9	1,5	1,6	0,3	0,7
<i>Corynebacterium</i>	26,2	11,3	7,0	8,2	3,0	4,2
<i>Enhydrobacter</i>	0,3	0,4	0,5	0,4	0,6	1,1
<i>Facklamia</i>	0,4	0,4	1,2	1,1	0,5	0,5
<i>Ignavigranum</i>	0,4	0,4	1,1	1,1	0,5	0,7
<i>Kocuria</i>	0,5	0,6	1,3	1,5	0,5	0,9
<i>Lachnospiraceae</i> NK3A20 group	1,2	0,2	0,1	0,1	0,0	0,1
<i>Lactococcus</i>	1,6	2,2	2,7	2,7	1,9	3,6
<i>Macrococcus</i>	0,1	0,5	1,6	1,4	0,3	0,1
<i>Micrococcus</i>	0,1	0,3	0,5	0,6	1,0	0,9
<i>Ornithinimicrobium</i>	0,2	0,3	0,5	0,5	0,7	1,1
<i>Paracoccus</i>	0,6	0,9	0,5	0,6	0,8	4,2
<i>Rothia</i>	0,8	0,3	1,5	1,6	0,3	0,3
<i>Staphylococcus</i>	10,5	11,7	21,1	20,4	35,4	4,3
<i>Streptococcus</i>	8,1	8,3	19,9	19,1	9,0	7,3
<i>Turicibacter</i>	6,6	6,6	1,8	1,8	0,3	0,3
Gattungen <1%	4,2	4,8	4,0	12,3	4,8	9,7
Keine Gattungszuordnung	25,1	27,0	11,7	4,3	7,1	14,9

Anhang

Tabelle A4 Relative Abundanzen (%) auf Gattungsebene gruppiert nach Regionen in Nord- und Süddeutschland. Dargestellt sind die Mittelwerte aller Gattungen mit relativen Anteilen $\geq 0,5\%$ in mindestens einer der untersuchten Kategorien. NO: Nord-Ost (n=141); Nord (n=110); NW: Nord-West (n=289); SO: Süd-Ost (n=123); Süd-1 (n=104); Süd-2 (n=78); SW: Süd-West (n=85).

Gattungen	NO	Nord	NW	SO	Süd-1	Süd-2	SW
<i>Acinetobacter</i>	2,3	3,9	5,0	1,3	4,4	2,2	1,5
<i>Aerococcus</i>	3,2	1,7	2,6	1,7	1,5	1,3	1,6
<i>Bacillus</i>	1,0	0,4	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
<i>Bifidobacterium</i>	1,8	1,2	0,8	1,7	0,9	1,5	2,0
<i>Brochothrix</i>	0,0	0,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Carnobacterium</i>	0,2	1,0	1,0	0,4	2,3	0,8	2,2
<i>Chryseobacterium</i>	1,6	2,7	2,5	1,7	3,0	1,6	2,0
<i>Clostridium sensu stricto</i>	2,6	1,9	1,5	2,6	1,7	1,4	2,7
<i>Clostridium XI</i>	4,7	4,3	2,9	5,1	4,8	3,4	5,6
<i>Corynebacterium</i>	10,2	8,7	7,2	17,1	11,6	13,0	14,7
<i>Dietzia</i>	0,5	0,4	0,4	0,6	0,4	0,5	0,6
<i>Enhydrobacter</i>	1,2	0,9	0,6	1,2	0,7	0,5	0,5
<i>Enterococcus</i>	1,5	0,8	2,1	1,7	1,2	1,5	0,7
<i>Escherichia/Shigella</i>	0,1	0,1	0,4	0,0	0,1	0,6	0,2
<i>Facklamia</i>	2,8	2,4	1,7	3,3	2,6	2,3	3,4
<i>Fusobacterium</i>	0,1	0,2	0,6	0,3	0,0	0,1	0,4
<i>Janibacter</i>	0,4	0,7	0,5	0,6	0,3	0,3	0,4
<i>Jeotgalicoccus</i>	0,9	0,7	0,5	0,9	0,5	0,6	0,8
<i>Kocuria</i>	2,6	1,4	1,4	1,9	4,5	2,4	1,3
<i>Lactobacillus</i>	1,7	0,9	1,3	1,0	1,4	2,0	1,9
<i>Lactococcus</i>	5,1	3,3	9,3	1,5	5,5	7,2	4,7
<i>Leuconostoc</i>	0,9	0,4	2,6	0,1	0,1	0,9	0,2
<i>Macrococcus</i>	0,3	0,8	1,5	0,9	0,7	1,6	0,1
<i>Microbacterium</i>	0,5	0,5	0,8	0,5	0,3	0,1	0,3
<i>Olsenella</i>	0,5	0,3	0,2	0,4	0,9	0,3	0,7
<i>Ornithinimicorbium</i>	0,4	0,5	0,3	0,4	0,1	0,2	0,2
<i>Paracoccus</i>	0,3	0,6	0,3	0,4	0,6	0,3	0,2
<i>Pseudomonas</i>	1,1	7,6	7,7	0,6	1,5	10,0	1,4
<i>Romboutsia</i>	6,8	6,4	4,1	8,1	8,0	5,6	8,8
<i>Rothia</i>	1,2	0,5	0,6	0,7	0,9	1,1	1,0
<i>Saccharibacteria genera i.s.</i>	0,5	2,6	0,3	0,7	0,6	0,4	0,4
<i>Staphylococcus</i>	5,6	5,5	7,4	3,6	4,6	5,1	3,5
<i>Streptococcus</i>	15,2	9,2	15,1	12,9	12,2	10,5	13,5
<i>Tepidiphilus</i>	0,0	0,8	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Trueperella</i>	0,4	0,4	0,4	0,8	0,3	0,4	0,5
<i>Turicibacter</i>	3,4	3,0	1,9	4,3	3,9	2,8	4,4
Gattungen <0,5%	8,2	11,9	7,9	8,4	6,7	7,0	6,8

Tabelle A5 Relative Abundanzen (%) auf Gattungsebene gruppiert nach Produktionsart. Dargestellt sind die Mittelwerte aller Gattungen mit relativen Anteilen $\geq 0,5\%$ in mindestens einer der untersuchten Kategorien. konventionell: n=431 und ökologisch: n=197.

Gattungen	konventionell	ökologisch
<i>Acinetobacter</i>	4,5	3,0
<i>Aerococcus</i>	2,3	1,7
<i>Bifidobacterium</i>	1,2	1,1
<i>Carnobacterium</i>	0,9	1,1
<i>Chryseobacterium</i>	2,3	2,2
<i>Clostridium sensu stricto</i>	1,7	1,8
<i>Clostridium XI</i>	3,6	4,3
<i>Corynebacterium</i>	9,3	11,8
<i>Dietzia</i>	0,4	0,6
<i>Enhydrobacter</i>	0,7	1,1
<i>Enterococcus</i>	1,7	1,5
<i>Facklamia</i>	2,2	2,6
<i>Janibacter</i>	0,4	0,6
<i>Jeotgalicoccus</i>	0,5	0,8
<i>Kocuria</i>	1,9	2,0
<i>Lactobacillus</i>	1,4	1,0
<i>Lactococcus</i>	7,1	4,2
<i>Leuconostoc</i>	1,8	0,5
<i>Macrococcus</i>	1,4	0,9
<i>Microbacterium</i>	0,6	0,8
<i>Paracoccus</i>	0,4	0,6
<i>Pseudomonas</i>	7,5	1,7
<i>Romboutsia</i>	5,4	6,6
<i>Rothia</i>	0,7	1,0
<i>Saccharibacteria genera i.s.</i>	0,9	0,6
<i>Staphylococcus</i>	5,9	5,8
<i>Streptococcus</i>	13,3	12,8
<i>Turicibacter</i>	2,7	3,2
Gattungen <0,5%	9,3	13,3

Anhang

Tabelle A6 Relative Abundanzen (%) auf Gattungsebene gruppiert nach Tierhaltungsform. Dargestellt sind die Mittelwerte aller Gattungen mit relativen Anteilen $\geq 0,5\%$ in mindestens einer der untersuchten Kategorien. Laufstall: n=287, Laufstall + Weidehaltung: n=280 und Anbindestall: n=61.

Gattungen	Laufstall	Laufstall + Weidehaltung	Anbindestall
<i>Acinetobacter</i>	3,5	4,5	4,6
<i>Aerococcus</i>	2,0	2,3	1,9
<i>Bifidobacterium</i>	1,0	1,2	1,7
<i>Carnobacterium</i>	0,6	1,3	0,9
<i>Chryseobacterium</i>	1,5	2,8	3,3
<i>Clostridium sensu stricto</i>	1,6	1,8	2,7
<i>Clostridium XI</i>	3,0	4,3	5,3
<i>Corynebacterium</i>	8,4	10,3	17,0
<i>Enhydrobacter</i>	0,6	1,1	0,7
<i>Enterococcus</i>	2,4	1,1	0,5
<i>Escherichia/Shigella</i>	0,3	0,1	1,3
<i>Facklamia</i>	1,7	2,6	4,1
<i>Fusobacterium</i>	0,3	0,2	0,9
<i>Janibacter</i>	0,5	0,6	0,1
<i>Jeotgalicoccus</i>	0,5	0,8	0,7
<i>Kocuria</i>	2,1	1,8	1,6
<i>Lactobacillus</i>	1,5	1,1	0,9
<i>Lactococcus</i>	8,1	4,8	3,3
<i>Leuconostoc</i>	2,1	1,0	0,1
<i>Macrococcus</i>	1,7	0,9	0,3
<i>Microbacterium</i>	0,6	0,8	0,1
<i>Paracoccus</i>	0,3	0,6	0,6
<i>Pseudomonas</i>	8,9	2,9	2,8
<i>Romboutsia</i>	4,6	6,3	8,8
<i>Rothia</i>	0,8	0,7	1,0
<i>Saccharibacteria genera i.s.</i>	1,1	0,5	0,6
<i>Staphylococcus</i>	6,6	5,7	2,8
<i>Streptococcus</i>	14,5	13,0	7,9
<i>Trueperella</i>	0,4	0,4	0,7
<i>Turicibacter</i>	2,3	3,1	4,4
Gattungen <0,5%	8,6	12,0	7,3

Tabelle A7 Relative Abundanzen (%) auf Gattungsebene gruppiert nach Melksystem. Dargestellt sind die Mittelwerte aller Gattungen mit relativen Anteilen $\geq 0,5\%$ in mindestens einer der untersuchten Kategorien. Automatisches Melksystem: n=153; Melkstand: n=532; Rohrmelkanlage: n=120.

