TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Lehrstuhl für Mikrobielle Ökologie

Analyse der bakteriellen Biodiversität von boviner Rohmilch mittels kultureller und kulturunabhängiger Verfahren

Franziska Thekla Breitenwieser

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

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

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

Die Dissertation wurde am 23.03.2018 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 04.07.2018 angenommen.

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS I
ZUSAMMENFASSUNG V
SUMMARY VII
ABBILDUNGSVERZEICHNIS IX
TABELLENVERZEICHNIS XI
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS XIII

1. EINLEITUNG 1

1.1 Rohmilch 1

1.1.1 Gesetzliche Vorgaben zur Rohmilchqualität 1
1.1.2 Rohmilchmikrobiota 2

1.1.2.1 Kontaminationsquellen auf die mikrobielle Zusammensetzung frisch ermolkener Rohmilch 2
1.1.2.2 Einflussfaktoren auf die Rohmilch 3

1.2 Kulturabhängige und kulturunabhängige Analyse der Rohmilchmikrobiota 5

1.2.1 Kulturabhängige Methoden 5
1.2.2 Kulturunabhängige Methoden 7

1.3 Verderb von Milchprodukten 10

1.3.1 Verderb durch vegetative Keime 11
1.3.2 Verderb durch hitze-stabile Enzyme 12

1.4 Ziel der Arbeit 14

2. MATERIAL UND METHODEN 16

2.1 Probenmaterial und Probenahme 16

2.1.1 Betriebsdaten 16
2.1.2 Probenahme und Probenzeitraum der Rohmilch analysiert mit einer Stichprobengröße von 50 bzw. 500 Isolaten 17

2.1.3 Probenahme und Probenzeitraum der Rohmilch analysiert mit einer Stichproben-größe von 1500 Isolaten 18

2.2 Kulturabhängige Analyse der Rohmilchmikrobiota 18

2.2.1 Gesamtkeimzahlbestimmung und Biodiversitätsanalyse 18
2.2.2 Identifizierung der Isolate mittels FT-IR Spektroskopie 19

2.2.2.1 Probenaufbereitung und Messung 19
2.2.2.2 Auswertung und Identifizierung der Spektren 20
2.2.2.3 Cluster-Analyse 20

2.2.3 Identifizierung der Isolate anhand von DNA-Sequenzen 20

2.2.3.1 DNA-Extraktion 20
2.2.3.2 PCR Ansatz und Sequenzierung des 16S rDNA bzw. *rpoB* Gens 21
2.2.3.3 Identifizierung der Sequenzen 22

2.3 Kulturunabhängige Analyse (llumina Sequenzierung) der Rohmilchmikrobiota 23

2.3.1 Aufarbeitung der Rohmilch 23

2.3.1.1 Konzentrierung der Bakterienzellen 23
2.3.1.2 Entfernung des Caseins 23

2.3.2 DNA-Extraktion 24
2.3.3 Anreicherung und Aufreinigung der bakteriellen DNA 25
2.3.4 Bestimmung der bakteriellen DNA-Konzentration 25
2.3.5 Library Preparation für die Illumina Sequenzierung 27
2.3.6 Sequenzierung 30
2.3.7 Sequenzauswertung und Identifizierung 30

2.4 Statistische Auswertung 31
2.5 Taxonomische Methoden 31

2.5.1 Phylogenetische Analyse 31
2.5.2 Morphologische Charakterisierung 32
2.5.3 Physiologische Charakterisierung 33

2.5.3.1 Enzymatische Aktivität und Substratverwertung 33
2.5.3.2 Wachstumsgrenzen 34

2.5.4 Chemotaxonomische Charakterisierung 34

2.5.4.1 Peptidoglykan-Analyse 35
2.5.4.2 Zelluläre Fettsäuren 35
2.5.4.3 Ganzzell-Zucker 35
2.5.4.4 G+C Gehalt 35
2.5.4.5 Quinone und Polare Lipide 35

3. ERGEBNISSE 37

3.1 Zusammensetzung der Rohmilchmikrobiota von 21 Betrieben 37

3.1.1 Einteilung der Tankmilchproben anhand der Gesamtkeimzahl 37
3.1.2 Abundanz und Prävalenz der häufigsten Gattungen 38
3.1.3 Einflussfaktoren auf die Rohmilchmikrobiota 41

3.1.3.1 Zusammenhang von Gesamtkeimzahl, Biodiversität und taxonomischen Großgruppen 41
3.1.3.2 Einflussfaktor Probenalter 43
3.1.3.3 Einflussfaktor Jahreszeit 45

3.1.4 Stabilität und Variabilität der Rohmilchmikrobiota einzelner Betriebe 46
3.1.5 Hofspezifische Mikrobiota 49
3.1.6 Einfluß der Stichprobengröße auf die erfasste Biodiversität 50

3.2 Vergleich der Biodiversität zweier ausgewählter Betriebe mittels kulturabhängiger und -unabhängiger Analyse 51

3.2.1 Erfassung der Biodiversität mittels kulturabhängiger Analyse 52

3.2.1.1 Erfasste Biodiversität von Betrieb 4 52
3.2.1.2 Erfasste Biodiversität von Betrieb 6 55
3.2.1.3 Vergleich der Biodiversität beider Betriebe und Einfluss der Stichprobengröße auf die erfasste Biodiversität 58

3.2.2 Erfassung der Biodiversität mittels Illumina Sequenzierung 62

3.2.2.1 Reproduzierbarkeit der Methodik 62
3.2.2.2 Erfasste Biodiversität von Betrieb 4 und 6 64

3.2.3 Vergleich der kulturabhängigen und -unabhängigen Analysen 66

3.3 Beschreibung einer potentiell neuen Gattung 70

3.3.1 Phylogenetische Einordnung 71
3.3.2 Phänotypische Charakterisierung 72
3.3.3 Chemotaxonomische Charakterisierung 74

4. DISKUSSION 78

4.1 Methoden zur Erfassung der Rohmilchmikrobiota 78
4.2 Biodiversität der Rohmilchmikrobiota 81
4.3 Einflüsse der Mikrobiota auf die Rohmilchqualität 86

5. SCHLUSSFOLGERUNG 92

LITERATURVERZEICHNIS 94
DANKSAGUNG 102
EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG 103
LISTE DER VORVERÖFFENTLICHUNGEN 104
CURRICULUM VITAE 105
ANHANG 106

ZUSAMMENFASSUNG

Die mikrobiologische Qualität von Rohmilch hat einen erheblichen Einfluss auf die Qualität und Haltbarkeit der daraus hergestellten Produkte. Um wirksame Strategien zur Verbesserung der Rohmilchqualität zu entwickeln, ist jedoch mehr Wissen über Zusammensetzung, Variabilität und Stabilität der Rohmilchmikrobiota sowie über mögliche Einflussfaktoren notwendig.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden daher zwei Ansätze verfolgt, die zum einen auf die breite Erfassung vieler Proben abzielten und zum anderen vier Proben im Detail analysierten. Zudem kamen mit dem klassischen kulturellen Verfahren sowie der Hochdurchsatzsequenzierung zwei verschiedene Verfahren der Mikrobiomanalyse zum Einsatz.

Bei der fünfmaligen Beprobung von 21 Betrieben aus Baden-Württemberg mit einer Stichprobengröße von jeweils 50 Isolaten wurde *Pseudomonas* als häufigste Gattung gefunden, die Mikrobiota einzelner Betriebe und oftmals auch einzelner Proben desselben Betriebs schwankten jedoch erheblich. Die Daten lassen darauf schließen, dass es hofspezifische Faktoren gibt, die einen Einfluss auf die Biodiversität, die Keimzahl aber auch auf das Auftreten von spezifischen Gattungen haben. Es wurde festgestellt, dass die Biodiversität von der Gesamtkeimzahl signifikant beeinflusst wird, da Proben mit einer hohen Keimzahl eine geringere Artenvielfalt zeigten. Bei den anderen möglichen Einflussfaktoren konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden, Tendenzen waren jedoch erkennbar. Dies galt insbesondere für den Einfluss der Gesamtkeimzahl auf den Anteil Gram-negativer, obligat aerober Bakterien, sowie der Korrelation zwischen Jahreszeit und dem Probenalter auf die Gesamtkeimzahl.

In tiefgehenden Analysen mit großen Zahlen an identifizierten Isolaten, sollte die Biodiversität von vier Rohmilchmikrobiota im Detail erfasst werden. Eine Erhöhung der Stichprobengröße auf 500 bzw. 1500 Isolate für zwei ausgewählte Betriebe konnte die Mannigfaltigkeit der Rohmilchbiodiversität jedoch nicht vollständig erfassen, wenn auch mit der Stichprobengröße von 1500 Isolaten 112 bzw. 125 Arten detektiert wurden. Daher wurden zwei Rohmilchproben zusätzlich zur Analyse mit einer Stichprobengröße von 1500 Isolaten mittels Next Generation Sequencing (NGS) analysiert. Beim direkten Vergleich beider Methoden konnte festgestellt werden, dass die Ergebnisse teilweise deutlich abweichen, was methodische Gründe wie beispielsweise selektive Lyse, präferenzielle Amplifikation in der PCR oder spezielle

Wachstumsanforderungen haben kann. Mittels NGS konnten viele weitere Taxa identifiziert werden, die im kulturabhängigen Ansatz nur schwer oder nicht kultiviert werden konnten, wie etwa anaerobe Bakterien der Ordnung *Clostridiales*, welche insbesondere bei der Käseherstellung zu Problemen führen können. Auch andere Taxa wie z.B. *Staphylococcus* zeigten unterschiedliche Prävalenzen, jedoch ergab sich für beide Milchproben nicht immer ein einheitlicher methodenspezifischer Trend. Die Gründe für abweichende Ergebnisse zwischen kultureller und kulturunabhängiger Analyse sind daher nicht immer klar zu nennen.

Erstaunlich war die Anzahl an bis dato unbekannten Arten (19-23/Probe) und Gattungen (2-5/Probe), die bei der kulturellen Analyse der beiden Betriebe 4 und 6 detektiert wurde. Hier liegt eine Stärke des klassischen Ansatzes der Mikrobiomanalyse, da gewonnene Isolate weitergehend charakterisiert und archiviert werden können. Eine dieser potentiell neuen Gattungen wurde im Rahmen dieser Arbeit morphologisch, physiologisch und chemotaxonomisch charakterisiert und in die Systematik eingeordnet.

Die Daten dieser Arbeit zeigen, dass es für Milcherzeuger möglich ist, eine stabile Mikrobiota mit einer niedrigen Zahl an Gram-negativen Bakterien zu erreichen. Das individuelle Betriebsmanagement scheint eine viel größere Wirkung als andere Faktoren, wie z.B. saisonale Effekte, zu haben. Der Einsatz von kulturabhängigen und -unabhängigen Analyseansätzen ergibt, dass die Biodiversität und Artenzusammensetzung von Rohmilch bislang nur in Ansätzen bekannt ist und am besten durch die Kombination beider Methoden erfasst werden kann.

SUMMARY

The microbiological quality of raw milk has a significant impact on the quality and shelf life of the products produced thereof. More knowledge about the composition, variability and stability of the raw milk microbiota, as well as potential influencing factors are required to develop effective strategies to improve the raw milk quality.

Therefore, two approaches were performed in this work. On the one hand a varitiy of farmes were analysed to record the broad and on the other hand four samples were analyzed in detail. In addition, two different methods of microbiome analysis were used: classical cultural method and high-throughput sequencing.

When sampling 21 farms in Baden-Württemberg five times each time with a sample size of 50 isolates *Pseudomonas* was found to be the most common genus, but the microbiota of individual farms and often even individual samples of the same farm varied considerably. The data suggest that there are farm-specific characteristics that have an impact on biodiversity, on the total plate count but also on the occurrence of specific genera. It was found that the biodiversity is significantly influenced by the total number of bacteria, as samples with a high bacterial count showed lower biodiversity. No significant differences were found for the other possible influencing factors, but tendencies were evident. This was especially true for the influence of the total bacterial count on the proportion of Gram-negative, obligate aerobic bacteria, as well as the correlation between the season and the sample age on the total bacterial count. In-depth analysis of biodiversity of four raw milk microbiota by identifying many isolates, should captured the biodiversity in detail. Increasing the sample size to 500 or 1500 isolates for two selected farms could not fully capture the diversity of raw milk biodiversity, even though by analysing 1500 isolates 112 and 125 species, respectively, were detected. Therefore, two raw milk samples were analyzed in addition to analysis with a sample size of 1500 isolates using Next Generation Sequencing (NGS). By directly comparing the two methods, it was found that the results differ in some cases significantly, which may have methodological reasons such as selective lysis, preferential amplification in the PCR or special growth requirements. By using the NGS methodology many more taxa have been identified, which are difficult or impossible to cultivate in a culture-dependent approach, such as anaerobic bacteria like *Clostridiales*, which can be particularly problematic in cheese production. Other taxa such as e.g. *Staphylococcus* showed different prevalence, but there was not always a consistent method-

specific trend for both milk samples. The reasons for diverging results between cultural and culture-independent analysis are therefore not always clear.

Surprisingly was the number of hitherto unknown species (19-23/ sample) and genera (2-5/ sample) which were detected in the cultural analysis of both farms 4 and 6. This is one of the strengths of the classical approach of microbiome analysis, as isolates can be further characterized and archived. One of these potentially new genera was characterized morphologically, physiologically and chemotaxonomically in this work and classified into the classification systematic.

The data of this thesis shows that it is possible for dairy farmers to achieve a stable microbiota with a low number of Gram-negative bacteria. Individual operational management seems to have a much greater impact than other factors, such as e.g. seasonal effects. The use of culture-dependent and -independent analytical approaches suggests that the biodiversity and species composition of raw milk is so far only vaguely known and can best be captured in a combination of both methods.

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1 Quellen der Milchkontamination auf dem Milchviehbetrieb. 3

Abbildung 2 Schematische Darstellung der Schritte der Illumina Sequenzierung. 9

Abbildung 3 Hypothetischer Mechanismus der UHT-Milch-Destabilisierung durch Casein-Mizellen-Proteolyse durch hitzebeständige Peptidasen während der Lagerung bei Umgebungstemperatur. 14

Abbildung 4 Arbeitschritte der Rohmilchaufarbeitung bis zur DNA-Extraktion. 24

Abbildung 5 Einteilung der logarithmischen aeroben, mesophilen Gesamtkeimzahl der Tankmilchproben in die Güteklassen der deutschen Milchgüteverordnung 38

Abbildung 6 Abundanz und Prävalenzder zehn häufigsten Gattungen. 39

Abbildung 7 Zusammenhang zwischen der aeroben, mesophilen Gesamtkeimzahl und der Biodiversität.. 41

Abbildung 8 Prozentualer Anteil der Gram-negativen, obligat aeroben Bakterien bzw. Gram-positiven Bakterien mit einem hohen G+C Gehalt im Verhältnis zur aeroben, mesophilen Gesamtkeimzahl.. 43

Abbildung 9 Verteilung der aeroben, mesophilen Gesamtkeimzahl, dem prozentualen Anteil Gram-negativer unddem prozentualen Anteil an *Pseudomonas* für die verschiedenen Probenalter. 44

Abbildung 10 Einfluss der Jahreszeit auf die aerobe, mesophile Gesamtkeimzahl und die Keimzahl der Gram-negativen, obligat aeroben Bakterien.. 45

Abbildung 11 Prozentualer Anteil der verschiedenen taxonomischen Großgruppen innerhalb der Mikrobiota der Höfe 4, 9, 16 und 18. 47

Abbildung 12 Durchschnittliche Anzahl detektierter Gattungen sowie Minimum und Maximum für jeden der 21 Betriebe. 48

Abbildung 13 Rarefaction Analyse der einzelnen Betriebe bei vier- bzw. fünffacher Beprobung mit je 50 Isolaten. 51

Abbildung 14 Prozentualer Anteil der Arten mit einer Häufigkeit von ≥ 1% für die Analyse der Rohmilchprobe von Betrieb 4 mit einer Stichprobengröße von mit 500 Isolaten. 53

Abbildung 15 Prozentualer Anteil der Arten mit einer Häufigkeit von ≥ 1% für die Analyse der Rohmilchprobe von Betrieb 4 mit einer Stichprobengröße von mit 1500 Isolaten. 54

Abbildung 16 Prozentualer Anteil der Arten mit einer Häufigkeit von ≥ 1% für die Analyse der Rohmilchprobe von Betrieb 6 mit einer Stichprobengröße von mit 500 Isolaten. 57
Abbildung 17 Prozentualer Anteil der Arten mit einer Häufigkeit von ≥ 1% für die Analyse der Rohmilchprobe von Betrieb 6 mit einer Stichprobengröße von mit 1500 Isolaten. 57
Abbildung 18 Prozentualer Anteil der zehn häufigsten Gattungen an der Mikrobiota für alle drei Stichprobengrößen für Betrieb 4 und 6. 59
Abbildung 19 Rarefaction-Analyse für die Analyse der Rohmilchmikrobiota mit einer Stichprobengröße von 500 Isolate für die Betriebe 4 und 6. 61
Abbildung 20 Prozentuale Verteilung der Reads auf Ebene taxonomischer Gattungen für jede Probe von Betrieb 4 und Betrieb 6. 63
Abbildung 21 Multidimensionale Skalierungs (MDS) Plot für die Teilproben beider Betriebe mittels NGS Methodik. 64
Abbildung 22 Prozentuale Verteilung aller generiert Reads von Betrieb 4 und 6 auf Ebene taxonomischer Phyla. 65
Abbildung 23 Maximum-Likelihood-Baum, basierend auf der fast vollständigen 16S rRNA Sequenz zur phylogenetischen Einordnung der acht gen. nov., sp. nov. Stämme und der Typstämme aller Gattungen der Familie *Propionibacteriaceae* sowie drei ähnlichsten Sequenzen zu WS 4900^T. 72
Abbildung 24 Phasenkontrastbild des Stamms WS 4900^T und Koloniefarbe aller acht Stämme der potentiell neuen Gattung. 73
Abbildung 25 Polare Lipide des Stammes gen. nov., sp. nov. WS 4900^T, aufgetrennt mittels 2-dimensionaler Dünnschichtchromatographie. 75

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1 Dominante Bakteriengruppen in Rohmilchproben nach der Kühllagerung. 4

Tabelle 2 Übersicht über Kuhzahl, Rasse, Haltungsform, Futter, Tankkapzität und Milchmenge für die 21 beprobten Betriebe. 16

Tabelle 3 Primer für die 16S rDNA bzw. *rpoB* Gen Amplifizierung und die erwartete Länge der Fragmente. 21

Tabelle 4 Temperatur- und Zeitprofil für die PCR der Amplifikation des 16S rDNA bzw. *rpoB* Gens. 22

Tabelle 5 Primer für die Sanger Sequenzierung. 22

Tabelle 6 Mischverhältnis von bakteriellen und somatischen Standard für die Erstellung der Standardkurve zur Berechnung des prozentualen Anteils an bakterieller DNA. 25

Tabelle 7 Zusammensetzung des PCR-Ansatzes für die Quantifizierung der bakteriellen DNA-Menge mittels qRT-PCR. 26

Tabelle 8 Temperatur- und Zeitprofil für die Quantifizierung der bakteriellen DNA-Menge mittels qRT-PCR. 26

Tabelle 9 Eingesetzt Menge bakterieller DNA, Anzahl der Zyklen bzw. der unabhängigen PCR-Ansätze für die Ansatzvarianten 1 und 2 des 1. Steps der Library Preparation. 27

Tabelle 10 Verwendete Oligonukleotide für den 1. Step Library Preparation, der Amplifikation der V3-V4 Region des 16S rDNA Gens. 28

Tabelle 11 Zusammensetzung des PCR-Ansatz für die drei verschiedenen Ansätze des 1. Steps der Library Preparation. 28

Tabelle 12 Temperatur- und Zeitprofil für die drei verschiedenen Ansätze des 1. Steps sowie des 2. Steps der Library Preparation. 29

Tabelle 13 Verwendete Oligonukleotide für den 2. Step Library Preparation, dem Anheften von Adapter und Index. 29

Tabelle 14 Zusammensetzung des PCR-Ansatzes für den 2. Step der Library Preparation. 30

Tabelle 15 Auflistung der verwendeten Typstämme und ihrer GenBank Nummer für die Berechnung des phylogenetischen Baumes. 32

Tabelle 16 Prozentualer Anteil der Isolate und Gattungen an den sechs taxonomischen Großgruppen. 39

Tabelle 17 Übersicht der fünf häufigsten Gattungen bei Zusammenfassung aller 4 bzw. 5 Proben eines Betriebs. 40

Tabelle 18 Verteilung der durchschnittlichen aeroben, mesophilen Gesamtkeimzahl und dem prozentualen Anteil Gram-negativer, obligat aerober Bakterien je Probenalter. 44

Tabelle 19 Minimaler, maximaler und durchschnittlicher Anteil sowie Standardabweichung der detektierten Gattungen in einer, zwei oder mehr Proben des gleichen Hofes.. 49

Tabelle 20 Prozentualer Anteil der zehn häufigsten Gattungen für die Analyse der Rohmilchproben von Betrieb 4 mit einer Stichprobengröße von 500 Isolaten (Probe 1) bzw. 1500 Isolaten (Probe 3).. 52

Tabelle 21 Prozentualer Anteil der zehn häufigsten Gattungen für die Analyse der Rohmilchproben von Betrieb 6 mit einer Stichprobengröße von 500 Isolaten (Probe 2) bzw. 1500 Isolaten (Probe 4). 56

Tabelle 22 Vergleich der detektierten Biodiversität für die Betriebe 4 und 6 erfasst mittels kulturabhängiger Analyse für die Stichprobengrößen von 500 bzw. 1500 Isolaten. 58

Tabelle 23 Anzahl der Reads pro Teilprobe und gesamt für Betrieb 4 und 6. 62

Tabelle 24 Auszug aus dem Vergleich des prozentualen Vorkommens auf Ebene taxonomischer Familien erfasst mittels kulturabhängiger (1500 Isolate) bzw. -unabhängiger Methode für die Betrieb 4 und 6. 67

Tabelle 25 Statistischer Vergleich der kulturabhängigen bzw. -unabhängigen Analyse für die Probe von Betrieb 4 und 6. 70

Tabelle 26 Innerartliche Diversität unter den acht Stämmen der potentiellen neuen Gattung. 74

Tabelle 27 Eigenschaften des Stammes WS 4900^{T} und der Typstämme verwandter Gattungen. 76

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

x *g*	Zentrifugalkraft
°C	Grad Celsius
APT	all purpose Agar mit Tween
bp	Basenpaare
BSD	bakterieller Standard
CASO	Caseinpepton-Sojamehlpepton
cm	Zentimeter
ct-Wert	Schwellenwert (engl. *threshold*)
d	Tag
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DSMZ	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EG	Europäische Gemeinschaft
ESL	längere Haltbarkeit (engl. *extended shelf life*)
FAO	Ernährungs- und Landwirtschaftsorganisation der Vereinten Nationen (engl. *Food and Agriculture Organization*)
FT-IR	Fourier-Transform-Infrarot
g	Gramm
GB	Gigabyte
gen. nov.	*genus novum* (neue Gattung)
GKZ	Gesamtkeimzahl
h	Stunde
H_2O	Wasser
H_2S	Schwefelwasserstoff
H_2SO_4	Schwefelsäure
HCl	Chlorwasserstoff
High G+C	*Actinobacteria*, hoher Guanin und Cytosin Gehalt in der DNA
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
K_2HPO_4	Dikaliumhydrogenphosphat
KbE	Koloniebildende Einheit
KNO_3	Kaliumnitrat
KOH	Kaliumhydroxid
l	Liter
log	Logarithmus
m	milli- (10^{-3})
m	Meter
M	molar
MALDI-TOF MS	Matrix Assistierte Laser Desorption Ionisierung - Time of Flight Massenspektrometrie

$MgCl_2$	Magnesiumchlorid
min	Minute
Mio.	Millionen
MPR BW	Milchprüfring Baden-Württemberg e.V.
MIV	Milchindustrie Verband
MSB	Milchsäurebakterien
n	nano- (10^{-9})
N	Normalität
NaCl	Natriumchlorid
NGS	Next Generation Sequencing
OTU	operative taxonomische Einheit (engl. *operational taxonomic unit*)
p	Wahrscheinlichkeit (engl. *probability*)
PC+MM	Plate Count Agar mit Magermilchzusatz
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl. *polymerase chain reaction*)
qRT-PCR	quantitative real-time PCR
RNA	Ribonukleinsäure
rpoB	ß-Untereinheit der bakteriellen RNA-Polymerase
rRNA/rDNA	ribosomale Ribonukleinsäure bzw. Desoxyribonukleinsäure
s	Sekunde
SIM	Sulfid-Indol-Motilität Agar
sp.	Spezies
sp. nov.	*species nova* (neue Art)
ssp.	Subspezies
SSD	somatischer Standard
TBE	TRIS-Borat-EDTA
Tier-LMHV	Tierische Lebensmittel-Hygieneverordnung
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TU	Technische Universität
µ	mikro- (10^{-6})
U	Umdrehungen
UHT	ultrahochtemperiert
V	Volt
ZIEL	Zentralinstitut für Ernährungs- und Lebensmittelforschung
ZnSe	Zinkselenid

1. EINLEITUNG

1.1 Rohmilch

1.1.1 Gesetzliche Vorgaben zur Rohmilchqualität

Milch und Milchprodukte sind bei den Deutschen sehr beliebt, 82% essen mehrmals in der Woche Käse, aber auch Butter (64%), Joghurt (63%), Trinkmilch (62%) und Frischkäse (48%) werden mehrmals wöchentlich konsumiert, so eine repräsentative Umfrage des Meinungsforschungsinstituts Ears & Eyes bei 1000 Bürgern. Für 95% der Befragten ist der Geschmack beim Kauf von Milcherzeugnissen entscheidend, aber auch die Qualität spielt für 80% der Befragten eine Rolle (Haselbach, 2014).

Es ist hinlänglich bekannt, dass die spezifische Zusammensetzung der Rohmilchmikrobiota einen direkten Einfluss auf das Endprodukt hat und maßgeblich den Geschmack, die Qualität und die Haltbarkeit des Produktes beeinflusst (Quigley *et al*., 2013b). Das Hauptkriterium von qualitativer hochwertiger Rohmilch sind ein niedriger Keimgehalt und die Abwesenheit von Verderbs- und pathogenen Keimen (für das Tier als auch für den Menschen) (Hassan und Frank, 2011). In Deutschland gehören Milch und Milchprodukte zu den am strengsten kontrollierten Lebensmitteln. Es gibt keinen Abschnitt auf dem Weg von der Rohmilch bis zum fertigen Produkt, der nicht überwacht, analysiert und protokolliert wird (MIV, 2016). Eine Reihe von Gesetzen und Verordnungen auf deutscher und europäischer Ebene regelt die Qualitätssicherung von Milch und Milchprodukten. Insbesondere das Hygienepaket aus den Verordnungen (EG) Nr. 852 bis 854/2004 ist hier zu nennen. Das Hygienepaket garantiert die Lebensmittelhygiene auf allen Stufen der Herstellung, gewährleistet ein hohes Maß an Lebensmittelsicherheit und Gesundheitsschutz und regelt die amtliche Überwachung. In der Verordnung (EG) Nr. 853/2004 wird unter anderem für Rohmilch vorgeschrieben, dass eine Keimzahl von ≤100.000 Koloniebildende Einheiten (KbE)/ml bzw. eine somatische Zellzahl von ≤400.000 Zellen/ml nicht überschritten werden darf, wobei hier das geometrische Mittel aus mindesten zwei Probenahmen je Monat über zwei bzw. drei Monate betrachtet wird. Des Weiteren muss die Milch unmittelbar nach dem Melken im Fall der täglichen Abholung unverzüglich auf eine Temperatur von nicht mehr als 8 °C und bei nicht täglicher Abholung auf nicht mehr als 6 °C abgekühlt werden. Der Gehalt an Rückständen von Antibiotika darf nicht über den gesetzlich zugelassenen Mengen liegen (EuropeanUnion, 2004). Auf deutscher Ebene regelt die Milchgüte-Verordnung die Güteprüfung und die Bezahlung der Rohmilch, die von Erzeugern an Molkereien angeliefert wird. Auf Grundlage dieser Verordnung kontrolliert der

zuständige Landeskontrollverband bzw. Milchprüfring Fett- und Eiweißgehalt, Keim- und Zellzahl, Hemmstoffe und Gefrierpunkt (MIV, 2016). Allein 2014 wurden in Deutschland 5,5 Mio. Tankmilchproben nach der Milchgüte-Verordnung untersucht. Darüber hinaus werden im Rahmen von Monitoring-Programmen das Vorkommen wichtiger Parameter, wie zum Beispiel Reinigungs- und Desinfektionsmittelrückstände, Dioxine, Aflatoxin M1 oder Melamin geprüft (Baumgartner und Märtlbauer, 2016).

1.1.2 Rohmilchmikrobiota

1.1.2.1 Kontaminationsquellen auf die mikrobielle Zusammensetzung frisch ermolkener Rohmilch

Die von gesunden Tieren produzierte Milch ist im Euter nahezu steril. Erst beim Melkvorgang und der anschließenden Lagerung gelangen Bakterien in die Milch. Hassan und Frank (2011) geben an, dass sich die Mikrobiota von frisch ermolkener Milch zu 30-99% aus Mikro- und Staphylokokken und zu 0-50% aus den Milchsäurebakterien *Streptococcus* und *Lactococcus* zusammensetzt. Alle anderen Bakteriengruppen, wie Sporenbildner, Coryneforme oder Gram-negative Bakterien haben eine Anteil unter 10%, ebenso wie Hefen und Schimmelpilze. Die möglichen Eintragsquellen sind in Abbildung 1 dargestellt. Als Quelle für Mikro- und Staphylokokken, sowie Milchsäurebakterien gelten hauptsächlich die Euter- und Zitzenoberflächen. In der Studie von Verdier-Metz *et al*. (2012) gehörten über 70% der Zitzenhautmikrobiota dem Phylum der *Firmicutes* an, wobei die Zusammensetzung der Mikrobiota auf der Zitzenoberfläche qualitativ und quantitativ von einem Bauernhof zum anderen variierte. Des Weiteren gelangen Gram-positive Bakterien, aber auch Hefen und Schimmelpilze aus der Luft und dem Staub des Stalles in die Milch (Vacheyrou *et al*., 2011). Werden Melkanlage, Milchleitung und Lagertank nicht ausreichend gereinigt und desinfiziert, bleiben Milchrückstände zurück, die ein idealer Nährboden für Mikroorganismen sind und die Bildung von Biofilmen begünstigen. Insbesondere unerwünschte Gram-negative Bakterien gelangen so in die Milch. Aber auch das Wasser, welches für die Euterreinigung und das Reinigen der Geräte genutzt werden, ist Reservoir für diese unerwünschten Keime. Über das Futter gelangen sporenbildende Bakterien in die Milch, die über den Kot ausgeschieden werden und dann in erster Linie über Euter- und Zitzenverschmutzung in die Milch gelangen (Zangerl, 2016).

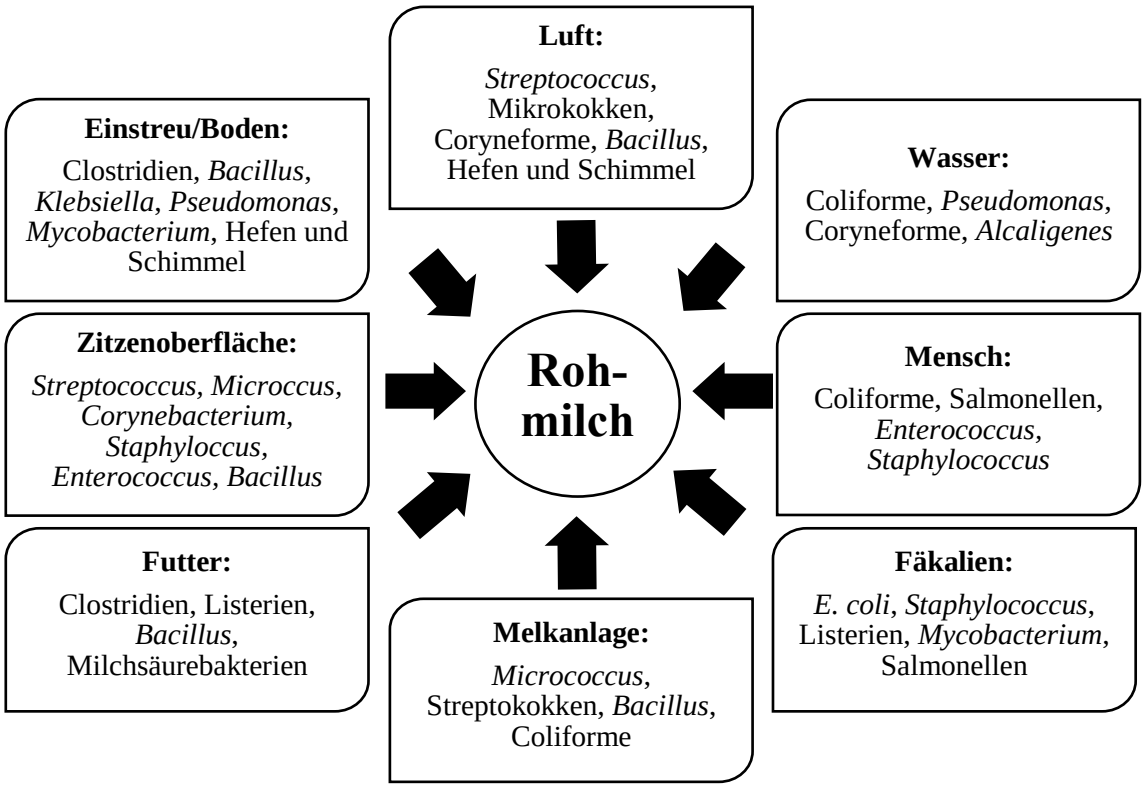


Abbildung 1 Quellen der Milchkontamination auf dem Milchviehbetrieb in Anlehnung an Hassan und Frank (2011).

1.1.2.2 Einflussfaktoren auf die Rohmilch

Die Zusammensetzung (Art und Anzahl) der Rohmilchmikrobiota wird von mehreren Faktoren beeinflusst. Einen erheblichen Einfluss haben die Lagertemperatur und Lagerdauer (O'Connell *et al*., 2016, Vithanage *et al*., 2016). Da in den meisten Fällen die Milch nicht direkt nach dem Melken verarbeitet wird, wird diese zunächst gekühlt, um die Qualität aufrecht zu erhalten (Machado *et al*., 2017). In zahlreichen Publikationen konnte gezeigt werden, dass sich die Rohmilchmikrobiota während der Kühllagerung veränderte und die Biodiversität abnahm, wobei die Dominanz von psychrotoleranten Bakterien zunahm (Fricker *et al*., 2011, Lafarge *et al*., 2004, O'Connell *et al*., 2016, Rasolofo *et al*., 2010, von Neubeck *et al*., 2015). De Jonghe *et al*. (2011) und O'Connell *et al*. (2016) fanden heraus, dass die Anzahl psychrotoleranter Bakterien mit höherer Lagertemperatur zunimmt und dies bereits bei einem Temperaturanstieg von 4 °C auf 6 °C eintritt. Entscheidend für den Anteil an psychrotoleranten Bakterien in der Rohmilch am Ende der Lagerung war auch wie hoch der Anteil am Anfang der Kühllagerung war.

Tabelle 1 gibt eine Auflistung der dominierenden Gattungen nach der Kühllagerung. Die Dauer der Lagerung variiert von Studie zu Studie, auch die gefundenen Gattungen unterscheiden sich.

Jedoch die Gattungen *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus* und *Pseudomonas* (nicht nach Häufigkeit, sondern alphabetisch sortiert) wurden in den meisten Studien als Hauptgattungen identifiziert (Machado *et al*., 2017).