Gattungen	Automatisches Melksystem	Melkstand	Rohrmelkanlage
<i>Acinetobacter</i>	4,9	3,0	3,8
<i>Aerococcus</i>	2,8	2,1	2,3
<i>Bacillus</i>	0,9	0,1	0,1
<i>Bacteroides</i>	0,5	0,2	0,3
<i>Bifidobacterium</i>	0,8	1,3	1,4
<i>Carnobacterium</i>	0,7	0,9	1,1
<i>Chryseobacterium</i>	0,8	2,3	3,9
<i>Clostridium sensu stricto</i>	1,3	2,1	2,2
<i>Clostridium XI</i>	2,7	4,3	4,6
<i>Corynebacterium</i>	6,7	10,7	13,4
<i>Dietzia</i>	0,3	0,5	0,3
<i>Enhydrobacter</i>	0,4	0,9	0,9
<i>Enterococcus</i>	2,4	1,5	0,8
<i>Escherichia/Shigella</i>	0,7	0,2	0,0
<i>Facklamia</i>	1,5	2,4	3,3
<i>Fusobacterium</i>	1,0	0,1	0,0
<i>Janibacter</i>	0,4	0,6	0,2
<i>Jeotgalicoccus</i>	0,5	0,7	0,7
<i>Kocuria</i>	0,8	2,4	2,2
<i>Lactobacillus</i>	0,6	1,6	1,4
<i>Lactococcus</i>	11,3	4,3	4,9
<i>Leuconostoc</i>	2,1	1,1	0,4
<i>Macrococcus</i>	0,9	1,2	0,6
<i>Microbacterium</i>	0,5	0,7	0,1
<i>Pseudomonas</i>	5,3	4,9	4,7
<i>Romboutsia</i>	3,9	6,4	7,3
<i>Rothia</i>	0,7	0,8	0,7
<i>Saccharibacteria genera i.s.</i>	0,3	0,9	0,5
<i>Staphylococcus</i>	5,8	6,1	4,5
<i>Streptococcus</i>	21,7	11,9	10,1
<i>Trueperella</i>	0,7	0,4	0,4
<i>Turicibacter</i>	2,0	3,2	3,5
Gattungen <0,5%	7,0	10,2	9,4

Anhang

Tabelle A8 *Assembly* Statistik der Isolate zur Neubeschreibung von *Fundicoccus ignavus* gen. nov. sp. nov.. Tabelle aus Siebert et al. (2020).

Charakteristik	WS4937^T	WS4759	WS5303
<i>Assembly</i> Größe [Mb]	3,0	2,7	2,7
G + C Gehalt [mol %]	37,4	37,5	37,5
Anzahl der Contigs	64	37	46
Durchschnittliche Contig Größe [kb]	47	73	59
N50 Wert [kb]	118	287	273
Geschätze Genomvollständigkeit [%]	99,4	99,4	99,4
Geschätze Genomkontamination [%]	1,1	1,3	1,3
Sequenziertiefe	58,1	152,6	54,3
Qualität Genomverarbeitung	<i>high-quality draft</i>	<i>high-quality draft</i>	<i>high-quality draft</i>
Anzahl proteincodierender Genome	2661	2328	2412

Tabelle A9 Zelluläre Fettsäuren der drei *Fundicoccus ignavus* gen. nov., sp. nov. Stämme WS4937^T, WS4759 und WS5303. Fett: Hauptfettsäuren >10%; -: nicht detektiert.

Fettsäure	WS4937^T	WS4759	WS5303
Gesättigt			
C _{10:0}	0,7	0,4	-
C _{12:0}	0,5	0,4	0,3
C _{14:0}	4,2	2,2	1,2
C _{16:0}	23,5	20,3	12,2
C _{17:0}	-	0,2	-
C _{18:0}	6,5	7,0	6,4
Ungesättigt			
C _{16:1} ω ₉ c	27,6	26,2	18,1
C _{17:1} iso ω ₅ c	0,5	0,6	0,6
C _{18:1} ω ₉ c	17,6	23,7	37,3
C _{19:1} iso I	1,1	1,8	4,9
C _{20:2} ω _{6,9} c	0,5	0,5	-
C _{20:1} ω ₉ c	0,4	0,6	2,1
Summed feature			
3 (C _{16:1} ω ₇ c/C _{16:1} ω ₆ c)	6,0	5,2	3,2
5 (C _{18:2} ω _{6,9} c/C _{18:0} ante)	5,6	5,1	4,9
7 (<i>unknown</i> 18.85/C _{19:1} ω ₆ c)	-	-	-
8 (C _{18:1} ω ₇ c/C _{18:1} ω ₆ c)	4,1	4,8	6,8
9 (C _{17:1} iso ω ₉ c/C _{16:0} 10-methyl)	1,2	1,1	2,1

Tabelle A10 Assembly Statistik der Isolate zur Neubeschreibung von *Raineyella* sp. nov..

Charakteristik	WS4898 ^T	WS4899
Assembly Größe [Mb]	3,0	3,1
G + C Gehalt [mol%]	69,4	69,4
Anzahl der Contigs	75	64
N50 Wert [kb]	135	150
Qualität Genomverarbeitung	<i>high-quality draft</i>	<i>high-quality draft</i>
Anzahl proteincodierender Genome	2769	2854

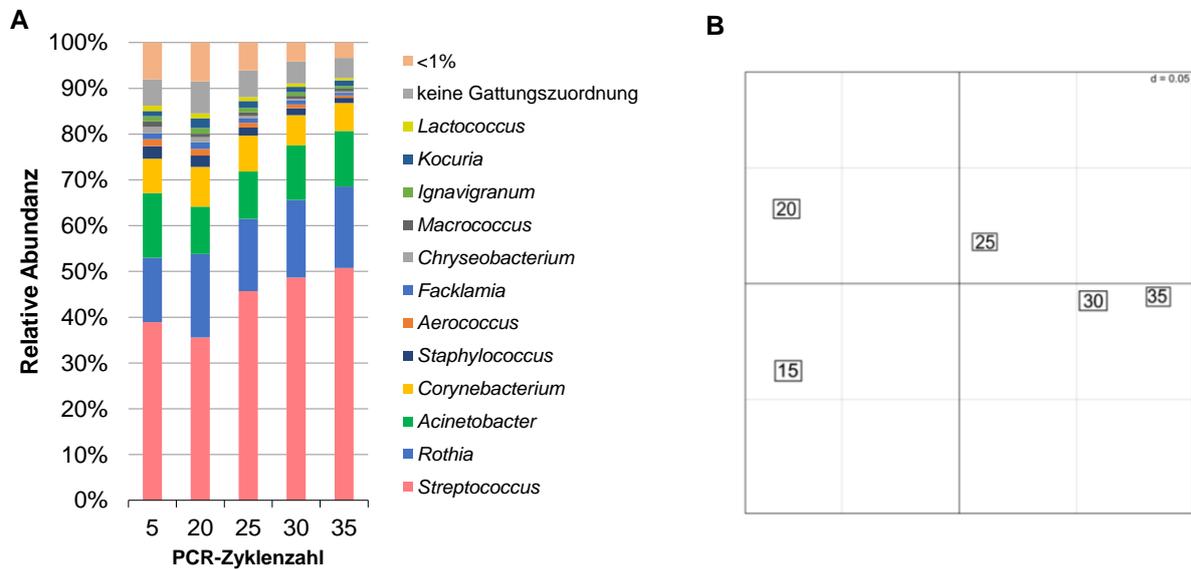


Abbildung A1 Verteilung der relative Abundanz (%) auf Gattungsebene (A) und NMDS (generalized UniFrac distance) Plot nach der Anwendung von 15-35 Zyklen im 1. Schritt der *library*-PCR (B). Untersucht wurde RM 3: Molkereiprobe mit aerober, mesophiler Keimzahl von 4,8 log KBE/ml. Alle Gattungen mit einer relativen Abundanz $\geq 1\%$ sind in A gezeigt. Abbildung aus Siebert et al. (2021).

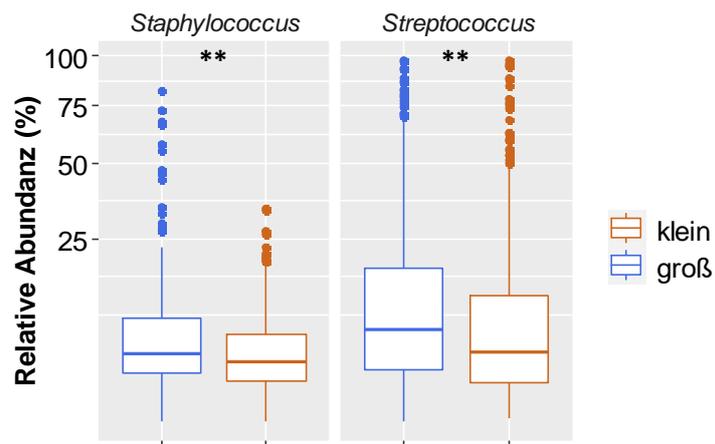


Abbildung A2 Verteilung relativer Abundanzen (%) der Gattungen *Staphylococcus* und *Streptococcus* in Rohmilch gruppiert nach Hofgröße. klein: Liefermenge von ≤ 500.000 Liter/Jahr ($n=447$); groß: Liefermenge von >500.000 Liter/Jahr ($n=415$). $**p < 0,01$.