Tabelle 1 Dominante Bakteriengruppen in Rohmilchproben nach der Kühllagerung (Machado et al., 2017).

Vorherrschende Bakteriengruppen	**Lagerbedingungen**	**Referenz**
Stenotrophomonas rhizophila, Stenotrophomonas maltophilia, Chryseobacterium indologenes	4 °C für 7 Tage	Boubendir *et al.* (2016)
Lactobacillus pentosus, Lactobacillus plantarum	4 °C für 10 Tage	
Acinetobacter guillouiae	4 °C für 21 Tage	
Pseudomonas fluorescens, Bacillus cereus, Bacillus weihenstephanensis, Bacillus circulans	2 °C für 10 Tage	Vithanage *et al.* (2016)
Pseudomonas, Acinetobacter, Hafnia, Bacillus, Lactococcus, Microbacterium	4–10 °C für 10 Tage	
Pseudomonas fluorescens, Pseudomonas putida, Pseudomonas stutzeri, Serratia liquefaciens, Serratia odorifera, Bacillus amyloliquefaciens, Bacillus subtilis, Bacillus sp.*, Paenibacillus alvei, Paenibacillus macerans, Lactococcus lactis ssp. cremoris, Lactococcus* sp.*, Enterococcus faecalis, Enterococcus faecium*	4 °C für 2 Tage	de Oliveira Pinto *et al.* (2015)
Acinetobacter sp.*, Acinetobacter calcoaceticus, Staphylococcus aureus, Staphylococcus equorum, Facklamia tabacinasalis, Enterococcus faecium, Lactococcus lactis, Streptococcus uberis*	4 °C für 3 Tage	Rasolofo *et al.* (2010)
Pseudomonas fluorescens	4 °C für 7 Tage	
Staphylococcus haemolyticus, Staphylococcus aureus, Staphylococcus saprophyticus, Staphylococcus hominis, Staphylococcus epidermidis, Lactococcus lactis, Enterococcus faecalis, Kocuria rhizophila, Stenotrophomonas maltophilia, Acinetobacter johnsonii	2–4 °C für 24–48 h	Mallet *et al.* (2012)
Pseudomonas, Laktokokken	4 °C für 24 h	Desmasures und Gueguen (1997)
Pseudomonas proteolytica, Lactococcus lactis, Acinetobacter sp. nov.	4-5 °C für 3–4 Tage	von Neubeck *et al.* (2015)
Pseudomonas, Acinetobacter, Staphylococcus	4°C für 22–102 h	Raats *et al.* (2011)
Pseudomonas, Klebsiella, Enterobacter, Escherichia	7 °C für 12–18 h	Jayarao und Wang (1999)

Darüber hinaus konnten noch weitere Einflussfaktoren gefunden werden. Insbesondere spielen die Hygiene im Stall und während des Melkens, sowie des Personals eine nicht zu

unterschätzende Rolle (Bava *et al*., 2009, Miller *et al*., 2015, Verdier-Metz *et al*., 2009). So konnte beispielsweise nachgewiesen werden, dass bei guter Hygiene der Anteil an unerwünschten Gram-negativen Bakterien niedriger ist als bei Betrieben, welche ein schlechtes Hygienemanagement haben (Verdier-Metz *et al*., 2009). Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Jahreszeit (Buehner *et al*., 2014, Mallet *et al*., 2012, Vithanage *et al*., 2016), die Haltungsform und die Art des Einstreus, einen Einfluss auf das Vorkommen mancher Bakterienarten haben (Doyle *et al*., 2017, Vacheyrou *et al*., 2011). Aber auch die Laktationsphase (Callon *et al*., 2007) und der Gesundheitsstatus der Kühe (Oikonomou *et al*., 2012) können Einfluss nehmen.

1.2 Kulturabhängige und kulturunabhängige Analyse der Rohmilchmikrobiota

Trotz jahrzehntelanger Forschung sind weitere Untersuchungen notwendig, um einen allumfassenden Einblick in die Biodiversität der Rohmilchmikrobiota zu bekommen, um geeignete Maßnahmen zur Verbesserung der Rohmilchqualität treffen zu können. Generell gibt es zwei Möglichkeiten, die Mikrobiota zu analysieren entweder mittels kulturabhängiger oder unabhängiger Methoden.

1.2.1 Kulturabhängige Methoden

Für die Identifizierung der Mikroorganismen mit Hilfe von kulturabhängigen Methoden müssen diese zunächst kultiviert und anschließend isoliert werden. Hierzu gibt es eine große Auswahl an nicht selektiven und selektiven Nährböden, ergänzt durch morphologische, biochemische oder physiologische Charakterisierung (Quigley *et al*., 2013b). Bei der Vielzahl von Methoden, die für die Identifizierung und Differenzierung der kultivierten Mikroorganismen zur Verfügung stehen, gibt es zwei Methoden, die einfach und kostengünstig sind und dennoch relativ zuverlässig. Die Fourier Transform Infrarot (FT-IR) Spektroskopie und die Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight Massenspektrometrie (MALDI-TOF MS). Beide folgen einem standardisierten Laborprotokoll und nehmen das Spektrum der gesamten Bakterienzelle, welches ähnlich einem phänotypischen Fingerabdruck ist, auf. Die generierten Spektren werden anschließend mit einer Datenbank abgeglichen. Mit beiden Methoden ist sogar eine Identifizierung bis auf Stammebene möglich (Wenning *et al*., 2014). Viele Daten, die die Mikrobiota der Rohmilch betreffen, wurden mittels kulturabhängiger Methoden generiert. In der Vergangenheit wurden oftmals nur bestimmte

Bakteriengruppen mittels selektiver Nährböden quantitativ nachgewiesen, aber eine Identifizierung auf Gattungs- oder Artebene nicht durchgeführt. Von Intresse waren vor allem die aerobe, mesophile Gesamtkeimzahl, die Gesamtkeimzahl nach der Laborpasteurisierung sowie der Gehalt an Coliformenkeimen, Pseudomonaden oder thermoduren Keimen (D'Amico und Donnelly, 2010, Desmasures und Gueguen, 1997, Elmoslemany *et al*., 2009, Leriche und Fayolle, 2012, O'Connell *et al*., 2016). In anderen Studien wurden die Isolate nach der Kultivierung jedoch noch weiter differenziert, wobei unterschiedliche Methoden zum Einsatz kamen. Auch die Stichprobengröße variierte. So haben Holm *et al*. (2004) 1500 zufällig gewählte Isolate anhand von physiologischen und biochemischen Charakteristiken identifiziert. Von Neubeck *et al*. (2015) identifizierten insgesamt 3000 Isolate, welche aus zehn Tankmilchproben und zehn Stapeltankproben zufällig isoliert wurden. Zunächst wurden die Isolate mittels FT-IR Spektroskopie und anschließend repräsentative Isolate mittels Gensequenzierung identifiziert. Vithanage *et al*. (2016) verfolgten eine ähnliche Strategie, nur wurden die Isolate nicht zufällig gewählt, sondern anhand ihrer Morphologie. Die erste Identifizierung erfolgte hierbei mittels MALDI-TOF MS. Aber auch Mallet *et al*. (2012) und Vacheyrou *et al*. (2011) untersuchten mit Hilfe der 16S rDNA Gensequenzierung 1697 bzw. 1290 Isolate, die zuvor nach ihrer Morphologie ausgewählt wurden, ebenso wie Buehner *et al*. (2014), wobei hier zusätzlich auch noch die MALDI-TOF MS zum Einsatz kam.

Zwar sind kulturabhängige Methoden arbeits- und zeitintensiv, von Vorteil ist, dass diese Methoden preiswert und technisch nicht sehr anspruchsvoll sind (Quigley *et al*., 2013a). Durch den Einsatz der Gensequenzierung, insbesonder der Sequenzierung des 16S rDNA Gens, konnten und können stets neue Mikroorganismen detektiert werden, die mit Rohmilch assoziiert sind, darunter auch viele neue Arten und Gattungen (Hantsis-Zacharov und Halpern, 2007, Vithanage *et al*., 2016, von Neubeck *et al*., 2015, Weber *et al*., 2014). Bakterielle Isolate sind dann notwendig, um festzustellen, ob zum Beispiel hitzebeständige Enzyme produziert werden, die für den Verderb von UHT-Milch und verwandten Produkten relevant sind (Machado *et al*., 2017). Für die erst kürzlich beschriebenen neuen Arten *Pseudomonas weihenstephanensis* (von Neubeck *et al*., 2016) und *Pseudomonas lactis* (von Neubeck *et al*., 2017) konnte gezeigt werden, dass diese Arten Peptidasen produzieren, die sich negativ auf das Endprodukt auswirken können.

1.2.2 Kulturunabhängige Methoden

Einen großen Nachteil haben jedoch Ansätze, die einen Kultivierungsschritt beinhalten. Es konnte gezeigt werden, dass diese relativ ungenau sind, da nicht alle Mikroorganismen kultiviert werden können (Mayo *et al*., 2014). In den letzten Jahren sind daher immer mehr kulturunabhängige Untersuchungen in den Fokus geraten. Diese basieren meist auf der Analyse von DNA oder RNA, wobei sich die meisten auf die Amplifikation der Nukleinsäuren durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) -Technik verlassen. Mit Hilfe dieser Verfahren ist es möglich, ganze Ökosysteme gleichzeitig zu analysieren und viele Arten daraus zu identifizieren. Darüber hinaus sind sie empfindlicher und schneller als herkömmliche kulturabhängige Analysen (Quigley *et al*., 2011). Auch für die Untersuchung der Rohmilchmikrobiota kamen kulturunabhängige Methoden zum Einsatz. So konnten Hou *et al*. (2015) mit Hilfe der SMRT (engl. *single molecule real time*) Sequenzierung der gesamten Länge des 16S rDNA Gens nachweisen, dass die Profile von 16 analysierten Milchproben auf den verschiedenen taxonomischen Ebenen deutliche Unterschiede in der bakteriellen Zusammensetzung hatten. Ogier *et al*. (2004) konnten dasselbe für die Käseoberfläche bzw. das Käseinnere zeigen. Auch dynamische Veränderungen in Bakterienpopulationen können verfolgt werden, wie es beispielsweise Lafarge *et al*. (2004) und Raats *et al*. (2011) mit Hilfe der Denaturierungsgradientengelelektrophorese (DGGE, engl. *denaturing gradient gel electrophoresis*) während der Kältelagerung machten. Mittels molekularer Anwendungen können aber auch die Qualität der Rohmilch (Machado *et al*., 2013) oder Auswirkungen dieser auf die Käseherstellung (Neviani *et al*., 2013) überprüft werden.

Doch auch diese Methoden haben Nachteile. Es gibt Einschränkungen im Durchsatz, in der Skalierbarkeit, bei den Kosten, in der Geschwindigkeit und in der Auflösung. Daher wurden in jüngster Zeit neue Hochdurchsatz-Sequenziertechnologien entwickelt, mit deren Hilfe es möglich ist, einen umfassenden Einblick in die Vielfalt und die Dynamik mikrobieller Gemeinschaften zu bekommen. Diese neuen Methoden werden üblicherweise als Next Generation Sequencing (NGS) Techniken bezeichnet. Im Vergleich zu früheren kulturunabhängigen Methoden, ermöglichen diese eine Steigerung des Durchsatzes um mehrere Größenordnungen bei gleichzeitig drastischer Reduzierung der Kosten. Die NGS Technik ermöglicht aber nicht nur die Charakterisierung von mikrobiellen Gemeinschaften durch die zielgerichtete Sequenzierung bestimmter Genomregionen, wie beispielsweise der hypervariablen Regionen des 16S rDNA Gens oder der ITS (Internal transcribed spacer)-Region, sondern auch die Erfassung der Gesamtheit des Genoms einer mikrobiellen

Gemeinschaften (auch Metagenomik genannt), welche die Analyse der funktionellen Eigenschaften der Mikrobiota ermöglichen.

Es gibt verschiedene NGS-Plattformen, wie beispielsweise der Roche 454 Pyrosequencer oder die Illumina Plattform, die sich hinsichtlich ihrer Technik, der Sequenzierungschemie, der Ausgabe (Länge der Lesevorgänge und der Anzahl der Sequenzen), der Genauigkeit und der Kosten erheblich unterscheiden (Mayo *et al*., 2014).

Wird die Illumina Plattform benutzt, so sind generell vier Arbeitsschritte notwendig: die Erstellung einer Bibliothek (Library Preparation), die Cluster Generierung, die Sequenzierung und die Datenanalyse. Eine schematische Darstellung der einzelnen Schritte zeigt Abbildung 2. Zunächst muss die genomische DNA aus der zu untersuchenden Probe extrahiert werden. Anschließend folgen zwei PCR-Ansätze zur Herstellung der DNA-Bibliothek. Im ersten Schritt werden ca. 300-450 bp große Fragmente der DNA amplifiziert. Die Länge der Fragmente hängt von den gewählten Primern ab. In einem zweiten PCR-Schritt werden an die beiden Enden des Fragmentes spezifische Oligonukleotide hinzugefügt. Diese Oligonukleotide bestehen aus Sequenzmotiven, die für die weiteren Schritte benötigt werden (Adapter) und einem Index. Die Cluster Generierung erfolgt auf einer sogenannten „Flow Cell“, deren Oberfläche mit Oligonukleotiden beschichtet ist, die komplementär zu den Adaptern sind. Die generierte Bibliothek wird durch Hybridisierung auf die „Flow Cell“ aufgebracht. Es gibt zwei Arten von Oligonukleotide, sodass beide Enden des Fragmentes binden können und eine „Brücke“ entsteht. Das gebundene Fragment wird in mehreren Zyklen immer wieder amplifiziert, wobei die Oligonukleotide als Primer dienen (Brücken-Amplifizierung). So entstehen einzelne, voneinander getrennte Cluster klonaler DNA-Fragmente, die jeweils aus etwa 1000 Kopien des Ausgangsfragments bestehen. Nach der Amplifizierung werden die komplementären Stränge getrennt und die jeweils freien Enden geblockt. Nun folgt die Sequenzierung durch Synthese. Hierbei werden bereits während des Einbaus der Basen in die Nukleinsäurekette diese detektiert. Möglich ist dies, da alle vier Basen an einen spezifischen Farbstoff gekoppelt und durch einen Terminator modifiziert sind, der verhindert, dass mehr als eine Base eingebaut wird. Die Detektion der vier Farbstoffe erfolgt durch die Aufnahme eines Bildes. Die Farbstoffe und der Terminator werden im Anschluss abgespalten und ein neuer Synthesezyklus beginnt. Die gesamte Leselänge wird schließlich durch die Anzahl der Zyklen begrenzt. Der Vorgang wird parallel für jedes Cluster der Zelle durchgeführt, so dass beispielsweise der MiSeq Sequenzierer die Ausgabe von bis zu 15 GB aus 25 Millionen Sequenzmessungen und 2 × 300 bp Leselänge ermöglicht. Während eines Sequenziervorganges können mehrere Proben

aufgrund der unterschiedlichen Indizes, die Teil des Adapters sind, gleichzeitig sequenziert werden (Anonymus, 2017, Brown, 2013, Caporaso *et al*., 2011).

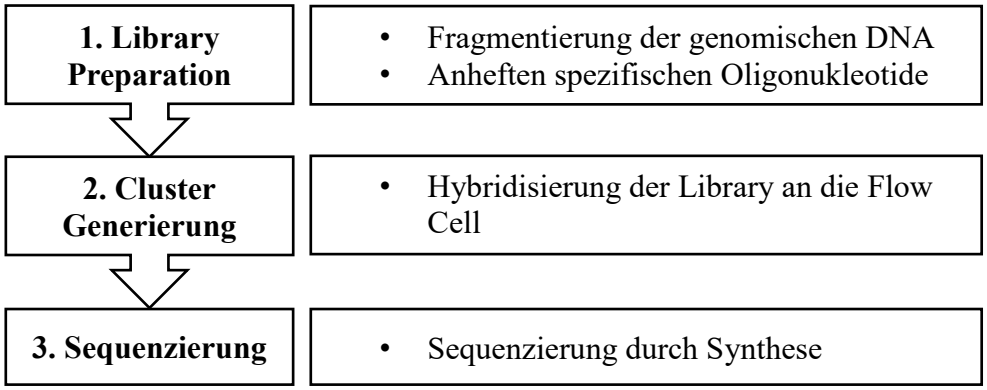


Abbildung 2 Schematische Darstellung der Schritte der Illumina Sequenzierung.

Für die Auswertung der Sequenzdaten gibt es eine Vielzahl an Softwares oder Plattformen, wie etwa die „integrated microbial NGS platform" (imngs.org) der Technischen Universität (TU) München. Die Rohdaten werden entsprechend der Nutzereinstellungen modifiziert, nach ihrer Ähnlichkeit geclustert und anschließend als Operative taxonomische Einheiten (OTUs) ausgegeben (Lagkouvardos *et al*., 2016). Auch für weiterführende Analysen, wie beispielsweise die Berechnung bestimmter Diversitätsindizes oder die Darstellung der taxonomischen Einordnung, gibt es diverse Programme, wie zum Beispiel „Rhea", ein Set von R Skripten, die die Analyse von mikrobiellen Profilen ermöglichen (Lagkouvardos *et al*., 2017).

Mittels der NGS Technologien, wurden bereits auch Rohmilch und andere Milchprodukte analysiert, wenn auch bis dato noch nicht so häufig, wie in anderen Forschungsgebieten. Quigley *et al*. (2013a) und Masoud *et al*. (2011) verwendeten unterschiedliche kulturunabhängige Verfahren, unter anderen auch NGS, um die Biodiversität von Rohmilch zu beleuchten. Die NGS Analytik wurde bis dato auch dafür eingesetzt, um Einflüsse auf die Rohmilchmikrobiota aufzuklären (Doyle *et al*., 2017, Rodrigues *et al*., 2017), oder die Unterschiede in der Rohmilch von gesunden und Euter-erkrankter Tiere darzustellen (Oikonomou *et al*., 2012). Bei einigen Studien wurde das Verfahren aber auch eingesetzt, um die Dynamiken in der Mikrobiota während der Käseherstellung und -reifung zu beschreiben (Alegria *et al*., 2012, Alessandria *et al*., 2016, Ercolini *et al*., 2009, Masoud *et al*., 2012). All

diese Studien amplifizierten dabei Teilstücke des 16S rDNA Gens, wobei unterschiedliche hypervariable Regionen (V1-V6) ausgewählt wurden.

Es gab aber auch Studien, die die Kombination von kulturabhängigen und -unabhängigen Analysemethoden einsetzten, um die Biodiversität von Rohmilch zu untersuchen (Delbes *et al*., 2007, Fricker *et al*., 2011, Weber *et al*., 2014). Dabei konnte gezeigt werden, dass sich der parallele Einsatz beider Methoden empfiehlt, da so die Biodiversität am besten abgebildet werden kann. Bis dato gab es jedoch keine Studie, die die Illumina Sequenzierung und eine kulturabhängige Methode für die Untersuchung der Rohmilchmikrobiota eingesetzt hat.

1.3 Verderb von Milchprodukten

Deutschland gehört zu den fünf wichtigsten Milchproduzenten weltweit (FAO, 2017), wobei die Milcherzeugung den wichtigsten Produktionszweig der deutschen Landwirtschaft darstellt. 2015 wurden knapp 31,5 Mio. Tonnen Rohmilch verarbeitet und knapp 23 Milliarden Euro erwirtschaftet.
Neben den gesetzlichen Kriterien müssen Milch und Milchprodukte noch weitere Kriterien erfüllen, um Verbraucherwünschen und Marktanforderungen gerecht zu werden. So gilt es beispielsweise besondere Anforderungen zu beachten, wenn Waren exportiert werden. Der Export von Milchprodukten hat für die deutsche Milchwirtschaft einen zunehmend höheren Stellenwert. Mehr als die Hälfte der verarbeiteten Milch ist für den Export bestimmt, Tendenz steigend (MIV, 2016). So ist zu bedenken, dass zum einen die Waren mehrere Wochen unterwegs sind und zum anderen, dass die Temperatur in einem Schiffscontainer während der Überfahrt 50 °C erreichen kann (GDV, 1999-2017). Qualitätseinbußen und Verderb im speziellen gilt es zu vermeiden, da ein Rückruf nicht nur finanzielle Einbußen mit sich bringen würde, sondern auch rufschädigend wäre (Machado *et al*., 2017). Beim Verderb von Milchprodukten gilt es zu unterscheiden, ob die Bakterien vor oder nach der Verarbeitung in das Endprodukt gelangten und ob die Keime direkt, als vegetative Keime, oder indirekt, durch die von ihnen gebildeten Hitze-stabilen Enzyme, die Qualität des Endprodukts beeinflussten (Zangerl, 2016).

1.3.1 Verderb durch vegetative Keime

Im Konsummilchbereich spielt die Qualität der Rohmilch in Bezug auf Haltbarkeit und Geschmack eine entscheidende Rolle. Bei pasteurisierter Milch (Frischmilch) ist die Haltbarkeit von der Zahl und Art der Rohmilchkeime, die die Pasteurisierung überleben, der Intensität der Wärmebehandlung, dem Grad der Kontamination mit Keimen nach der Pasteurisierung und der Temperatur während der Lagerung, abhängig (Zangerl, 2016). Die Haltbarkeit von ESL Milch wird hauptsächlich durch zwei Bakteriengruppen limitiert. Zum einen durch sporenbildende Bakterien und zum anderen durch Gram-negative Bakterien, wie *Chryseobacterium* und *Acinetobacter*, die nach der Verarbeitung in das Produkt gelangen. Während der Kühllagerung können sich psychrotolerante Vertreter im Endprodukt weiter vermehren, enzymatisch aktiv sein und Geschmacksfehler hervorrufen. (Schmidt *et al*., 2012). Ein großes Problem stellt hier *Bacillus cereus* dar, seine proteolytische Aktivität führt zur Süßgerinnung, einer labartigen Dicklegung der Milch durch den Abbau von Casein. Die spezifische Aktivität seiner Phospholipasen führt zu einer Aggregation des Fettes und damit zum Ausflocken, auch bekannt im englischen unter „bitty cream“. Daneben kann *Bacillus cereus* Toxine produzieren, das Hitze-stabile Cereulid und die Hitze-labilen Enterotoxine. Nimmt der Mensch Lebensmittel, die mit Cereulid belastet sind auf, kann dies beim Menschen eine Lebensmittelvergiftung auslösen. Nimmt man hingegen die Sporen von *Bacillus cereus* auf, können diese im Darm auskeimen und die dort produzierten Enterotoxine können zu einer Toxin-Infektion führen (Lucking *et al*., 2013). Ultrahochtemperierte (UHT) -Milch ist steril. Nur die extrem hitzeresistenten Sporen von *Bacillus sporothermodurans* und *Geobacillus stearothermophilus* können die Ultrahocherhitzung überdauern. Obwohl *Bacillus sporothermodurans* kein Verderbskeim ist, kann er zum Problem werden, wenn er sich im Produkt vermehrt und so das Produkt nicht mehr mikrobiologisch stabil ist, wie es die Tier-LMHV Kapitel V 2.2, 2007 vorschreibt. *Geobacillus stearothermophilus* ist ein thermophiler Verderbsorganismus und spielt bei Packungen eine Rolle, die bei erhöhten Temperaturen gelagert werden. (Scheldeman *et al*., 2006, Scheldeman *et al*., 2005).

Bei Rohmilchkäse kann das Phänomen der Frühblähung auftreten. Vermehren sich coliforme Keime der Rohmilch bei Säuerungsstörung in der Kesselmilch zu stark (Keimzahl > 10^7 KbE/g), kommt es durch Gasbildung zu Lochungsfehlern und Blähungen. Des Weiteren kann es durch die Buttersäuregärung von *Clostridium tyrobutyricum* zur sogenannten Spätblähung kommen. Lochungsfehler und ein abweichender Geschmack sind die Folge. Bei fermentierten Produkten wie Joghurt, spielt der Verderb aufgrund ihres niedrigen pH-Werts nur eine

untergeordnete Rolle. In Ausnahmefällen kann es durch säureresistente Keime zu einer Übersäuerung kommen (Zangerl, 2016).

1.3.2 Verderb durch hitze-stabile Enzyme

UHT-Milch wird insbesondere durch Hitze-stabile Enzyme, welche von psychrotoleranten Bakterien vor der Ultrahocherhitzung in der gekühlten Rohmilch produziert werden, verdorben. Durch die Erhitzung werden zwar die vegetativen Keime abgetötet, die Enzyme bleiben jedoch im Endprodukt weiter aktiv. Die Proteolyse der Milchproteine führt zu einem unerwünschten bitteren Geschmack, zur Altersgelierung und zu einem Bodensatz, wohingegen die Anwesenheit von Lipasen zu Ranzigkeit führt (Machado *et al*., 2017). Auch bei Käse kann es durch proteolytische und lipolytische Enzyme, die in der Rohmilch produziert wurden, zu Geruchs- und Geschmacksfehlern kommen. Diese Hitze-stabilen Proteasen und Lipasen können aber nicht nur von Mikroorganismen produziert werden, sondern auch von der Kuh selbst. Gerade bei Rohmilch mit einem hohen Gehalt an somatischen Zellen, verursacht durch eine Mastitis Erkrankung, tritt dieses Problem auf (Barbano *et al*., 2006). Bis dato ist es schwierig, die in der Rohmilch gebildeten Hitze-stabilen Enzyme technologisch zu inaktivieren. Zu wissen, welche Bakterien diese Enzyme produzieren, welche Enzyme genau produziert werden und unter welchen Umständen, sind wichtige Erkenntnisse, um das Risiko der Enzymeproduktion in der Rohmilch zu minimieren und so die Rohmilchqualität zu verbessern. Die Beantwortung dieser Fragen ist daher aktuell Schwerpunkt vieler Publikationen (Baur *et al*., 2015, Glück *et al*., 2016, Lo *et al*., 2016, Machado *et al*., 2015, Stoeckel *et al*., 2016, von Neubeck *et al*., 2015).

Von Neubeck *et al*. (2015) isolierten mehr als 2500 Isolate aus 20 verschiedenen Rohmilchproben und untersuchten deren enzymatisches Aktivitätspotential, *Pseudomonas*, *Lactococcus* und *Acinetobacter* wurden dabei am häufigsten nachgewiesen. Sie konnten nachweisen, dass das Potential der Isolate zur Herstellung von Lipasen oder Peptidasen in vielen Fällen einem Gattungs- oder gruppenspezifischen Muster folgte. So waren Isolate der Gattung *Pseudomonas* entweder lipolytisch und proteolytisch oder nur proteolytisch aktiv. Auf der anderen Seite, waren fast alle Isolate der Gattung *Acinetobacter* lipolytisch, aber nicht proteolytisch aktiv und Milchsäurebakterien hingegen ausschließlich proteolytisch. Die lipolytische und proteolytische Aktivität von 231 dieser Isolate wurden in einem neuen Flüssigscreening nach Kultivierung in Milch bei 6 °C untersucht und quantifiziert (Baur *et al*., 2015). Des Weiteren wurde die Thermostabilität der Peptidasen genauer untersucht. Es stellte

sich heraus, dass fast alle untersuchten Peptidasen eine Restaktivität von mindestens 5% nach einer Wärmebehandlung bei 70 °C und 95 °C für 5 Minuten aufwiesen. Die meisten dieser Peptidasen wurden von Isolaten der Gattung *Pseudomonas* produziert. Darunter gab es auch Peptidasen von drei bis dato unbekannten Pseudomonas Spezies (darunter *Pseudomonas weihenstephanensis* (von Neubeck *et al.*, 2016)), die eine UHT-Behandlung überstanden und noch eine Restaktivität von 45,8-58,9% hatten und somit in der Lage wären, Milchprodukt während der Lagerung zu destabilisieren (Glück *et al*., 2016). Stoeckel *et al*. (2016) stellten UHT-Milch aus Rohmilch her, die unter anderem mit *Pseudomonas weihenstephanensis* inkubiert wurde, und lagerten diese über vier Monate bei 20 °C. Dabei traten Produktfehler in folgender Reihenfolge auf: Bitterkeit, Partikelbildung, Aufrahmung, Bodensatzbildung und Gelierung. Es konnte eine lineare Korrelation zwischen der proteolytischen Aktivität und dem Beginn der Produktdefekte gefunden werden. Auch in anderen Studien wird die Gattung *Pseudomonas* übereinstimmend als dominierende Verderbsgattung von UHT Produkten genannt. Des Weiteren werden aber auch die Gattungen *Acinetobacter, Chryseobacterium* und *Serratia* aufgeführt, wobei die Forschung hier noch am Anfang steht (Machado *et al*., 2017).

Die Zahl der verschiedenen Peptidasen, die von der Gattung *Pseudomonas* gebildet wird, ist heterogen und variiert je nach Art und Stämmen, wobei von ihnen die Metallopeptidase AprX im Zusammenhang mit dem Verderb von Milch in der Literatur am häufigsten genannt wird (Machado *et al*., 2017). Die Mechanismen der Regulierung der Peptidasen und Lipasen, die von *Pseudomonas* und anderen psychrotoleranten Bakterien in Milch produziert werden, ist nach wie vor begrenzt und weitere Forschung ist nötig. Der hypothetische Mechanismus des Verderbs von UHT-Milch durch die hitzestabilen Peptidasen ist in Abbildung 3 dargestellt (Machado *et al*., 2017). In der kühlgelagerten Rohmilch befinden sich unter anderem die stabilen Casein-Mizellen, aber auch Hitze-stabile bzw. -labile Peptidasen. Durch die UHT-Behandlung werden die Hitze-labilen Peptidasen inaktiviert, nur die Hitze-stabilen Peptidasen sind weiter aktiv. Während der Lagerung der UHT-Milch sind diese aktiv. Im Laufe der Zeit wird durch die Proteolyse der Casein Mizellen die UHT-Milch immer weiter destabilisiert bis es schließlich zur Gelbildung oder Ausflockung der UHT-Milch kommt.

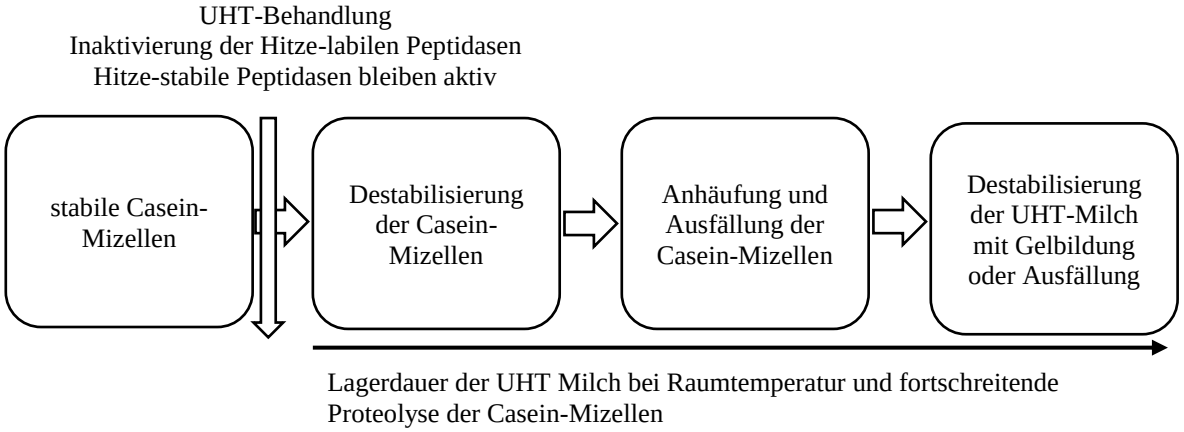


Abbildung 3 Hypothetischer Mechanismus der UHT-Milch-Destabilisierung durch Casein-Mizellen-Proteolyse durch hitzebeständige Peptidasen während der Lagerung bei Umgebungstemperatur in Anlehnung an Machado *et al.* (2017).

1.4 Ziel der Arbeit

Milchprodukte mit höchster Qualität und längerer Haltbarkeit sind im Zeitalter des weltweiten Handels unabdingbar. Ein frühzeitiger Verderb der Produkte führt zu großen Problemen. Ein Produktrückruf bringt große finanzielle Verluste mit sich und schädigt gegebenenfalls das Ansehen der Molkerei langfristig. Die Milchindustrie legt daher ein großes Augenmerk auf die stetige Optimierung von Prozessen und Produkten, um sowohl den Verbraucherwünschen als auch den Marktanforderungen (Export über lange Strecken ohne Qualitätseinbußen) gerecht zu werden. Die Qualität der Rohmilch zu verbessern, spielt dabei eine große Rolle. Bis dato ist es nicht möglich, die in der Rohmilch gebildeten Hitze-stabilen Enzyme technologisch zu inaktivieren, daher stellte die Reduktion unerwünschter Gram-negativer psychrotoleranter Bakterien eine gute Möglichkeit dar. Ein umfassendes Wissen über die Zusammensetzung und die Variabilität der Tankmilchmikrobiota ist jedoch erforderlich, um effektive Strategien zu entwickeln. Aufgrund der Tatsache, dass Molkereien die Milch von wenigen bis zu über Tausend Betrieben verarbeiten, ist Wissen über die Varianz zwischen den verschiedenen Höfen und über die Faktoren, die die Zahl der Gram-negativen Bakterien beeinflussen nötig.

Ziel dieser Arbeit war es daher, Wissen über die Biodiversität der Rohmilchmikrobiota und deren Einflussfaktoren zu generieren. Dazu wurde die Tankmilch von mehreren Höfen in einem kulturabhängigen Ansatz mit einer kleinen Stichprobengröße analysiert, um so einen Einblick in die Unterschiede der Rohmilchmikrobiota zwischen den Höfen, aber auch innerhalb eines Hofes über die Zeit zu erhalten. Des Weiteren wurde die Zusammensetzung der Mikrobiota

zweier ausgewählter Betriebe sowohl mittels eines klassisch kulturabhängigen Ansatzes mit einer großen Stichprobengröße sowie mittels NGS Methodik erfasst und die Ergebnisse beider Methoden miteinander verglichen. Im Zuge der Dissertation wurden auch Stämme, die einer bis dato unbekannte Gattung zugeordnet wurden, isoliert. Ziel war es, diese potentiell neue Gattung mittels polyphasischem Ansatz zu charakterisieren.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Probenmaterial und Probenahme

2.1.1 Betriebsdaten

Im Zuge dieser Dissertation wurden 22 Betriebe aus Baden-Württemberg ausgewählt, die einen Querschnitt in Bezug auf Herdengröße und Milchmenge der baden-württembergischen Milchproduktion darstellen (Tabelle 2). Betrieb 3 wurde jedoch ausgeschlossen, daher wird in der Dissertation von nur 21 Betrieben gesprochen. Die Herdengröße reichte von vier bis 130 Tieren pro Betrieb, der Durschnitt lag bei 47 Tieren. Die tägliche Milchleistung variierte zwischen 40 und 2.800 Liter und die entsprechende Tankgröße lag zwischen 80 und 10.000 Liter. Die Lagertemperatur der Tankmilch lag bei allen Betrieben unter 8 °C. Die Tiere wurden alle im Laufstall gehalten, mit Ausnahme des kleinsten Betriebes. Hier wurden die Tiere in Anbindehaltung gehalten.

Tabelle 2 Übersicht über Kuhzahl, Rasse, Haltungsform, Futter, Tankkapzität und Milchmenge für die 21 beprobten Betriebe.