LITERATURVERZEICHNIS

- Abeijon Mukdsi, M.C., Falentin, H., Maillard, M.B., Chuat, V., Medina, R.B., Parayre, S., and Thierry, A. (2014). The secreted esterase of *Propionibacterium freudenreichii* has a major role in cheese lipolysis. *Appl Environ Microbiol* 80(2), 751-756.
- Abellan-Schneyder, I., Matchado, M.S., Reitmeier, S., Sommer, A., Sewald, Z., Baumbach, J., List, M., und Neuhaus, K. (2021). Primer, pipelines, parameters: issues in 16S rRNA gene sequencing. *mSphere* 6(1).
- Addis, M.F., Tanca, A., Uzzau, S., Oikonomou, G., Bicalho, R.C., und Moroni, P. (2016). The bovine milk microbiota: insights and perspectives from -omics studies. *Mol Biosyst* 12(8), 2359-2372.
- Albonico, F., Barelli, C., Albanese, D., Manica, M., Partel, E., Rosso, F., Ripellino, S., Pindo, M., Donati, C., Zecconi, A., Mortarino, M., und Hauffe, H.C. (2020). Raw milk and fecal microbiota of commercial Alpine dairy cows varies with herd, fat content and diet. *PLoS One* 15(8), e0237262.
- Alonso-Vega, P., Carro, L., Martinez-Molina, E., und Trujillo, M.E. (2011). *Auraticoccus monumenti* gen. nov., sp. nov., an actinomycete isolated from a deteriorated sandstone monument. *Int J Syst Evol Microbiol* 61(Pt 5), 1098-1103.
- Agrarmarkt Informations-Gesellschaft mbH AMI (2020). <https://www.ami-informiert.de/ami-meldungen-milchwirtschaft> (Zugang am 11.05.2021).
- An, D.S., Im, W.T., und Yoon, M.H. (2008). *Micrococcus panaciterrae* sp. nov., a beta-glucosidase-producing bacterium isolated from soil in a ginseng field. *Int J Syst Evol Microbiol* 58(Pt 12), 2734-2738.
- Arnold, J.W., Roach, J., und Azcarate-Peril, M.A. (2016). Emerging technologies for gut microbiome research. *Trends Microbiol* 24(11), 887-901.
- Artursson, K., Schelin, J., Thisted Lambert, S., Hansson, I., und Olsson Engvall, E. (2018). Foodborne pathogens in unpasteurized milk in Sweden. *Int J Food Microbiol* 284, 120-127.
- Bankevich, A., Nurk, S., Antipov, D., Gurevich, A.A., Dvorkin, M., Kulikov, A.S., Lesin, V.M., Nikolenko, S.I., Pham, S., und Prjibelski, A.D. (2012). SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J Comput Biol* 19(5), 455-477.
- Baumgartner, C., und Märtlbauer, E. (2016). "Qualitätskontrolle der Anlieferungsmilch," in *Milchkunde und Milchhygiene*, eds. E. Märtlbauer & H. Becker. Stuttgart: Eugen Ulmer Verlag, 125-140.
- Berry, D., Ben Mahfoudh, K., Wagner, M., und Loy, A. (2011). Barcoded primers used in multiplex amplicon pyrosequencing bias amplification. *Appl Environ Microbiol* 77(21), 7846-7849.
- Biagi, E., Quercia, S., Aceti, A., Beghetti, I., Rampelli, S., Turrone, S., Faldella, G., Candela, M., Brigidi, P., und Corvaglia, L. (2017). The bacterial ecosystem of mother's milk and infant's mouth and gut. *Front Microbiol* 8, 1214.
- Biesbroek, G., Sanders, E.A., Roeselers, G., Wang, X., Caspers, M.P., Trzcinski, K., Bogaert, D., und Keijsers, B.J. (2012). Deep sequencing analyses of low density microbial communities: working at the boundary of accurate microbiota detection. *PLoS One* 7(3), e32942.
- Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung BLE (2020). https://www.ble.de/DE/BZL/Daten-Berichte/Milch-Milcherzeugnisse/milch-milcherzeugnisse_node.html (Zugang am 11.05.2021).
- Bligh, E.G., und Dyer, W.J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 37(8), 911-917.

- Bolger, A.M., Lohse, M., und Usadel, B. (2014). Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 30(15), 2114-2120.
- Borreani, G., Ferrero, F., Nucera, D., Casale, M., Piano, S., und Tabacco, E. (2019). Dairy farm management practices and the risk of contamination of tank milk from *Clostridium* spp. and *Paenibacillus* spp. spores in silage, total mixed ration, dairy cow feces, and raw milk. *J Dairy Sci* 102(9), 8273-8289.
- Breitenwieser, F., Doll, E.V., Clavel, T., Scherer, S., und Wenning, M. (2020). Complementary use of cultivation and high-throughput amplicon sequencing reveals high biodiversity within raw milk microbiota. *Front Microbiol* 11, 1557.
- Cacho, N.T., Harrison, N.A., Parker, L.A., Padgett, K.A., Lemas, D.J., Marcial, G.E., Li, N., Carr, L.E., Neu, J., und Lorca, G.L. (2017). Personalization of the microbiota of donor human milk with mother's own milk. *Front Microbiol* 8, 1470.
- Cao, Y., Fanning, S., Proos, S., Jordan, K., und Srikumar, S. (2017). A review on the applications of next generation sequencing technologies as applied to food-related microbiome studies. *Front Microbiol* 8, 1829.
- Carafa, I., Navarro, I.C., Bittante, G., Tagliapietra, F., Gallo, L., Tuohy, K., und Franciosi, E. (2020). Shift in the cow milk microbiota during alpine pasture as analyzed by culture dependent and high-throughput sequencing techniques. *Food Microbiol* 91, 103504.
- Chen, J., Bittinger, K., Charlson, E.S., Hoffmann, C., Lewis, J., Wu, G.D., Collman, R.G., Bushman, F.D., und Li, H. (2012). Associating microbiome composition with environmental covariates using generalized UniFrac distances. *Bioinformatics* 28(16), 2106-2113.
- Chun, J., und 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.
- Chun, J., Oren, A., Ventosa, A., Christensen, H., Arahal, D.R., da Costa, M.S., Rooney, A.P., Yi, H., Xu, X.W., De Meyer, S., und Trujillo, M.E. (2018). Proposed minimal standards for the use of genome data for the taxonomy of prokaryotes. *Int J Syst Evol Microbiol* 68(1), 461-466.
- Claassen, S., du Toit, E., Kaba, M., Moodley, C., Zar, H.J., und Nicol, M.P. (2013). A comparison of the efficiency of five different commercial DNA extraction kits for extraction of DNA from faecal samples. *J Microbiol Methods* 94(2), 103-110.
- Cole, J.R., Wang, Q., Fish, J.A., Chai, B., McGarrell, D.M., Sun, Y., Brown, C.T., Porras-Alfaro, A., Kuske, C.R., und Tiedje, J.M. (2014). Ribosomal Database Project: data and tools for high throughput rRNA analysis. *Nucleic Acids Res* 42(Database issue), D633-642.
- Collins, M., Aguirre, M., Facklam, R., Shallcross, J., und Williams, A. (1992). *Globicatella sanguis* gen. nov., sp. nov., a new gram-positive catalase-negative bacterium from human sources. *Appl Microbiol* 73(5), 433-437.
- Collins, M.D., Falsen, E., Lemozy, J., Åkervall, E., Sjöden, B., und Lawson, P.A. (1997). Phenotypic and phylogenetic characterization of some *Globicatella*-like organisms from human sources: description of *Facklamia hominis* gen. nov., sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 47(3), 880-882.
- Collins, M.D., Jovita, M.R., Hutson, R.A., Falsen, E., Sjöden, B., und Facklam, R.R. (1999a). *Dolosicoccus paucivorans* gen. nov., sp. nov., isolated from human blood. *Int J Syst Evol Microbiol* 49(4), 1439-1442.
- Collins, M.D., Jovita, M.R., Lawson, P.A., Falsen, E., und Foster, G. (1999b). Characterization of a novel Gram-positive, catalase-negative coccus from horses: description of *Eremococcus coleocola* gen. nov., sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 49, 1381-1385.
- Collins, M.D., Lawson, P.A., Monasterio, R., Falsen, E., Sjöden, B., und Facklam, R.R. (1999c). *Ignavigranum ruoffiae* sp. nov., isolated from human clinical specimens. *Int J Syst Evol Microbiol* 49(1), 97-101.

- Collins, M.D., und Lawson, P.A. (2000). The genus *Abiotrophia* (Kawamura et al.) is not monophyletic: proposal of *Granulicatella* gen. nov., *Granulicatella adiacens* comb. nov., *Granulicatella elegans* comb. nov. and *Granulicatella balaenopterae* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 50(1), 365-369.
- Cremonesi, P., Ceccarani, C., Curone, G., Severgnini, M., Pollera, C., Bronzo, V., Riva, F., Addis, M.F., Filipe, J., Amadori, M., Trevisi, E., Vigo, D., Moroni, P., und Castiglioni, B. (2018). Milk microbiome diversity and bacterial group prevalence in a comparison between healthy Holstein Friesian and Rendena cows. *PLoS One* 13(10), e0205054.
- Curone, G., Filipe, J., Cremonesi, P., Trevisi, E., Amadori, M., Pollera, C., Castiglioni, B., Turin, L., Tedde, V., und Vigo, D. (2018). What we have lost: mastitis resistance in Holstein Friesians and in a local cattle breed. *Res Vet Sci* 116, 88-98.
- Cusco, A., Catozzi, C., Vines, J., Sanchez, A., und Francino, O. (2019). Microbiota profiling with long amplicons using Nanopore sequencing: full-length 16S rRNA gene and the 16S-ITS-23S of the *rrn* operon. *F1000Res* 7, 1755.
- Dahlberg, J., Sun, L., Persson Waller, K., Ostensson, K., McGuire, M., Agenas, S., und Dicksved, J. (2019). Microbiota data from low biomass milk samples is markedly affected by laboratory and reagent contamination. *PLoS One* 14(6), e0218257.
- Dahlberg, J., Williams, J.E., McGuire, M.A., Peterson, H.K., Ostensson, K., Agenas, S., Dicksved, J., und Waller, K.P. (2020). Microbiota of bovine milk, teat skin, and teat canal: similarity and variation due to sampling technique and milk fraction. *J Dairy Sci* 103(8), 7322-7330.
- de Koning, K., Slaghuis, B., und van der Vorst, Y. (2003). Robotic milking and milk quality: effects on bacterial counts, somatic cell counts, freezing point and free fatty acids. *Ital J Anim Sci* 2(4), 291-299.
- Delbes, C., Ali-Mandjee, L., und Montel, M.C. (2007). Monitoring bacterial communities in raw milk and cheese by culture-dependent and -independent 16S rRNA gene-based analyses. *Appl Environ Microbiol* 73(6), 1882-1891.
- Derakhshani, H., Fehr, K.B., Sepehri, S., Francoz, D., De Buck, J., Barkema, H.W., Plaizier, J.C., und Khafipour, E. (2018a). Invited review: microbiota of the bovine udder: contributing factors and potential implications for udder health and mastitis susceptibility. *J Dairy Sci* 101(12), 10605-10625.
- Derakhshani, H., Plaizier, J.C., De Buck, J., Barkema, H.W., und Khafipour, E. (2018b). Composition of the teat canal and intramammary microbiota of dairy cows subjected to antimicrobial dry cow therapy and internal teat sealant. *J Dairy Sci* 101(11), 10191-10205.
- Douglas, C.A., Ivey, K.L., Papanicolas, L.E., Best, K.P., Muhlhausler, B.S., und Rogers, G.B. (2020). DNA extraction approaches substantially influence the assessment of the human breast milk microbiome. *Sci Rep* 10(1), 123.
- Doyle, C.J., Gleeson, D., O'Toole, P.W., und Cotter, P.D. (2017a). Impacts of seasonal housing and teat preparation on raw milk microbiota: a high-throughput sequencing study. *Appl Environ Microbiol* 83(2), e02694-02616.
- Doyle, C.J., Gleeson, D., O'Toole, P.W., und Cotter, P.D. (2017b). High-throughput metataxonomic characterization of the raw milk microbiota identifies changes reflecting lactation stage and storage conditions. *Int J Food Microbiol* 255, 1-6.
- 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.
- Edgar, R.C. (2010). Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics* 26(19), 2460-2461.
- Edgar, R.C., Haas, B.J., Clemente, J.C., Quince, C., und Knight, R. (2011). UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics* 27(16), 2194-2200.

- Edgar, R.C. (2013). UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads. *Nature methods* 10(10), 996-998.
- Edgar, R.C. (2018). Updating the 97% identity threshold for 16S ribosomal RNA OTUs. *Bioinformatics* 34(14), 2371-2375.
- Elmoslemany, A.M., Keefe, G.P., Dohoo, I.R., Wichtel, J.J., Stryhn, H., und Dingwell, R.T. (2010). The association between bulk tank milk analysis for raw milk quality and on-farm management practices. *Prev Vet Med* 95(1-2), 32-40.
- EU-Verordnung (2004). *Regulation (EC) No 853/2004 of the european parliament and the council of 29 April 2004 laying down specific hygiene rules for on the hygiene of foodstuffs.*
- Facklam, R., und Elliott, J. (1995). Identification, classification, and clinical relevance of catalase-negative, gram-positive cocci, excluding the streptococci and enterococci. *Clin Microbiol Rev* 8(4), 479-495.
- Facklam, R. (2002). What happened to the streptococci: overview of taxonomic and nomenclature changes. *Clin Microbiol Rev* 15(4), 613-630.
- Falardeau, J., Keeney, K., Trmcic, A., Kitts, D., und Wang, S. (2019). Farm-to-fork profiling of bacterial communities associated with an artisan cheese production facility. *Food Microbiol* 83, 48-58.
- Federhen, S. (2012). The NCBI taxonomy database. *Nucleic Acids Res* 40(D1), D136-D143.
- Fehlings, K., und Baumgartner, C. (2016). "Eutergesundheit," in *Milchkunde und Milchhygiene*, eds. E. Märtlbauer & H. Becker. Stuttgart: Eugen Ulmer Verlag, 89-114.
- Fretin, M., Martin, B., Rifa, E., Isabelle, V.M., Pomies, D., Ferlay, A., Montel, M.C., und Delbes, C. (2018). Bacterial community assembly from cow teat skin to ripened cheeses is influenced by grazing systems. *Sci Rep* 8(1), 200.
- Fricker, M., Skanseng, B., Rudi, K., Stessl, B., und Ehling-Schulz, M. (2011). Shift from farm to dairy tank milk microbiota revealed by a polyphasic approach is independent from geographical origin. *Int J Food Microbiol* 145 Suppl 1, S24-30.
- Fusco, V., Chieffi, D., Fanelli, F., Logrieco, A.F., Cho, G.S., Kabisch, J., Bohnlein, C., und Franz, C. (2020). Microbial quality and safety of milk and milk products in the 21st century. *Compr Rev Food Sci Food Saf* 19(4), 2013-2049.
- Ganda, E.K., Bisinotto, R.S., Lima, S.F., Kronauer, K., Decter, D.H., Oikonomou, G., Schukken, Y.H., und Bicalho, R.C. (2016). Longitudinal metagenomic profiling of bovine milk to assess the impact of intramammary treatment using a third-generation cephalosporin. *Sci Rep* 6, 37565.
- Giannino, M.L., Marzotto, M., Dellaglio, F., und Feligini, M. (2009). Study of microbial diversity in raw milk and fresh curd used for Fontina cheese production by culture-independent methods. *Int J Food Microbiol* 130(3), 188-195.
- Gohl, D.M., Vangay, P., Garbe, J., MacLean, A., Hauge, A., Becker, A., Gould, T.J., Clayton, J.B., Johnson, T.J., Hunter, R., Knights, D., und Beckman, K.B. (2016). Systematic improvement of amplicon marker gene methods for increased accuracy in microbiome studies. *Nat Biotechnol* 34(9), 942-949.
- Gomes, S.I.F., van Bodegom, P.M., van Agtmaal, M., Soudzilovskaia, N.A., Bestman, M., Duijm, E., Speksnijder, A., und van Eekeren, N. (2020). Microbiota in dung and milk differ between organic and conventional dairy farms. *Front Microbiol* 11, 1746.
- Gonzalez, J.M., Portillo, M.C., Belda-Ferre, P., und Mira, A. (2012). Amplification by PCR artificially reduces the proportion of the rare biosphere in microbial communities. *PLoS One* 7(1), e29973.
- Gregersen, T. (1978). Rapid method for distinction of Gram-negative from Gram-positive bacteria. *Eur J Appl Microbiol* 5(2), 123-127.

- Haft, D.H., DiCuccio, M., Badretdin, A., Brover, V., Chetvermin, V., O'Neill, K., Li, W., Chitsaz, F., Derbyshire, M.K., und Gonzales, N.R. (2017). RefSeq: an update on prokaryotic genome annotation and curation. *Nucleic Acids Res* 46(D1), D851-D860.
- Hall, B.G. (2013). Building phylogenetic trees from molecular data with MEGA. *Mol Biol Evol* 30(5), 1229-1235.
- Hantsis-Zacharov, E., und Halpern, M. (2007). Culturable psychrotrophic bacterial communities in raw milk and their proteolytic and lipolytic traits. *Appl Environ Microbiol* 73(22), 7162-7168.
- Heikkila, M.P., und Saris, P.E. (2003). Inhibition of *Staphylococcus aureus* by the commensal bacteria of human milk. *J Appl Microbiol* 95(3), 471-478.
- Hiitio, H., Simojoki, H., Kalmus, P., Holopainen, J., Pyorala, S., und Taponen, S. (2016). The effect of sampling technique on PCR-based bacteriological results of bovine milk samples. *J Dairy Sci* 99(8), 6532-6541.
- Hogenboom, J.A., Pellegrino, L., Sandrucci, A., Rosi, V., und D'Incecco, P. (2019). Invited review: hygienic quality, composition, and technological performance of raw milk obtained by robotic milking of cows. *J Dairy Sci* 102(9), 7640-7654.
- Hopkins, M., Sharp, R., und Macfarlane, G.J.G. (2001). Age and disease related changes in intestinal bacterial populations assessed by cell culture, 16S rRNA abundance, and community cellular fatty acid profiles. *BMJ Gut* 48(2), 198-205.
- Hoyles, L. (2014). "The genus *Facklamia*," in *Lactic Acid Bacteria: Biodiversity and Taxonomy*, eds. W.H. Holzapfel & B.J. Wood. John Wiley & Sons, Ltd, 91-98.
- Huch, M., Gyu-Sung, C., Gálvez, A., und Franz, C.M. (2014). "Minor genera of the *Aerococcaceae* (*Dolosicoccus*, *Eremococcus*, *Globicatella*, *Ignavigranum*)," in *Lactic Acid Bacteria: Biodiversity and Taxonomy*, eds. W.H. Holzapfel & B.J. Wood. John Wiley & Sons, Ltd, 99-105.
- Huptas, C., Scherer, S., und 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.
- Hyatt, D., Chen, G.-L., LoCascio, P.F., Land, M.L., Larimer, F.W., und Hauser, L.J. (2010). Prodigal: prokaryotic gene recognition and translation initiation site identification. *BMC Bioinform* 11(1), 119.
- Illumina (2013). *16S Metagenomic Sequencing Library Preparation*. Available: https://support.illumina.com/documents/documentation/chemistry_documentation/16s/16s-metagenomic-library-prep-guide-15044223-b.pdf (Zugang am 23.03.2021).
- Jacobs, J.A., und Siegford, J.M. (2012). Invited review: The impact of automatic milking systems on dairy cow management, behavior, health, and welfare. *J Dairy Sci* 95(5), 2227-2247.
- Jago, J.G., Davis, K.L., Copeman, P.J., und Woolford, M.M. (2006). The effect of pre-milking teat-brushing on milk processing time in an automated milking system. *J Dairy Res* 73(2), 187-192.
- Janda, J.M., und Abbott, S.L. (2007). 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. *J Clin Microbiol* 45(9), 2761-2764.
- Johler, S., Weder, D., Bridy, C., Huguenin, M.C., Robert, L., Hummerjohann, J., und Stephan, R. (2015). Outbreak of staphylococcal food poisoning among children and staff at a Swiss boarding school due to soft cheese made from raw milk. *J Dairy Sci* 98(5), 2944-2948.
- Jost, T., Lacroix, C., Braegger, C., und Chassard, C. (2013). Assessment of bacterial diversity in breast milk using culture-dependent and culture-independent approaches. *Br J Nutr* 110(7), 1253-1262.
- Julien, M.C., Dion, P., Lafreniere, C., Antoun, H., und Drouin, P. (2008). Sources of clostridia in raw milk on farms. *Appl Environ Microbiol* 74(20), 6348-6357.