Betrieb	Anzahl Kühe	Kuhrasse	Haltungs-form	Futter	Tank-kapazität [Liter]	Milch-Menge/ Tag [Liter]
1	35	Braun- und Schwarzbunte	Laufstall	50% Mais/ 50% Gras	2500	500
2	28	Schwarzbunte	Laufstall	60% Mais/ 40% Gras	2000	500
4	46	Schwarzbunte	Laufstall	60% Mais/ 40% Gras	3000	1000
5	70	Schwarzbunte	Laufstall	50% Mais/ 50% Gras	4600	1400
6	48	Fleckvieh	Laufstall	60% Mais/ 40% Gras	2700	1000
7	130	Fleckvieh und Schwarzbunte	Laufstall	60% Mais/ 40% Gras	6000	2400
8	100	Schwarzbunte	Laufstall	60% Mais/ 40% Gras	10000	2500
9	110	Schwarzbunte	Laufstall	70% Mais/ 30% Gras	10000	2800
10	keine Informationen verfügbar					
11	10	Fleckvieh	Laufstall	30% Mais/ 70% Gras	1000	70
12	35	Fleckvieh	Laufstall	50% Mais/ 50% Gras	2600	650

Fortsetzung Tabelle 2

Betrieb	Anzahl Kühe	Kuhrasse	Haltungs-form	Futter	Tank-kapazität [Liter]	Milch-Menge/ Tag [Liter]
13	40	Fleckvieh	Laufstall	60% Mais / 40% Gras	3500	750
14	60	Fleckvieh und Schwarzbunte	Laufstall	60% Mais / 40% Gras	3000	1100
15	90	Fleckvieh	Laufstall	50% Mais/ 50% Gras	4000	2000
16	60	Fleckvieh und Schwarzbunte	Laufstall	50% Mais/ 50% Gras	3500	1200
17	75	Fleckvieh und Schwarzbunte	Laufstall	50% Mais/ 50% Gras	6000	2000
18	40	Fleckvieh	Laufstall	50% Mais/ 50% Gras	2000	700
19	50	Schwarz- und Rotbunte	Laufstall	50% Mais/ 50% Gras	4000	1100
20	80	Fleckvieh und Schwarzbunte	Laufstall	45% Mais/ 55% Gras	6000	1900
21	4	Fleckvieh	Anbinde-haltung	100% Gras/ Klee	80	40
22	45	Schwarzbunte	Laufstall	60% Mais / 40% Gras	5000	1000

2.1.2 Probenahme und Probenzeitraum der Rohmilch analysiert mit einer Stichprobengröße von 50 bzw. 500 Isolaten

Von November 2009 bis Februar 2013 wurde die Rohmilchmikrobiota dieser 21 Betrieben in einem kulturabhängigen Ansatz analysiert. Von jedem Betrieb wurden fünf unabhängige Milchproben mit einer Stichprobengröße von je 50 Isolaten analysiert, wobei der Zeitraum zwischen acht und 28 Monaten variierte. Zusätzlich wurden die Betriebe 4 und 6 Ende Januar 2011 mit einer Stichprobengröße von 500 Isolaten beprobt. Als Probenmaterial dienten unkonservierte Güteproben des Milchprüfring Baden-Württemberg e.V. (MPR BW). Diese Proben wurden von vollautomatischen Probenahmeanlagen in den Milchsammelfahrzeugen während der Abholung auf dem Betrieb genommen. Die Proben wurden während des gesamten Transports bis zum Untersuchungslabor in Kirchheim unter Teck bei maximal 6 °C gekühlt gelagert. Der Transport erfolgte in der Regel binnen 24 Stunden. Bei sechs der 105 Proben dauerte der Transport länger, daher wurden diese Proben von der Untersuchung ausgeschlossen. Die untersuchten Milchproben enthielten entweder vier oder sechs sukzessive Gemelke (siehe

im Anhang Tabelle 1). Die Untersuchung selbst erfolgte binnen einer Stunde nach Probeneingang.

2.1.3 Probenahme und Probenzeitraum der Rohmilch analysiert mit einer Stichprobengröße von 1500 Isolaten

Betrieb 4 und 6 wurden im April 2013 bzw. Juli 2012 ein weiteres Mal beprobt. Die Probenahme erfolgte direkt auf dem Betrieb über das Kupplungsrohr am Sammeltank. Vor der Entnahme wurde dieses mit 70% Ethanol desinfiziert. Von jedem Betrieb wurde je ein Liter Milch in sterile Schottflaschen entnommen. Der Sammeltank von Betrieb 4 enthielt 500 Liter Milch aus einem Gemelk und hatte eine Temperatur von 6 °C, wohingegen der Sammeltank von Betrieb 6 1000 Liter Milch aus zwei sukzessiven Gemelken fasste und eine Temperatur von 4,2 °C hatte. Der Transport ins Untersuchungslabor erfolgte gekühlt binnen 1,5 (Betrieb 4) bzw. 3,5 Stunden (Betrieb 6). Ein halber Liter wurde bei -80 °C für die kulturunabhängige Analyse eingefroren.

2.2 Kulturabhängige Analyse der Rohmilchmikrobiota

2.2.1 Gesamtkeimzahlbestimmung und Biodiversitätsanalyse

Nach Probeneingang wurde von jeder der Probe des Kapitels 2.1.2 eine dezimale Verdünnungsreihe mit Hilfe von ¼ starker Ringerlösung (Oxoid GmbH) hergestellt. Je 100 µl der Verdünnung 1:10 bis 1:1000 wurden auf Caseinpepton-Sojamehlpepton-Agar (CASO-Agar; Oxoid GmbH) ausplattiert. Die Analyse erfolgte im einfachen Ansatz, nur für die Analyse der 500 Isolate wurde ein zehnfacher Ansatz gewählt. Für die Bestimmung der aeroben, mesophilen Gesamtkeimzahl der Proben des Kapitels 2.1.3 wurden von der Milch zehnmal eine dezimale Verdünnungsreihe mit ¼ starker Ringerlösung hergestellt und je 100 µl der Verdünnungen 1:10 und 1:100 im Doppelansatz auf Plate Count Agar mit Magermilchzusatz (PC+MM; Merck KGaA) ausplattiert. Für die Biodiversitätsanalyse wurden PC+MM Platten mit einem Durchmesser von 15 cm verwendet. Hierfür wurde je 1 ml der Rohmilch und sieben bzw. zwölfmal 1 ml der 1:10 Verdünnung ausplattiert.
Die Agarplatten wurden anschließend aerob bei 30 °C für fünf bis sechs Tage bebrütet. Die Bebrütungsdauer der Agarplatten wurde so gewählt, damit auch langsam wachsende Gram-positive Bakterien erfasst werden konnten.

Nach Inkubation erfolgte die Bestimmung der aeroben, mesophilen Gesamtkeimzahl. Wurden die dezimalen Verdünnungsreihen im Einfachansatz plattiert, so wurde die Gesamtkeimzahl aus dem arithmetischen Mittel der einzelnen Verdünnungen berechnet. Ausgewertet wurden alle Platten, die zwischen einer und 300 Kolonien hatten. Für die Proben, welche unter 2.1.3 beschrieben sind, wurde das gewichtete Mittel mit nachfolgender Formel berechnet und anschließend aus den zehn Einzelwerten der Mittelwert berechnet.

$$\frac{\text{KBE}}{\text{ml}} = \left(\frac{\sum \text{n}}{1 \times \text{f}_a + 0,1 \times \text{f}_b} \right) \times \text{c}$$

KbE/ml = Keimbildende Einheiten pro ml Rohmilch

$\sum n$ = Summe der Kolonien aller Platten, die zur Berechnung herangezogen werden (niedrigste und nächsthöhere auswertbare Verdünnungsstufe)

f_a = Anzahl der Platten der niedrigsten auswertbaren Verdünnungsstufe

f_b = Anzahl der Platten der nächsthöheren auswertbaren Verdünnungsstufe

c = Verdünnungsfaktor der niedrigsten ausgewerteten Verdünnungsstufe

Für die Biodiversitätsanalysen wurden 50 bzw. 500 bzw. 1500 Isolate zufällig mit Hilfe steriler Zahnstocher abgenommen. Hierfür wurde eine Kolonie in der Mitte der Platte gewählt und um diese kreisförmig alle anderen Kolonien abgenommen und mit einem Reinigungsausstrich auf CASO-Agar ausgestrichen und bei 30 °C weitere zwei bis vier Tage bebrütet. Falls nötig, erfolgte ein weiterer Reinigungsausstrich.

2.2.2 Identifizierung der Isolate mittels FT-IR Spektroskopie

2.2.2.1 Probenaufbereitung und Messung

Die Probenaufbereitung erfolgte wie von Oberreuter *et al*. (2002) erstmals beschrieben. Hierzu wurde die Menge einer halben Impföse von der Reinkultur abgenommen und mit Hilfe eines Drigalski-Spatels auf CASO-Agar (Oxoid GmbH) ausplattiert. Die Inkubation der Platten erfolgte für 24 Stunden plus/minus 30 Minuten bei 30 °C. Für Milchsäurebakterien (MSB) und aerobe Gram-positive Sporenbildner wichen die Inkubationstemperatur und/oder das Nährmedium ab. MSB wurden anaerob auf APT-Agar (All purpose Agar mit Tween; Merck KGaA) bei 34 °C und Sporenbildner auf CASO-Agar bei 25 °C bebrütet. Nach der Bebrütung wurde für die Messung aus der Mitte des Bakterienrasens eine bestimmte Menge (variierte je

nach Bakteriengruppe) mittels steriler Platinimpföse abgenommen und in 100 µl autoklaviertem Wasser resuspendiert und gut gemischt. 25 µl der Suspension wurden auf einen Spot einer 96 Well Zink-Selenid Platte (Bruker Optics) aufgetragen und anschließend für etwa 45 Minuten bei 42 °C getrocknet. Die Messung erfolgte im Tensor 27 Spektrometer mit HTS-XT-Gerät unter Anwendung der Software OPUS^{TM} V6.5 (Bruker Optics).

2.2.2.2 Auswertung und Identifizierung der Spektren

Die aufgenommenen Spektren wurden mit Hilfe der OPUS^{TM}-Software Version 6.5 (Bruker Optics) mit den FT-IR Bibliotheken der Abteilung Mikrobiologie des ZIEL der TU München abgeglichen. Die Referenzdatenbanken umfassten ca. 8.000 Spektren von 1000 Arten. Der Vergleiche erfolgte nach den von Oberreuter *et al*. (2002) und Kümmerle *et al*. (1998) beschriebenen Parametern.

2.2.2.3 Cluster-Analyse

Des Weiteren wurden die Spektren aus der Analyse mit der Stichprobengröße von 500 Isolaten mittels einer hierarchischen Clusteranalyse verglichen, um so die Anzahl der Isolate für die nachfolgende Sequenzierung zu reduzieren. Mittels OPUS^{TM}-Software wurde unter Verwendung des Average Linkage Cluster Algorithmus die spektrale Distanz der Spektren zueinander berechnet. Hierzu wurden die Spektren Vektor normalisiert und die ersten Ableitungen berechnet. Verglichen wurden die Spektralbereiche von 3000 bis 2800, 1800 bis 1500, 1500 bis 1200, 1200 bis 900 und 900 bis 700 cm^{-1}. Betrug der Abstand zwischen den Spektren weniger als 0,3, gehörten die Spektren zu einer Clustergruppe. Für jedes Cluster wurden abhängig von der Clustergröße ein oder mehrere Isolate zur Sequenzierung ausgewählt. Die Ergebnisse wurden dann auf das ganze Cluster übertragen.

2.2.3 Identifizierung der Isolate anhand von DNA-Sequenzen

2.2.3.1 DNA-Extraktion

Für die Sequenzierung wurde zunächst die DNA der ausgewählten Isolate des Versuches mit 500 Isolaten bzw. aller 1500 Isolate der Milchproben von April 2013 bzw. Juli 2012 extrahiert. Die Lyse der Zellen erfolgte mechanisch mittels Silicium/Zirkoniumperlen (Carl Roth GmbH + Co. KG). Hierfür wurde etwa eine Impföse der Reinkultur in 200 µl sterilem Milli-Q-Wasser in einem 2 ml Reaktionsgefäß suspendiert und mit den Perlen (0,1 mm Durchmesser) vermischt.

Die Lyse selbst erfolgte im FastPrep®-24 (MP Biomedicals) zweimal für 45 Sekunden bei 6,5 m/s. Anschließend wurden die Reaktionsgefäße bei 95 °C für 5 Minuten zur Inaktivierung der DNasen erhitzt und danach bei 13000 U/min für 3 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. 80 µl des Überstandes, der die DNA der lysierten Zellen enthielt, wurden in ein 0,5 ml Reaktionsgefäß transferiert und bei -20 °C gelagert.

2.2.3.2 PCR Ansatz und Sequenzierung des 16S rDNA bzw. rpoB Gens

Die Identifizierung der Bakterien erfolgte mittels 16S rDNA Gen Sequenzierung. Da aber von Mollet *et al*. (1997) gezeigt werden konnte, dass die Sequenz dieses Genabschnittes für die Identifizierung der Staphylokokken nicht genügend diskriminierend ist, wurde das *rpoB*-Gen für die Identifizierung der Staphylokokken verwendet (Mellmann *et al*., 2006). Die für die Amplifizierung der Gene verwendeten Primer sind Tabelle 3 zu entnehmen.

Tabelle 3 Primer für die 16S rDNA bzw. *rpoB* Gen Amplifizierung und die erwartete Länge der Fragmente.

Primer	Sequenz	Fragmentlänge
16S 27 forward	5'AGAGTTTGATCCTGGCTCA-3'	1465 bp
16S 1492 reverse	5'CGGCTACCTTGTTACGAC-3'	
rpoB forward	5'CAATTCATGGACCAAGC-3'	899 bp
rpoB reverse	5'CCGTCCCAAGTCATGAAAC-3'	

Jede Reaktion setzte sich aus 2,5 µl 10x Reaktionspuffer, 2,5 µl dNTPs (2 mM), 1,5 µl $MgCl_2$ (25 mM), je 0,25 µl forward und reverse Primer (50 mM), 0,15 µl Thermo Start Taq Polymerase (Thermo Fisher Scientific Inc), 16,85 µl MilliQ und 1 µl Template DNA zusammen. Die Amplifikation erfolgte im Biometra® T 3000 Thermocycler (Biometra GmbH) unter den in Tabelle 4 aufgeführten Bedingungen.

Tabelle 4 Temperatur- und Zeitprofil für die PCR der Amplifikation des 16S rDNA bzw. *rpoB* Gens.

	Temperatur	**Dauer**	**Zyklen**
Initiale Denaturierung	95 °C	15 min	1
Denaturierung	95 °C	20 s	35
Annealing	52 °C (16S) 48 °C (*rpoB*)	40 s	
Elongation	72 °C	100 s (16S) 70 s (*rpoB*)	
Finale Elongation	72 °C	5 min	1

Zum Test, ob die Amplifikation erfolgreich war, wurde eine Agarose Gel Elektrophorese durchgeführt. Hierfür wurde ein 1%iges Agarosegel (Carl Roth GmbH & Co. KG) mit 3% 10x SafeRed™ (Applied Biological Materials Inc) versetzt. Die elektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte bei 110 V für 35 Minuten in 1x TBE-Puffer (pH 8,0). Der GeneRuler™ DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific Inc.) wurde als Längenstandard benützt.

Für die Sequenzierung wurden die PCR Produkte an LGC Genomics GmbH in Berlin geschickt, wo auch die Aufreinigung erfolgte. Für die Sequenzierung des 16S rDNA Gens bzw. des *rpoB* Gens wurden die Primer in Tabelle 5 verwendet.

Tabelle 5 Primer für die Sanger Sequenzierung.

Gen	**Primer**	**Sequenz**
16S	907 reverse	5'CCGTCAATTCMTTTGAGTTT-3'
16S	519 forward [1]	5'CAGCAGCCGCGGTAATAC-3'
rpoB	Staph forward	5'CAATTCATGGACCAAGC-3'

[1] für die Erstellung der fast vollständiger 16S rRNA Sequenzen zur Charakterisierung der neuen Taxa

2.2.3.3 Identifizierung der Sequenzen

Für die Identifizierung der Bakterien wurden die Sequenzen der Staphylokokken (*rpoB*) auf der Online-Datenbank NCBI mit dem Programm BLASTn (Altschul *et al*., 1990) ausgewertet. Die Sequenzen aller anderen Bakterien (16S rRNA) wurden mit der EzBioCloud-Datenbank (Kim *et al*., 2012) abgeglichen. Wie von Kim *et al*. (2014) publiziert, wurde als Artgrenze 98,65% Sequenzübereinstimmung festgelegt und für Gattungen 95%.

Immer eine 96-Well Platte (ca. 50-96 PCR Produkte), die für die Sequenzierung an LGC Genomics GmbH gesendet wurde, wurde gemeinsam ausgewertet. Mittels ClustalW wurde das Sequenzalignment durchgeführt und ein phylogenetischer Baum mit der Software MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) Version 5.2.2 erstellt (Hall, 2013). Von jedem Cluster des resultierenden Neighbor-Joining Baumes wurde eine Sequenz ausgewählt, identifiziert und das Ergebnis auf die verbleibenden Sequenzen im Cluster extrapoliert.

2.3 Kulturunabhängige Analyse (llumina Sequenzierung) der Rohmilch-mikrobiota

2.3.1 Aufarbeitung der Rohmilch

2.3.1.1 Konzentrierung der Bakterienzellen

Die bakteriellen Zellen in den beiden Milchproben wurden mittels Zentrifugation angereichert. Dreimal 150 ml Rohmilch wurden bei 8000 x *g* für 20 Minuten bei 4 °C zentrifugiert, wodurch sich im Pellet Bakterienzellen, somatischen Zellen und hohe Mengen an Casein sammelten. Der Überstand, welcher aus einer Fettschicht und dem Magermilchanteil bestand, wurde bis auf ca. 10 ml sorgfältig entfernt. Danach wurde das Pellet in der verbleibenden Magermilch resuspendiert und in ein 50 ml Röhrchen überführt und nochmals bei 5000 x *g* für 10 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Die Fettschicht wurde abermals sorgfältig entfernt. Die Milchmenge wurde von 450 ml auf ca. 30 ml konzentriert. Für den nächsten Schritt wurde je 1 ml der aufkonzentrierten Milch in 24 Reagenzgefäße (1,5 ml) überführt.

2.3.1.2 Entfernung des Caseins

Durch die Zentrifugation wurden neben den bakteriellen Zellen auch die somatischen Zellen und eine hohe Menge an Caseinmizellen aufkonzentriert. Da die Caseinmizellen die weiteren Schritte beeinträchtigen können, wurden diese wie von Murphy *et al*. (2002) empfohlen, entfernt. Hierzu wurde zu der 1 ml aufkonzentrierten Rohmilch 300 µl 0,5 M EDTA-Dinatriumsalzlösung (pH 8,0) und 200 µl TE-Puffer (10 mM Tris-HCl + 1 mM EDTA-Dinatriumsalz, pH 7,6) gegeben und gut gemischt. Die Mischung wurde solange stehen gelassen, bis die Suspension die weiße Färbung verlor (ca. 1 Minute) und anschließend bei 16000 x *g* für 1 Minute bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 100 µl ¼ starker Ringerlösung resuspendiert. Der Inhalt von je zwölf Reaktionsgefäßen wurde in einem Reaktionsgefäß vereint (Ansatz A und B) und nochmals bei

16000 x *g* für 1 Minute bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde abermals verworfen und das Pellet in 350 µl ¼ starker Ringerlösung resuspendiert.

2.3.2 DNA-Extraktion

Die DNA-Extraktion wurde mittels eines kommerziell erhältlichen Kits durchgeführt, dem PathoProof™ Extraktionskit von Thermo Fisher Scientific Inc. PathoProof™-PCR-Assays identifizieren Mastitis-verursachende Bakterien direkt aus der Kuhmilch. Die DNA der in der Milchprobe vorhandenen Bakterien wird aus allen anderen Milchkomponenten extrahiert und gereinigt. Hierfür wird die DNA mittels mehrerer enzymatischer Schritte extrahiert und anschließend über Säulchen aufgereinigt. Die Extraktion wurde gemäß Herstellerangaben durchgeführt. Anstelle der Rohmilch wurde das resuspendierte Pellet aus Schritt 2.3.1.2 eingesetzt. Von jedem der beiden Betriebe wurden je zweimal 100 µl DNA-Extrakt gewonnen (A + B) und anschließend je 50 µl der beiden Ansätze A und B gepoolt. Eine schematische Zusammenfassung der einzelnen Arbeitsschritte der Kapitels 2.3.1 bzw. 2.3.2 kann der Abbildung 4 entnommen werden.

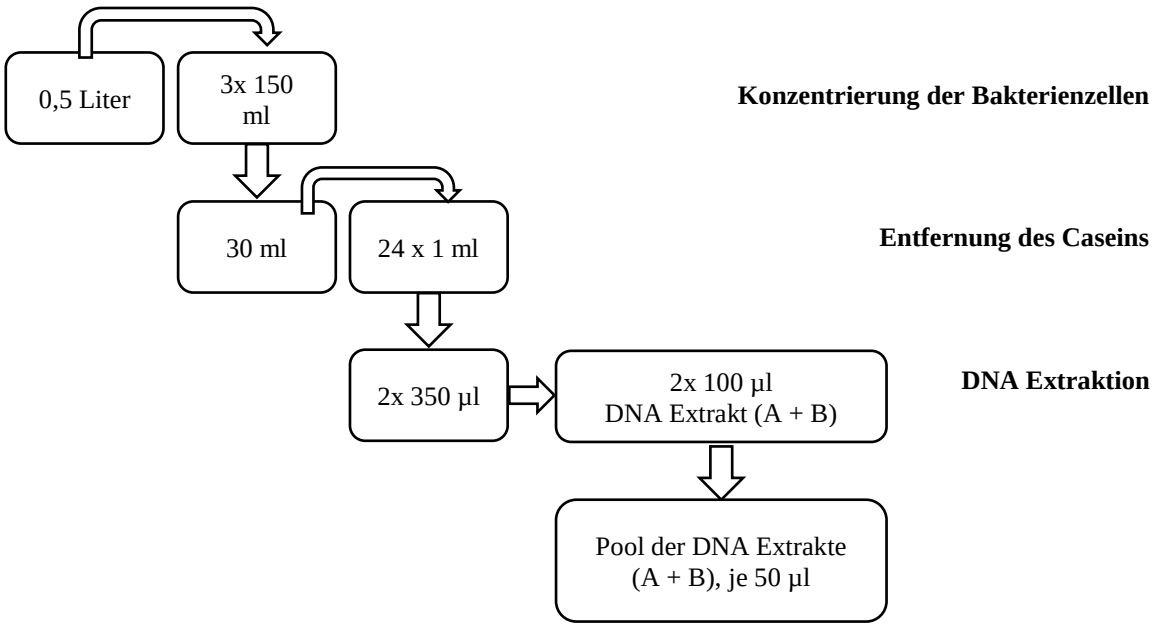


Abbildung 4 Arbeitschritte der Rohmilchaufarbeitung bis zur DNA-Extraktion.

2.3.3 Anreicherung und Aufreinigung der bakteriellen DNA

Für die Anreicherung der bakteriellen DNA wurde das Looxster Enrichment Kit von Analytik Jena nach Herstellerangaben verwendet. Hierbei wird mehr als 95% der eukaryontischen DNA mittels magnetischer Partikel entfernt. Eingesetzt wurden je 75 µl der gepoolten DNA beider Betriebe. Die Elution erfolgte in 30 µl DNA-freiem Wasser (Roth GmbH+Co KG).

2.3.4 Bestimmung der bakteriellen DNA-Konzentration

Zunächst wurde die gesamte DNA-Menge (bakteriell und somatisch) mit dem Qubit 2.0 Fluorometer (Life Technologies Co.) nach Herstellerangaben mit Hilfe des dsDNA HS Assay Kits bestimmt.

Die Menge an bakteriellen DNA wurde mittels quantitativer real-time PCR (qRT-PCR) bestimmt, als Fluoreszenzfarbstoff kam SYBR-Green zum Einsatz. Für die qRT-PCR wurde der SmartCycler 2.0c von Cepheid genutzt. Um den Anteil der bakteriellen DNA in den Proben ermitteln zu können, musste eine Standardkurve erstellt werden. Zunächst wurde für den bakteriellen Standard die DNA einer Reinkultur eines *Pseudomonas*- und eines *Enterococcus*-Stammes extrahiert und anschließend gemischt (BSD). Des Weiteren wurde ein Standard mit reiner bovinen DNA hergestellt (SSD). Der Gehalt beider Standards (BSD und SSD) wurde mit dem Qubit 2.0 Fluorometer gemessen und mit DNA-freiem Wasser auf 3,1 ng/µl eingestellt. Für die Erstellung der Standardkurve wurde der bakterielle Standard zunächst 1:10 und 1:100 verdünnt, um anschließend drei Standards wie in Tabelle 6 gezeigt herzustellen.

Tabelle 6 Mischverhältnis von bakteriellen (BSD) und somatischen Standard (SSD) für die Erstellung der Standardkurve zur Berechnung des prozentualen Anteils an bakterieller DNA.

	Mischverhältnis SSD und BSD	**Prozentualer Anteil bakterielle DNA**
Standard 1	27 µl SSD + 3 µl BSD	10%
Standard 2	27 µl SSD + 3 µl 1:10 BSD	1%
Standard 3	27 µl SSD + 3 µl 1:100 BSD	0,1%

Die Zusammensetzung des qRT-PCR -Ansatzes kann Tabelle 7 entnommen werden. Als Primer wurden die Primer 515F (5‘ GTG CCA GCM GC GCG GTA A-3‘) und 806R (5‘ GGA CTA CHV GGG TWT CTA AT-3‘) nach Caporaso *et al*. (2011) verwendet. Diese Primer amplifizieren ein 291 bp langes Fragment in der V2 Region der 16S rDNA Gens.

Tabelle 7 Zusammensetzung des PCR-Ansatzes für die Quantifizierung der bakteriellen DNA-Menge mittels qRT-PCR.

Phusion® Buffer HF (Thermo Fisher Scientific Inc.)	4,0 µl
dNTPs (20 mM)	1,0 µl
Primer 515F (10 pmol/µl)	2,0 µl
Primer 806R (10 pmol/µl)	2,0 µl
Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase Hotstart (Thermo Fisher Scientific Inc.)	0,1 µl
SYBR-Green (1:50000 verdünnt)	1,0 µl
Milli-Q Wasser	2,9 µl

Von den drei Standards wurden je 7 µl DNA-Extrakt eingesetzt. Von Betrieb 4 wurde 2 µl bzw. von Betrieb 6 1 µl der jeweils 1:10 Verdünnung der aufgereinigten und konzentrierten DNA aus 2.3.3 eingesetzt. Um auf 20 µl zukommen, wurde das fehlende Volumen mit 5 µl bzw. 6 µl Milli-Q Wasser aufgefüllt. Sowohl die Standards als auch die Proben wurden im Doppelansatz gemessen.

Das in Tabelle 8 aufgeführte Temperatur- und Zeitprofil wurde für den qRT-PCR -Ansatz verwendet.

Tabelle 8 Temperatur- und Zeitprofil für die Quantifizierung der bakteriellen DNA-Menge mittels qRT-PCR.

	Temperatur	**Dauer**	**Zyklen**
Initiale Denaturierung	98 °C	30s	1
Denaturierung	98 °C	5 s	40
Annealing	52,5 °C	10 s	
Elongation	72 °C	10 s	

Abschließend wurde die Schmelzkurve zwischen 53 °C und 97 °C bestimmt und der ct-Wert ermittelt. Mit Hilfe der Standards und den ct-Werte konnte über die lineare Regression der Anteil der bakteriellen DNA in den Proben ermittelt werden. Diese Berechnung wurde von der Software des SmartCycler 2.0c von Cepheid automatisch durchgeführt. Über den prozentualen

Anteil der bakteriellen DNA und der ermittelten gesamten DNA-Menge war die Berechnung der Menge an bakterieller DNA [ng/µl] möglich.

2.3.5 Library Preparation für die Illumina Sequenzierung

Für die Sequenzierung unter Verwendung der Illumina Plattform ist die Erstellung einer sogenannten Library mittels einer 2-Step PCR nötig. Das hierfür angewendete Protokoll wurde von Lagkouvardos *et al*. (2015) beschrieben und in modifizierter Form in dieser Arbeit angewendet.

Zunächst wurde die V3-V4 Region des 16S rDNA Gens amplifiziert (1. Step). Da das Protokoll bis dato für Rohmilch noch nicht angewendet worden war, wurden zwei unterschiedliche Ansatzvarianten mit unterschiedlichen DNA-Konzentrationen und Zyklenzahlen durchgeführt (siehe Tabelle 9).

Tabelle 9 Eingesetzt Menge bakterieller DNA (BDNA), Anzahl der Zyklen bzw. der unabhängigen PCR-Ansätze für die Ansatzvarianten 1 und 2 des 1. Steps der Library Preparation.

	Ansatz 1	**Ansatz 2**
eingesetzte Menge an BDNA	0,7 ng je Betrieb	3,5 ng (Betrieb 4) 2,5 ng (Betrieb 6)
Anzahl Zyklen	15	17
Anzahl unabhängige PCR-Ansätze	8	3

In beiden Ansatzvarianten wurde das wie unter 2.3.2 beschriebene DNA-Extrakt eingesetzt. Für jede Ansatzvariante wurden jedoch zwei unabhängige Looxster-Ansätze (siehe 2.3.3) durchgeführt. Die ermittelte Menge an bakterieller DNAwar für Betrieb 4 0,7 ng/µl und für Betrieb 6 0,25 ng/µl. Für die Ansatzvariante 1 wurde der Gehalt an bakterieller DNA für beide Höfe auf 0,2 ng/µl eingestellt, sodass insgesamt 0,7 ng bakterielle DNA eingesetzt wurden. Die Menge an bakterieller DNA für die Ansatzvariante 2 wurde nicht wie unter 2.3.4 beschrieben, bestimmt. Es wurde angenommen, dass diese identisch zum Ansatzvariante 1 war. Für die Ansatzvariante 2 wurde das aufkonzentrierte DNA-Extrakt von Betrieb 4 mit DNA-freiem Wasser 1:1 verdünnt und in die PCR-Reaktion eingesetzt, wohingegen das aufkonzentrierte DNA-Extrakt von Betrieb 6 unverdünnt eingesetzt wurde. Bei der Ansatzvariante 1 wurden für jeden Betrieb acht unabhängige PCR-Ansätze durchgeführt, bei der Ansatzvariante 2 waren es je Betrieb drei unabhängige Ansätze. Es zeigte sich jedoch, dass die Menge an Amplifikat nicht

ausreichend war und dass der erste Schritt der Library Preparation, also die Amplifikation, wiederholt werden musste (Ansatz 3). Als Template für den Ansatz 3 dienten die PCR-Produkte aus dem ersten und zweiten Ansatz. Der Tabelle 10 können die verwendten Primer entnommen werden.

Tabelle 10 Verwendete Oligonukleotide für den 1. Step Library Preparation, der Amplifikation der V3-V4 Region des 16S rDNA Gens.

Step	Oligonukleotid	Sequenz
Ansatz 1/ Ansatz 2	Forward-Primer (341F HTS)	5‘CCTACGGGNGGCWGCAG-3‘
	Reverse-Primer (785r HTS)	5‘GACTACHVGGGTATCTAATCC-3‘
Ansatz 3	Forward-Primer (341F-ovh)	5‘TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAG ACAGCCTACGGGNGGCWGCAG-3‘
	Reverse-Primer (785r-ovh)	5’GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGA GACAGGACTACHVGGGTATCTAATCC-3’

Die Zusammensetzung des PCR-Ansatzes für die drei verschiedenen Ansätze des 1. Steps der Library Preparation ist in Tabelle 11 dargestellt.

Tabelle 11 Zusammensetzung des PCR-Ansatz für die drei verschiedenen Ansätze des 1. Steps der Library Preparation.

	Ansatz 1	Ansatz 2	Ansatz 3
Phusion® HF Buffer (Thermo Fisher Scientific Inc.)	4,0 µl	4,0 µl	4,0 µl
dNTP`s (20 µM)	0,4 µl	0,4 µl	0,4 µl
Primer 341F HTS (20µM)	0,125 µl	0,125 µl	-
Primer 785r HTS (20µM)	0,125 µl	0,125 µl	-
341 F-ovh (20µM)	-	-	0,125 µl
785 R-ovh (20µM)	-	-	0,125 µl
Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase Hotstart (Thermo Fisher Scientific Inc.)	0,1 µl	0,1 µl	0,1 µl
DMSO (7,5%)	1,5 µl	1,5 µl	1,5 µl
Milli-Q Wasser	10,25 µl	3,75 µl	11,75 µl
Template[1]	3,5 µl	10,0 µl	2,0 µl

[1] bei Ansatz 3 wurde als Template das PCR-Produkt aus Ansatz 1 und 2 verwendet

Das Temperatur- und Zeitprofil der drei verschiedenen Ansätze können der nachfolgenden Tabelle 12 entnommen werden.

Tabelle 12 Temperatur- und Zeitprofil für die drei verschiedenen Ansätze des 1. Steps sowie des 2. Steps der Library Preparation; das Temperatur- und Zeitprofil des 2. Steps entspricht dem von Ansatz 3.

	Temperatur	**Dauer**			**Zyklen**		
		Ansatz 1	**Ansatz 2**	**Ansatz 3**	**Ansatz 1**	**Ansatz 2**	**Ansatz 3**
Initiale Denaturierung	98 °C	30 s	30 s	40 s		1	
Denaturierung	98 °C	5 s	5 s	20 s	15	17	10
Annealing	55 °C	10 s	10 s	40 s			
Elongation	72 °C	10 s	10 s	40 s			
Finale Elongation	72 °C	2 Min	2 Min	2 Min		1	

Nach der Amplifikation folgte der 2. Step der Library Preparation, um spezielle Oligonukleotide (siehe Tabelle 13) einzubauen. Diese Oligonukleotide beinhalten unter anderem eine Indexsequenz (Barcode), mit welcher es möglich ist, mehrere Proben in einem Sequenzlauf gemeinsam zu sequenzieren. Anschließend können anhand des Barcodes die Ergebnisse den einzelnen Proben wieder zugeordnet werden.

Tabelle 13 Verwendete Oligonukleotide für den 2. Step Library Preparation, dem Anheften von Adapter und Index.

Oligonukleotid	**Sequenz**
341-ovh-HTS-Nr.*	5’AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC**ACGACGTG** TCGTCGGCAGCGTC-3’
785r-ovh-HTS-Nr.*	5’CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT **AACTCTCG** GTCTCGTGGGCTCGG-3’

* Jede Probe wird mit einem einzigartigen Paar von Barcodes versehen. Der Barcode wird von der acht basenumfassenden Indexsequenz (**fett gedruckt**) bestimmt. Die Indexsequenz ist für jeden Primer unterschiedlich. Die hier dargestellten Primer sind nur Beispiele. Die verwendeten Primer und die Indexsequenz sind im Anhang Tabelle 2 zu entnehmen.

Da für die Sequenzierung 2 nM PCR-Produkt benötigt wurden, wurde im 2. Step der Library Preparation ein Mehrfachansatz durchgeführt (je nach Probe 6 bis 12-fach). Tabelle 14 bzw. Tabelle 12 zeigen die Zusammensetzung der PCR-Ansätze sowie das Temperatur- und Zeitprofil des 2. Steps der Library Preparation.

Tabelle 14 Zusammensetzung des PCR-Ansatzes für den 2. Step der Library Preparation.