- Jung, S.Y., Kim, H.S., Song, J.J., Lee, S.G., Oh, T.K., und Yoon, J.H. (2007). *Aestuariimicrobium kwangyangense* gen. nov., sp. nov., an LL-diaminopimelic acid-containing bacterium isolated from tidal flat sediment. *Int J Syst Evol Microbiol* 57(9), 2114-2118.
- Kable, M.E., Srisengfa, Y., Laird, M., Zaragoza, J., McLeod, J., Heidenreich, J., und Marco, M.L. (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), e00836-00816.
- Kämpfer, P., und Glaeser, S.P. (2012). Prokaryotic taxonomy in the sequencing era-the polyphasic approach revisited. *Environ Microbiol* 14(2), 291-317.
- Kampmann, C., Dicksved, J., Engstrand, L., und Rautelin, H. (2016). Composition of human faecal microbiota in resistance to *Campylobacter* infection. *Clin Microbiol Infect* 22(1), 61.e61-61.e68.
- Kanehisa, M., Sato, Y., und Morishima, K. (2016). BlastKOALA and GhostKOALA: KEGG tools for functional characterization of genome and metagenome sequences. *J Mol Biol* 428(4), 726-731.
- Kawamura, Y., Hou, X.-G., Sultana, F., Liu, S., Yamamoto, H., und Ezaki, T. (1995). Transfer of *Streptococcus adjacens* and *Streptococcus defectivus* to *Abiotrophia* gen. nov. as *Abiotrophia adiacens* comb. nov. and *Abiotrophia defectiva* comb. nov., respectively. *Int J Syst Evol Microbiol* 45(4), 798-803.
- Kim, M., Oh, H.-S., Park, S.-C., und Chun, J. (2014). Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes. *Int J Syst Evol Microbiol* 64(2), 346-351.
- Kim, Y.B., Kim, J.Y., Song, H.S., Lee, C., Kim, J., Whon, T.W., Lee, S.H., Rhee, J.K., und Roh, S.W. (2020). *Raineyella fluvialis* sp. nov., an actinobacterium isolated from freshwater sediment. *Int J Syst Evol Microbiol* 70(7), 4298-4304.
- Klaas, I.C., und Zadoks, R.N. (2018). An update on environmental mastitis: challenging perceptions. *Transbound Emerg Dis* 65 Suppl 1, 166-185.
- Klijin, N., Nieuwenhof, F., Hoolwerf, J.D., Van Der Waals, C., und Weerkamp, A.H. (1995). Identification of *Clostridium tyrobutyricum* as the causative agent of late blowing in cheese by species-specific PCR amplification. *Appl Environ Microbiol* 61(8), 2919-2924.
- Klindworth, A., Pruesse, E., Schweer, T., Peplies, J., Quast, C., Horn, M., und Glockner, F.O. (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.
- Klungel, G., Slaghuis, B., und Hogeveen, H. (2000). The effect of the introduction of automatic milking systems on milk quality. *J Dairy Sci* 83(9), 1998-2003.
- Konstantinidis, K.T., und Tiedje, J.M. (2005). Towards a genome-based taxonomy for prokaryotes. *J Bacteriol* 187(18), 6258-6264.
- Kopylova, E., Noe, L., und Touzet, H. (2012). SortMeRNA: fast and accurate filtering of ribosomal RNAs in metatranscriptomic data. *Bioinformatics* 28(24), 3211-3217.
- Kuczynski, J., Lauber, C.L., Walters, W.A., Parfrey, L.W., Clemente, J.C., Gevers, D., und Knight, R. (2011). Experimental and analytical tools for studying the human microbiome. *Nat Rev Genet* 13(1), 47-58.
- Kuehn, J.S., Gorden, P.J., Munro, D., Rong, R., Dong, Q., Plummer, P.J., Wang, C., und Phillips, G.J. (2013). Bacterial community profiling of milk samples as a means to understand culture-negative bovine clinical mastitis. *PLoS One* 8(4), e61959.
- Kulichevskaya, I.S., Naumoff, D.G., Miroshnikov, K.K., Ivanova, A.A., Philippov, D.A., Hakobyan, A., Rijpstra, W.I.C., Damste, J.S.S., Liesack, W., und Dedysh, S.N. (2020). *Limnoglobus roseus* gen. nov., sp. nov., a novel freshwater planctomycete with a giant genome from the family *Gemmataceae*. *Int J Syst Evol Microbiol* 70(2), 1240-1249.

- Kuykendall, L., Roy, M., O'Neill, J., und Devine, T. (1988). Fatty acids, antibiotic resistance, and deoxyribonucleic acid homology groups of *Bradyrhizobium japonicum*. *Int J Syst Evol Microbiol* 38(4), 358-361.
- Lagkouvardos, I., Joseph, D., Kapfhammer, M., Giritli, S., Horn, M., Haller, D., und Clavel, T. (2016). IMNGS: a comprehensive open resource of processed 16S rRNA microbial profiles for ecology and diversity studies. *Sci Rep* 6, 33721.
- Lagkouvardos, I., Fischer, S., Kumar, N., und Clavel, T. (2017). Rhea: a transparent and modular R pipeline for microbial profiling based on 16S rRNA gene amplicons. *PeerJ* 5, e2836.
- Lapage, S., Sneath, P., Lessel, E., Skerman, V., Seeliger, H., und Clark, W. (1992). *International Code of Nomenclature of Bacteria: Bacteriological Code, 1990 Revision*. Washington DC: ASM Press.
- Lawson, P.A. (2014a). "The genus *Aerococcus*," in *Lactic Acid Bacteria: Biodiversity and Taxonomy*, eds. W.H. Holzapfel & B.J. Wood. John Wiley & Sons, Ltd, 81-90.
- Lawson, P.A. (2014b). "The family *Aerococcaceae*," in *Lactic Acid Bacteria: Biodiversity and Taxonomy*, eds. W.H. Holzapfel & B.J. Wood. John Wiley & Sons, Ltd, 71-74.
- Lazarevic, V., Gaia, N., Girard, M., Francois, P., und Schrenzel, J. (2013). Comparison of DNA extraction methods in analysis of salivary bacterial communities. *PLoS One* 8(7), e67699.
- Li, F., Zhao, W., Li, N., Li, H., Liao, D., Song, J., und Yang, S. (2019). *Suicoccus acidiformans* gen. nov., sp. nov., isolated from a sick pig. *Int J Syst Evol Microbiol* 69(5), 1443-1451.
- Li, N., Wang, Y., You, C., Ren, J., Chen, W., Zheng, H., und Liu, Z. (2018). Variation in raw milk microbiota throughout 12 months and the impact of weather conditions. *Sci Rep* 8(1), 2371.
- Lima, S.F., Bicalho, M.L.S., und 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.
- Loit, K., Adamson, K., Bahram, M., Puusepp, R., Anslan, S., Kiiiker, R., Drenkhan, R., und Tedersoo, L. (2019). Relative performance of MinION (Oxford Nanopore Technologies) versus Sequel (Pacific Biosciences) third-generation sequencing instruments in identification of agricultural and forest fungal pathogens. *Appl Environ Microbiol* 85(21), e01368-01319.
- Ludwig, W., Strunk, O., Klugbauer, S., Klugbauer, N., Weizenegger, M., Neumaier, J., Bachleitner, M., und Schleifer, K.H. (1998). Bacterial phylogeny based on comparative sequence analysis. *Electrophoresis* 19(4), 554-568.
- Ludwig, W., und Klenk, H.-P. (2001). "Overview: a phylogenetic backbone and taxonomic framework for procaryotic systematics," in *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, eds. D.J. Brenner, N.R. Krieg, J.T. Staley & G.M. Garrity. New York: Springer, 49-66.
- Ludwig, W., Schleifer, K.-H., und Whitman, W.B. (2009). "Family II. *Aerococcaceae* fam. nov.," in *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, eds. P. De Vos, G.M. Garrity, D. Jones, N.R. Krieg, W. Ludwig, R. Fred A., K.-H. Schleifer & W.B. Whitman. New York: Springer, 533-548.
- Machado, S.G., Bagliniere, F., Marchand, S., Van Coillie, E., Vanetti, M.C., De Block, J., und Heyndrickx, M. (2017). The biodiversity of the microbiota producing heat-resistant enzymes responsible for spoilage in processed bovine milk and dairy products. *Front Microbiol* 8, 302.
- Maillet, A., Bouju-Albert, A., Roblin, S., Vaissie, P., Leuillet, S., Dousset, X., Jaffres, E., Combrisson, J., und Prevost, H. (2021). Impact of DNA extraction and sampling methods on bacterial communities monitored by 16S rDNA metabarcoding in cold-smoked salmon and processing plant surfaces. *Food Microbiol* 95, 103705.

- Mallet, A., Guéguen, M., Kauffmann, F., Chesneau, C., Sesboué, A., und Desmasures, N.J.I.D.J. (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.
- Marchand, S., Heylen, K., Messens, W., Coudijzer, K., De Vos, P., Dewettinck, K., Herman, L., De Block, J., und Heyndrickx, M. (2009). 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.
- Mardis, E.R. (2008). The impact of next-generation sequencing technology on genetics. *Trends Genet* 24(3), 133-141.
- Maszenan, A., Seviour, R., Patel, B., Schumann, P., und Rees, G. (1999). *Tessaracoccus bendigoensis* gen. nov., sp. nov., a Gram-positive coccus occurring in regular packages or tetrads, isolated from activated sludge biomass. *Int J Syst Evol Microbiol* 49(2), 459-468.
- Mattarelli, P., Holzapfel, W., Franz, C., Endo, A., Felis, G.E., Hammes, W., Pot, B., Dicks, L., und Dellaglio, F. (2014). Recommended minimal standards for description of new taxa of the genera *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* and related genera. *Int J Syst Evol Microbiol* 64(Pt 4), 1434-1451.
- McGovern, E., Waters, S.M., Blackshields, G., und McCabe, M.S. (2018). Evaluating established methods for rumen 16S rRNA amplicon sequencing with mock microbial populations. *Front Microbiol* 9, 1365.
- McMurdie, P.J., und Holmes, S. (2013). phyloseq: an R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PLoS One* 8(4), e61217.
- Meier-Kolthoff, J.P., Auch, A.F., Klenk, H.-P., und Göker, M. (2013). Genome sequence-based species delimitation with confidence intervals and improved distance functions. *BMC Bioinform* 14(1), 1-14.
- Meier-Kolthoff, J.P., und Göker, M. (2019). TYGS is an automated high-throughput platform for state-of-the-art genome-based taxonomy. *Nat Commun* 10(1), 2182.
- Metzger, S.A., Hernandez, L.L., Skarlupka, J.H., Suen, G., Walker, T.M., und Ruegg, P.L. (2018). Influence of sampling technique and bedding type on the milk microbiota: results of a pilot study. *J Dairy Sci* 101(7), 6346-6356.
- Metzker, M.L. (2010). Sequencing technologies - the next generation. *Nat Rev Genet* 11(1), 31-46.
- 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(3), 584-586.
- Milchindustrieverband MiV (2020a). <https://milchindustrie.de/marktdaten/erzeugung/> (Zugang am 11.05.2021).
- Milchindustrieverband MiV (2020b). <https://milchindustrie.de/wp-content/uploads/2019/09/Fakten-Milch-September-2019.pdf> (Zugang am 11.05.2021).
- Mollerup, S., Friis-Nielsen, J., Vinner, L., Hansen, T.A., Richter, S.R., Fridholm, H., Herrera, J.A., Lund, O., Brunak, S., Izarzugaza, J.M., Mourier, T., Nielsen, L.P., und Hansen, A.J. (2016). *Propionibacterium acnes*: disease-causing agent or common contaminant? Detection in diverse patient samples by next-generation sequencing. *J Clin Microbiol* 54(4), 980-987.
- Montel, M.C., Buchin, S., Mallet, A., Delbes-Paus, C., Vuitton, D.A., Desmasures, N., und Berthier, F. (2014). Traditional cheeses: rich and diverse microbiota with associated benefits. *Int J Food Microbiol* 177, 136-154.
- Moore, E.R., Mihaylova, S.A., Vandamme, P., Krichevsky, M.I., und Dijkshoorn, L. (2010). Microbial systematics and taxonomy: relevance for a microbial commons. *Res Microbiol* 161(6), 430-438.

- Mounier, J., Gelsomino, R., Goerges, S., Vancanneyt, M., Vandemeulebroecke, K., Hoste, B., Scherer, S., Swings, J., Fitzgerald, G.F., and Cogan, T.M. (2005). Surface microflora of four smear-ripened cheeses. *Appl Environ Microbiol* 71(11), 6489-6500.
- Mungai, E.A., Behravesh, C.B., and Gould, L.H. (2015). Increased outbreaks associated with nonpasteurized milk, United States, 2007-2012. *Emerg Infect Dis* 21(1), 119-122.
- Murphy, K., Curley, D., O'Callaghan, T.F., O'Shea, C.A., Dempsey, E.M., O'Toole, P.W., Ross, R.P., Ryan, C.A., and Stanton, C. (2017). The composition of human milk and infant faecal microbiota over the first three months of life: a pilot study. *Sci Rep* 7, 40597.
- Murphy, M., Sharifou, M., and Moran, C. (2002). High quality genomic DNA extraction from large milk samples. *J Dairy Res* 69, 645-649.
- Na, S.-I., Kim, Y.O., Yoon, S.-H., Ha, S.-m., Baek, I., and Chun, J. (2018). UBCG: Up-to-date bacterial core gene set and pipeline for phylogenomic tree reconstruction. *J Microbiol* 56(4), 280-285.
- Nakamura, K., Hiraishi, A., Yoshimi, Y., Kawaharasaki, M., Masuda, K., and Kamagata, Y. (1995). *Microlunatus phosphovor* gen. nov., sp. nov., a new gram-positive polyphosphate-accumulating bacterium isolated from activated sludge. *Int J Syst Evol Microbiol* 45(1), 17-22.
- Nayfach, S., and Pollard, K.S. (2015). Average genome size estimation improves comparative metagenomics and sheds light on the functional ecology of the human microbiome. *Genome Biol* 16, 51.
- Oikonomou, G., Machado, V.S., Santisteban, C., Schukken, Y.H., and Bicalho, R.C. (2012). Microbial diversity of bovine mastitic milk as described by pyrosequencing of metagenomic 16S rDNA. *PLoS One* 7(10), e47671.
- Oikonomou, G., Bicalho, M.L., Meira, E., Rossi, R.E., Foditsch, C., Machado, V.S., Teixeira, A.G., Santisteban, C., Schukken, Y.H., and Bicalho, R.C. (2014). Microbiota of cow's milk; distinguishing healthy, sub-clinically and clinically diseased quarters. *PLoS One* 9(1), e85904.
- Owen, A.J., and Andrews, A.T. (1984). A procedure for the complete clarification of milk of various species and its suitability for use with colorimetric measurements. *J Dairy Res* 51(2), 307-315.
- Pahlow, G., Muck, R.E., Driehuis, F., Elferink, S.J.O., and Spoelstra, S.F. (2003). Microbiology of ensiling. *Silage Sci Technol* 42, 31-93.
- Panek, M., Cipcic Paljetak, H., Baresic, A., Peric, M., Matijasic, M., Lojkic, I., Vranesic Bender, D., Krznicaric, Z., and Verbanac, D. (2018). Methodology challenges in studying human gut microbiota - effects of collection, storage, DNA extraction and next generation sequencing technologies. *Sci Rep* 8(1), 5143.
- Parente, E., Zotta, T., Faust, K., De Filippis, F., and Ercolini, D. (2017). Structure of association networks in food bacterial communities. *Food Microbiol* 73, 49-60.
- Parente, E., Ricciardi, A., and Zotta, T. (2020). The microbiota of dairy milk: a review. *Int Dairy J* 107, 104714.
- Patel, J.B. (2001). 16S rRNA gene sequencing for bacterial pathogen identification in the clinical laboratory. *Mol Diagn* 6(4), 313-321.
- Patel, R.K., and Jain, M. (2012). NGS QC Toolkit: a toolkit for quality control of next generation sequencing data. *PloS One* 7(2), e30619.
- Pfister, H., Morzadec, C., Le Cann, P., Madec, L., Lecureur, V., Chouvet, M., Jouneau, S., and Vernhet, L. (2017). Granulometry, microbial composition and biological activity of dusts collected in French dairy farms. *Environ Res* 158, 691-702.
- Pikuta, E.V., Menes, R.J., Bruce, A.M., Lyu, Z., Patel, N.B., Liu, Y., Hoover, R.B., Busse, H.J., Lawson, P.A., and Whitman, W.B. (2016). *Raineyella antarctica* gen. nov., sp. nov., a psychrotolerant, d-amino-acid-utilizing anaerobe isolated from two geographic locations of the Southern Hemisphere. *Int J Syst Evol Microbiol* 66(12), 5529-5536.

- Polz, M.F., und Cavanaugh, C.M. (1998). Bias in template-to-product ratios in multitemplate PCR. *Appl Environ Microbiol* 64(10), 3724-3730.
- Porcellato, D., Meisal, R., Bombelli, A., und Narvhus, J.A. (2020). A core microbiota dominates a rich microbial diversity in the bovine udder and may indicate presence of dysbiosis. *Sci Rep* 10(1), 21608.
- Porcellato, D., Smistad, M., Bombelli, A., Abdelghani, A., Jørgensen, H.J., und Skeie, S.B. (2021). Longitudinal study of the bulk tank milk microbiota reveals major temporal shifts in composition. *Front Microbiol* 12, 616429.
- Pruesse, E., Peplies, J., und Glockner, F.O. (2012). SINA: accurate high-throughput multiple sequence alignment of ribosomal RNA genes. *Bioinformatics* 28(14), 1823-1829.
- Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., Peplies, J., und Glockner, F.O. (2013). The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res* 41(D1), D590-D596.
- Quigley, L., O'Sullivan, O., Beresford, T.P., Paul Ross, R., Fitzgerald, G.F., und Cotter, P.D. (2012). A comparison of methods used to extract bacterial DNA from raw milk and raw milk cheese. *J Appl Microbiol* 113(1), 96-105.
- Quigley, L., McCarthy, R., O'Sullivan, O., Beresford, T.P., Fitzgerald, G.F., Ross, R.P., Stanton, C., und Cotter, P.D. (2013a). The microbial content of raw and pasteurized cow milk as determined by molecular approaches. *J Dairy Sci* 96(8), 4928-4937.
- Quigley, L., O'Sullivan, O., Stanton, C., Beresford, T.P., Ross, R.P., Fitzgerald, G.F., und Cotter, P.D. (2013b). The complex microbiota of raw milk. *FEMS Microbiol Rev* 37(5), 664-698.
- Raats, D., Offek, M., Minz, D., und Halpern, M. (2011). Molecular analysis of bacterial communities in raw cow milk and the impact of refrigeration on its structure and dynamics. *Food Microbiol* 28(3), 465-471.
- Rainard, P. (2017). Mammary microbiota of dairy ruminants: fact or fiction? *Vet Res* 48(1), 25.
- Rasolofoa, E.A., St-Gelais, D., LaPointe, G., und Roy, D. (2010). Molecular analysis of bacterial population structure and dynamics during cold storage of untreated and treated milk. *Int J Food Microbiol* 138(1-2), 108-118.
- Reddy, C., Beveridge, T.J., Breznak, J.A., Marzluf, G., Schmidt, T., und Snyder, L. (2007). *Methods for General and Molecular Microbiology*. Washington: American Society for Microbiology Press.
- Rhuland, L.E., Work, E., Denman, R.F., und Hoare, D.S. (1955). The behavior of the isomers of α,ϵ -diaminopimelic acid on paper chromatograms. *J Am Chem Soc* 77(18), 4844-4846.
- Richter, M., und Rosselló-Móra, R. (2009). Shifting the genomic gold standard for the prokaryotic species definition. *PNAS* 106(45), 19126-19131.
- Rodriguez-R, L.M., und Konstantinidis, K.T. (2014). Bypassing cultivation to identify bacterial species. *Microbe* 9(3), 111-118.
- Rossello-Mora, R., und Amann, R. (2015). Past and future species definitions for bacteria and archaea. *Syst Appl Microbiol* 38(4), 209-216.
- Rosselló-Mora, R., und Amann, R. (2001). The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiol Rev* 25(1), 39-67.
- Ruegg, P.L. (2017). A 100-year review: mastitis detection, management, and prevention. *J Dairy Sci* 100(12), 10381-10397.
- Sakwinska, O., Moine, D., Delley, M., Combremont, S., Rezzonico, E., Descombes, P., Vinyes-Pares, G., Zhang, Y., Wang, P., und Thakkar, S.K. (2016). Microbiota in breast milk of chinese lactating mothers. *PLoS One* 11(8), e0160856.