Phusion® HF Buffer (Thermo Fisher Scientific Inc.)	10,0 µl
dNTP`s (20 µM)	1,0 µl
341-ovh-HTS-Nr. (20µM)	0,313 µl
785r-ovh-HTS-Nr. (2,5µM)	2,5 µl
Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase Hotstart (Thermo Fisher Scientific Inc.)	0,2 µl
DMSO (5%)	2,5 µl
Milli-Q Wasser	31,487 µl
Template[1]	2,0 µl

1 als Template diente das PCR-Produkt von Ansatz 3 des 1. Steps der Library Preparation

Nach dem 2. Step der Library Preparation wurden alle Mehrfachansätze einer Probe in ein Reagenzgefäß überführt und mittels AMPure XP MicroBeads aufgereinigt. Hierzu wurden die Beads zunächst auf Raumtemperatur gebracht. Zum PCR-Produkt wurde die 1,8-fache Menge an Beads hinzugegeben und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reagenzgefäße wurden in einen Magnetständer gestellt. Es folgten zwei Waschschritte mit je 200 µl 70%-igem Ethanol. Die Beads wurden anschließend für maximal 5 Minuten getrocknet, bevor mit 20 µl DNA-freiem Wasser die DNA eluiert wurde. Zum Test, ob die beiden PCR-Schritte erfolgreich waren, wurde eine Agarose Gel Elektrophorese durchgeführt (siehe 2.2.3.2).
Die Menge an DNA wurde je Probe in einer dreifach Messung mit dem Qubit 2.0 Fluormeter ermittelt und der Durchschnitt berechnet, zusätzlich wurde berechnet wie viel Template in die Sequenzierung eingesetzt werden muss, um 2 nM DNA einzusetzen. Die Ergebnisse der Qubit Messung und die daraus resultierende Menge an Template kann im Anhang Tabelle 3 entnommen werden.

2.3.6 Sequenzierung

Die Sequenzierung selbst erfolgte im MiSeq System (Illumina, Inc.) nach Herstellerangaben im paired-end Modus (PE275). Die Proben wurden gepoolt und 25% (v/v) der PhiX Standard Library dazugegeben. Die Probenmenge wurde wie beschrieben auf 2 nM eingestellt.

2.3.7 Sequenzauswertung und Identifizierung

Die Rohsequenzen wurden auf der imngs Plattform ausgewertet (Lagkouvardos *et al.*, 2016). Folgende Parameter wurden dabei eingestellt:

- Number of allowed mismatches in the barcode: 1
- Min fastq quality score for trimming of unpaired reads: 4
- Min length for single reads or amplicons for paired overlaping sequences: 300
- Max length for single reads or amplicons for paired overlaping sequences: 600
- Max number of expected errors in paired sequences: 4
- Length of trimming at the forward side of the seqs: 5
- Length of trimming at the reverse side of the seqs: 5
- Min relative abundance of OTU cutoff (0-1): 0.0005

Die Rohsequenzen wurden anhand der eingestellten Parameter modifiziert und schließlich den einzelnen Proben zugeordnet und zu operativen taxonomischen Einheiten (OTUs) gruppiert. Gleichzeitig wurden die OTUs mit einer Datenbank abgeglichen und taxonomisch eingeordnet, wobei dies im Idealfall bis auf Genus-Ebene erfolgte.

2.4 Statistische Auswertung

Die Rarefaction Analyse wurde mit dem Softwarepaket Species Diversity und Richness 4.1.2 durchgeführt (Seaby und Henderson, 2006).
Die Biodiversitätsindizes Shannon Index, Simpson Index und Chao 1 Index wurden mathematisch nach Colwell (2008) berechnet.

2.5 Taxonomische Methoden

2.5.1 Phylogenetische Analyse

Unter den 500 Isolaten von Betrieb 6 (siehe 2.1.2) waren auch Isolate, die bis dato unbekannten Gattungen angehörten, darunter auch das Isolat VG341 (WS 4900). Von diesem Isolat wurde die DNA extrahiert (siehe 2.2.3.1), der Vorwärts- als auch der Rückwärtsstrang des 16S rDNA Gen sequenziert (siehe 2.2.3.2) und zu einer Gesamtsequenz zusammengesetzt. Für die phylogenetische Einordnung wurde mittels der MEGA 6.06 Software ein phylogenetischer Baum mit dem Maximum Likelihood-Algorithmus konstruiert (Tamura *et al*., 2013). Für die Berechnung des phylogenetischen Baumes wurden die ersten drei ähnlichsten Sequenzen des Abgleiches mit der EzBioCloud Datenbank sowie die Typstammsequenzen aller zu den *Propionibacteriaceae* gehörenden Gattungen (Tabelle 15) verwendet. Als Outgroup wurde die Sequenz von *Kribella flavida* (GenBank Nr. AY253863) gewählt.

Tabelle 15 Auflistung der verwendeten Typstämme und ihrer GenBank Nummer für die Berechnung des phylogenetischen Baumes.

Typstamm bzw. Bakterienklon	**GenBank Nr.**
Acidipropionibacterium jensenii DSM 20535^T	AJ704571
Aestuariimicrobium kwangyangense R27^T	DQ830982
Auraticoccus monumenti MON 2.2^T	FN552748
Brooklawnia cerclae BL-34^T	DQ196625
Cutibacterium acnes ATCC 6919^T	AB042288
Friedmanniella antarctica DSM 11053^T	Z78206
Granulicoccus phenolivorans PG-02^T	AY566575
Luteococcus japonicus IFO 12422^T	D85487
Mariniluteicoccus flavus YIM M13146^T	KF564278
Microlunatus phosphovorus DSM 10555^T	Z78207
Micropruina glycogenica Lg2^T	AB012607
Naumannella halotolerans WS4616^T	FR832425
Propionibacterium freudenreichii DSM 20271^T	X53217
Propionicicella superfundia BL-10^T	DQ176646
Propioniciclava tarda WR061^T	AB298731
Propionicimonas paludicola DSM15597^T	FR733712
Propioniferax innocua ATCC 49929^T	AF227165
Propionimicrobium lymphophilum DSM 4903^T	AJ003056
Pseudopropionibacterium propionicum NBRC 14587^T	BCWS01000019
Raineyella antarctica LZ-22^T	KM406782
Tessaracoccus bendigoniensis Ben106^T	AF038504
Unkultivierter Bakteriumklon 12TCLN399	AB637325
Unkultivierter Bakteriumklon BD11789	JQ191103
Unkultivierter Bakteriumklon nbw37d03c1	GQ062880

2.5.2 Morphologische Charakterisierung

Für die morphologische Charakterisierung wurden die Stämme zunächst auf CASO-Agar mit Zusatz von 1mg/Liter Vitamin B12 für zwei Tage bei 30 °C bebrütet. Bei 63-facher Vergrößerung im Phasenkontrastmikroskop (Leica Camera AG) wurden die Zellmorphologie, die Bildung von Endosporen und die Beweglichkeit der Zellen untersucht. Das Gram-Färbeverhalten wurde mittels 3%-iger KOH-Lösung bestimmt (Powers, 1995).

2.5.3 Physiologische Charakterisierung

Jede Analyse wurde in einem zweiten unabhängigen Ansatz bestätigt. Die Bebrütung erfolgte, wenn nicht anders angegeben bei 30 °C für drei bis fünf Tage. Allen Nährmedien wurde 1mg/Liter Vitamin B12 zugegeben.

2.5.3.1 Enzymatische Aktivität und Substratverwertung

Die Oxidaseaktivität wurde mittels Bactident® Oxidase -Teststreifen (Merck KGaA) bzw. die Katalase-Reaktion mittels Bactident® Katalase-Reagenz (Merck KGaA) nach Herstellerangaben überprüft. Die Produktion von Indol und H_2S wurde mit Hilfe von SIM-Röhrchen (Oxoid GmbH) und Bactident® Indol-Reagenz (Merck KGaA) getestet. Die Umsetzung von Nitrat zu Nitrit wurde unter Verwendung der MQuant™ Nitrit Teststreifen (Merck KGaA) nachgewiesen. Für die Untersuchung der Hydrolyse von Gelatine, Stärke und Casein, die Reduktion von Nitrat und die Aktivität der Enzyme Arginin-Dihydrolase und β-Galaktosidase kamen folgende Nährmedien zum Einsatz, wobei sich die Angaben auf einen Liter Nährmedium beziehen.

Gelatine-Agar:
4,0 g Pepton, 1,0 g Hefeextrakt, 12,0 g Gelatine und 15,0 g Agar

Stärke-Agar:
40,0 g CASO-Agar (Oxoid GmbH) und 2,0 g Stärke

Casein-Agar pH 6,8:
1:1 Mischung aus doppelt konzentriertem Nutrient Agar (6,0 g Fleischextrakt, 10,0 g Trypton und 30,0 g Agar) und 10% Magermilch (100 g Magermilchpulver/Liter)

Nitrat-Agar:
30,0 g CASO-Bouillon (Merck KGaA), 1,0 g KNO_3 und 1,7 g Agar
Arginin-Dihydrolase-Bouillon pH 6,0:
1,0 g Fleischextrakt, 5,0 g NaCl, 0,3 g K_2HPO_4, 10,0 g L-Arginin, 0,016 g Bromkresolpurpur und 3,0 g Agar

Blau-Weiß- Agar (ß-Galactosidase-Aktivität):
5,0 ml X-Gal Stock Solution (20 mg/ml in DMSO), 5,0 ml 0,1 M IPTG (250 mg/ml in H_2O, steril filtriert) und 1 Liter Lysogeny Broth (LB) -Agar pH 7,0 (5,0 g Hefeextrakt, 10,0 g Trypton, 5,0 g NaCl und 15,0 g Agar)

Die Untersuchung auf die Hydrolyse von Stärke, Gelantine und Casein wurde wie von von Neubeck *et al*. (2016) beschrieben, durchgeführt. Die Substratverwertung wurde nach von Neubeck *et al*. (2017) durchgeführt. Die Bebrütung erfolgte jedoch bei 30 °C für sieben Tage.

2.5.3.2 Wachstumsgrenzen

Für den Nachweis der Fähigkeit des Wachstums bei anaeroben Bedingungen, wurden die Stämme auf CASO-Agar ausgestrichen und in einem Anaerobier Topf mit Anaerocult A (Merck KGaA) bei 30 °C bebrütet. Für die Bestimmung der Wachstumsgrenzen bzw. der Salz- sowie pH-Toleranz wurden die Stämme in CASO-Bouillon über Nacht bei 30 °C bebrütet. Getestet wurde die Toleranz gegenüber NaCl-Konzentrationen von 0% bis 12% in 1%-Schritten und pH-Werten von pH 4 bis pH 10 in 0,5 Schritten. Bei allen Untersuchungen war CASO-Bouillon ohne NaCl-Zusatzt das Basismedium (17,0 g Trypton, 3,0 g Sojamehlpepton, 2,5 g K_2HPO_4, 2,5 g Glukose, pH 7,3 ± 0,2). Für die Bestimmung der pH-Toleranz wurde das Bouillon nach Xu *et al*. (2005) gepuffert und 5,0 g NaCl zum Basismedium hinzugefügt. Für die Bestimmung der Temperaturgrenzen wurden die Stämme bei 6 °C, 8 °C, 10 °C, 15 °C, 37 °C und 40 °C in CASO-Bouillon (Merck KGaA) bebrütet.
Für alle Untersuchungen wurden 5 ml der entsprechenden Bouillon mit 50 µl der Übernachtkultur beimpft und für maximal sieben Tage bebrütet. Eine Trübung der Bouillon wurde als positive Reaktion gewertet.

2.5.4 Chemotaxonomische Charakterisierung

Die Peptidoglykan-Analyse, die Analyse der zellulären Fettsäuren und des Ganzzell-Zuckers wurden vom Identifizierungsdienst der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) durchgeführt. Der G+C Gehalt wurde am Lehrstuhl für mikrobielle Ökologie der TU München von Herrn Christoph Huptas bestimmt. Haupt-Menaquinone und polare Lipide wurden von Herrn Dr. Hans-Jürgen Busse am Institut für Mikrobiologie der Veterinärmedizinischen Universität Wien analysiert.

Für die Untersuchung der zellulären Fettsäuren wurde das Isolat gefriergetrocknet. Für die Bestimmung des Peptidoglycantyps der Zellwand wurde das Zellpellet in einer 1:1 Mischung aus Isopropanol und Wasser suspendiert. Lyophilisierte Zellen waren für die Bestimmung der Ganzzellzucker nötig.

2.5.4.1 Peptidoglykan-Analyse

Die Peptidoglykan-Analysen wurden nach dem von Schumann (2011) veröffentlichten Protokoll durchgeführt.

2.5.4.2 Zelluläre Fettsäuren

Die Extraktion und die Analyse der Fettsäuren wurden wie von Verbarg *et al*. (2008) beschrieben, durchgeführt. Es wurden dabei ein Agilent 6890N Gas Chromatograph, ein automatischer Flüssigprobengeber (Agilent 7683A) und die Version 6.1 der MIDI Inc. Sherlock MIS Software verwendet (Datenbank MIDI, Inc., TSBA 40 4.10 (NMC) bzw. TSBA 6 6.10 (NNH)).

2.5.4.3 Ganzzell-Zucker

Die Zellen wurden hydrolysiert (1N H_2SO_4, 100 °C, 2 Stunden) und anschließend der Ganzzell-Zucker nach der Methode nach Staneck und Roberts (1974) analysiert.

2.5.4.4 G+C Gehalt

Die Sequenzierung der gesamten genomischen DNA wurde mittels der Illumina MiSeq-Plattform und dem Illumina TruSeq DNA PCR Free Sample Preparation Kit durchgeführt. Anschließend wurden die Sequenzdaten zunächst einer Qualitätskontrolle unterzogen und gefiltert und schließlich mit Hilfe von SPAdes zusammengefügt. Der G+C Gehalt ergibt sich aus der Formel (Anzahl G + Anzahl C) / Gesamtlänge des Assemblies in Basenpaare.

2.5.4.5 Quinone und Polare Lipide

Die Quinone und die polaren Lipide wurde zunächst mittels eines integrierten Verfahrens extrahiert und gemäß den Protokollen von Tindall (1990a, b) bzw. Altenburger *et al.* (1996) analysiert. Die Analyse des Chinon-Systems wurde unter Verwendung der

Hochdruckflüssigchromatographie (HPLC) unter den von Stolz *et al*. (2007) beschriebenen Bedingungen durchgeführt.

3. ERGEBNISSE

3.1 Zusammensetzung der Rohmilchmikrobiota von 21 Betrieben

Für den ersten Teil der Dissertation wurde von November 2009 bis Februar 2013 die Variabilität und Stabilität der mikrobiellen Zusammensetzung der unkonservierten Tankmilch von 21 Betrieben aus Baden-Württemberg in einem kulturabhängigen Ansatz analysiert. Hierfür wurde jeder Betrieb fünf Mal mit einer Stichprobengröße von 50 Isolaten beprobt, wobei von den insgesamt 105 Proben sechs Proben ausgeschlossen wurden, da der Transport zum Untersuchungslabor nicht binnen 24 Stunden erfolgte. Die Proben umfassten je nach Abholfrequenz vier oder sechs Gemelke und hatten ein Probenalter zwischen zwei und vier Tagen. Zwischen der ersten und der letzten Probenahme innerhalb eines Betriebes lagen maximal 28 Monate (Anhang Tabelle 1). Zusätzlich zur Identifizierung der Isolate mittels FT-IR Spektroskopie, wurde bei 74 Proben zusätzlich die aerobe, mesophile Gesamtkeimzahl ermittelt.

3.1.1 Einteilung der Tankmilchproben anhand der Gesamtkeimzahl

Nach der deutschen Milchgüteverordnung gibt es drei Güteklassen von Rohmilch. Die Milch hat S-Klasse Niveau, wenn die Milch weniger als 50.000 Bakterien pro Milliliter (< 4,7 log KbE/ml) enthält. Um die Voraussetzung für die Klasse 1 zu erfüllen, darf die Gesamtkeimzahl (GKZ) nicht mehr als 100.000 Bakterien pro Milliliter (≤ 5,0 log KbE/ml) übersteigen. In unserem Testzeitraum hatte etwa ein Viertel der Proben den S-Klasse Status und ein weiteres Viertel den Klasse 1 Status. 22% der Proben überschritten jedoch den in der Milchgüteverordnung vorgeschriebenen Grenzwert von 300.000 KbE/ml (> 5,5 log KbE/ml). Die Ergebnisse der ermittelten aeroben, mesophilen Geamtkeimzahl sind in Abbildung 5 dargestellt.

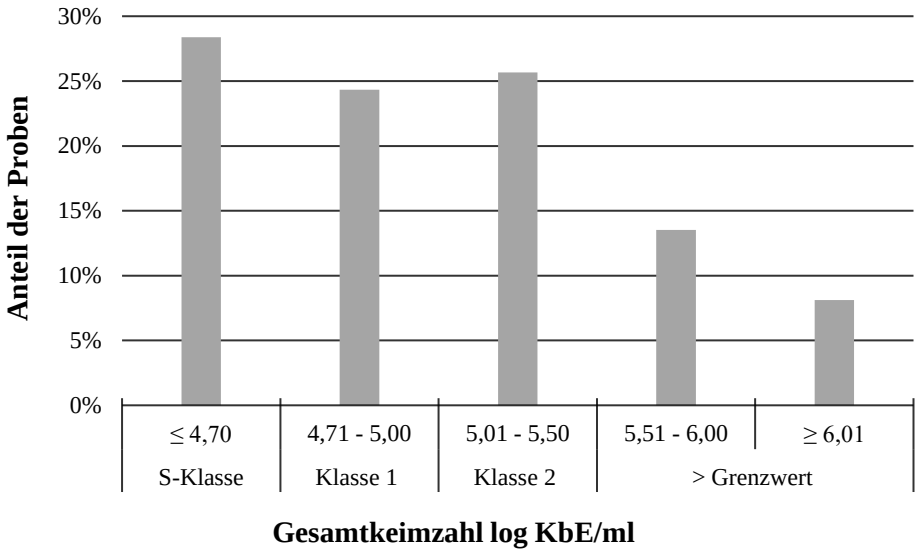


Abbildung 5 Einteilung der logarithmischen aeroben, mesophilen Gesamtkeimzahl der Tankmilchproben (n=74) in die Güteklassen der deutschen Milchgüteverordnung

3.1.2 Abundanz und Prävalenz der häufigsten Gattungen

Insgesamt wurden 4.965 Isolate isoliert wovon 4.839 Isolate mittels FT-IR-Spektroskopie identifiziert wurden. Bei 108 Isolaten handelte es sich um Hefen (n=106) oder Schimmelpilze (n=2), sie wurden nicht weiter differenziert. 4.435 Isolate konnten zu einer der insgesamt 101 Bakteriengattungen zugeordnet werden (siehe im Anhang Tabelle 4). 296 Isolate (6%) konnten nicht eindeutig einer Gattung zugeordnet werden, jedoch zu einer der sechs taxonomischen Großgruppen: Gram-negative, obligat aerobe Bakterien (*Pseudomonas* etc.), Gram-negative fakultative anaerobe Bakterien (*Enterobacteriaceae*), Gram-positive Sporenbildner, Gram-positive mit hohem G+C-Gehalt in ihrer DNA (Actinobakterien), Milchsäurebakterien (MSB) und andere Gram-positive Bakterien (hauptsächlich *Staphylococcus*). Wie Tabelle 16 zu entnehmen ist, gehörten die meisten Isolate den Gram-negativen, obligat aeroben Bakterien an, die fast die Hälfte der Isolate und mehr als ein Drittel aller identifizierten Gattungen repräsentierten. Actinobakterien wurden mit 29,4% aller Isolate als zweithäufigste Gruppe identifiziert, dennoch stammten die meisten Gattungen aus dieser Gruppe. Die am seltensten nachgewiesenen Gruppen waren Gram-positive Sporenbildner (0,4%) und *Enterobacteriaceae* (2,7%).

Tabelle 16 Prozentualer Anteil der Isolate und Gattungen an den sechs taxonomischen Großgruppen.
GN oa = Gram-negativ, obligat aerobe; GN fa = Gram-negativ, fakultativ anaerobe; GP HG = Gram-positiv, High GC; GP SB = Gram-positiv, Sporenbildner; GP a = Gram-positiv, andere; MSB= Milchsäurebakterien; Hef = Hefen

	GN oa	**GN fa**	**GP HG**	**GP SB**	**GP a**	**MSB**	**Hef**
% der Isolate	44,0%	2,7%	29,4%	0,4%	7,3%	14,0%	2,2%
% der Gattungen	36,6%	5,9%	39,6%	2,0%	4,0%	11,9%	

Abbildung 6 zeigt die Abundanz (angegeben als Prozentsatz aller Isolate) und die Prävalenz (angegeben als Prozentsatz der Proben, bei denen diese Gattung nachgewiesen wurde) der zehn häufigsten Gattungen. *Pseudomonas* konnte nicht nur in dreiviertel der Proben nachgewiesen werden, sondern wurde auch mit 22% am häufigsten detektiert. Die zweithäufigste Gattung, die auch zu den Gram-negativen, obligat aeroben Bakterien gehörte, war *Acinetobacter*, auf die 13% aller Isolate entfielen und die in 60% der Proben gefunden wurden. Sieben der zehn häufigsten Gattungen waren Gram-positiv. *Corynebacterium* und *Staphylococcus* waren gleichermaßen weit verbreitet als *Pseudomonas* und *Acinetobacter*, machten aber nur 8% und 7% der Gesamtzahl aller Isolate aus. Die restlichen sechs Gattungen wurden in etwa jeder dritten Probe detektiert. Obwohl insgesamt 101 Gattungen gefunden wurden, machten die zehn häufigsten insgesamt 73% aller Isolate aus und nur 15 Gattungen hatten eine Häufigkeit ≥ 1%. 86 Gattungen wurden mit < 1% gefunden und machten nur 11% aller identifizierten Isolate aus.

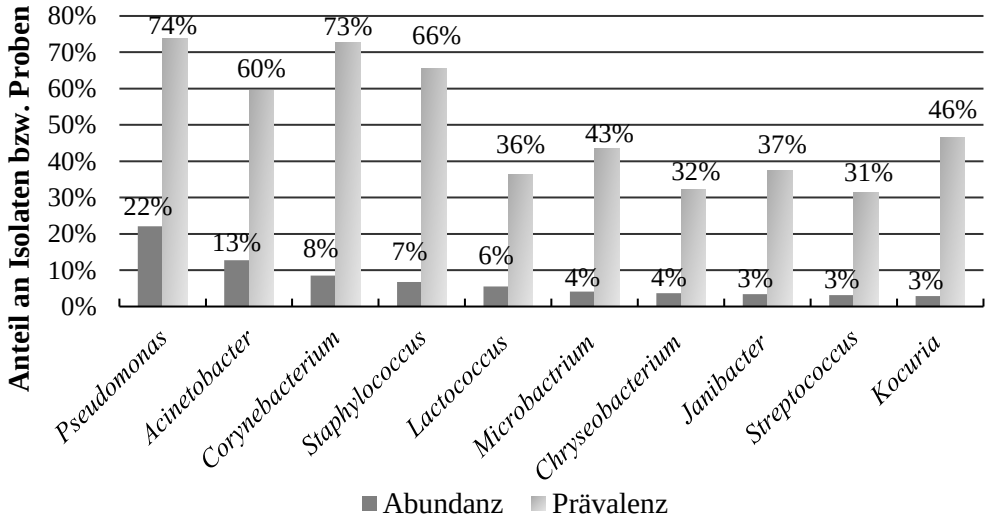


Abbildung 6 Abundanz (Dunkelgrau) und Prävalenz (Grau) der zehn häufigsten Gattungen (n=99).

Neben den zehn häufigsten Gattungen, die in allen Proben gefunden wurden, wurden auch die fünf häufigsten Gattungen je Betrieb erfasst. Wie Tabelle 17 zeigt, war die Hälfte der fünf häufigsten Gattungen auf den Betrieben Teil der zehn häufigsten Gattungen aller 99 Rohmilchproben. Weitere sieben Gattungen waren nur auf je einem Betrieb unter den fünf häufigsten Gattungen zu finden. Nur die Gattungen *Aerococcus* und *Arthrobacter* waren auf mehreren Betrieben unter den fünf häufigsten Gattungen. Auf drei Höfen (2, 9 und 18) wurden Hefen häufig detektiert. Die Zusammensetzung der fünf häufigsten Gattungen für jeden Hof war jedoch verschieden (Tabelle 17). Wenn auch auf den Höfen zwei oder drei der fünf häufigsten Gattungen identisch waren, so gab es unter den 21 Betrieben keine Übereinstimmung der fünf häufigsten Gattungen.

Tabelle 17 Übersicht der fünf häufigsten Gattungen bei Zusammenfassung aller 4 bzw. 5 Proben eines Betriebs.

Gatttung/Betrieb	**1**	**2**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**12**	**13**	**14**	**15**	**16**	**17**	**18**	**19**	**20**	**21**	**22**
Pseudomonas	x			x		x	x	x	x	x		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Acinetobacter	x	x		x		f	x		x	x	x	f	x	x	x		x			x	x
Corynebacterium	x	x	x	x	x	x			x		x		x				x		x		x
Staphylococcus		x	x	f	x	x	x	x			x	x	x			x					
Lactococcus				x						x	x					x		x			
Microbacterium	f						x	x				x		f	x	x					x
Chryseobacterium	f	x	x							x								x		x	
Janibacter			x			x		x			x		x			x					
Streptococcus					x					x		f						x	x		
Kocuria	x				x							x								x	
Aerococcus				f	x														x		
Arthrobacter									x					x					x		
Brachybacterium			x			f															
Brevibacterium																	x				
Enterococcus														f							
Frigoribacterium									x												
Hefe		x						x									x				
Pseudoclavibacter														x							
Rhodococcus																				x	
Stenotrophomonas																					x
Enterobacteriaceae 1															x						
Enterobacteriaceae 2															x						
Enterobacteriaceae 3																		x			
Milchsäurebakterium							x														

x= Gattung gehört zu den fünf häufigsten Gattungen des jeweiligen Betriebs
f = zwei Gattungen mit gleichem prozentualen Anteil belegten den 5. Platz

Neben der Tatsache, dass der Großteil der Isolate von nur wenigen Gattungen repräsentiert wurde, konnte auch gezeigt werden, dass es immer wieder die gleichen Gattungen waren, die auf den einzelnen Betrieben den Großteil der Isolate ausmachten. Zwar wurden weitere

Gattungen häufig nachgewiesen, ihr Vorkommen beschränkte sich jedoch auf nur wenige Betriebe. Es konnte somit eine Core-Mikrobiota festgestellt werden, die auf allen Höfen, bis auf sehr wenige Ausnahmen nachgewiesen wurden, hierzu zählen die Gattungen *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Corynebacterium*, *Staphylococcus* und *Microbacterium*. Für jeden Hof wurde dieses jedoch individuell mit weiteren Gattungen aufgefüllt.

3.1.3 Einflussfaktoren auf die Rohmilchmikrobiota

3.1.3.1 Zusammenhang von Gesamtkeimzahl, Biodiversität und taxonomischen Großgruppen

Drückt man die Biodiversität als Anzahl detektierter Gattungen pro Probe aus, so konnte ein Zusammenhang zwischen der Gesamtkeimzahl und dieser nachgewiesenen Biodiversität festgestellt werden. Mit zunehmender Gesamtkeimzahl nahm die Biodiversität ab (Abbildung 7). Proben mit einer Gesamtkeimzahl von < 4,7 log KbE/ml hatten durchschnittlich 13 Gattungen und waren signifikant vielfältiger als Proben mit einer erhöhten Keimzahl (> log 5,0 KbE/ml) mit nur durchschnittlich acht Gattungen (p = < 0,0001).

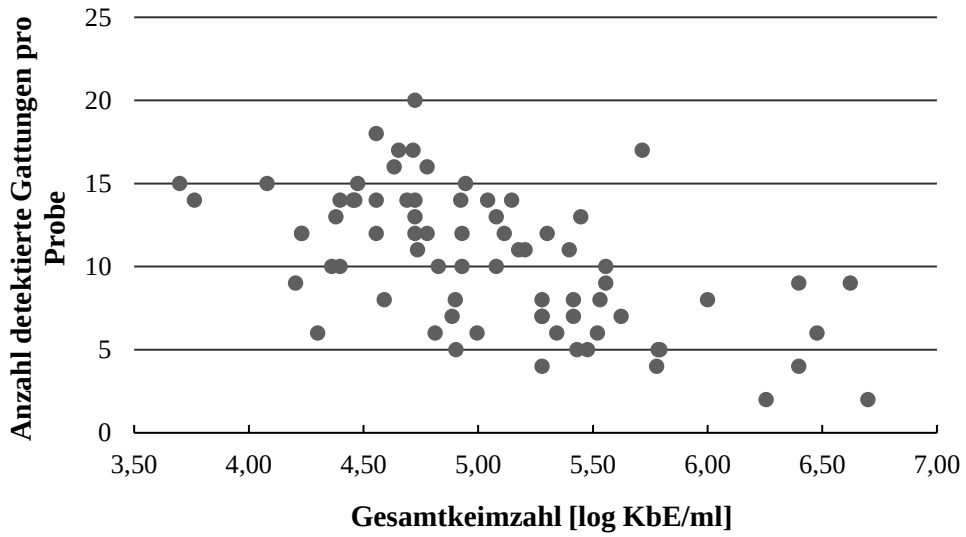


Abbildung 7 Zusammenhang zwischen der aeroben, mesophilen Gesamtkeimzahl und der Biodiversität ausgedrückt als Anzahl detektierter Gattungen pro Probe. Jeder Kreis repräsentiert eine Probe.

Der Zusammenhang zwischen der Gesamtkeimzahl und der detektierten Biodiversität könnte mit der Kühllagerung erklärt werden. Während der Kühllagerung kommt es zu einer Verschiebung der Mikrobiota, aber auch zur Verdrängung anderer Arten durch das Wachstum psychrotoleranter Arten. Eine stetige Erhöhung des durchschnittlichen relativen Anteiles der

Gram-negativen, obligat aeroben Bakterien mit steigender Gesamtkeimzahl konnte in der Tat nachgewiesen werden (Abbildung 8A). Dagegen nahm der Anteil an Gram-positiven Bakterien mit einem hohen G+C Gehalt im Bereich zwischen 5,0 und 6,7 log KbE/ml deutlich ab (Abbildung 8C). Die Unterschiede waren statistisch jedoch nicht signifikant. Der Grund hierfür ist die enorme Streuung, die bei der Betrachtung einzelner Probenwerte ersichtlich wird (Abbildung 8B+D). Im Keimzahlbereich zwischen 4 und 6 log KbE/ml war die Verteilung des Anteils der Gram-negativen Bakterien pro Probe nahezu identisch (Abbildung 8B). Es ist konnte somit gezeigt werden, dass Proben mit einer hohen oder sogar sehr hohen Gesamtkeimzahl (>5,5 log KbE/ml) nicht unbedingt von Gram-negativen Bakterien dominiert werden müssen und umgekehrt. Auch auf die anderen taxonomischen Großgruppen hatte die Gesamtkeimzahl keinen Einfluss, auch konnte keine Tendenz festgestellt werden.

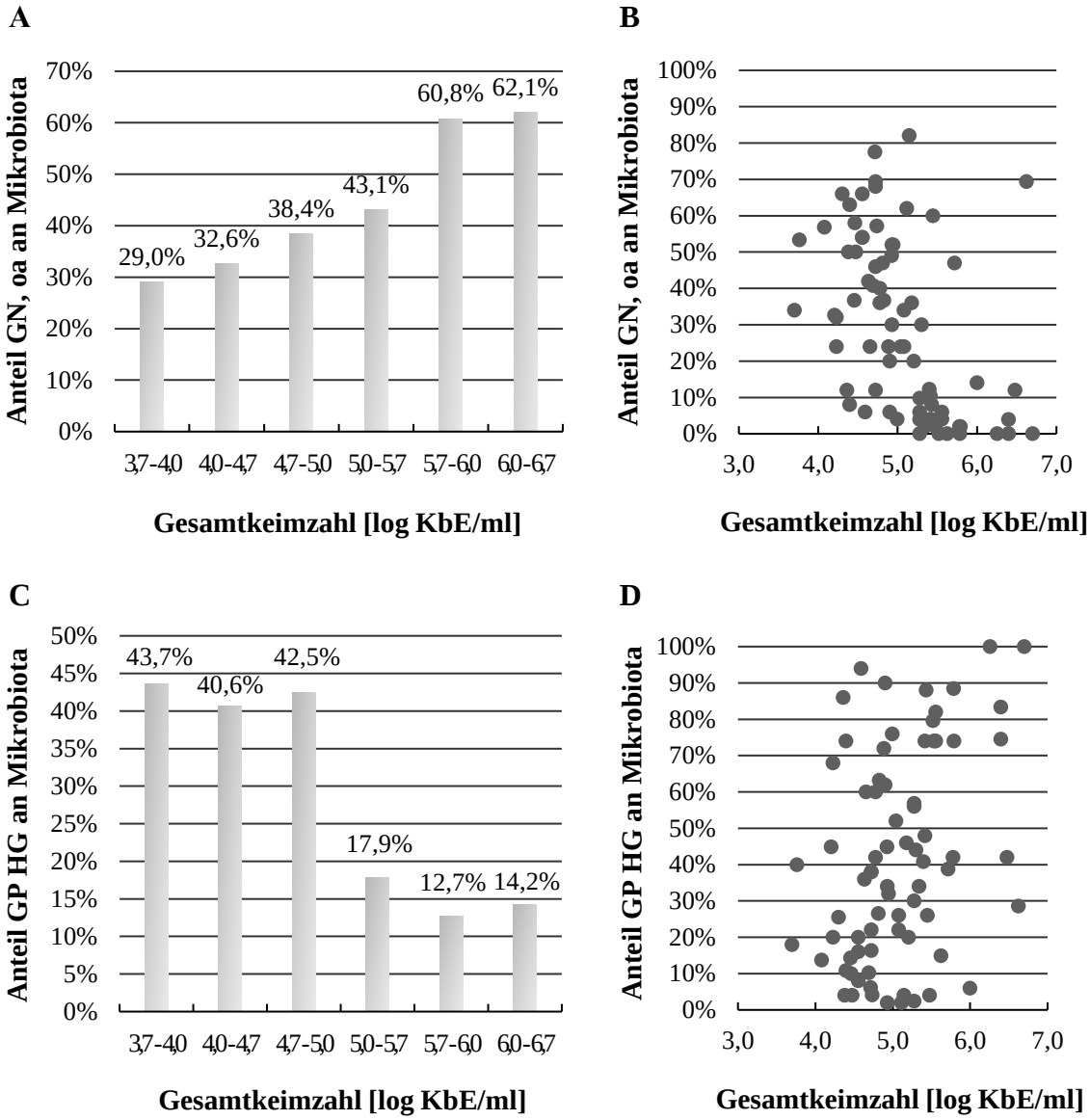


Abbildung 8 Prozentualer Anteil der Gram-negativen, obligat aeroben Bakterien (GN, oa) (A + B) bzw. Gram-positiven Bakterien mit einem hohen G+C Gehalt (GP HG) (C + D) im Verhältnis zur aeroben, mesophilen Gesamtkeimzahl (n=74). A + C: Mittelwerte über alle Proben für den jeweiligen GKZ-Bereich, B + D: jeder Kreis repräsentiert eine Probe.

3.1.3.2 Einflussfaktor Probenalter

Des Weiteren wurde der Zusammenhang von Mikrobiota und Probenalter untersucht. Für zwei und drei Tage alte Proben war die durchschnittliche Gesamtkeimzahl (GKZ) bzw. der Anteil an Gram-negativen, obligat aeroben Bakterien fast identisch, während Proben nach vier Tagen Lagerung eine erhöhte durchschnittliche Gesamtkeimzahl von 5,23 log KbE/ml hatten und fast die Hälfte der Isolate zu den Gram-negativen, obligat aeroben Bakterien gehörten (Tabelle 18).

Tabelle 18 Verteilung der durchschnittlichen aeroben, mesophilen Gesamtkeimzahl (n=74) und dem prozentualen Anteil Gram-negativer, obligat aerober Bakterien (n=99) je Probenalter.