- Salipante, S.J., Kawashima, T., Rosenthal, C., Hoogestraat, D.R., Cummings, L.A., Sengupta, D.J., Harkins, T.T., Cookson, B.T., und Hoffman, N.G. (2014). Performance comparison of Illumina and ion torrent next-generation sequencing platforms for 16S rRNA-based bacterial community profiling. *Appl Environ Microbiol* 80(24), 7583-7591.
- Schleifer, K.H., und Kandler, O. (1972). Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. *Bacteriol Rev* 36(4), 407-477.
- Scholz, C.F.P., und Kilian, M. (2016). The natural history of cutaneous propionibacteria, and reclassification of selected species within the genus *Propionibacterium* to the proposed novel genera *Acidipropionibacterium* gen. nov., *Cutibacterium* gen. nov. and *Pseudopropionibacterium* gen. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 66(11), 4422-4432.
- Schreiner, M. (2014). Biodiversitätsanalyse der Rohmilchmikrobiota mittels Next Generation Sequencing: Methodenoptimierung und Veränderung der Mikrobiota während der Kühllagerung *Masterarbeit, Technische Universität München, Lehrstuhl für Mikrobielle Ökologie.*
- Schumann, P. (2011). "Peptidoglycan Structure," in *Taxonomy of Prokaryotes*, eds. F. Rainey & A. Oren. *Methods Microbiol* (38): Academic Press, 101-129.
- Schwab, C., Voney, E., Ramirez Garcia, A., Vischer, M., und Lacroix, C. (2019). Characterization of the cultivable microbiota in fresh and stored mature human breast milk. *Front Microbiol* 10, 2666.
- Sharpton, T.J. (2014). An introduction to the analysis of shotgun metagenomic data. *Front Plant Sci* 5, 209.
- Shendure, J., und Ji, H. (2008). Next-generation DNA sequencing. *Nat Biotechnol* 26(10), 1135-1145.
- Siebert, A., Huptas, C., Wenning, M., Scherer, S., und Doll, E.V. (2020). *Fundicoccus ignavus* gen. nov., sp. nov., a novel genus of the family *Aerococcaceae* isolated from bulk tank milk. *Int J Syst Evol Microbiol* 70(8), 4774-4781.
- Siebert, A., Hofmann, K., Staib, L., Doll, E.V., Scherer, S., und Wenning, M. (2021). Amplicon-sequencing of raw milk microbiota: impact of DNA extraction and library-PCR. *Appl Microbiol Biotechnol* 105, 4761-4773.
- Sinclair, L., Osman, O.A., Bertilsson, S., und Eiler, A. (2015). Microbial community composition and diversity via 16S rRNA gene amplicons: evaluating the illumina platform. *PLoS One* 10(2), e0116955.
- Skeie, S.B., Haland, M., Thorsen, I.M., Narvhus, J., und Porcellato, D. (2019). Bulk tank raw milk microbiota differs within and between farms: a moving goalpost challenging quality control. *J Dairy Sci* 102, 1-13.
- Stackebrandt, E., Rainey, F.A., und Ward-Rainey, N.L. (1997). Proposal for a new hierarchic classification system, *Actinobacteria* classis nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 47(2), 479-491.
- Stackebrandt, E. (2002). Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *Int J Syst Evol Microbiol* 52(3), 1043-1047.
- Stackebrandt, E. (2006). "Defining Taxonomic Ranks," in *The Prokaryotes*, eds. M. Dworking, S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer & E. Stackebrandt. New York: Springer, 29-57.
- Stackebrandt, E., Cummings, L.A., und Johnson, A.J. (2006). "Family *Propionibacteriaceae*: The Genus *Propionibacterium*," in *The Prokaryotes*, eds. M. Dworking, S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer & E. Stackebrandt. New York: Springer, 400-418.
- Stackebrandt, E., und Ebers, J. (2006). Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards. *Microbiol Today Nov* 6, 152-155.

- Stackebrandt, E., und Schaal, K.P. (2006). "The Family *Propionibacteriaceae*: The Genera *Friedmaniella*, *Luteococcus*, *Microlunatus*, *Micropruina*, *Propioniferax*, *Propionimicrobium*, *Tessarococcus*," in *The Prokaryotes*, eds. M. Dworking, S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer & E. Stackebrandt. New York: Springer, 429-445.
- Stoeckel, M., Lidolt, M., Achberger, V., Glück, C., Krewinkel, M., Stressler, T., von Neubeck, M., Wenning, M., Scherer, S., Fischer, L., und Hinrichs, J. (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.
- Sun, L., Dicksved, J., Priyashantha, H., Lundh, A., und Johansson, M. (2019). Distribution of bacteria between different milk fractions, investigated using culture-dependent methods and molecular-based and fluorescent microscopy approaches. *J Appl Microbiol* 127(4), 1028-1037.
- Sze, M.A., und Schloss, P.D. (2019). The impact of DNA polymerase and number of rounds of amplification in PCR on 16S rRNA gene sequence data. *mSphere* 4(3), e00163-00119.
- Tamura, T., Takeuchi, M., Yokota, A., und Microbiology, E. (1994). *Luteococcus japonicus* gen. nov., sp. nov., a new gram-positive coccus with LL-diaminopimelic acid in the cell wall. *Int J Syst Evol Microbiol* 44(2), 348-356.
- Taponen, S., McGuinness, D., Hiitio, H., Simojoki, H., Zadoks, R., und Pyörala, S. (2019). Bovine milk microbiome: a more complex issue than expected. *Vet Res* 50(1), 44.
- Tatusova, T., DiCuccio, M., Badretdin, A., Chetvernin, V., Nawrocki, E.P., Zaslavsky, L., Lomsadze, A., Pruitt, K.D., Borodovsky, M., und Ostell, J. (2016). NCBI prokaryotic genome annotation pipeline. *Nucleic Acids Res* 44(14), 6614-6624.
- R Core Team (2020). "R: a language and environment for statistical computing.", in: <http://www.r-project.org/> (Zugang am 23.03.2021).
- Teh, K.H., Flint, S., Palmer, J., Andrewes, P., Bremer, P., und Lindsay, D. (2012). Proteolysis produced within biofilms of bacterial isolates from raw milk tankers. *Int J Food Microbiol* 157(1), 28-34.
- Thierry, A., Deutsch, S.M., Falentin, H., Dalmasso, M., Cousin, F.J., und Jan, G. (2011). New insights into physiology and metabolism of *Propionibacterium freudenreichii*. *Int J Food Microbiol* 149(1), 19-27.
- Thijs, S., Op De Beeck, M., Beckers, B., Truyens, S., Stevens, V., Van Hamme, J.D., Weyens, N., und Vangronsveld, J. (2017). Comparative evaluation of four bacteria-specific primer pairs for 16S rRNA gene surveys. *Front Microbiol* 8, 494.
- Thomas, M., Webb, M., Ghimire, S., Blair, A., Olson, K., Fenske, G.J., Fonder, A.T., Christopher-Hennings, J., Brake, D., und Scaria, J. (2017). Metagenomic characterization of the effect of feed additives on the gut microbiome and antibiotic resistome of feedlot cattle. *Sci Rep* 7(1), 12257.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., und Gibson, T.J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22(22), 4673-4680.
- Tindall, B.J., Sikorski, J., Smibert, R.A., und Krieg, N.R. (2007). "Phenotypic characterization and the principles of comparative systematics," in *Methods for General and Molecular Microbiology*, eds. Reddy C, Beveridge T, Breznak JA, Marzluf G, Schmidt TM & S. LR. DC: American Society of Microbiology, 330-393.
- Tindall, B.J., Rosselló-Móra, R., Busse, H.-J., Ludwig, W., und Kämpfer, P. (2010). Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes. *Int J Syst Evol Microbiol* 60(1), 249-266.

- TRBA 466 (2015). "Einstufung von Prokaryonten (Bacteria und Archaea) in Risikogruppen". Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin.
- Trüper, H., und Schleifer, K.-H. (2006). "Prokaryote characterization and identification," in *The Prokaryotes*, eds. M. Dworking, S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer & E. Stackebrandt. New York: Springer, 58-69.
- Vacheyrou, M., Normand, A.C., Guyot, P., Cassagne, C., Piarroux, R., und Bouton, Y. (2011). Cultivable microbial communities in raw cow milk and potential transfers from stables of sixteen French farms. *Int J Food Microbiol* 146(3), 253-262.
- Vaidya, J.D., van den Bogert, B., Edwards, J.E., Boekhorst, J., van Gastelen, S., Saccenti, E., Plugge, C.M., und Smidt, H. (2018). The effect of DNA extraction methods on observed microbial communities from fibrous and liquid rumen fractions of dairy cows. *Front Microbiol* 9, 92.
- Vandamme, P., Pot, B., Gillis, M., De Vos, P., Kersters, K., und Swings, J. (1996). Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol Rev* 60(2), 407-438.
- Vandamme, P., De Bruyne, K., und Pot, B. (2014). "Phylogenetics and systematics," in *Lactic Acid Bacteria: Biodiversity and Taxonomy.*, eds. W. Holzapfel & B. Wood. John Wiley & Sons, Ltd., 31-44.
- Vangay, P., Johnson, A.J., Ward, T.L., Al-Ghalith, G.A., Shields-Cutler, R.R., Hillmann, B.M., Lucas, S.K., Beura, L.K., Thompson, E.A., Till, L.M., Batres, R., Paw, B., Pergament, S.L., Saenyakul, P., Xiong, M., Kim, A.D., Kim, G., Masopust, D., Martens, E.C., Angkurawanon, C., McGready, R., Kashyap, P.C., Culhane-Pera, K.A., und Knights, D. (2018). US immigration westernizes the human gut microbiome. *Cell* 175(4), 962-972.
- Vogtmann, E., Hua, X., Zeller, G., Sunagawa, S., Voigt, A.Y., Hercog, R., Goedert, J.J., Shi, J., Bork, P., und Sinha, R. (2016). Colorectal cancer and the human gut microbiome: reproducibility with whole-genome shotgun sequencing. *PLoS One* 11(5), e0155362.
- von Neubeck, M., Baur, C., Krewinkel, M., Stoeckel, M., Kranz, B., Stressler, T., Fischer, L., Hinrichs, J., Scherer, S., und Wenning, M. (2015). Biodiversity of refrigerated raw milk microbiota and their enzymatic spoilage potential. *Int J Food Microbiol* 211, 57-65.
- von Neubeck, M., Huptas, C., Glück, C., Krewinkel, M., Stoeckel, M., Stressler, T., Fischer, L., Hinrichs, J., Scherer, S., und Wenning, M. (2016). *Pseudomonas helleri* sp. nov. and *Pseudomonas weihenstephanensis* sp. nov., isolated from raw cow's milk. *Int J Syst Evol Microbiol* 66(3), 1163-1173.
- Wagner Mackenzie, B., Waite, D.W., und Taylor, M.W. (2015). Evaluating variation in human gut microbiota profiles due to DNA extraction method and inter-subject differences. *Front Microbiol* 6, 130.
- Wang, G.C.-Y., und Wang, Y. (1997). Frequency of formation of chimeric molecules as a consequence of PCR coamplification of 16S rRNA genes from mixed bacterial genomes. *Appl Environ Microbiol* 63, 4645-4650.
- Wang, H., Du, P., Li, J., Zhang, Y., Zhang, W., Han, N., Woo, P.C.Y., und Chen, C. (2014). Comparative analysis of microbiome between accurately identified 16S rDNA and quantified bacteria in simulated samples. *J Med Microbiol* 63(Pt 3), 433-440.
- Wang, Q., Garrity, G.M., Tiedje, J.M., und Cole, J.R. (2007). Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Appl Environ Microbiol* 73(16), 5261-5267.
- Weber, M., Liedtke, J., Plattes, S., und 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.