Probenalter [d]	Durchschnittliche GKZ [log KbE/ml]	Anteil obligat aerobe Gram-negative Bakterien
2	4,74	31%
3	4,77	32%
4	5,23	46%

Die Verteilung der Gesamtkeimzahl der einzelnen Proben (Abbildung 9A) für das gleiche Probenalter variierte nicht so stark, wie der Anteil an Gram-negativen, obligat aeroben Bakterien je Probenalter (Abbildung 9B). Der minimale und maximale Anteil an Gram-negativen, obligat aeroben Bakterien, der in den jüngsten Proben (2% und 86%) ermittelt wurde, war nahezu bzw. identisch mit denen der ältesten Proben (2% und 100%). Betrachtet man nur die Gattung *Pseudomonas* anstelle aller Gram-negativen, obligat aeroben Bakterien, zeigt sich ein sehr ähnliches Bild nur mit der Ausnahme, dass der Anteil in den zwei und drei Tage alten Proben niedriger war (Abbildung 9C). Ein Trend zur altersbedingten Verschiebung der Milchmikrobiota konnte beobachtet werden, es scheint aber eher so, dass es hofspezifische oder prozessspezifische Faktoren gibt, welche einen stärkeren Effekt in positiver oder negativer Richtung haben.

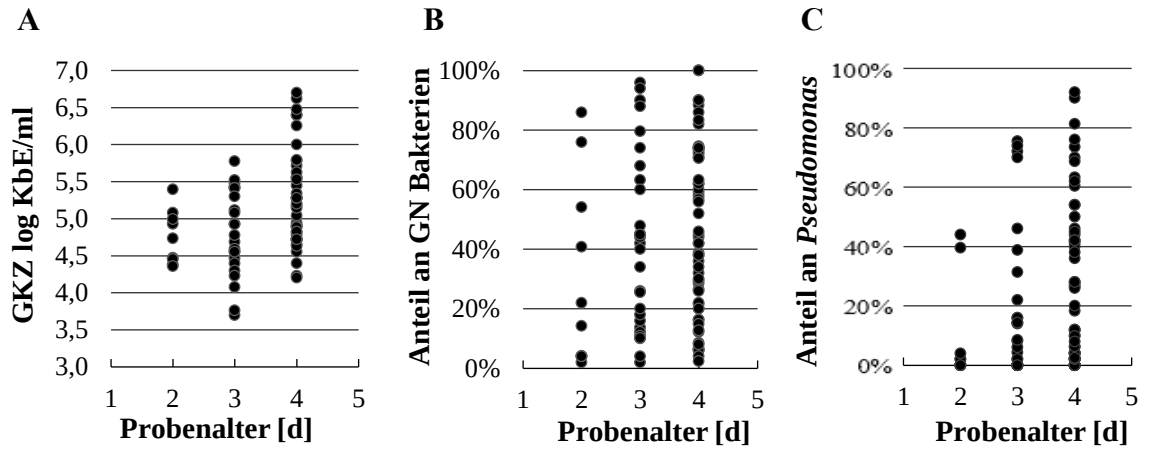


Abbildung 9 (A) Verteilung der aeroben, mesophilen Gesamtkeimzahl (GKZ) (n=74), (B) dem prozentualen Anteil Gram-negativer (GN) Bakterien (n=99) und (C) dem prozentualen Anteil an *Pseudomonas* (n=99) für die verschiedenen Probenalter. Jeder Kreis repräsentiert eine Probe.

3.1.3.3 Einflussfaktor Jahreszeit

Um den Einfluss der Jahreszeiten auf die Mikrobiota zu beurteilen, wurden die Daten nach dem Monat der Probenahme gruppiert. Die Probennahme war über die Jahreszeiten nicht gleich verteilt und es wurden auch nicht alle Bauernhöfe zu jeder Jahreszeit beprobt. Die meisten Proben wurden in den Herbstmonaten September - November (n=39) gezogen. Im Frühjahr (März - Mai), Sommer (Juni - August) oder Winter (Dezember - Februar) wurden zwischen 17 und 22 Proben analysiert. Für Abbildung 10 wurde eine Box-Whisker-Plot-Darstellung gewählt, welche den gesamten Studienzeitraum darstellt. Die Boxen repräsentieren das erste Quartil, den Median und das dritte Quartil, die Whisker repräsentieren milde Ausreißer (1,5x interquartiler Bereich) und offene Kreise stellen extreme Ausreißer dar. Die höchsten durchschnittlichen Gesamtkeimzahlwerte wurden im Juni und Juli beobachtet (Abbildung 10A), dennoch konnte eine große Varianz innerhalb der Monate beobachtet werden. Für die Gram-negativen, obligat aeroben Bakterien gab es eine Zunahme der durchschnittlichen Keimzahl bis zum Maximum im Juli, gefolgt von einem Rückgang auf ein Minimum im Dezember (Abbildung 10B). Allerdings gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Probenahmemonaten, weder in Bezug auf die Gesamtkeimzahl noch auf die Zahl der Gram-negativen, obligat aeroben Bakterien.

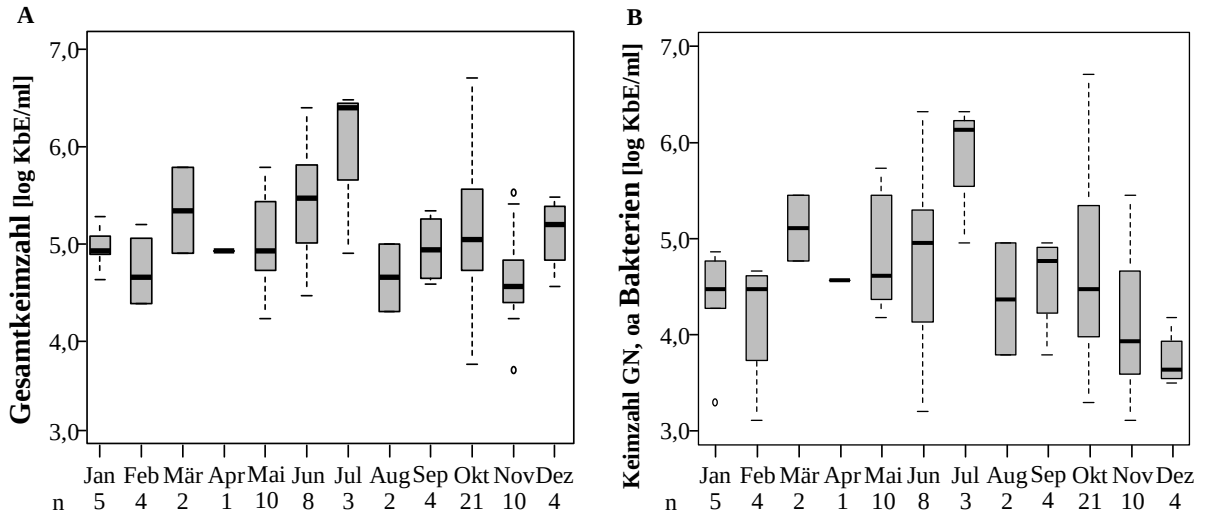


Abbildung 10 Einfluss der Jahreszeit auf die (A) aerobe, mesophile Gesamtkeimzahl und die (B) Keimzahl der Gram-negativen, obligat aeroben (GN, oa) Bakterien (n=74). 21 Betriebe wurden zwischen November 2009 und Februar 2013 fünf Mal analysiert.

3.1.4 Stabilität und Variabilität der Rohmilchmikrobiota einzelner Betriebe

Betrachtet man allein die Zusammensetzung der Mikrobiota der Höfe auf Ebene der taxonomischen Großgruppen, konnten beachtliche Unterschiede sowohl zwischen den Höfen als auch zwischen den fünf Proben eines Hofes festgestellt werden (siehe im Anhang Abbildung 1). Die Zusammensetzung der Mikrobiota von Hof 4 war nahezu stabil und durch einen hohen Anteil an Gram-positiven Bakterien gekennzeichnet (Abbildung 11). Der Anteil der Gram-negativen, obligat aeroben Bakterien betrug etwa 2% bis 16% (mit einer Ausnahme von 32%) und auch der Anteil der verschiedenen anderen Gram-positiven Bakterien war konstant. Gleiches galt für den Betrieb 6. Die Mikrobiota von Hof 18 war durch die klare Dominanz von entweder Gram-negativen, obligat aeroben oder Gram-positiven Bakterien mit einem hohen G+C Gehalt gekennzeichnet. Die anderen Großgruppen machten nur einen sehr kleinen Teil der Mikrobiota aus. Die Zusammensetzung war jedoch nicht stabil, da der Anteil der beiden dominierenden Großgruppen sehr unterschiedlich war. In drei Proben von Betrieb 9 wurde ein großer Anteil an Hefen detektiert, was ungewöhnlich war. Dagegen wurde auf Hof 16 immer eine große Zahl an Gram-negativen Bakterien nachgewiesen, wobei in drei Proben der Anteil an *Enterobacteriaceae* sehr hoch war. Meist waren die Unterschiede der taxonomischen Gruppen jedoch innerhalb der fünf Proben eines Betriebes groß, Betriebe mit einer stabilen Mikrobiota waren eher die Ausnahme.

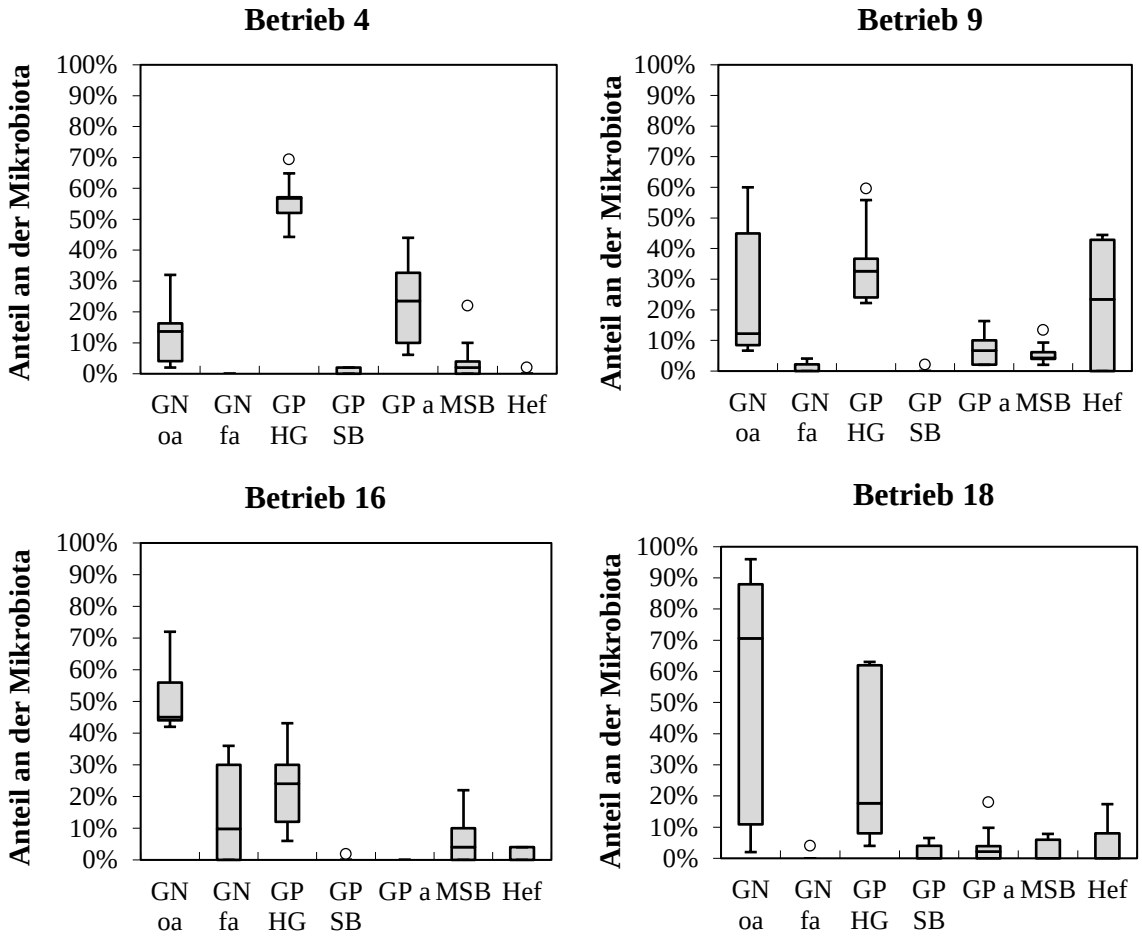


Abbildung 11 Prozentualer Anteil der verschiedenen taxonomischen Großgruppen innerhalb der Mikrobiota der Höfe 4, 9, 16 und 18. GN oa = Gram-negativ, obligat aerobe; GN fa = Gram-negativ, fakultativ anaerobe; GP HG = Gram-positiv, High GC; GP SB = Gram-positiv, Sporenbildner; GP a = Gram-positiv, andere; MSB= Milchsäurebakterien; Hef = Hefen.

Ein Maß für die Biodiversität ist die Anzahl an detektierten Gattungen pro Probe. Wie Abbildung 12 zu entnehmen ist, gab es innerhalb der Betriebe teilweise starke Schwankungen. Jedoch ist ein Indiz für die Stabilität der Biodiversität eine gleichbleibende Anzahl an detektierten Gattungen. Die Höfe 4, 6, 10, 13 und 17 hatten demzufolge eine relativ stabile Biodiversität, da die Anzahl der Gattungen maximal um fünf Gattungen abwich. Bei Betrieb 6 waren es sogar nur drei Gattungen.

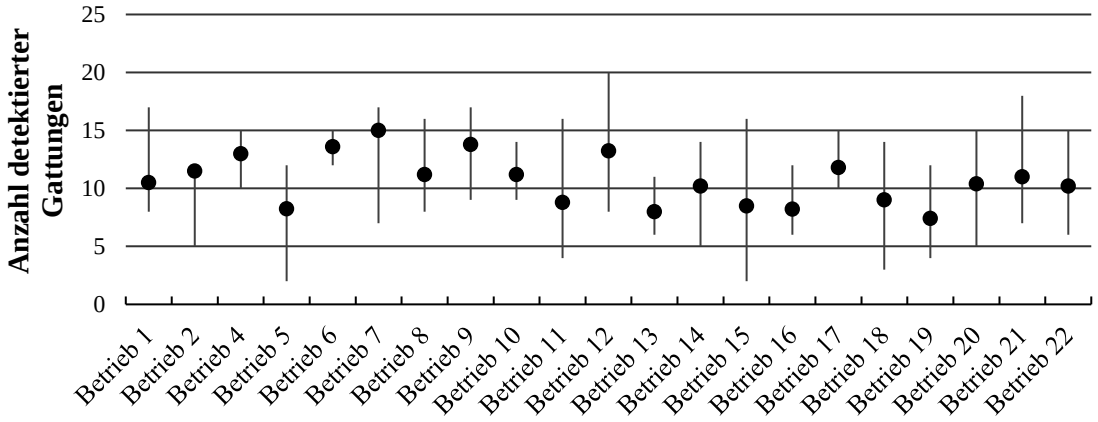


Abbildung 12 Durchschnittliche Anzahl detektierter Gattungen sowie Minimum und Maximum für jeden der 21 Betriebe. Der Kreis repräsentiert den Durchschnitt. Das obere bzw. untere Ende des Striches markieren das Maximum bzw. Minimum.

Der Tabelle 19 ist der Anteil zu entnehmen, in wie vielen der fünf Proben eine Gattung detektiert wurde. Zudem wird der Durchschnitt über alle Höfe und die Standardabweichung dargestellt. Im Durchschnitt wurden 58% der Gattungen in nur einer Probe pro Hof nachgewiesen, wobei die Werte zwischen 47% und 70% variierten. Nur ein kleiner Bruchteil von Gattungen wurde in vier oder fünf Proben detektiert, wobei es auch in diesem Punkt wieder Unterschiede zwischen den einzelnen Höfen gab. So gab es in der Mikrobiota der Bauernhöfe 20 und 21, die beide große Variationen im Anteil der verschiedenen taxonomischen Gruppen zeigten (siehe im Anhang Abbildung 1), keine einzige Gattung, die in allen fünf Proben gefunden wurden. Im Gegensatz dazu wurden auf Hof 4, der stetig einen sehr geringen Anteil an Gram-negativen Bakterien hatte, insgesamt 11% der Gattungen in allen fünf Proben gefunden. Dies waren *Staphylococcus*, *Corynebacterium*, *Janibacter* und *Brachybacterium*, die zusammen jeweils zwischen 50 und 75% der Isolate repräsentierten. Die Wiederfindungsraten auf den anderen Höfen, bei denen die Zahl an detektieren Gattungen relativ stabil war (Hof 6, 10,13 und 17), war deutlich niedriger. Nur ein oder zwei Gattungen konnten jeweils in allen Proben gefunden werden. Neben Betrieb 4 hatte Betrieb 7 die höchste Wiederfindungsrate in allen fünf Proben mit 13%. Vier der insgesamt 30 Gattungen konnten in allen fünf Proben nachgewiesen werden. Hierbei handelte es sich um *Corynebacterium*, *Staphylococcus*, *Brachybacterium* und *Brevibacterium*. Die gesamte Mikrobiota von Betrieb 7 war jedoch nicht stabil und es gab deutliche Unterschiede im Vorkommen der taxonomischen Großgruppen.

Tabelle 19 Minimaler, maximaler und durchschnittlicher Anteil sowie Standardabweichung der detektierten Gattungen in einer, zwei oder mehr Proben des gleichen Hofes. n: Anzahl der Proben; Min: Minimum; Max: Maximum; SD: Standardabweichung.

Anteil der Gattungen in n Proben				
n Proben	**Min**	**Max**	**Durchschnitt**	**SD**
1	47%	70%	58%	7%
2	6%	36%	18%	8%
3	3%	24%	12%	6%
4	3%	14%	7%	3%
5	0%	13%	6%	5%

3.1.5 Hofspezifische Mikrobiota

Ein genauerer Blick auf das Auftreten einzelner Gattungen zeigte die Anwesenheit von hofspezifischen Mikrobiota. Obwohl Gattungen wie *Pseudomonas* oder *Corynebacterium* in der Mehrzahl der Proben gefunden werden konnten, gab es auch Gattungen, die nur für einen oder wenige Höfe charakteristisch waren. *Luteimonas* wurde in vier der fünf Proben von Hof 4 gefunden, trat aber nur auf fünf weiteren Höfen und dann je in nur einer einzigen Probe auf. Ähnliches galt für *Ornithinimicrobium,* welches viermal auf Betrieb 17 detektiert wurde und noch auf sechs weiteren Betrieben mit ein oder maximal zwei Isolaten. *Isoptericola* wurde vor allem in den Proben der Betriebe 4, 9 und 17 identifiziert und *Janibacter* auf den Betrieben 4, 14 und 17. *Serratia* wurde nur in den Proben des Hofes 1 nachgewiesen. *Leucobacter*, *Naumannella* und *Aquamicrobium* wurden ausschließlich auf Hof 2 gefunden und *Luteococcus* wurde nur auf Hof 6 identifiziert. Die Mikrobiota des Betriebes 19 zeichnete sich durch eine hohe Häufigkeit eines Enterobakteriums aus, welches in allen Proben gefunden wurde und einen Anteil der Mikrobiota von bis zu 50% ausmachte, aber bei keinem anderen Betrieb detektiert wurde. Eine Identifizierung auf Gattungsebene war nicht möglich, aber es scheint ähnlich zu *Rahnella* zu sein. Neben der Anwesenheit von hofspezifischen Gattungen waren einige Bauernhöfe durch das Fehlen von sonst häufigen Gattungen gekennzeichnet. *Staphylococcus* wurde in keiner der fünf Proben des Hofes 16 gefunden, obwohl es die dritthäufigste Gattung war, die in zwei Drittel aller Proben vorhanden war (Abbildung 6). In der Probe von Betrieb 19 konnte hingegen *Kocuria* nicht nachgewiesen werden. *Pseudomonas* wurde sehr selten in den Proben der Bauernhöfe 2, 4, 6 und 12 gefunden, obwohl 22% aller Isolate dieser Gattung zugeordnet wurden. Ähnliches konnte auch für die zweithäufigste

Gattung *Acinetobacter* beobachtet werden. Auf den Höfen 4, 6, 9, 19 und 20 spielte *Acinetobacter* nur eine untergeordnete Rolle und machte weniger als 5% aller Isolate auf dem Betrieb aus.

3.1.6 Einfluß der Stichprobengröße auf die erfasste Biodiversität

Insgesamt wurden im Zeitrahmen von 3,5 Jahren zwischen 195 und 250 Isolate pro Betrieb analysiert und durchschnittlich 28 Gattungen je Hof detektiert, wobei die Varianz zwischen den Höfen von 17 bis 39 Gattungen reichte. Die Frage, welcher Anteil der Biodiversität erfasst wurde, lässt sich mit Hilfe der Rarefaction Analyse beantworten (Abbildung 13). Die Rarefaction Analyse stellt die Anzahl der detektierten Gattungen in Abhängigkeit der Isolatzahl dar. Je flacher eine Kurve ist, desto kleiner ist die Biodiversität auf dem Betrieb. Steil ansteigende Kurven deuten darauf hin, dass noch eine Vielzahl an weiteren Gattungen auf dem Betrieb vermutet wird. Betrieb 19 wies somit die niedrigste Biodiversität auf, wo hingen Betrieb 9 und 12 die größte Biodiversität hatten. Die Rarefaction Analyse zeigt, dass die Kurven der einzelnen Betriebe und somit das Maß der erfassten Biodiversität variierte. Keine der Kurven erreichte jedoch die Plateauphase, was bedeutet, dass auf keinem Betrieb die Biodiversität vollständig erfasst wurde. Als Begründung kann die kleine Stichprobengröße genannt werden, oder aber auch die Tatsache, dass sich die Daten aus mehreren Proben zusammensetzten und somit auch transiente Arten erfasst wurden. Welcher der beiden Gründe letztendlich die Rolle spielte, kann mit den erfassten Daten nicht differenziert werden. Daher wurde im zweiten Teil der Studie die Stichprobengröße auf zunächst 500 Isolate und in einem zweiten Ansatz auf 1500 Isolate erhöht, um zu sehen, welchen Einfluss die Stichprobengröße hat und welche Stichprobengröße nötig ist, um eine verlässliche Aussage bezüglich der Biodiversität auf einem Betrieb treffen zu können (siehe 3.2.1 und 3.2.2).

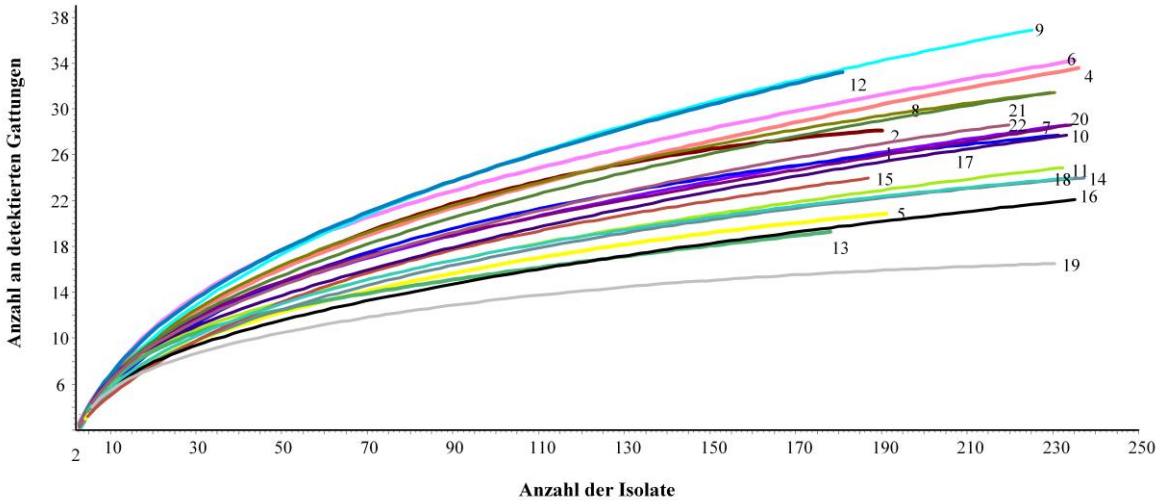


Abbildung 13 Rarefaction Analyse der einzelnen Betriebe (n=21) bei vier- bzw. fünffacher Beprobung mit je 50 Isolaten. Je flacher eine Kurve ist, desto kleiner ist die detektierte Biodiversität auf dem Betrieb. Die Zahl an den Kurven steht für die Betriebsnummer.

3.2 Vergleich der Biodiversität zweier ausgewählter Betriebe mittels kulturabhängiger und -unabhängiger Analyse

Ziel des zweiten Teils der Dissertation war herauszufinden, ob es möglich ist, auch mittels eines kulturabhängigen Ansatzes eine geeignete, große Biodiversität zu erfassen. Des Weiteren wurde verglichen in wie weit sich die Biodiversität, erfasst mittels kulturabhängiger bzw. -unabhängiger Analyse, unterscheidet. Hiefür wurden zwei Betriebe gewählt, die in der ersten Studie eine stabile Mikrobiota aufwiesen und in Bezug auf Betriebsgröße und Haltungsbedingungen vergleichbar waren (Betrieb 4 und 6). Zunächst wurde die Biodiversität beider Höfe in einem kulturabhängigen Ansatz mit einer Stichprobengröße von 500 Isolaten erfasst (Probe 1 und 2). Die Isolate wurden zunächst mittels FT-IR Spektrometer identifiziert und die Ergebnisse anschließend mittels 16S rRNA bzw. *rpoB* Sequenzierung bestätigt. Beide Betriebe wurden ein weiteres Mal mit einer Stichprobengröße von 1500 Isolaten beprobt (Probe 3 und 4), wobei die Identifizierung ausschließlich anhand der Sequenzierergebnisse erfolgte. Je ein halber Liter dieser Milchproben wurden bei –80 °C eingefroren, um zu einem späteren Zeitpunkt die Biodiversität in einem kulturunabhängigen Ansatz mittels Illumina Sequenzierung zu erfassen.

3.2.1 Erfassung der Biodiversität mittels kulturabhängiger Analyse

3.2.1.1 Erfasste Biodiversität von Betrieb 4

Die beiden Proben von Betrieb 4 (Probe 1 und 3) unterschieden sich nicht nur hinsichtlich der Zahl an sukzessiven Gemelken, sondern auch in Bezug auf die aerobe, mesophile Gesamtkeimzahl. Probe 1 enthielt sechs sukzessive Gemelke und hatte eine Gesamtkeimzahl von $4{,}5\times10^4$ KbE/ml. Probe 3 hingegen enthielt nur ein Gemelk und hatte eine Gesamtkeinzahl von $2{,}1\times10^4$ KbE/ml. Ein gemeinsames Merkmal beider Proben war der sehr hohe Anteil an Gram-positiven Bakterien mit einem hohen GC-Gehalt und Staphylokokken, welche zusammen rund 80% aller Isolate ausmachten.

495 Isolate von Probe 1 konnten eindeutig zu einer der insgesamt 71 detektierten Arten aus insgesamt 36 Gattungen zugeordnet werden, wohingegen in Probe 3 insgesamt 50 Gattungen und 117 Arten identifiziert werden konnten. Die exakte Auflistung der Biodiversität beider Proben ist im Anhang Tabelle 7 und im Anhang Tabelle 9 zu entnehmen. Fasst man beide Proben zusammen, konnten insgesamt 63 verschiedene Gattungen detektiert werden, wovon 20 in beiden Proben nachgewiesen werden konnten. In Probe 1 machten diese 20 Gattungen fast 92% aller Isolate aus. Tabelle 20 listet die zehn häufigsten Gattungen der beiden Proben auf. Mit Abstand die häufigste Gattung in beiden Proben war *Staphylococcus*, die über ein Drittel aller Isolate aus (31,1 bzw. 38,0%) repräsentierte.

Tabelle 20 Prozentualer Anteil der zehn häufigsten Gattungen für die Analyse der Rohmilchproben von Betrieb 4 mit einer Stichprobengröße von 500 Isolaten (Probe 1) bzw. 1500 Isolaten (Probe 3). Grau hinterlegt: Gattungen, die in beiden Proben detektiert wurden.

Probe 1		**Probe 3**	
Gattung	**% Isolate**	**Gattung**	**% Isolate**
Staphylococcus	31,1%	*Staphylococcus*	38,0%
Corynebacterium	19,5%	*Microbacterium*	10,7%
Brachybacterium	8,4%	*Corynebacterium*	8,5%
Janibacter	7,2%	*Gordonia*	6,5%
Acinetobacter	3,4%	*Streptococcus*	4,7%
Isoptericola	3,4%	*Pseudoxanthomonas*	4,4%
Dietzia	3,0%	*Janibacter*	3,3%
Chryseobacterium	2,6%	*Brachybacterium*	3,1%
Streptococcus	2,4%	*Aerococcus*	2,8%
Brochothrix bzw. *Leuconostoc*	je 2,2%	*Brevibacterium*	2,4%

In Probe 1 gehörte jedes fünfte Isolat der Gattung *Corynebacterium* (19,5%) an. In Probe 3 belegte diese Gattung jedoch mit 8,5% aller Isolate nur den dritten Platz. *Microbacterium*

(10,7%) war die zweithäufigste Gattung in Probe 3, wurde in Probe 1 jedoch deutlich seltener nachgewiesen (1,4%). Trotz der sichtbaren Unterschiede der zehn häufigsten Gattungen beider Proben (Tabelle 20), wurden alle zehn häufigsten Gattungen von Probe 1, mit Ausnahme von *Brochothrix*, auch in Probe 3 detektiert. Die beiden häufig detektierten Gattungen der Probe 3 *Gordonia* und *Pseudoxanthomonas* konnten jedoch nicht in Probe 1 nachgewiesen werden. Alle anderen 25 Gattungen, die ausschließlich in Probe 3 gefunden wurden, machten jeweils weniger als 1% der Gesamtisolatzahl aus.

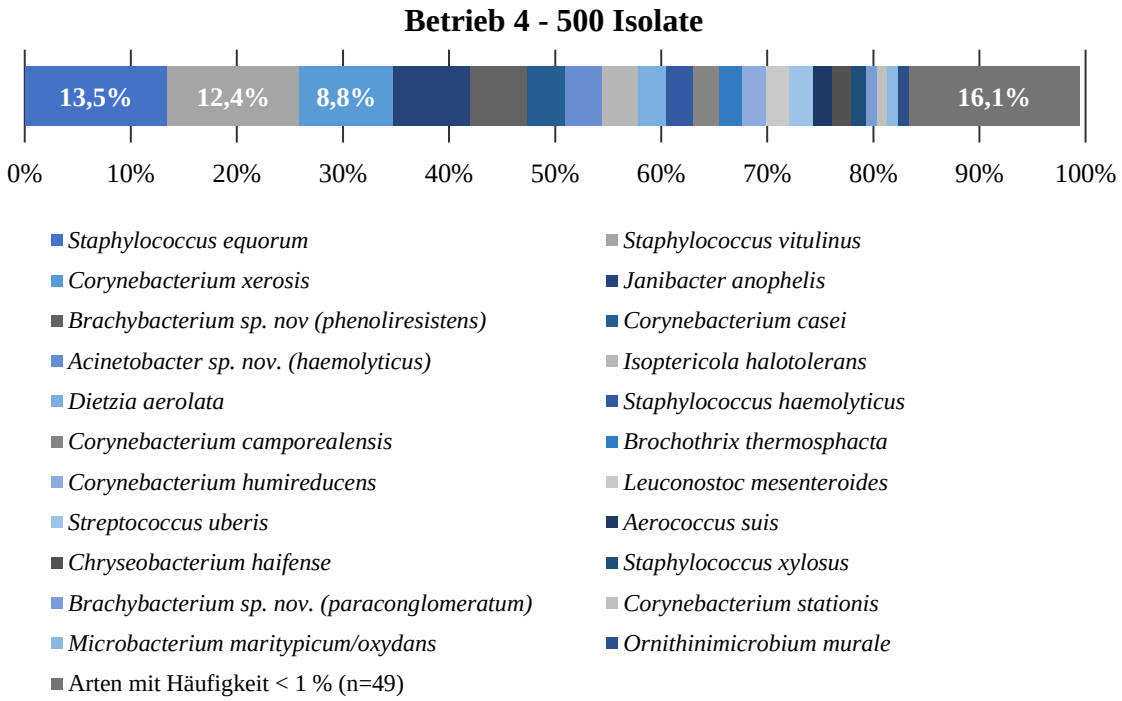


Abbildung 14 Prozentualer Anteil der Arten mit einer Häufigkeit von ≥ 1% für die Analyse der Rohmilchprobe von Betrieb 4 mit einer Stichprobengröße von mit 500 Isolaten (Probe 1). Alle Arten mit einer Häufigkeit < 1% sind im dunkelgrauen Block ganz rechts zusammengefasst dargestellt.

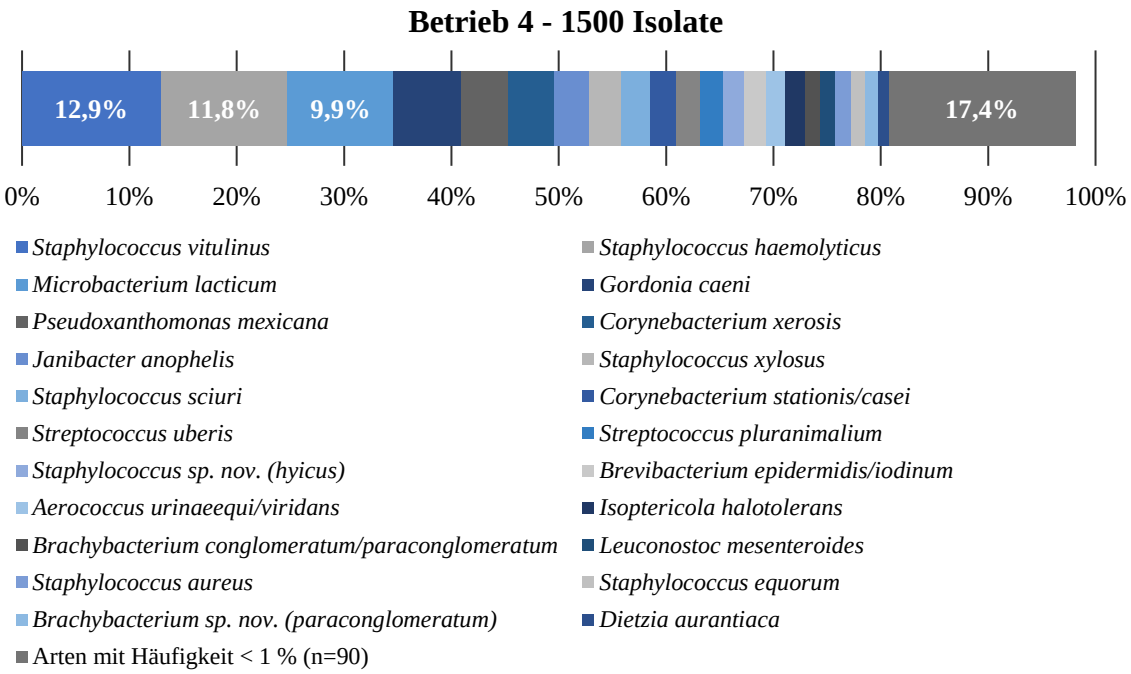


Abbildung 15 Prozentualer Anteil der Arten mit einer Häufigkeit von ≥ 1% für die Analyse der Rohmilchprobe von Betrieb 4 mit einer Stichprobengröße von mit 1500 Isolaten (Probe 3). Alle Arten mit einer Häufigkeit < 1% sind im dunkelgrauen Block ganz rechts zusammengefasst dargestellt.