- Wenning, M., Breitenwieser, F., Huptas, C., Doll, E., Bachler, B., Schulz, A., Dunkel, A., Hofmann, T., von Neubeck, M., Busse, H.J., und Scherer, S. (2020). *Brevilactibacter flavus* gen. nov., sp. nov., a novel bacterium of the family *Propionibacteriaceae* isolated from raw milk and dairy products and reclassification of *Propioniciclava sinopodophylli* as *Brevilactibacter sinopodophylli* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 70(4), 2186-2193.
- Whitman, W.B., Coleman, D.C., und Wiebe, W.J. (1998). Prokaryotes: the unseen majority. *PNAS* 95, 6578-6583.
- Whitman, W.B. (2015). Genome sequences as the type material for taxonomic descriptions of prokaryotes. *Syst Appl Microbiol* 38(4), 217-222.
- Williams, R., Hirsch, A., und Cowan, S. (1953). *Aerococcus*, a new bacterial genus. *Microbiology* 8(3), 475-480.
- Willis, C., Jorgensen, F., Aird, H., Elviss, N., Fox, A., Jenkins, C., Fenelon, D., Sadler-Reeves, L., und McLauchlin, J. (2018). An assessment of the microbiological quality and safety of raw drinking milk on retail sale in England. *J Appl Microbiol* 124(2), 535-546.
- Woese, C.R. (1987). Bacterial evolution. *Microbiol Rev* 51(2), 221.
- Woese, C.R., Kandler, O., und Wheelis, M.L. (1990). Towards a natural system of organisms: proposal for the domains archaea, bacteria, and eucarya. *PNAS* 87(12), 4576-4579.
- Yarza, P., Richter, M., Peplies, J., Euzéby, J., Amann, R., Schleifer, K.-H., Ludwig, W., Glöckner, F.O., und Rosselló-Móra, R. (2008). The all-species living tree project: a 16S rRNA-based phylogenetic tree of all sequenced type strains. *Syst Appl Microbiol* 31(4), 241-250.
- Yarza, P., Yilmaz, P., Pruesse, E., Glöckner, F.O., Ludwig, W., Schleifer, K.-H., Whitman, W.B., Euzéby, J., Amann, R., und Rosselló-Móra, R. (2014). Uniting the classification of cultured and uncultured bacteria and archaea using 16S rRNA gene sequences. *Nat Rev Microbiol* 12(9), 635-645.
- Yoon, S.-H., Ha, S.-M., Kwon, S., Lim, J., Kim, Y., Seo, H., und Chun, J. (2017). Introducing EzBioCloud: a taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies. *Int J Syst Evol Microbiol* 67(5), 1613-1617.
- Yuan, S., Cohen, D.B., Ravel, J., Abdo, Z., und Forney, L.J. (2012). Evaluation of methods for the extraction and purification of DNA from the human microbiome. *PLoS One* 7(3), e33865.
- Zangerl, P. (2016). "Verderb durch Mikroorganismen," in *Milchkunde und Milchhygiene*, eds. E. Märtlbauer & H. Becker. Stuttgart: Eugen Ulmer KG, 296-321.
- Zhang, J., Shi, H., Wang, Y., Li, S., Cao, Z., Ji, S., He, Y., und Zhang, H. (2017). Effect of dietary forage to concentrate ratios on dynamic profile changes and interactions of ruminal microbiota and metabolites in Holstein Heifers. *Front Microbiol* 8, 2206.
- Zhang, Z., Wang, Y., Hou, Q., Zhao, H., Li, W., Sun, Z., und Guo, Z. (2020). *Lactobacillus enshiensis* sp. nov., a novel arsenic-resistant bacterium. *Int J Syst Evol Microbiol* 70(4), 2580-2587.
- Zimin, A.V., Delcher, A.L., Florea, L., Kelley, D.R., Schatz, M.C., Puiu, D., Hanrahan, F., Pertea, G., Van Tassell, C.P., und Sonstegard, T.S. (2009). A whole-genome assembly of the domestic cow, *Bos taurus*. *BMC Genome Biology* 10(4), R42.

DANKSAGUNG

Mein ausdrücklicher Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Scherer für die Möglichkeit diese Arbeit anzufertigen und das mir entgegengebrachte Vertrauen. Danke für die stets herzliche und positive Arbeitsatmosphäre an ihrem Lehrstuhl.

Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Prof. Dr. Vogel für die Erstellung des Zweitgutachtens und bei Herrn Prof. Dr. Kulozik für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei Mareike Wenning und Etienne Doll, für die hervorragende und kompetente Betreuung. Vielen Dank euch beiden für die konstruktiven und freundschaftlichen Gespräche, eure vielen Anregungen, die motivierenden Worte und nicht zuletzt die unzähligen Korrekturen durch die ich mich weiterentwickeln konnte. Danke für eure Zeit, die ihr euch bei jeglichen Anliegen, auch nach eurer Zeit am Lehrstuhl, für mich genommen habt.

Vielen herzlichen Dank auch an Lena Staib für die super Unterstützung bei der Projektkoordination und die Hilfsbereitschaft in jeglicher Hinsicht. Damit danke ich auch dem gesamten Team vom Max Ruber-Institut in Kiel für die Kooperation, vor allem Gregor Fiedler für den fachlichen Austausch. Ich danke auch Caroline Ziegler von der Core-Facility für die Hilfestellung bei den Sequenzierungen.

Weiterhin vielen Dank an Kathi für den reibungslosen Ablauf bei der gemeinsamen Bearbeitung des immensen Probenaufkommens. Lieben Dank auch an Genia für die schöne Zusammenarbeit und an Chris für den bioinformatischen Einsatz. Ein großes Dankeschön an Angela, Inge, Lisa, Patrick und Sonja für die zuverlässige Unterstützung im Laboralltag. Euer Engagement und eure Spontanität habe ich sehr geschätzt, es hat mir Spaß gemacht mit euch zu arbeiten. Allen Kolleginnen und Kollegen des Lehrstuhls bin ich dankbar für den kollegialen Umgang, die tollen Gespräche und eine wunderbare Doktorandenzeit. Meine lieben Bürokollegen Anna, Mariana und Chris aber auch Alina, danke euch für die lustige, stets optimistische Stimmung und die tolle Zeit in unseren unvergesslichen Urlauben.

Zum Schluss möchte ich mich bei meiner Familie bedanken. Ich bin unendlich dankbar für euren Rückhalt und all das, was ihr mir in den vielen Jahren ermöglicht habt damit ich meinen Weg gehen kann. Von ganzem Herzen bedanke ich mich auch bei meinem Freund Steven. Danke für deine Unterstützung und deine Geduld, die du vor allem in den letzten Wochen beim Schreiben der Arbeit aufgebracht hast.

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

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

**Rohmilchmikrobiota in Nord- und Süddeutschland –
Zusammensetzung und Ermittlung hofseitiger Einflussfaktoren**

am Lehrstuhl für Mikrobielle Ökologie, 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.

Ich habe keine Organisation eingeschaltet, die gegen Entgelt Betreuerinnen und Betreuer für die Anfertigung von Dissertationen sucht, oder die mir obliegenden Pflichten hinsichtlich der Prüfungsleistung 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, Unterschrift

CURRICULUM VITAE

ANNEMARIE KAROLINE SIEBERT

Persönliche Daten

Geburtsdatum	19.09.1991
Geburtsort	Grünstadt
Staatsangehörigkeit	deutsch

Ausbildung

Seit 10/2017	Promotionsstudium an der Technischen Universität München, TUM School of Life Sciences, Lehrstuhl für Mikrobielle Ökologie (Prof. Dr. Siegfried Scherer) Doktorarbeit: „Rohmilchmikrobiota in Nord- und Süddeutschland – Zusammensetzung und Ermittlung hofseitiger Einflussfaktoren“
10/2014 – 04/2017	Masterstudium Biologie, Technische Universität München Masterarbeit, Lehrstuhl für Technische Mikrobiologie (Prof. Dr. Rudi F. Vogel): „Identifizierung und Charakterisierung von Gushing-assoziierten Proteinen im Schaumwein“
10/2011 - 09/2014	Bachelorstudium Biologie, Johannes Gutenberg-Universität Mainz Bachelorarbeit, Institut für Mikrobiologie (Prof. Dr. Gottfried Uden): „DcuS/CitA Hybridsensoren in <i>Escherichia coli</i> “
2002 - 2011	Abitur , Leiniger-Gymnasium, Grünstadt