Auf Artebene hatten in beiden Proben je 22 Arten einen Anteil von ≥ 1,0% an der Gesamtisolatzahl. Sie repräsentieren zusammen 83,3% bzw. 80,8% aller Isolate. Allein ein Viertel aller Isolate wurde von nur zwei Arten repräsentiert. In Probe 1 waren dies *Staphylococcus equorum* (13,5%) und *Staphylococcus vitulinus* (12,4%) (Abbildung 14) und in Probe 3 *Staphylococcus vitulinus* (12,7%) *und Staphylococcus haemolyticus* (11,6%) (Abbildung 15). Sowohl *Staphylococcus equorum* als auch *Staphylococcus haemolyticus* konnten in der jeweils anderen Probe nachgewiesen werden, wurden jedoch weniger häufig isoliert (< 3%). Insgesamt waren 31 der insgesamt 152 Arten in beiden Proben identisch, wobei sich das prozentuale Vorkommen teilweise deutlich unterschied. Unter den Arten, die exklusiv in nur einer Probe detektiert wurden, waren auch häufig vorkommende Arten. So wurde beispielsweise in Probe 3 fast jedes zehnte Isolat als *Microbacterium lacticum/saccharophilum* identifiziert. In Probe 1 erfolgte jedoch kein Nachweis dieser Art. Auch die Arten *Gordonia caeni, Pseudoxanthomonas mexicana, Streptococcus pluranimalium, Staphylococcus aureus* und eine potentiell neue *Staphylococcus* Art wurden ausschließlich in Probe 3 detektiert. Demgegenüber wurden die Arten C*orynebacterium casei, Brochothrix thermosphacta, Corynebacterium humireducens, Orthninimicrobium murale* und eine potentiell neue *Acinetobacter* Art exklusiv in Probe 1 gefunden. All die genannten Arten hatten eine Häufigkeit

≥ 1% in ihrer jeweiligen Probe. Alle anderen Arten, die jeweils nicht in der anderen Probe gefunden wurden, repräsentierten weniger als 1% (35 bzw. 75 Arten). Des Weiteren fiel auf, dass einige Gattungen eine hohe Biodiversität zeigten, wie etwa *Corynebacterium*, *Staphylococcus* und *Brachybacterium*. So konnten beispielsweise von *Corynebacterium* zehn bzw. elf verschiedene Arten detektiert werden.

3.2.1.2 Erfasste Biodiversität von Betrieb 6

Auch von Betrieb 6 wurde die Biodiversität mit einer Stichprobengröße von 500 (Probe 2) bzw. 1500 Isolaten (Probe 4) erfasst, wobei Probe 2 vier sukzessive Gemelke enthielt und eine Gesamtkeimzahl von $5{,}0\times10^4$ KbE/ml hatte. Probe 4 umfasste hingegen zwei Gemelke und hatte eine aerobe, mesophile Gesamtkeimzahl von $2{,}5\times10^4$ KbE/ml. 409 Isolate von Probe 4 konnten zu einer von drei Hefearten zugeordnet werden. Diese waren *Candida parapsilosis*, *Yarrowia lipolytica* und *Candida pararugosa*. Damit wurde fast ein Drittel aller Isolate von Hefen ausgemacht. Für die weitere Ergebnisdarstellung wurden die Hefeisolate jedoch nicht weiter berücksichtigt und alle Prozentangaben beziehen sich ausschließlich auf die bakteriellen Isolate, womit die Stichprobengröße im Vergleich zu Probe 2 nur etwas mehr als verdoppelt war.

Auf Ebene der taxonomischen Großgruppen waren beide Proben recht ähnlich, lediglich im Vorkommen von Gram-positiven Sporenbildnern gab es Unterschiede, da diese in Probe 4 mit 1,8% nachgewiesen wurden, in Probe 2 jedoch nicht detektiert wurden. In Probe 2 wurden insgesamt 110 Arten aus 57 Gattungen nachgewiesen. 60 Gattungen und 125 Arten wurden demgegenüber in Probe 4 detektiert. Beide Proben wiesen die Eigenschaft auf, dass nur wenige Gattungen für einen Großteil der Isolate verantwortlich waren. 24 bzw. 21 Gattungen konnten mit einer Häufigkeit ≥ 1% nachgewiesen werden und machten zusammen 86,2% bzw. 90,7% aller Isolate aus. Wie der Tabelle 21 zu entnehmen ist, waren die zwei häufigsten Gattungen von Probe 2 *Corynebacterium* (19%) und *Chryseobacterium* (9,6%). Probe 4 wurde hingegen von *Microbacterium* dominiert. Allein ein Viertel aller Isolate entfiel auf diese Gattung. Zwar war auch *Microbacterium* unter den zehn häufigsten von Probe 2 vertreten, belegte aber nur den sechsten Platz (5,2%). *Corynebacterium* war die zweithäufigste Gattung mit 12,7%. Insgesamt gab es sechs Gattungen unter den zehn häufigsten Gattungen, die jeweils in beiden Proben detektiert wurden. Dennoch wurden die beiden häufig detektierten Gattungen *Knoellia* und *Rothia* exklusiv nur in Probe 2 nachgewiesen, hingegen *Stenotrophomonas* exklusiv in Probe 4. Die jeweils verbleibenden Gattungen, der zehn häufigsten Gattungen, wurden zwar in

der jeweils anderen Probe isoliert, spielten jedoch nur eine untergeordnete Rolle. Beide Proben hatten 29 der insgesamt 88 Gattungen gemeinsam, unter ihnen auch eine potentiell neue Gattung, die am nächsten mit *Sphingobacterium* verwandt ist.

Tabelle 21 Prozentualer Anteil der zehn häufigsten Gattungen für die Analyse der Rohmilchproben von Betrieb 6 mit einer Stichprobengröße von 500 Isolaten (Probe 2) bzw. 1500 Isolaten (Probe 4). Grau hinterlegt: Gattungen, die in beiden Proben detektiert wurden.

Probe 2		**Probe 4**	
Gattung	**% Isolate**	**Gattung**	**% Isolate**
Corynebacterium	19,0%	*Microbacterium*	25,6%
Chryseobacterium	9,6%	*Corynebacterium*	12,7%
Knoellia	8,2%	*Stenotrophomonas*	7,9%
Streptococcus	7,8%	*Aerococcus*	6,4%
Kocuria	6,2%	*Streptococcus*	5,9%
Microbacterium	5,2%	*Kocuria*	4,7%
Aerococcus	3,6%	*Pseudoclavibacter*	3,9%
Rothia	3,4%	*Shinella*	3,7%
Lactococcus	2,6%	*Chryseobacterium*	3,4%
Janibacter	2,4%	*Staphylococcus*	2,3%

Die häufigste Spezies in Probe 2 war *Corynebacterium xerosis* (10,4%), gefolgt von einer potentiell neuen *Knoellia* Art (7,8%) und *Streptococcus dysgalactiae ssp. dsygalactiae* mit 4,8% (Abbildung 16). In Probe 4 waren die beiden häufigsten Arten jedoch *Microbacterium yannicii* und *Microbacterium lacticum/saccharophilum*. Zusammen waren sie für fast ein Viertel aller Isolate verantwortlich (Abbildung 17). In Probe 2 spielten diese beiden Arten nur eine untergeordnete Rolle und machten 0,4% bzw. 2% der Isolate aus. Auch weitere, relativ häufige Arten (Häufigkeit von ≥ 1%), wie etwa eine potentiell neue *Chryseobacterium* oder auch eine potentiell neue *Knoellia* Art wurden ausschließlich in Probe 2 nachgewiesen. Demgegenüber wurden *Stenotrophomonas maltophilia* und eine potentiell neue *Pseudoclavibacter* Art exklusiv in Probe 4 identifiziert. Gerade einmal 39 Arten kamen in beiden Proben gemeinsam vor (Tabelle 23). Die Detailergebnisse beider Proben können im Anhang Tabelle 8 und im Anhang Tabelle 10 entnommen werden.

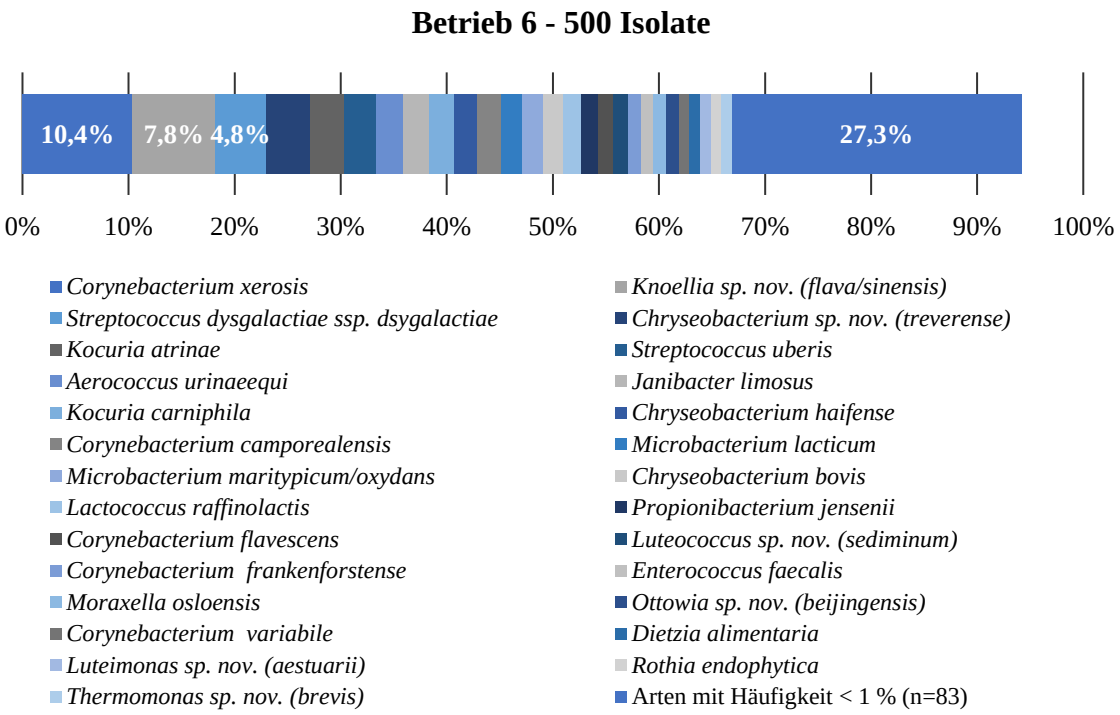


Abbildung 16 Prozentualer Anteil der Arten mit einer Häufigkeit von ≥ 1% für die Analyse der Rohmilchprobe von Betrieb 6 mit einer Stichprobengröße von mit 500 Isolaten (Probe 2). Alle Arten mit einer Häufigkeit < 1% sind im blauem Block ganz rechts zusammengefasst dargestellt.

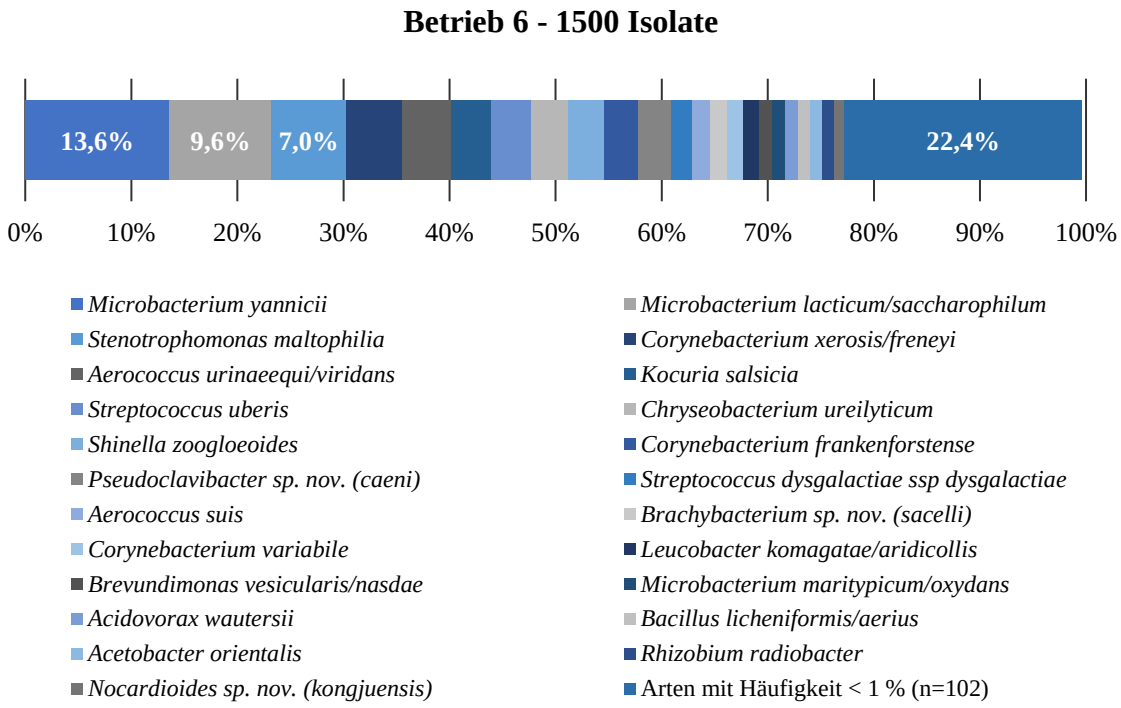


Abbildung 17 Prozentualer Anteil der Arten mit einer Häufigkeit von ≥ 1% für die Analyse der Rohmilchprobe von Betrieb 6 mit einer Stichprobengröße von mit 1500 Isolaten (Probe 4). Alle Arten mit einer Häufigkeit < 1% sind im blauem Block ganz rechts zusammengefasst dargestellt.

3.2.1.3 Vergleich der Biodiversität beider Betriebe und Einfluss der Stichprobengröße auf die erfasste Biodiversität

Zunächst konnte festgestellt werden, dass trotz unterschiedlicher Anzahl an Gemelken, die aerobe, mesophile Gesamtkeimzahl aller vier Proben recht niedrig war (siehe Tabelle 22) und die Milch in Bezug auf diese von guter Qualität war. Die Gesamtkeimzahl der Proben 3 und 4 war im Vergleich zu den Proben 1 und 2 um etwa die Hälfte geringer. Dies kann in der kürzeren Lagerung auf dem Hof und im Probentransport begründet liegen, da die Proben 3 und 4 direkt nach der Probennahme in das Untersuchungslabor gebracht wurden und nicht weitere 24 Stunden vergingen wie bei den Proben 1 und 2.

Tabelle 22 Vergleich der detektierten Biodiversität für die Betriebe 4 und 6 erfasst mittels kulturabhängiger Analyse für die Stichprobengrößen von 500 bzw. 1500 Isolaten.

	Betrieb 4		**Betrieb 6**	
Probennummer	1	3	2	4
Probenahmedatum	Jan. 2011	März 2013	Jan. 2011	Juli 2012
Anzahl der Gemelke	6	1	4	2
Gesamtkeimzahl [KbE/ml]	$4{,}5 \times 10^4$	$2{,}1 \times 10^4$	$5{,}0 \times 10^4$	$2{,}5 \times 10^4$
Anzahl bakterieller Isolate (eindeutige Zuordnung zu einer Art möglich)	498 (495)	1475 (1447)	501 (472)	1102 (1098)
Anzahl detektierte Gattungen	36	47	57	60
Anzahl bis dato unbekannte Gattungen	2	2	5	3
Anzahl Gattungen mit Häufigkeit ≥ 1% [% der Isolate]	16 (92,4)	14 (91,2)	24 (86,2)	21 (90,7)
Anzahl detektierte Arten	71	112	110	125
Anzahl bis dato unbekannte Arten	21	23	28	24
Anzahl Arten mit Häufigkeit ≥ 1% [% der Isolate]	22 (83,3)	22 (80,8)	27 (66,9)	23 (77,2)
Anzahl Gattungen in beiden Proben zusammen (davon gemeinsam)	63 (20)		88 (29)	
Anzahl Arten in beiden Proben zusammen (davon gemeinsam)	152 (31)		196 (39)	
Shannon Index	3,357	3,47	3,996	3,696
Simpson Index	0,94	0,94	0,96	0,95

Alle vier Proben wurden von Gram-positiven Bakterien dominiert, wobei diese auf Betrieb 4 hauptsächlich von der Gattung *Staphylococcus* repräsentiert wurden. In den beiden Proben von Betrieb 6 spielte hingegen die Gattung *Staphylococcus* eine untergeordnete Rolle. Die meisten

Isolate von Betrieb 6 konnten den Gram-positiven Bakterien mit einem hohen G+C-Gehalt zugeordnet werden, gefolgt von Gram-negativen, strikt oxidativen Bakterien. Der Anteil der letzt genannten Großgruppe war auf Betrieb 4 deutlich geringer. Sporenbildner wurden in allen vier Proben gar nicht (Probe 2) oder nur sehr wenige isoliert.

Die Unterschiede, die bereits auf Ebene der taxonomischen Großgruppen festgestellt wurden, setzten sich auf Gattungsebene weiter fort. Dies galt sowohl innerhalb der Proben der beiden Betriebe als auch zwischen den beiden Betrieben. Gerade einmal 15 Gattungen konnten in allen vier Proben gemeinsam nachgewiesen werden. Dies waren insbesondere jene Gattungen, die zu den zehn häufigsten Gattungen zählten, darunter etwa *Aerococcus*, *Brachybacterium*, *Chryseobacterium* und *Streptococcus*. Das prozentuale Vorkommen unterschied sich jedoch teilweise recht deutlich, bis hin zu extren Unterschieden wie etwa bei der Gattung *Staphylococcus*. Die Gattung *Corynebacterium* konnte auf jeweils beiden Betrieben und Proben häufig detektiert werden, insbesondere die Art *Corynebacterium xerosis/freneyi* wurde in allen vier Proben häufig nachgewiesen. Jeweils drei Gattungen wurden exklusiv in beiden Proben eines Betriebes nachgewiesen. *Georgenia*, *Isoptericola* und *Jeotgalibaca* auf Betrieb 4, sowie *Bosea*, *Shinella* und eine potentiell neue Gattung, die am ähnlichsten zu *Sphingobacterium* war auf Betrieb 6. Erstaunlich war die beachtliche Anzahl an potentiell neuen Arten (siehe Tabelle 22), die zwischen 21 und 28 je Probe betrug. Trotz vieler Unterschiede konnten aber auch Gemeinsamkeiten aufgezeigt werden. Wie Abbildung 18 zeigt, gab es einen Trend in der Verteilung der zehn häufigsten Gattungen.

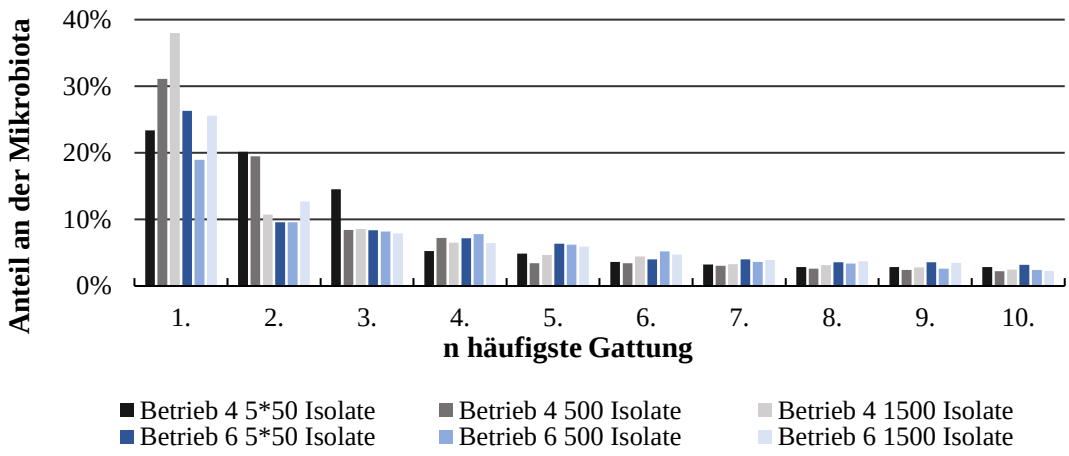


Abbildung 18 Prozentualer Anteil der zehn häufigsten Gattungen an der Mikrobiota für alle drei Stichprobengrößen für Betrieb 4 und 6. n: Häufigkeit der Gattung.

Die beiden häufigsten Gattungen repräsentierten allein um die 40% aller Isolate, wobei die häufigste Gattung durchschnittlich einen Anteil von 27% hatte. Die dritt Häufigste machte noch durchschnittlich 10% aller Isolate aus. Die Schwankungen im Anteil der drei häufigsten Gattungen waren teilweise recht groß. Jedoch wurden ab der viert häufigsten Gattung diese Unterschiede immer kleiner unabhängig von der Stichprobengröße und dem Betrieb (siehe im Anhang Abbildung 2). Der Anteil ab der sechst häufigsten Gattung sank auf unter 5%. Würde man die Verteilung anhand einer Kurve darstellen, so würde sich diese immer mehr den 2% annähern. Diese Verteilung ist letzendlich für eine weitere Beobachtung verantwortlich. Unabhängig der Stichprobengröße wurden nur wenige Gattungen von einem Großteil der Isolate repräsentiert. Gleiches galt auf Artebene. Dies konnte insbesondere für Betrieb 4 gezeigt werden. Je 90% der Isolate der beiden Proben von Betrieb 4 wurden von 14 bzw. 16 Gattungen, die eine Häufigkeit von ≥ 1% hatten, repräsentiert. Auf Artebene machten 22 Arten (je ≥ 1%) mehr als 80% der Isolate aus. Auch auf Betrieb 6 konnte diese Beobachtung gemacht werden, wenn auch nicht mit einer solchen Deutlichkeit wie auf Betrieb 4 (siehe Tabelle 22).

Neben der Erfassung der Biodiversität der beiden Betriebe, galt es auch herauszufinden, ob es mittels eines kulturabhängigen Ansatzes möglich ist, die Gesamtheit der Biodiversität nahezu gänzlich zu erfassen. Um die Biodiversität der Proben objektiv vergleichen zu können, wurden die beiden Biodiversitätsindezies Shannon Index und Simpson Index berechnet (siehe Tabelle 22). Der Shannon Index ist ein Maß für die Vielfältigkeit in einer Probe. Für die Berechnung des Shannon Index werden Anzahl der Isolate und Anzahl der Spezies herangezogen. Der Simpson Index hingegen gibt die Wahrscheinlichkeit an, dass zwei zufällig ausgewählte Isolate nicht der gleichen Spezies angehören. Je größer die Biodiversität einer Probe ist, desto mehr nähert sich der Wert des Simpson Index an die Zahl 1 an. Obwohl aus den beiden Proben 1 und 2 eine beachtliche Anzahl an Gattungen und Arten isoliert werden konnte, zeigen sowohl die Rarefaction- Analyse (Abbildung 19) als auch der Simpson Index (Tabelle 22), dass in beiden Proben die erwartete Biodiversität noch nicht ausreichend abgedeckt wurde. Bei der Rarefaction-Analyse ist die Plateau-Phase bei beiden Proben nicht erreicht und der Simpson Index beträgt 0,94 bzw. 0,96.

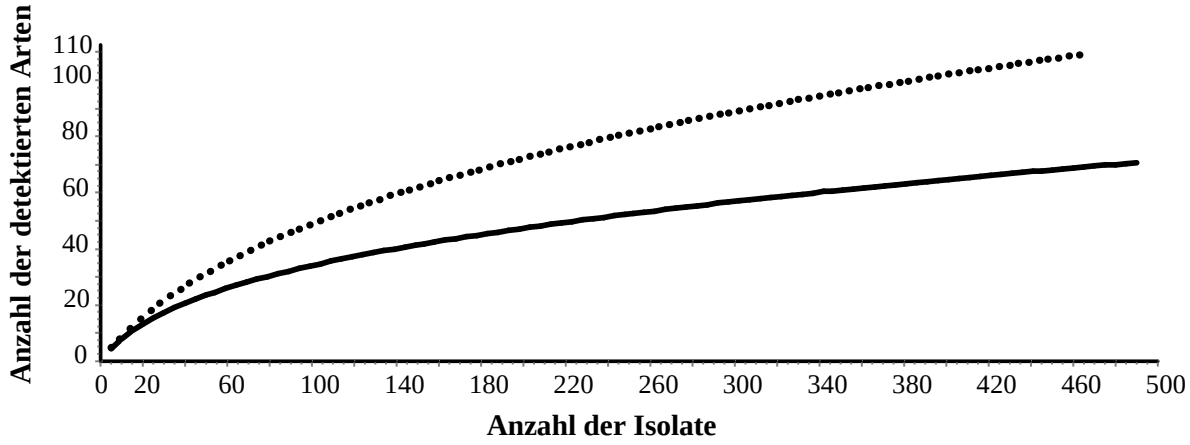


Abbildung 19 Rarefaction-Analyse für die Analyse der Rohmilchmikrobiota mit einer Stichprobengröße von 500 Isolate für die Betriebe 4 (gestrichelte Linie) und 6 (gepunktete Linie).

Mit der Erhöhung der Stichprobengröße auf 1500 Isolate ging die Erwartung einher, die Biodiversität der beiden Betriebe noch präziser erfassen zu können. Dies galt insbesondere für den Betrieb 6. Doch erstaunlicherweise war der Shannon Index für Probe 2 (3,996) größer als für Probe 4 (3,696). Gleiches galt auch für den Simpson Index (0,96 vs. 0,95). Probe 2 war damit diverser als Probe 4, obwohl die Anzahl bakterieller Isolate in Probe 4 verdoppelt wurde. Eine Begründung hierfür könnte sein, dass durch die hohe Anzahl an Hefen die Biodiversität allgemein gesenkt wurde. Ein Vergleich der Proben 2 und 4 ist daher nur eingeschränkt möglich. Ein hoher Anteil an Hefen ist ein Indiz für Probleme mit der Reinigung der Melkanlage. Auf Betrieb 4 hingegen konnte die detektierte Biodiversität erhöht werden, wenn auch der Simpson Index der Proben 1 und 3 identisch war. Der Shannon Index legt jedoch dar, dass Probe 3 vielfältiger war als Probe 1. Die Rarefaction-Analyse von Probe 1 zeigte zwar, dass die Biodiversität noch nicht vollständig erfasst wurde, da die Plateau-Phase nicht erreicht wurde. Die Kurve war jedoch flacher als die von Probe 2. Nichts desto trotz hätte man bei einer Verdreifachung der Stichprobengröße erwartet, eine noch größere Biodiversität zu erfassen.

Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass es trotz einer großen Stichprobengröße von 500 bzw. 1500 Isolaten nicht möglich ist, die Biodiversität in ihrer Gesamtheit vollends zu erfassen. Insbesondere Gattungen bzw. Arten, die nur einen sehr kleinen Anteil an der Mikrobiota haben, können nicht alle erfasst werden. Desweiteren ist es mit den gewählten Kultivierungsbedingungen nicht möglich, alle Mikroorganismen zu erfassen. Beispielsweise strikt anaerobe Bakterien oder Bakterien mit speziellen Nährstoffanforderungen.

3.2.2 Erfassung der Biodiversität mittels Illumina Sequenzierung

Weiter war es Ziel dieser Dissertation zu zeigen, in wie weit mittels eines kulturunabhängigen Ansatzes die Biodiversität der Milchproben 3 und 4 gegenüber der kulturabhängig, erfassten Biodiversität gesteigert werden kann. Hierfür wurde die Illumina Sequenzierung verwendet. Bei dieser PCR-basierte Hochdurchsatzmethodik können unerwünschte Artefakte auftreten, welche auf ein Minimum reduziert werden sollten.

3.2.2.1 Reproduzierbarkeit der Methodik

Zunächst sollte die Reproduzierbarkeit der Methodik analysiert werden, um einschätzen zu können, welchen Einfluss die Probenvorbereitung auf die ermittelte Biodiversität haben kann. Die Reproduzierbarkeit spielt insbesondere bei Proben mit einer geringen Gesamtkeimzahl eine große Rolle und ist entscheidend, um die Ergebnisse später miteinander vergleichen zu können. Für beide Betriebe wurden mehrere, unabhängige Sequenzier-Bibliotheken mittels einer 2-Step PCR generiert. Für den 1. Step wurden verschiedene Protokolle verwendet, die sich in der Menge an eingesetzter DNA und in der Zyklenzahl unterschieden. Um schließlich ausreichend viel PCR Produkt in die Sequenzierung einsetzten zu können, wurden im 2. Step mehrere (6-10) PCR-Ansätze parallel durchgeführt und anschließend zusammen gepoolt. So ergaben sich für Betrieb 4 drei und für Betrieb 6 sechs unabhängige Teilproben. Die Anzahl der Reads pro Teilprobe kann Tabelle 23 entnommen werden. Die Anzahl der Reads variierte innerhalb der Teilproben von Betrieb 4 zwischen 7462 und 11590 Reads bzw. für Betrieb 6 zwischen 5044 und 10684 Reads, obwohl die eingesetzte Menge an PCR Produkt für jede Teilprobe 2 nM betrug.

Tabelle 23 Anzahl der Reads pro Teilprobe und gesamt für Betrieb 4 und 6.

	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**gesamt**
Betrieb 4	11590	10958	7462	-	-	-	29950
Betrieb 6	10348	10684	10340	10237	5044	5526	52155

Trotz der Unterschiede in der Probenvorbereitung und der Anzahl der Reads, war die Reproduzierbarkeit der Proben sehr gut, wie man der Abbildung 20 entnehmen kann. Sie zeigt die Zuordnung der OTUs auf Gattungsebene für alle Teilproben. Vergleicht man die Teilproben beider Betriebe so sind die Unterschiede zwischen den beiden Betrieben deutlich zu erkennen, die Teilproben eines Betriebes zu einander jedoch recht identisch.

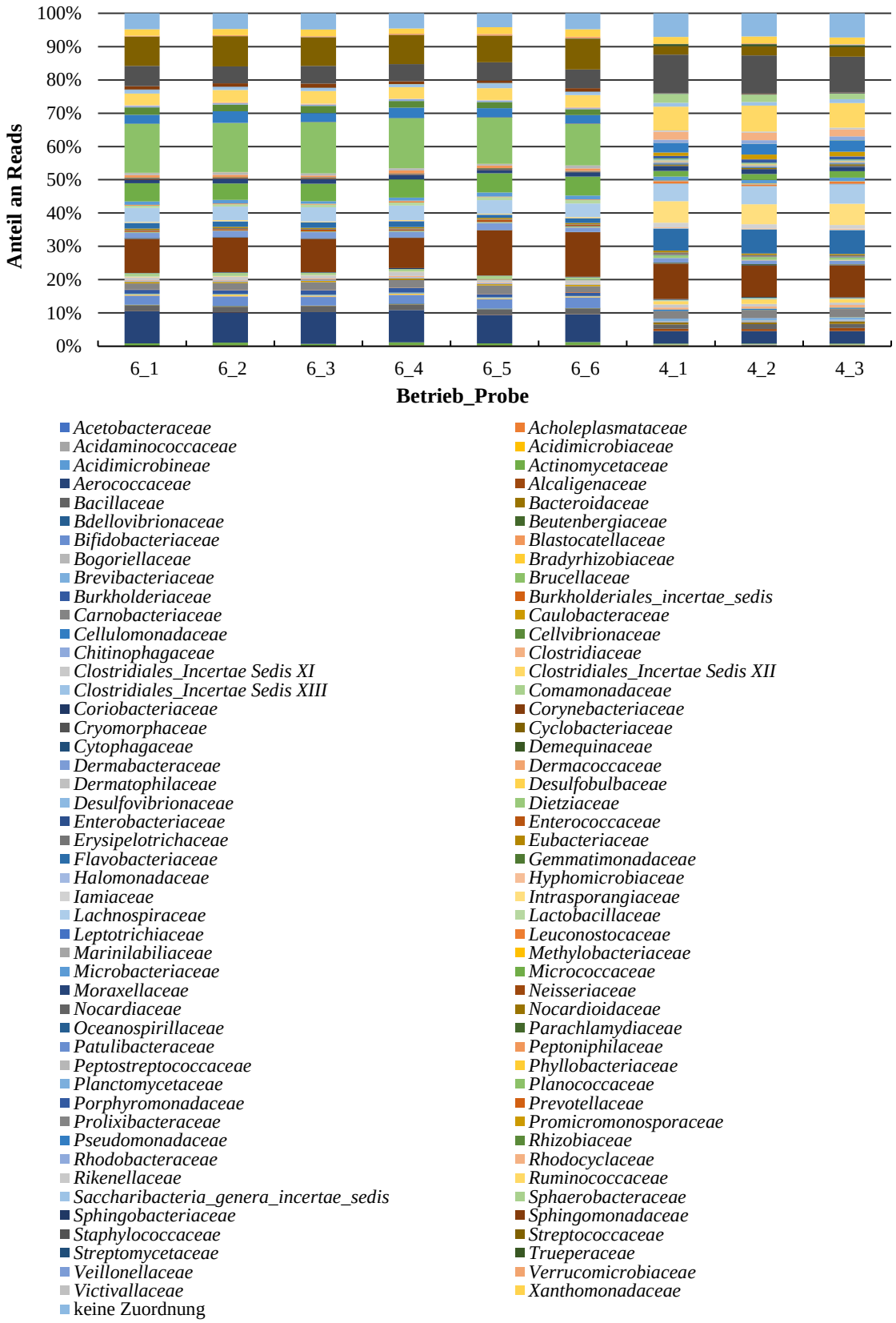


Abbildung 20 Prozentuale Verteilung der Reads auf Ebene taxonomischer Gattungen für jede Probe von Betrieb 4 und Betrieb 6.

Ein weiteres Indiz für die gute Reproduzierbarkeit der Methodik liefert der Multidimensionale Skalierungs (MDS) Plot in Abbildung 21. Je weiter die Punkte in einem MDS Plot voneinander entfernt sind, desto unähnlicher sind diese. Der Abstand zwischen den Teilproben eines Betriebes war kleiner als der Abstand zwischen den zwei Proben. Die Varianz zwischen den Teilproben eines Betriebes war gering, wenn auch zwei Proben von Betrieb 6 weiter weg waren.

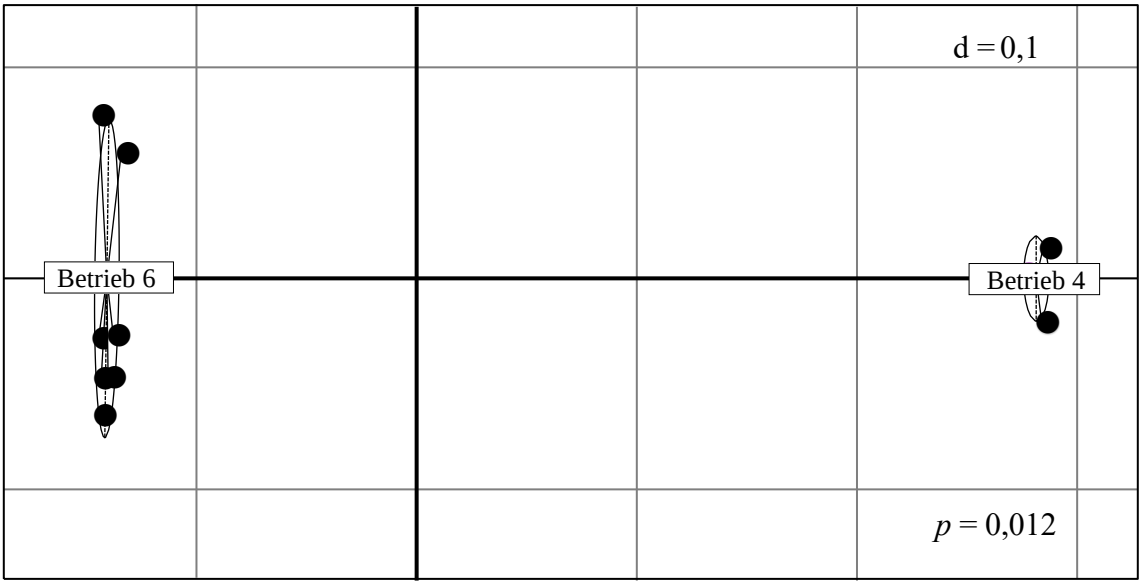


Abbildung 21 Multidimensionale Skalierungs (MDS) Plot für die Teilproben beider Betriebe mittels NGS Methodik, berechnet aus der generalisierten UniFrac-Unähnlichkeitsmatrix. Beide Gruppen unterscheiden sich signifikant ($p < 0,05$).

Aufgrund der sehr guten Reproduzierbarkeit wurden die jeweiligen Teilproben der beiden Betriebe zusammengefasst. Die Auswertung und der Vergleich der erfassten Biodiversität der beiden Betriebe im Nachfolgenden beruht auf dieser Zusammenfassung der einzelnen Teilproben.

3.2.2.2 Erfasste Biodiversität von Betrieb 4 und 6

Fasst man alle Teilproben von Betrieb 4 zusammen, wurden insgesamt 29950 Reads generiert, die sich auf 555 OTUs verteilten. Für Betrieb 6 waren es hingegen 52155 Reads, die sich auf 552 OTUs verteilten. Die Verteilung der Reads auf die einzelnen Phyla zeigt Abbildung 22.

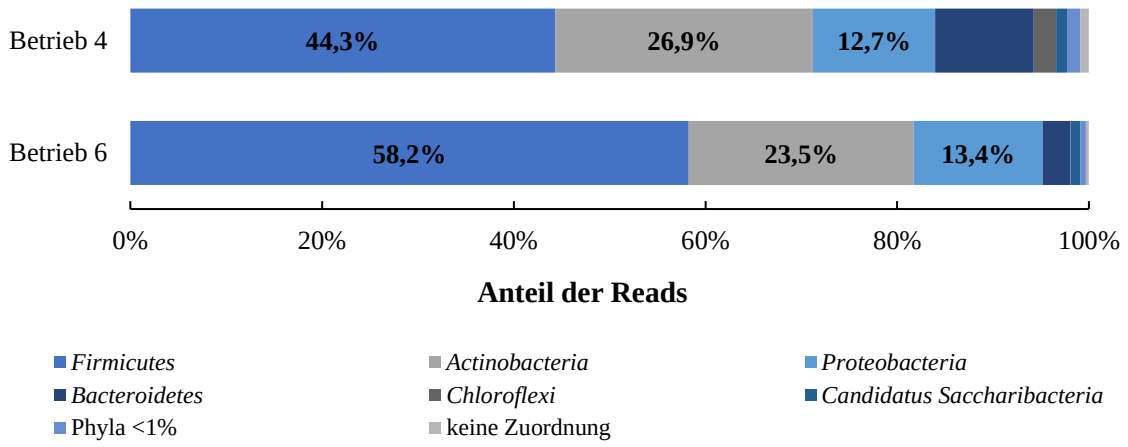


Abbildung 22 Prozentuale Verteilung aller generiert Reads von Betrieb 4 und 6 auf Ebene taxonomischer Phyla.

Der größte Anteil der Reads gehörten dem Phylum der *Firmicutes* an. Auf Betrieb 4 wurden 44,3% der Reads von diesem Phylum repräsentiert. Auf Betrieb 6 waren es über die Hälfte aller Reads (58,2%). Jeweils ein knappes Viertel der Reads entfielen bei beiden Höfen auf die *Actinobacteria* und knappe 13% gehörten den *Proteobacteria* an. In der Rohmilchprobe von Betrieb 4 wurden weitere 10% der Reads den *Bacteroidetes* zugeordnet. Auf Ordnungsebene wurden allein 24,9% der Reads von der Ordnung *Actinomycetales* repräsentiert. *Clostridiales* (19,5%), *Bacillales* (12,9%) und *Lactobacillales* (9,6%) waren die weiteren dominierenden Ordnungen. 7,1% der Reads gehörten zu *Flavobacteriales* und 4,5% zu *Pseudomonadales*. Eine andere Zusammensetzung hatte dagegen die Rohmilchprobe von Betrieb 6. *Lactobacillales*, *Bacillales* und *Actinomycetales* waren die drei häufigsten Ordnungen. Sie waren etwa gleich stark vertreten und machten zusammen 64% aller Reads aus. Weitere 12,3% gehörten den *Clostridiales* an und 4,2% den *Pseudomonadales*. Alle anderen Ordnungen hatten auf beiden Höfen eine Häufigkeit < 3%.

78,8% der Sequenzen von Betrieb 4 konnten einer von insgesamt 162 Gattungen zugeordnet werden, bei weiteren 14% war eine Zuordnung auf Familienebene möglich. Insgesamt konnten 86 Familien nachgewiesen werden. 23 Familien hatten eine Häufigkeit ≥ 1% und machten 78,5% aller Reads aus. Die mit der Hautoberfläche und der Luft assoziierten Familien *Staphylococcaceae* (11,3%) und *Corynebacteriaceae* (9,9%) wurden am häufigsten nachgewiesen, gefolgt von *Lachnospiraceae* (7,5%). Hingegen wurden 166 Gattungen aus 84 Familien in der Probe von Betrieb 6 nachgewiesen. Zusammen waren sie für 95,3% der Reads verantwortlich. 82,1% der Reads wurden von jenen 19 Familien repräsentiert, die eine

Häufigkeit von ≥ 1% hatten. Anders als auf Betrieb 4 war am häufigsten die Familie der *Planococcaceae* vertreten. Sie machte 14,6% der Reads aus, auf Betrieb 4 jedoch nur 0,3%. Identisch war jedoch die am zweit häufigsten nachgewiesene Familie, die *Corynebacteriaceae* mit 10,7%. Mit 9,3% aller Reads wurde die Familie der *Aerococcaceae* detektiert, welche auf Betrieb 4 nur 3,8% der Reads ausmachte. Dagegen betrug der Anteil der *Staphylococcaceae* nur 5,5%. Deutliche Unterschiede zwischen den beiden Betrieben gab es zudem noch im Vorkommen der Familien *Flavobacteriaceae*, *Intrasporangiaceae* und *Ruminococcaceae*. Diese hatten auf Betrieb 4 eine Häufigkeit zwischen 6,3% und 7,5%. Ihr Anteil auf Betrieb 6 betrug jedoch nur zwischen 0,25% und 3,6%. Genau konträr verhielt es sich bei den Familien der *Micrococcaceae* sowie *Streptococcaceae*. Sie repräsentierten 5,4% bzw. 8,8% der Reads in der Probe von Betrieb 6 und nur 1,7% bzw. 2,8% auf Betrieb 4. Eine Gegenüberstellung der Häufigkeit auf der Ebene der Familien kann der Tabelle 24 entnommen werden. Da es bereits auf der Ebene der Familien teilweise deutliche Unterschiede gab, ist es wenig verwunderlich, dass sich die beiden Proben auch auf Gattungsebene deutlich unterschieden. So wurde in der Probe von Betrieb 4 am häufigsten *Corynebacterium* (9,9%) nachgewiesen, gefolgt von *Staphylococcus* mit 8,9% und *Chryseobacterium* mit knappen 6%. Die häufigste Gattung auf Betrieb 6 war *Caryophanon*, ein Gram-positives Bakterium, welches häufig in Rinderkot vorkommt und 14,5% der Reads repräsentierte. Deneben wurden *Corynebacterium* (10,7%) und *Streptococcus* (8,5%) am häufigsten detektiert.

3.2.3 Vergleich der kulturabhängigen und -unabhängigen Analysen

Nimmt man die Anzahl der nachgewiesenen Familien als Maß für die erfasste Biodiversität, so zeigt der Vergleich der beiden Analysemethoden (kulturabhängig vs. kulturunabhängig), dass mit Hilfe der kulturunabhängigen Methode eine deutlich größere Biodiversität erfasst wurde. Mehr als das 2,5-fache an Familien konnte in der Probe von Betrieb 4 mittels NGS Methodik detektiert werden. In der Probe von Betrieb 6 war es immerhin das Doppelte.

Tabelle 24 Auszug aus dem Vergleich des prozentualen Vorkommens auf Ebene taxonomischer Familien erfasst mittels kulturabhängiger (1500 Isolate) bzw. -unabhängiger Methode für die Betrieb 4 und 6.
Aufgeführt sind jene Familien, die in mindesten einer Probe eine Häufigkeit von > 1% hatten (fett markiert) bzw. nur mit der kulturabhängigen Methode nachgewiesen wurden (kursiv); die vollständige Tabelle kann im Anhang Tabelle 5 entnommen werden.

	Betrieb 4		**Betrieb 6**	
	Kultur-unabhängig	**Kultur-abhängig**	**Kultur-unabhängig**	**Kultur-abhängig**
Acetobacteraceae			0,100%	**1,089%**
Aerococcaceae	**3,793%**	**2,983%**	**9,278%**	**6,897%**
Bacillaceae	**1,339%**		**1,664%**	**1,361%**
Bifidobacteriaceae	0,180%		**2,726%**	0,272%
Brevibacteriaceae	0,708%	**2,441%**	0,240%	0,363%
Burkholderiaceae	0,030%		**1,168%**	
Carnobacteriaceae	**2,357%**	0,068%	**2,182%**	
Caulobacteraceae	0,027%	0,203%	0,431%	**1,270%**
Clostridiales_Incertae Sedis XII	**1,155%**		0,144%	
Comamonadaceae	0,260%	0,339%	0,830%	**1,180%**
Corynebacteriaceae	**9,883%**	**8,542%**	**10,672%**	**12,886%**
Dermabacteraceae	**1,205%**	**3,119%**	**1,718%**	**1,996%**
Dietziaceae	0,835%	**1,559%**	0,163%	
Enterococcaceae	0,117%	0,746%	0,452%	**1,180%**
Flavobacteriaceae	**6,928%**	0,203%	**1,588%**	**3,630%**
Iamiaceae	**1,232%**		0,019%	
Intrasporangiaceae	**6,270%**	**3,390%**	0,253%	0,091%
Jonesiaceae		*0,339%*		
Lachnospiraceae	**5,439%**		**4,201%**	
Lactobacillaceae	0,040%	0,407%	0,830%	**1,089%**
Leuconostocaceae	0,588%	**1,627%**	0,245%	
Microbacteriaceae	**1,142%**	**11,593%**	0,987%	**31,670%**
Micrococcaceae	**1,746%**	**1,017%**	**5,374%**	**4,900%**
Moraxellaceae	**1,366%**	*0,203%*	**1,283%**	0,544%
Morganellaceae		*0,068%*		
Mycobacteriaceae				*0,363%*
Nocardiaceae	0,260%	**6,780%**	0,224%	0,272%
Nocardioidaceae	0,337%	0,068%	0,048%	**1,452%**
Paenibacillaceae		*0,068%*		*0,272%*
Planococcaceae	0,270%		**14,599%**	0,181%
Promicromonosporaceae	**1,219%**	**1,831%**	0,006%	0,091%
Propionibacteriaceae		*0,949%*		*0,544%*
Pseudomonadaceae	**3,085%**	0,271%	**2,899%**	**1,180%**
Rhizobiaceae	0,060%		**2,027%**	**4,809%**

Fortsetzung Tabelle 24

	Betrieb 4		Betrieb 6	
	Kultur-unabhängig	**Kultur-abhängig**	**Kultur-unabhängig**	**Kultur-abhängig**
Rhodobacteraceae	**1,052%**	0,068%	0,420%	0,091%
Rhodocyclaceae	**2,247%**		0,176%	
Ruminococcaceae	**7,479%**		**3,595%**	
Saccharibacteria_genera_incertae_sedis	**1,129%**		**1,033%**	
Sphaerobacteraceae	**2,257%**		0,017%	
Staphylococcaceae	**11,339%**	**37,966%**	**5,451%**	**2,722%**
Streptococcaceae	**2,755%**	**6,441%**	**8,787%**	**6,171%**
Tsukamurellaceae				*0,091%*
Xanthomonadaceae	**2,050%**	**4,407%**	**1,896%**	**7,985%**

Wie Tabelle 24 zu entnehmen ist, gab es einige Familien, die nur mittels der kulturunabhängigen Methode nachgewiesen werden konnten. Darunter auch die beiden häufig vertretenen Familien *Lachnospiraceae* und *Ruminococcaceae*. Beide haben ihren Ursprung im Magen-Darm-Trakt und wachsen nur unter anaeroben Bedingungen. Dieser Tatsache ist es wohl auch geschuldet, dass sie kulturell nicht nachgewiesen werden konnten. Aber auch weniger häufig detektierte Familien wie *Burkholderiaceae*, *Iamiaceae*, *Rhodocyclaceae* und *Sphaerobacteraceae*, sowie zwei Familien, deren taxonomische Einteilung noch ungeklärt ist, konnten nur mittels NGS Methodik detektiert werden.

Es gab aber auch sechs Familien, die nur kulturell detektiert wurden. Dies waren die Familien *Jonesiaceae* und *Morganellaceae* in der Probe von Betrieb 4 und die Familien *Mycobacteriaceae* und *Tsukamurellaceae* in der Probe von Betrieb 6, sowie auf beiden Betrieben *Paenibacillaceae* und *Propionibacteriaceae*. Der Anteil dieser sechs Familien an der Gesamtisolatzahl war jedoch teilweise sehr gering. Alle hatten einen Anteil von weniger als 1%.

Die Familie der *Microbacteriaceae* konnte zwar mit beiden Methoden nachgewiesen werden, spielte jedoch kulturell eine viele größere Rolle. Auf Betrieb 6 repräsentierte diese ein Drittel aller Isolate und auf Betrieb 4 immerhin jedes Zehnte. Der Anteil an den Reads betrug hingegen nur um die 1%. Ähnliches, wenn auch nicht so ausgeprägt, konnte auch für die Familie der *Xanthomonadaceae* auf Betrieb 6 und für die Familien der *Nocardiaceae* auf Betrieb 4 beobachtet werden. Auch diese Familien wurden kulturell deutlich häufiger detektiert. Es gab aber auch Familien, die auf dem einen Betrieb kulturell häufiger vorkamen, auf dem anderen Betrieb jedoch mittel NGS Analytik häufiger nachgewiesen wurden. Als Beispiel kann hier die Familie der *Staphylococcaceae* genannt werden. Kulturell machte sie 38% der Isolate von

Betrieb 4 aus, repräsentierte jedoch nur 11,3% der Reads. Auf Betrieb 6 verhielt es sich genau konträr, wenn auch bei Weitem nicht so ausgeprägt. Kulturell war der Anteil mit 2,7% geringer als mittels NGS Methodik (5,5%). Auch das Vorkommen der *Flavobacteriaceae* und der *Streptococcaceae* war auf den beiden Betrieben konträr. *Flavobacteriaceae* wurden in der Probe von Betrieb 4 mittels kulturunabhängiger Methode häufiger nachgewiesen, hingegen *Streptococcaceae* kulturell häufiger. Auf Betrieb 6 war es jeweils umgekehrt. Daneben gab es Familien, die mit beiden Methoden etwa gleich häufig in den jeweiligen Proben des Betriebes detektiert wurden, wie die Familien der *Aerococcaceae*, *Dermabacteraceae*, *Corynebacteriaceae* und *Micrococcaceae*.

Der Versuch zeigte aber auch, dass es einen Unterschied zwischen den beiden Methoden in Bezug auf die Dominanz einzelner Familien gab. Kulturell waren es 14 bzw.18 Familien, die eine Häufigkeit ≥ 1% hatten und etwa 94% der Isolate ausmachten. Im Vergleich repräsentierten jene 23 bzw. 20 häufigsten Familien 79,5 bzw. 85% der Reads. Gleiches galt auch auf Gattungsebene. Somit war mittels NGS Analytik eine Dominanz einzelner Gattungen, wie es sich im Fall der kulturabhängigen Analyse zeigte, nicht erkennbar. Unterschiede gab es auch bezüglich der detektierten Biodiversität. Neben der Anzahl an detektieren Familien und Gattung pro Probe, der Anzahl gemeinsam detektiereter Familien und Gattungen pro Betrieb, sind auch diverse Biodiversitätsindizies in Tabelle 25 aufgelistet.

Tabelle 25 Statistischer Vergleich der kulturabhängigen bzw. -unabhängigen Analyse für die Probe von Betrieb 4 und 6.

	Betrieb 4		**Betrieb 6**	
	Kultur-unabhängig	**Kultur-abhängig**	**Kultur-unabhängig**	**Kultur-abhängig**
bakterielle Reads bzw. Isolate	29950	1475	52155	1102
Anzahl OTUs bzw. Arten	555	112	552	125
Anzahl detektierte Familien [% der Reads bzw. Isolate]	86 (92,9)	32 (98,2)	84 (95,3)	40 (99,6)
Anzahl gemeinsam detektierter Familien	28		36	
Anzahl Familien mit Häufigkeit ≥ 1% [% der Reads bzw. Isolate]	23 (78,5)	14 (93,7)	19 (82,1)	18 (93,5)
Anzahl detektierte Gattungen [% der Reads]	162 (78,8)	47	166 (87,7)	60
Anzahl gemeinsam detektierter Gattungen	34		46	
Shannon Index	5,78	3,47	4,55	3,70
Simpson Index	0,999	0,94	0,999	0,95
Chao 1 Index	577	156	590	177

Je näher sich der Simpson Index der Zahl 1 nähert, desto größer ist die erfasste Biodiversität. Mittels kulturunabhängiger Analyse wurde demnach die Gesamtheit der Biodiversität nahezu vollständig erfasst, da der Simpson Index mit 0,999 angegeben ist. Dass die Biodiversität noch nicht vollständig erfasst wurde, zeigt der Vergleich des Chao 1 Index, er gibt die Anzahl an erwarteten OTUs an, mit der Anzahl tatsächlich detektierter OTUs. Im Vergleich mit dem Shannon Index der kulturabhängigen Analyse sieht man jedoch, dass mittels NGS Analytik eine deutlich größere Biodiversität nachgewiesen wurde. Erst die Kombination beider Methoden ermöglicht es, die Biodiversität der Rohmilch in ihrer Gänze darzustellen. Beide Methoden haben methodische Schwächen, die in Kombination der beiden Methoden jeweils von der anderen abgefangen werden.

3.3 Beschreibung einer potentiell neuen Gattung

Bei der Analyse der beiden Betriebe 4 und 6 mit einer Stichprobengröße von 500 Isolaten wurden, wie bereits unter 3.2.1 beschrieben, eine beachtliche Anzahl an potentiell neuer Arten und Gattungen identifiziert. Der Abgleich der fast vollständigen Sequenzlänge des 16S rDNA Gens von 43 dieser Isolate ergab keine Übereinstimmung mit bis dato beschriebenen Bakterienarten (Übereinstimmung der Sequenz < 98,65%). Darunter wurde auch eine potentiell neue Gattung gefunden (Übereinstimmung der Sequenz < 95%). Diese wurden von drei Isolaten

(WS 4900, 4901 und 4902) vertreten. Am Lehrstuhl für mikrobielle Ökologie der TU München wurden zudem noch weitere Stämme mit unterschiedlicher Herkunft isoliert, die eine Übereinstimmung in ihrer partiellen 16S rRNA Sequenz zu den Stämmen WS 4900, 4901 und 4902 hatten. Stamm WS 4684 wurde im Jahr 2003 aus einem Milchprodukt und Stamm WS 4904 im Jahr 2007 aus unverarbeiteter Magermilch isoliert. In der Rohmilch eines anderen Hofes wurde im Jahr 2011 Stamm WS 4769 detektiert und die Stämme WS 4882 und 4883 wurden im Jahr 2013 nochmals auf Betrieb 6 nachgewiesen. Die Charakterisierung dieser und der anderen genannten Isolate wird nachfolgend beschrieben.

3.3.1 Phylogenetische Einordnung

Zunächst wurde die fast vollständige Sequenz des 16S rDNA Gens aller acht Stämme der potentiell neuen Gattung ermittelt. Diese ist mit der Ausnahme, dass der Stamm WS 4904 einen Nukleotidunterschied aufweist, identisch. Der Stamm WS 4900 wurden als Typstämme definiert. Der Datenbankabgleich der Typstammsequenz mit der EzBioCloud Datenbank ergab, dass die Stämme phylogenetisch am engsten mit der Familie *Propionibacteriaceae* verwandt sind. Die EzBioCloud Datenbank enthält viele Sequenzen von unkultivierten Stämmen, darunter auch die drei ähnlichsten Sequenzen zu WS 4900^T mit Ähnlichkeiten von 98,9, 97,3 und 96,3%. Der erste Treffer einer Nomenklaturart ist *Propioniciclava tarda* WR061^T mit 93,5% Ähnlichkeit, gefolgt von *Tessaracoccus lapidicaptus* IPBSL-7^T mit 92,9% Ähnlichkeit. Alle anderen Gattungen der Familie *Propionibacteriaceae* sind noch entfernter verwandt. Dies kann auch dem phylogenetischen Baum in Abbildung 23 entnommen werden. Die acht Stämme bilden eine eigne eindeutige Gruppe mit einem hohen Bootstrap-Wert von 99% innerhalb des Clusters mit den drei unkultivierten Bakterienklonen und *Propioniciclava tarda* WR061^T, die etwas entfernter verwandt sind. Die Typenstämme aller anderen bekannten Gattungen sind getrennt von diesem Cluster gruppiert.

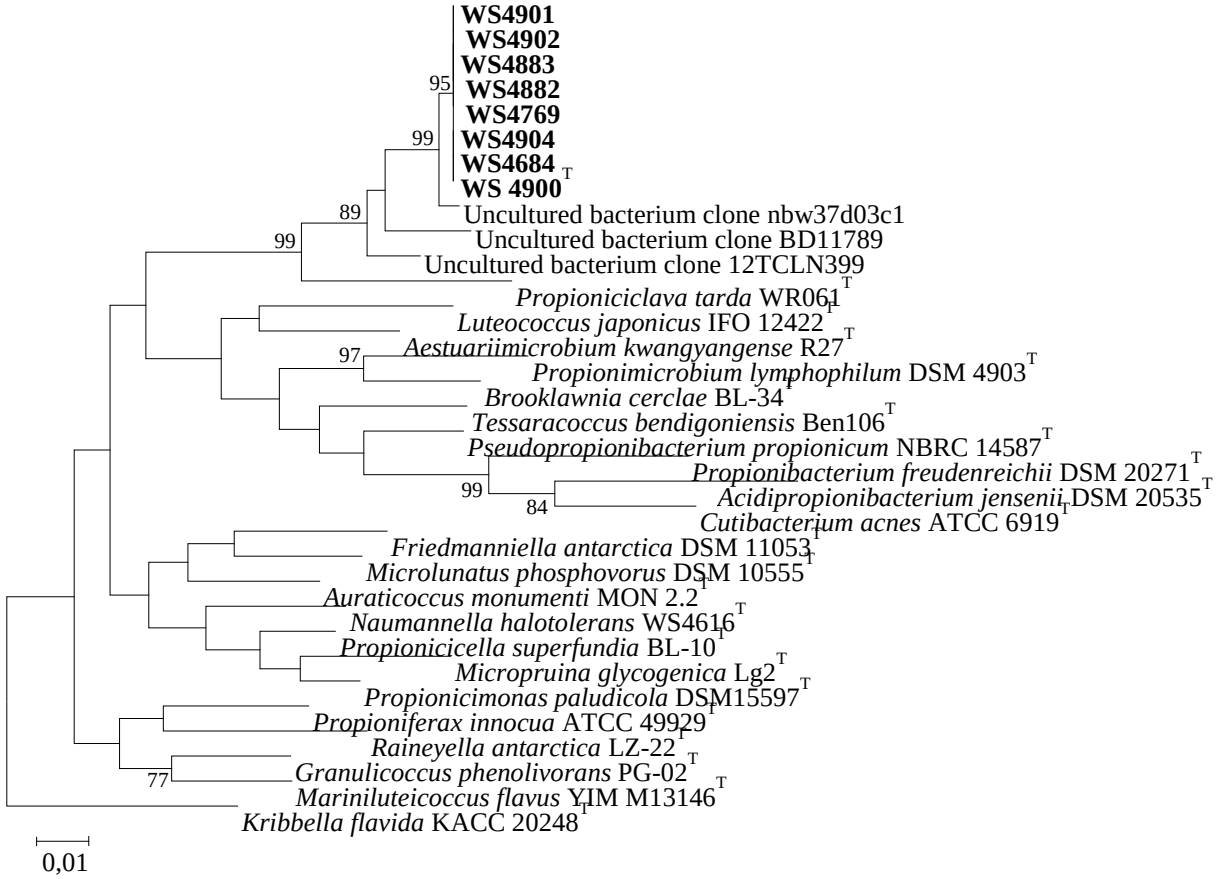


Abbildung 23 Maximum-Likelihood-Baum, basierend auf der fast vollständigen 16S rRNA Sequenz zur phylogenetischen Einordnung der acht gen. nov., sp. nov. Stämme und der Typstämme aller Gattungen der Familie *Propionibacteriaceae* sowie drei ähnlichsten Sequenzen zu WS 4900^T. Outgroup: *Kribbella flavida*; Bootstrap-Werte > 50% bei 1000 Replikationen werden in Prozent an den entsprechenden, internen Knoten angegeben. Balken: 0,01 Substitutionen je Nukleotidposition.

3.3.2 Phänotypische Charakterisierung

Zur genaueren Charakterisierung der potentiell neuen Gattung wurden die morphologischen Merkmale von WS 4900^T erfasst. Des Weiteren wurden die physiologischen, biochemischen und chemotaxonomischen Charakteristika des Typstammes untersucht. Für die physiologische und biochemische Untersuchung wurden zudem auch die anderen sieben Stämme (WS 4901, 4902, 4904, 4684, 4769, 4882 und 4883) herangezogen, um gleichzeitig innerartliche Diversitäten zu erfassen.

Wie Abbildung 24 zeigt, war der Typstamm WS 4900^T als pleomorphe Stäbchen im Mikroskop sichtbar, die weder beweglich waren noch Endosporen ausbildeten. Die Länge der Zellen betrug 0,8-2,2 µm und die Breite 0,4-0,9 µm. Die Kolonien erschienen auf CASO-Agar nach 48

Stunden Bebrütung bei 30 °C als matte Kolonien mit einer orangenen Pigmentierung. Die Stämme WS 4901, 4902, 4904 und 4883 waren in ihrer morphologischen Erscheinung identisch zu WS 4900^T. Die Stämme WS 4684, 4769 und 4882 unterschieden sich jedoch vom Typstamm. Ihre Kolonien waren gelblich-orange (WS 4684 und 4769) bzw. weiß (WS 4882) (siehe Abbildung 24B).

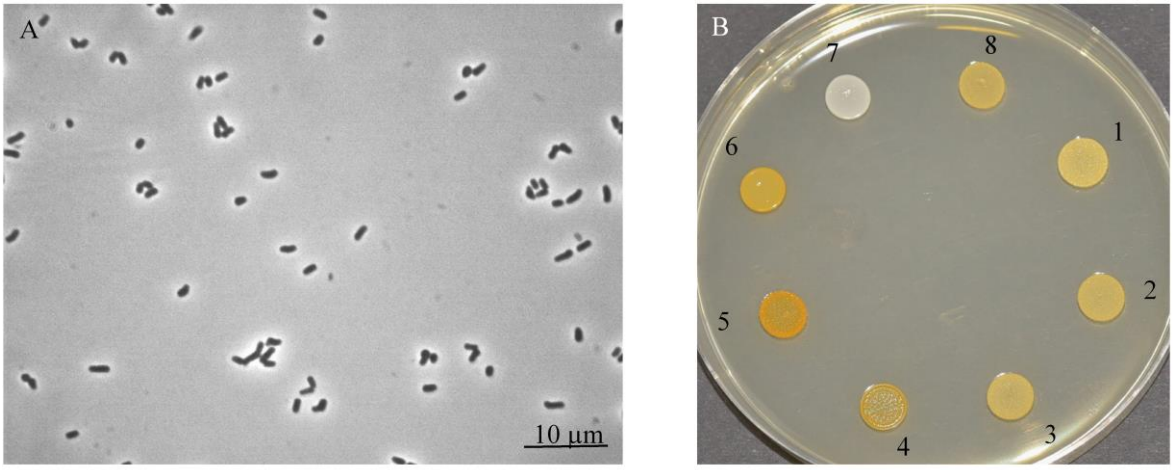


Abbildung 24 (A) Phasenkontrastbild des Stamms WS 4900^T gewachsen auf CASO-Agar bei 30 °C für 3 Tage und (B) Koloniefarbe aller acht Stämme der potentiell neuen Gattung nach Wachstum auf CASO-Agar für 4 Tage bei 30 °C; 1: WS 4900^T; 2: WS 4901; 3: WS 4902; 4: WS 4904; 5: WS 4684; 6: WS 4769; 7: WS 4882; 8: WS 4883.

WS 4900^T war Gram-positiv, Oxidase-positiv, Katalase-positiv, fakultativ anaerob und wuchs bei 6-40 °C in einem breiten pH-Bereich von 5,5-8,5 und bis zu einer NaCl-Konzentration von 5%. Er war nicht in der Lage, Casein, Stärke und Gelatine zu hydrolisieren und Nitrat zu Nitrit zu reduzieren. Der Test auf die Bildung von Indol fiel negativ aus, ebenso der Test zum Nachweis der Anwesenheit der Arginin-Dihydrolyse-Aktivität. Das Enzym ß-Galactosidase konnte jedoch gebildet werden. Untersucht wurde auch die Fähigkeit aus 47 verschiedenen Substraten Säuren zu bilden (vollständige Ergebnisaufstellung siehe im Anhang Tabelle 6). WS 4900^T konnte aus den folgenden 17 Substraten Säure bilden: Glycerol, D-Xylose, Methyl-ßD-Xylopyranose, D-Galactose, D-Glucose, D-Fructose, D-Mannose, D-Mannitol, Methyl-αD-glucopyranosid, Eisencitrat, D-Maltose, D-Lactose, D-Sucrose, D-Trehalose, D-Melezitose, D-Turanose und D-Arabitol.

Innerartliche Diversitäten konnten festgestellt werden. Nur die Hälfte der Stämme konnte Nitrat reduzieren, und einige Stämme unterschieden sich geringfügig in ihrer Toleranz gegenüber pH und NaCl sowie ihrer Wachstumstemperatur. Fünf von acht Stämmen produzierten Säure aus Ribose, vier aus Methyl-beta-D-Xylopyranose. N-Acetylglucosamin, D-Cellobiose und D-

Raffinose wurden nur von einem Stamm verwendet, wobei jedes Mal von einem andereren, wie der Tabelle 26 zu entnehmen ist.

Tabelle 26 Innerartliche Diversität unter den acht Stämmen der potentiellen neuen Gattung. Nit.-Red.: Nitrat-Reduktion; Temp.: Temperatur; MBDX: Methyl-beta-D-xylopyranose; NAG: N-Acetylglucosamin; D-Rib: D-Ribose; D-Cel: D-Cellobiose; D-Raf: D-Raffinose; 16S rDNA: Ähnlichkeit der Sequenz des 16S rDNA Gens zum Typstamm WS 4900^T; +: positiv; -: negativ.

	16S rDNA [%]	**Nit.-Red.**	**pH**	**NaCl [%]**	**Temp. [°C]**	**MBDX**	**NAG**	**D-Rib**	**D-Cel**	**D-Raf**
WS 4900^T	/	-	5,5-8,5	0-5	6-40	+	-	-	-	-
WS 4901	100	-	5,5-8,0	0-5	8-40	+	-	-	-	-
WS 4902	100	-	5,5-8,0	0-6	8-37	+	-	-	-	-
WS 4904	99,9	+	5,5-8,5	0-5	8-40	-	+	+	-	-
WS 4684	100	-	5,5-8,0	0-5	6-40	-	-	+	-	-
WS 4769	100	+	5,5-8,5	0-6	8-40	+	-	+	+	-
WS 4882	100	+	5,5-8,5	0-5	8-40	-	-	+	-	-
WS 4883	100	+	5,5-8,5	0-5	6-40	-	-	+	-	+

3.3.3 Chemotaxonomische Charakterisierung

Ein Teil der Untersuchungen für die chemotaxonomische Charakterisierung wurde bei der DSMZ durchgeführt, dabei wurde das Peptidoglycan isoliert, die Peptidoglycanstruktur untersucht und der Ganzzellzucker analysiert

Das Totalhydrolysat von Stamm WS 4900^T enthielt die Aminosäuren Alanin, Glutaminsäure und *meso*-Diaminopimelinsäure (meso-Dpm) im Verhältnis 1,5 : 1,0 : 1,0. Neben den Aminosäuren wurden zudem die Peptide L-Ala – D-Glu und *meso*-Dpm – D-Ala gefunden. Der Stamm WS 4900^T weist somit höchstwahrscheinlich A1γ *meso*-Dpm – direct als Peptidoglycantayp auf. Als Ganzzell-Zucker wurden Ribose, Rhamnose, Arabinose und Galactose gefunden.

Bei der Analyse des Fettsäurenprofils konnten 18 Bestandteilen detektiert werden, wobei die Fettsäure anteiso-$C_{15:0}$ über die Hälfte (53,6%) aller Fettsäurenanteile ausmachte, gefolgt von $C_{16:0}$ (8,5%). Mit relativ hohen Anteilen von 8,0%, 6,1% und 5,3% wurden außerdem die

Fettsäuren $C_{16:0}$ N Alkohol, $C_{17:0}$ und anteiso-$C_{17:0}$ detektiert. Alle anderen Fettsäuren hatten jeweils einen Anteil von weniger als 5%.

Das Chinon-System sowie das polare Lipidprofil wurden am Institut für Mikrobiologie der Veterinärmedizinischen Universität Wien analysiert. Das Chinon-System setzt sich aus dem Haupt-Menaquinon MK-9(H_2) (97%) und MK-8(H_2) (3%) zusammen. Im polaren Lipidprofil (Abbildung 25) wurden die Hauptverbindungen Diphosphatidylglycerol, Phosphatidylglycerol und drei unidentifizierte Glycolipide (GL1-3) nachgewiesen. Zusätzlich wurden vier kleinere nicht identifizierte Glycolipide (GL4-7) und sechs kleinere nicht identifizierte Lipide, denen eine funktionelle Gruppe fehlte, ebenfalls nachgewiesen.

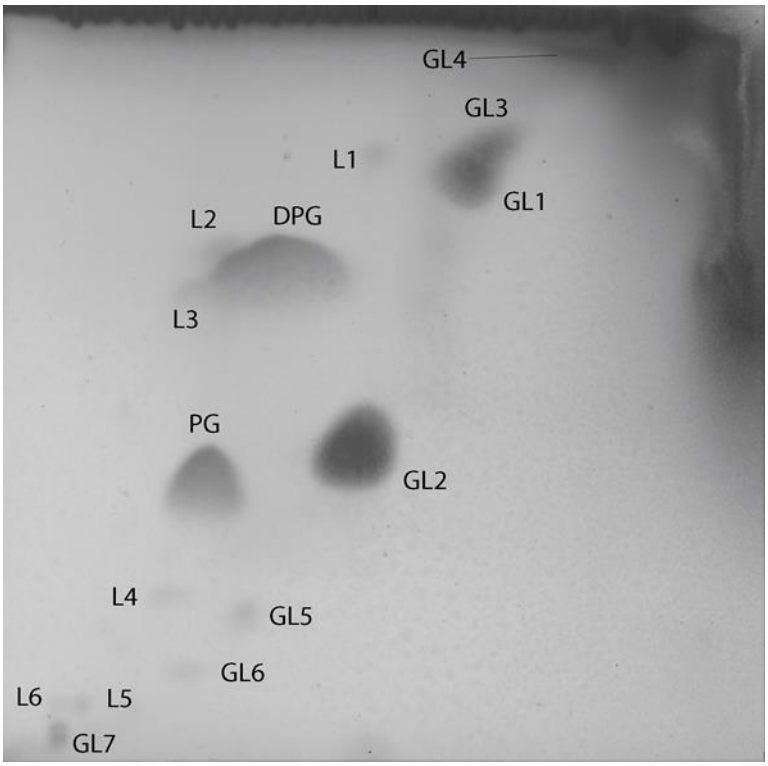


Abbildung 25 Polare Lipide des Stammes gen. nov., sp. nov. WS 4900^T, aufgetrennt mittels 2-dimensionaler Dünnschichtchromatographie. DPG: Diphosphatidylglycerol; PG: Phosphaditylglycerol; GL1-GL7: nicht identifizierte Glycolipide; L1-L6: nicht identifizierte Lipide, denen eine funktionelle Gruppe fehlt L: Lipid.

Eine Zusammenfassung der diskriminativen morphologischen, physiologischen, biochemischen, chemotaxonomischen und genetischen Merkmale des Typstammes WS 4900^T der potentiell neuen Gattung sowie der sieben Gattungen, die die höchsten 16S rRNA-Ähnlichkeiten aufweisen, sind Tabelle 27 zu entnehmen. Es zeigte sich, dass die potentiell neue Gattung sich nicht nur phylogenetisch von den Typstämmen der anderen Gattungen

unterschied, sondern es auch Unterschiede in den physiologischen und chemotaxonomischen Charakteristika gab.

Tabelle 27 Eigenschaften des Stammes WS 4900^T und der Typstämme verwandter Gattungen.
1: Stamm WS 4900^T (Daten aus dieser Studie); 2: *Propioniciclava tarda* WR061^T(Sugawara *et al*., 2011); 3: *Brooklawnia cerclae* BL-34^T (Bae *et al*., 2006a); 4: *Propionicicella superfundia* BL-10^T (Bae *et al*., 2006b); 5: *Propionicimonas paludicola* DSM 15597^T (Akasaka *et al*., 2003); 6: *Mariniluteicoccus flavus* YIM M13146^T (Zhang *et al*., 2014); 7: *Granulicoccus phenolivorans* PG-02^T (Maszenan *et al*., 2007); 8: *Tessaracoccus bendigoniensis* Ben 106^T (Maszenan *et al*., 1999). +: positiv; -: negativ; ND: keine Daten verfügbar; Stäb: Stäbchen; Kok: Kokken; FAn: fakultativ anaerob; Aer: aerob.

	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**
Zellmorphologie	Stäb	Stäb	Stäb	Stäb	Stäb	Kok	Kok	Kok
O_2 Metabolismus	FAn	FAn	FAn	FAn	FAn	Aer	FAn	FAn
Temperatur-bereich Wachstum [°C]	6 - 40	20-37	? - 40	15-37	10 - 40	5 - 40	15 - 40	15 - 37
pH-Bereich Wachstum	5,5-8,5	5,3-8	6,0-8,0	4,5-8,5	4,5-7,5	6,0-9,0	5,5,8,0	6,0-8,0
NaCl Toleranz [%]	0 - 5	0	0 - 3	0 - 4	0 - 2	0 - 6	0 - 6	0 - 3
Katalase	+	+	+	-	-	-	+	+
Oxidase	+	-	-	-	-	-	-	-
ß-Galactosidase	+	ND	-	ND	ND	+	-	+
Nitratreduktion	-	+	-	-	-	+	-	+
Hydrolyse von Stärke	-	-	-	ND	ND	ND	-	+
DNA G+C Gehalt [mol%]	67,7	69,5	67,5	69,9	68,7	67,2	69	74
Haupt-Menaquinon(e)	MK-9(H_2)	MK-9(H_4)	MK-9(H_4)	MK-9	MK-9(H_4), MK-10(H_4)	MK-9(H_4)	MK-9(H_4), MK-8(H_4)	MK-9(H_4), MK-7(H_4)
Haupt-Fettsäure(n)	ai-$C_{15:0}$	ai-$C_{15:0}$, i-$C_{15:0}$ DMA	ai-$C_{15:0}$, $C_{15:0}$	ai-C15:0, C15:0, C16:0	C13:0, ai-C15:0, C15:0	ai-$C_{15:0}$	i-$C_{15:0}$, i-$C_{15:0}$ DMA	ai-$C_{15:0}$
Peptidoglycantyp	AI-γ	ND	AI-γ	ND	ND	A3-γ	A3-γ	A3-γ′
Diaminosäure der Peptidoglycane	meso-DAP	meso-DAP	meso-DAP	meso-DAP	meso-DAP	LL-DAP-Gly	LL-A_2pm	LL-A_2pm

Die potentiell neue Gattung soll als *Lactibacter* publiziert werden. Der Typstamm ist *Lactibacter flavus*. Der Gattungsname setzt sich aus den lateinischen Wörtern für Milch (*lactis*) bzw. Stäbchen (*bacter*) zusammen und bedeutet in etwa „Stäbchen, welches in der Milch lebt“. Es bezieht sich auf die Tatsache, dass der Typstamm aus Rohmilch isoliert wurde. Der Artname *flavus*, was aus dem Lateinischen golden gelblich oder orange gelblich übersetzt heißt, ist in Anlehnung auf die Koloniefarbe des Typstammes gewählt worden.

Beschreibung von *Lactibacter flavus* gen. nov, sp. nov.

Die 0,8-2,2 x 0,4-0,9 µm großen, nicht beweglichen und nicht sporenbildenden Stäbchen sind Gram-positiv, Oxidase-positiv als auch Katalase-positiv und fakultativ anaerob. Sie treten nach Inkubation bei 30 ° C für 3-5 Tage auf CASO-Agar als gelbe bis orange pigmentierte kleine Kolonien auf. Wachstum ist zwischen 6 und 40 °C möglich. Der Toleranzbereich gegenüber pH-Werten liegt zwischen pH 5,5 und 8,5 und gegenüber Salz bei bis zu 5% (w/v) NaCl. Kleinere Abweichungen in Bezug auf die Temperatur und der pH- und NaCl-Toleranz gegenüber dem Typstamm sind möglich.
Aus Glycerin, D-Xylose, D-Galactose, D-Glucose, D-Fructose, D-Mannose, D-Mannitol, Methyl-aD-Glucopyranosid, Arbutin, Salicin, D-Maltose, D-Lactose, D-Melibiose, D-Saccharose, D-Trehalose, D-Melicitose, D-Turanose und D-Arabitol können Säuren gebildet werden. Die Säurebildung aus D-Ribose, Methyl-Beta-D-Xylopyranose, N-Acetylglucosamin, D-Cellobiose und D-Raffinose sowie die Reduktion von Nitrat ist variabel. Der Test auf die Hydrolyse von Stärke, Casein und Gelatine sowie Indolbildung war negativ, jedoch positiv für die β-Galactosidase-Aktivität und die Hydrolyse von Esculin. Es wird weder H_2S produziert noch die Arginindehydrolase und Urease.

Das Zellwandpeptidoglycan ist vom Typ A1-γ (meso-DPM-direct) und enthält Meso-DPM, Alanin und Glutaminsäure. Die wichtigsten zellulären Fettsäuren sind Anteiso-$C_{15:0}$, $C_{16:0}$, $C_{16:0}$ N Alkohol, $C_{17:0}$ und anteiso-$C_{17:0}$. Das polare Lipidprofil besteht aus den Hauptverbindungen Diphosphatidylglycerol, Phosphatidylglycerol und drei nicht identifizierten Glycolipiden, sowie aus geringen Mengen von vier nicht identifizierten Glycolipiden und sechs nicht identifizierten Lipiden ohne funktionelle Gruppe. Das Zuckermuster der Gesamtzelle umfasst Ribose, Rhamnose, Arabinose und Galaktose. Das Chinon-System enthält als wichtigstes respiratorisches Chinon MK-9(H2) und kleine Mengen an MK-8(H2).

Der G + C-Gehalt in der DNA des Typstammes beträgt 67,7 Mol-% und die Genomgröße beträgt 3,0 Mb. Phylogenetisch ist die Gattung *Lactibacter* ein Mitglied der Familie *Propionibacteriaceae* innerhalb der Unterordnung *Propionibacterineae* der Ordnung *Actinomycetales*.

4. DISKUSSION

4.1 Methoden zur Erfassung der Rohmilchmikrobiota

Da die mikrobiologische Beschaffenheit der Rohmilch Qualität und Haltbarkeit von Milchprodukten beeinflusst, wird eine stetige Verbesserung der Rohmilchqualität angestrebt. Bis dato ist jedoch wenig über die Zusammensetzung als auch über mögliche Einflussfaktoren auf die Rohmilchmikrobiota bekannt. Ziel war es, hierzu Daten zu generieren. Um die Biodiversität möglichst vollständig abbilden zu können, wurde sowohl eine kulturabhängige als auch -unabhängige Methode zur Analyse der Rohmilchmikrobiota eingesetzt.

Bei kulturabhängigen Methoden wird die erfasste Biodiversität maßgeblich von den Kulturbedingungen beeinflusst, ein Parameter ist unter anderem die Bebrütungsdauer. Insbesondere Gram-positive Bakterien benötigen bedingt durch ihre langsamere Wachstumsgeschwindigkeit mit Generationszeiten von mehreren Stunden mehr Zeit. Werden die Agarplatten bereits nach 48 oder 72 Stunden ausgewertet, wie etwa in der Studie von Mallet *et al*. (2012) oder von Desmasures *et al*. (1997), können unter Umständen noch nicht alle Mikroorganismen in der Rohmilch detektiert werden. Daher wurde für die Generierung der vorliegenden Daten, ebenso wie in der Studie von von Neubeck *et al*. (2015), eine Bebrütungsdauer von fünf Tagen gewählt. Ein weiterer entscheidender Punkt für die Erfassung der Biodiversität von Rohmilch ist die Stichprobengröße. Mit Hilfe der Rarefactionanalyse, als auch mit diversen Biodiversitätsindizes konnte gezeigt werden, dass eine Stichprobengröße von fünf mal 50 Isolaten bei Weitem nicht ausreichend ist, um die vorhandene Biodiversität auf den Betrieben zu erfassen. Auch die Erhöhung der Stichprobengröße auf 500 Isolate und sogar auf 1500 Isolaten pro Betrieb konnten die Mannigfaltigkeit der Rohmilchmikrobiota nicht vollständig abdecken. Delbes *et al*. (2007) ebenso wie Weber *et al*. (2014), aber auch Alegria *et al*. (2012) kamen zu dem Ergebnis, dass erst durch die Kombination kulturabhängiger und -unabhängiger Methoden die Mikrobiota in ihrer Gesamtheit erfasst werden kann. Bei kulturunabhängigen Methoden, wie der NGS Methodik, sind die Anzahl der Reads pro Probe und die Reproduzierbarkeit ausschlaggebend, um Proben miteinander vergleichen zu können. Das von Lagkouvardos *et al*. (2015) publizierte Protokoll zur Untersuchung von Stuhlproben, wurde für diese Arbeit modifiziert. Durchschnittlich konnten um die 9000 Reads pro Probe generiert werden. In der Studie von Lagkouvardos *et al*. (2015) selbst wurden durchschnittlich zwischen 25000 und 26000 Reads pro Probe erzielt. Andere Studien die Rohmilch analysierten,

kamen auf 2600 bis 15000 Reads pro Probe (Alessandria *et al*., 2016, Ercolini *et al*., 2012, Porcellato *et al*., 2018), aber auch deutlich mehr, wie etwa Rodrigues *et al*. (2017), die bis zu 158311 Reads pro Probe generieren konnten. Es ist hinlänglich bekannt, dass die Anzahl der Reads die detektierte Biodiversität beeinflusst. Caporaso *et al*. (2011) konnten jedoch zeigen, dass bereits 2000 single-end reads ausreichen, um Beziehungen zwischen den Proben aufzeigen zu können. Die in dieser Arbeit erzielten Reads waren daher ausreichend, um eine Aussage über die Biodiversität der Höfe treffen zu können. Auch wurde eine sehr gute Reproduzierbarkeit der eingesetzten Methodik festgestellt.

Vergleicht man nun die Ergebnisse beider Methoden miteinander, fällt auf, dass es bereits auf Ebene der Phyla deutliche Unterschiede gab. So wurden, ebenso wie in der Studie von Weber *et al*. (2014), auf beiden Betrieben kulturell deutlich mehr *Actinobacteria* isoliert. Mittels NGS Methodik dominierte jedoch das Phylum der *Firmicutes*. Suzuki und Giovannoni (1996) begründen dies mit der selektiven Amplifikation von Proben mit einem niedrigen G+C Gehalt. Sowohl in der Studie von Fricker *et al*. (2011) als auch in der von Weber *et al*. (2014) war der Anteil an Gram-negativen Bakterien bei der DNA-basierten Methode größer als mittels der kulturabhängigen Methode. Begründet wird dies mit der Aussage, dass die DNA von Gram-negativen Bakterien leichter extrahiert werden kann als die von Gram-positiven Bakterien. Für Betrieb 4 trifft diese Aussage zu, da der Anteil an Gram-negativen Bakterien mittels NGS Analyse viermal so groß war. In der Probe von Betrieb 6 hingegen wurden kulturell etwas mehr Gram-negative Bakterien detektiert. Die anderen Phyla waren zwar nur für wenige Reads verantwortlich, waren aber jene Phyla, welche mittels der kulturabhängigen Analyse nicht detektiert wurden, so etwa die anaerobe Ordnung der *Clostridiales*. Vertreter der Gattung *Clostridium* spielen, wie in der Einleitung erwähnt, doch insbesondere bei der Rohmilchkäseherstellung eine wichtige Rolle und ihr Nachweis ist daher nicht unbedeutend. Generell war die Biodiversität der beiden Proben mittels NGS Methodik deutlich größer als mit dem kulturellen Ansatz, wie es auch der Simpson Index zeigte. Für viele der häufig detektierten Gattungen wäre der kulturelle Nachweis unter den für diesen Versuch gewählten Bedingungen (30 °C, aerob) jedoch nicht möglich gewesen. So konnten beispielsweise auf Betrieb 6 allein rund 15% der Reads *Caryophanon tenue* zugeordnet werden. Diese Spezies wurde erstmals aus Rinderkot isoliert. Die Gattung *Caryophanon* ist strikt aerob, mesophil und chemo-organotroph. Kulturell kann sie nur auf einem sehr komplexen Nährmedium angezüchtet werden (Trentini, 1978), was erklärt, weshalb diese Gattung nicht kulturell nachgewiesen

wurde. Des Weiteren handelte es sich entweder um thermophile (*Sphaerobacter*), anaerobe (*Clostridium, Guggenheimella*) oder andere ernährungsphysiologisch anspruchsvolle Gattungen (*Atopostipes*). Für Saccharibakterien ist bis dato generell noch kein kultureller Nachweis gelungen (Ferrari *et al*., 2014). Der Nachweis von Gattungen, wie *Micrococcus, Rothia, Luteimonas, Ornithinimicrobium, Spingomonas, Pantoea* oder auch *Aquihabitans* wäre jedoch mit den gewählten kulturellen Bedingungen möglich gewesen. Ein möglicher Grund hierfür könnte im untersuchten Probenvolumen liegen, da der prozentuale Anteil der genannten Gattungen gering war. Kulturell wurde aus der Rohmilchprobe 1 ml entnommen, ausplattiert und anschließend 1500 Isolate gepickt. Für den kulturabhängigen Ansatz wurden die bakteriellen Zellen aus 450 ml Rohmilch auf 30 ml aufkonzentriert, wovon aus 24 ml 200 µl DNA-Extrakt eluiert wurde. Das untersuchte Volumen des kulturellen Ansatzes war demnach deutlich geringer und damit einhergehend auch die Detektionsgrenze. Die Wahrscheinlichkeit, eine Gattung, die einen sehr geringen Anteil der Reads hatte, kulturell nachzuweisen, war demnach gering. Beim kulturunabhängigen Ansatz ist es entscheidend, dass bei der DNA-Extraktion die Bakterienzelle gut aufgeschlossen wird und die DNA extrahiert werden kann. Falls dies nicht der Fall ist, wird die Gattung im Anteil der Reads unterrepräsentiert. Gattungen, bei denen die DNA-Extraktion schlecht funktioniert, können jedoch sehr wohl kulturell nachgewiesen werden, eventuell sogar in einer nicht geringen Anzahl. So wie etwa auch bei der Gattung *Staphylocccus*, jedes vierte Isolat auf Betrieb 4, gehörte dieser Gattung an. Der geringere Anteil an Reads könnte in der DNA- Extraktion begründet sein. Zhao *et al.* (2012) konnten zeigen, dass der Anteil an *Staphylocccus* von der Lyse abhängig ist. Wurden bei der Lyse zusätzlich Lysostaphin und Lysozym eingesetzt, war die relative Abundanz von *Staphylococcus* signifikant höher als ohne den Einsatz der beiden Enzyme. In dieser Arbeit wurde das DNA-Extraktionskit des Thermo Scientific PathoProof Mastitis Complete-16 Assays verwendet, welches ProteinaseK und Lysozym für die Lyse der Bakterienzellen verwendet. Doch gegen Lysoszym können einige Arten von *Staphylococcus* resistent sein, wie in der Studie von Bera *et al.* (2005) gezeigt wurde. Der hohe kulturelle Anteil könnte aber auch durch die Tatsache begründet sein, dass eine Dominanz bestimmter Gattungen zur Abnahme der Biodiversität führen kann, da andere Gattungen verdrängt oder an ihrem Wachstum gehindert werden können.

Vergleicht man beide Methoden miteinander, so fällt aber auch auf, dass bestimmte Familien und auch Gattungen mit der einen oder anderen Methode über- bzw. unterrepräsentiert wurden. Die Familie der *Microbacteriaceae* war in der NGS Analyse deutlich unterrepräsentiert,

gleiches galt für die Familie der *Xanthomonadaceae* jedoch nicht im gleichen Umfang. Zu dieser Feststellung kamen auch Fricker *et al*. (2011). Sie begründen dies mit der Effizienz der DNA-Extraktion und der Präferenz bei der Amplifikation für bestimmte Arten oder auch mit der heterogenen Verteilung der Kopienanzahl des 16S rRNA Operons. Diese Begründung kann in der vorliegenden Studie jedoch nur bedingt angewendet werden, da man beim Vergleich der beiden Proben oft konträre Ergebnisse feststellen konnte. So war zum Beispiel die Familie der *Flavobacteriaceae* im kulturunabhängigen Ansatz in der Probe von Betrieb 4 überrepräsesentiert (6,9 % zu 0,2%), in der Probe von Betrieb 6 betrug der Anteil mittels DNA-basierter Analyse etwa die Hälfte des kulturabhängigen Anteils. Für die Gattung *Streptococcus* konnte eine gegenläufige Beobachtung gemacht werden. Auch im Anteil an Isolaten bzw. Reads für *Staphylococcus* wurden auf beiden Betrieben entgegengesetzte Ergebnisse erzielt.
Der Aussage, unter anderem von Delbes *et al*. (2007) und Fricker *et al*. (2011), dass nur mit der Kombination aus kulturunabhängiger und -abhängiger Methode es möglich ist, einen Gesamteindruck der mikrobiellen Ökologie von Rohmilch zu erhalten, kann nur zugestimmt werden.

4.2 Biodiversität der Rohmilchmikrobiota

Für die Erfassung der Biodiversität wurden aber nicht nur zwei verschiedene Methoden verwendet, sondern die Betriebe wurden auch kulturabhängigen mit drei unterschiedlichen Stichprobengrößen (50, 500 bzw. 1500 Isolate) analysiert. Ziel war es herauszufinden, welchen Einfluss die Stichprobengröße auf die detektierte Biodiversität hat.

Es konnte gezeigt werden, dass sich die vergleichsweise geringe Stichprobengröße von 50 Isolaten pro Probe nicht für eine detaillierte Analyse der Biodiversität eignet, sie jedoch ausreichend ist, um Mikrobiota zu vergleichen und die Hauptunterschiede zwischen den Bauernhöfen, aber auch innerhalb eines Betriebs aufzuzeigen. Wie bereits Ercolini *et al.* (2012) zeigten, gibt es nur wenige dominierende Gattungen, die den Hauptteil der Rohmilchmikrobiota ausmachen. Diese Beobachtung konnte auch bei der Beprobung der Betriebe mit einer Stichprobengröße von 50 Isolaten gemacht werden. Sowohl in dieser Arbeit als auch in den Arbeiten von von Neubeck *et al*. (2015) und Porcellato *et al.* (2018) konnte eine große Biodiversität nachgewiesen werden, wenn gleich die allermeisten Gattungen mit einer nur geringen Prävalenz und Häufigkeit nachgewiesen wurden. Auch bei der vertieften Analyse der

Biodiversität der Betrieb 4 und 6 mit 500 bzw. 1500 Isolaten dominierten nur wenige Gattungen und Arten die Gesamtzahl der Isolate, wobei dies auf Betrieb 4 deutlicher war als auf Betrieb 6. Eine Dominanz einzelner Gattungen, wie bei der kulturabhängigen Analyse konnte mittels NGS Methodik jedoch nicht festgestellt werden, jedoch machten auch hier all jene Gattungen mit einer Häufigkeit > 1% allein 53% bzw. 67% aller Reads aus. Auch bei der Analyse der Mikrobiota anderer Habitaten als der von Rohmilch, wie etwa der von chronischen Wunden (Dowd *et al*., 2008), von Käse (Alegria *et al*., 2012, Almeida *et al*., 2014) oder auch von Erde (Pudasaini *et al*., 2017), konnte immer wieder beobachtet werden, dass es dominante Gattungen gibt und dass die Verteilung der häufigsten Gattungen in etwa der von Abbildung 18 bzw. im Anhang Abbildung 2 entspricht.

Für die Erfassung der dominierenden Gattungen ist demnach auch eine kleine Stichprobengröße ausreichend. Die Rarefactionanalyse der 21 Betriebe zeigt aber, dass der Großteil der Biodiversität bei Weitem noch nicht erfasst wurde. Gattungen, die einen kleinen Anteil an der Rohmilchmikrobiota haben, können mit einer Stichprobengröße zwischen 200 und 250 Isolaten pro Betrieb nicht erfasst werden. Aber auch die Erhöhung der Stichprobengröße auf 500 Isolate ergab, dass diese Anzahl an Isolaten nicht ausreichend ist, um die Mannigfaltigkeit der Rohmilchmikrobiota zu erfassen, wenn auch bereits eine enorme Biodiversität detektiert wurde. Obwohl in einem weiteren Versuch die Isolatanzahl nochmals verdreifacht wurde, konnten auf Betrieb 6 nur etwa 10% mehr Arten nachgewiesen werden. Dies liegt sicher daran, dass in Probe 4 allein ein Drittel aller Isolate Hefen waren und im Endeffekt die Anzahl an bakteriellen Isolaten nur verdoppelt wurde. Die Zahl an Hefen beträgt in frisch ermolkener Rohmilch unter 10% (Hassan und Frank, 2011). Werden aber Futtermittel unsauber gewonnen und unsachgemäß gelagert, können sich Hefen massiv vermehren. In der Zwischenmelkzeit können sie bei einem massiven Infektionsdruck in das Euter gelangen und dort latente Infektionen oder auch eine Mastitis induzieren (Fehlings und Baumgartner, 2016). Auf Betrieb 4 konnte mit der Erhöhung der Stichprobengröße von 500 auf 1500 Isolate die Anzahl an detektierten Arten um das 1,5-fache erhöht werden. Der Grund, weshalb die Proben von Betrieb 4 weniger divers waren als jene von Betrieb 6, kann mit dem stabilen Vorkommen von *Staphylococcus* und weiteren dominierenden Gattungen erklärt werden. Mallet *et al*. (2012) stellten die Vermutung auf, dass während der Kühllagerung durch die Dominanz einer Gruppe das Wachstum von anderen Gruppen behindert oder gesenkt wird. Im Umkehrschluss bedeutet dies aber auch eine Abnahme der Biodiversität.

Insgesamt konnte eine beträchtliche mikrobielle Vielfalt detektiert werden. Bereits bei einer Stichprobengröße von 50 Isolaten je Probe konnten insgesamt 101 Gattungen nachgewiesen werden, durchschnittlich 28 Gattungen pro Betrieb, wobei es enorme Unterschiede in der Anzahl an detektierten Gattungen gab, so variierte die Anzahl zwischen 17 und 39 Gattungen pro Probe. Die Anzahl an detektierten Gattungen deckt sich mit denen von Callon *et al*. (2007) oder von Delbes *et al*. (2007). Mit Erhöhung der Stichprobengröße auf 1500 Isolate konnte die Anzahl bis auf zu 60 Gattungen gesteigert werden. Mittels NGS Methodik konnten 79% (Betrieb 4) bzw. 88% (Betrieb 6) der Reads einer von 162 bzw. 166 Gattungen zugeordnet werden. Die Zahl an detektierten Ordnungen lag bei knapp 40. Raats *et al*. (2011) konnten bei ihrer Analyse der Rohmilch 108 verschiedene Gattungen aus 22 Ordnungen detektieren. Mittels beider Methoden und unabhängig von der Stichprobengröße, konnten in dieser Studie insgesamt knapp 250 verschiedene Gattungen identifiziert werden. Die Mehrzahl von ihnen sind Gram-positiv. Dies ist nicht verwunderlich, da in der Literatur Gram-positive Bakterien als die typischen Bakterien von frischer ermolkener Rohmilch gelten (Hassan und Frank, 2011). Sehr viele der Gattungen, die von Verdier-Metz *et al*. (2012) auf der Zitzenoberfläche nachgewiesen wurden, konnten auch in der vorliegenden Arbeit identifiziert werden. Auch viele andere Gattungen, insbesondere all jene, die mehr als 1% der Isolate in den jeweiligen Proben ausmachten, konnten in weiteren Studien, welche sich mit der Mikrobiota von Rohmilch und Milchprodukten beschäftigen (u.a. Delbes *et al*.,2007, Quigley *et al*., 2011, Quigley *et al*., 2013b, Raats *et al*., 2011, Weber *et al*., 2014), bereits detektiert werden. Es gab aber auch kulturell nachgewiesene Gattungen, die nach unserem Wissensstand noch nicht in Verbindung mit Rohmilch beschrieben wurden, wie etwa *Orthinimicrobium*, *Ottowia* oder auch *Thermomonas*. Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass bis dato in noch keiner Studie eine so große Anzahl (500 bzw. 1500 Isolate) an zufällig gewählten Isolaten für eine einzelne Probe in einem kulturabhängigen Ansatz untersucht wurde. Eine andere Erklärung könnte aber auch sein, dass in den Arbeiten die Mikroorganismen oft erst gar nicht bis auf Gattungsebene differenziert wurden. Insbesondere bei kulturunabhängigen Methoden ist eine Differenzierung oftmals nur bis auf Ebene taxonomischer Familien möglich. Montel *et al*. (2014) konnten insgesamt 53 Familien in der Rohmilch detektieren, wovon bis auf neun auch alle in unsere Studie vertreten waren. Darunter auch die Familie *Intrasporangiaceae* zu der unter anderem auch die Gattungen *Janibacter*, *Isoptericola*, *Ornithinicoccus* und *Ornithinimicrobium* gehören. Dagegen wurden nach unserem Wissen die beiden Familien *Iamiaceae* und *Sphaerobacteraceae* noch nicht in Rohmilch nachgewiesen. Mitglieder der Familie *Iamiaceae*

findet man vor allem in mariner Umgebung, sie wurden aber auch aus Böden und Schlamm isoliert (Yokota, 2014). Auch die Gattung *Sphaerobacter* wurde bereits aus Böden isoliert (Acosta-Martínez *et al*., 2008). Es kann daher davon ausgegangen werden, dass beide Familien den Boden als Reservoir haben und so in die Rohmilch gelangen. Eine Differenzierung bis auf Gattungsebene ist jedoch empfehlenswert, ja sogar bis auf Speziesebene, insbesondere wenn man die Qualität der Rohmilch untersuchen möchte. Von Neubeck *et al*. (2015) bzw. Glück *et al*. (2016) konnten zeigen, dass unterschiedliche Spezies einer Gattung verschiedene enzymatische Fähigkeiten besitzen und ihre Peptidasen unterschiedlich Hitze-resistent sind.

Trotz der enormen Vielfalt konnte aber auch beobachtet werden, dass ein Core-Mikrobiom bestehend aus den Gattungen *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Corynebacterium*, *Staphylococcus* und *Microbacterium* in fast allen Proben dieser Studie enthalten waren. Die Gattung *Pseudomonas* wurde in 74% der 99 untersuchten Rohmilchproben nachgewiesen und stellte fast ein Viertel aller identifizierten Isolate dar. Auch in der Studie von von Neubeck *et al*. (2015) war *Pseudomonas* die dominierende Gattung und repräsentierte zusammen mit den Gattungen *Lactococcus*, *Acinetobacter*, *Microbacterium*, *Carnobacterium* und *Staphylococcus* über 75% der Isolate. Auch in anderen Studien unter anderem in der von Delbes *et al*. (2007), Raats *et al*. (2011) oder auch Weber *et al*. (2014) konnte das in dieser Arbeit detektierte Core-Mikrobiom nachgewiesen werden. Auch Rodrigues *et al*. (2017), Kable *et al*. (2016) und Porcellato *et al*. (2018) konnten in ihren Studien feststellen, dass es trotz aller Unterschiede in den Proben eine Hauptmikrobiota existiert. Dieses umfasste bei Rodrigues *et al*. (2017) 12 Taxa, darunter auch die Gattungen des Core-Mikrobioms mit Ausnahme von *Microbacterium*. Kable *et al*. (2016), welche 899 Rohmilchproben analysierten, zählen 29 Taxa aus 20 Familien zur Hauptmikrobiota, auch *Acinetobacter*, *Corynebacterium* und *Staphylococcus* zählen hierzu. Viele der in den drei Studien genannten Familien wurden auch in den Proben der Betriebe 4 und 6 nachgewiesen. Nur die vier Familien *Turicibacteraceae*, *Peptostreptococcaceae*, *Yaniellaceae* und *Mycoplasmataceae*, welche Kable *et al*. (2016) nennen, konnten nicht nachgewiesen werden, ebenso wie die Gattung *Thermoanaerobacterium*, die laut Rodrigues *et al*. (2017) zur Hauptmikrobiota zählte. Core-Mikrobiome also Mikrobiota, in denen nur beständige und teilweise dominierende Mitglieder einer mikrobiellen Gemeinschaft berücksichtigt werden, haben in der Forschung zunehmende Aufmerksamkeit erhalten (Shade und Handelsman, 2012). Mit ihrer Hilfe lässt sich ein möglicher Einfluss der Mikrobiota auf das jeweilige Habitat besser darstellen. Core-Mikrobiota konnten beispielsweise in den

Fäkalien von domestizierten Pflanzenfressen (O' Donnell *et al*., 2017) nachgewiesen werden, aber auch für bestimmte Körperregionen des Menschen (Gupta *et al*., 2017) oder im Pansen von Kälbern (Li *et al*., 2012).

Erstaunlich ist die beträchtliche Zahl an bis dato unbekannten Arten und Gattungen, die auf beiden Höfen in jeweils beiden Proben detektiert wurde. Mehr als 20 vermeintlich neue Arten wurden in jeder Probe identifiziert. Dies ist übereinstimmend mit den Erkenntnissen von Fricker *et al*. (2011), Vacheyrou *et al*. (2011) und von Neubeck *et al*. (2015). Dass eine vermeintlich bis dato unbekannte *Acinetobacter* Art auf beiden Höfen gefunden wurde, lässt vermuten, dass die Rohmilch ein mögliches Habitat für diese Art ist und bekräftigt die Aussage von Fricker *et al*. (2011), dass die Rohmilchmikrobiota ein Forschungsgebiet ist, welches es noch tiefer zu beleuchten gilt, um die Ökologie und die Dynamiken in der Rohmilchmikrobiota gänzlich zu verstehen.

Auf Betrieb 6 wurden zu zwei unterschiedlichen Zeitpunkten mehrere Isolate einer potentiell neuen Gattung, die zur Familie der *Propionibacteriaceae* gehört, detektiert. Diese Familie gehört zum Phylum der *Actinobacteria* und umfasst derzeit 21 Gattungen: *Acidipropionibacterium, Aestuariimicrobium, Auraticoccus, Brooklawnia, Cutibacterium, Friedmanniella, Granulicoccus, Luteococcus, Mariniluteicoccus, Microlunatus, Micropruina, Naumannella, Propionibacterium, Propionicicella, Propioniciclava, Propionicimonas, Propioniferax, Propionimicrobium, Pseudopropionibacterium, Raineyella* und *Tessaracoccus.* Die Gattung *Raineyella* ist die zuletzt beschriebene Gattung innerhalb der *Propionibacteriaceae* (Pikuta *et al*., 2016). Die drei neuen Gattungen *Acidipropionibacterium*, *Cutibacterium* und *Pseudopropionibacterium* wurden 2016 aus der Gattung *Propionibacterium* gespalten (Scholz and Kilian, 2016). Die phylogenetische Einordnung zeigte, dass sich die Stämme von den anderen Gattungen der Familie der *Propionibacteriaceae* deutlich abgrenzten. Der Abgleich der fast vollständigen 16S rRNA Sequenz mit der EzBioCloud Datenbank lieferte nur Übereinstimmungen unter 94% mit den bis dato beschriebenen Gattungen und auch die phylogenetische Analyse mittels des phylogenetischen Baumes zeigte, dass die potentiell neue Gattung eine eigene Abstammungslinie innerhalb der Familie der *Propionibacteriaceae* bildet. *Propioniclava tarda* WR061^{T} als die genetisch am nächsten verwandte Gattung zeigt chemotaxonomische Ähnlichkeiten zu WS 4900^{T}. Es enthält die gleiche Diaminosäure im Peptidoglykan (meso-DAP), sowie die gleiche Hauptfettsäure (anteiso-$C_{15:0}$). Auch die Zusammensetzung des Lipidprofils von *Propioniciclava tarda* WR061^{T} ist ähnlich zu WS

4900^T. Es enthält Phosphatidylglycerol und zwei größere unidentifizierte Glycolipide, die chromatographische ähnlich denen von GL1 und GL2 von WS 4900^T sind. Beide Stämme haben MK-9 als Menachinon, jedoch unterscheidet sich die Anzahl der sättigenden Wasserstoffatome der Seitenkette. Bei WS 4900^T sind es zwei (MK-9(H_2)) wohingegen es bei *Propioniciclava tarda* WR061^T vier Wasserstoffatome (MK-9(H_4)) sind. Im Vergleich zu den sieben Typstämmen, die die höchste Übereinstimmung in der 16S rRNA Sequenz zu WS 4900^T haben, findet man nur bei WS 4900^T MK-9(H_2) als Haupt-Menaquinon wieder. Auch *Propionicimonas paludicola* DSM 15597^T, *Propionicicella superfundia* BL-10^T und *Brooklawnia cerclae* BL-34^T, obwohl genetisch weiter entfernt verwandt, haben meso-DAP und anteiso-$C_{15:0}$ als chemotaxonomische Eigenschaften. Andererseits haben *Mariniluteicoccus flavus* YIM M13146^T und *Granulicoccus phenolivorans* PG-02^T, die die gleiche 16S rRNA-Ähnlichkeit aufweisen wie *Brooklawnia cerclae* BL-34^T und *Propionicimonas paludicola* DSM 15597^T zu WS 4900^T, LL-A2pm als Diaminosäure im Peptidoglycan und weisen als Peptidoglycan-Typ A3-γ auf. Aber auch phänotypisch gibt es Unterschiede zwischen WS 4900^T und den sieben genetisch am nächsten verwandten Typstämmen. WS 4900^T ist als einziger der Typstämme Oxidase-positiv. Seine Toleranz gegenüber NaCl (0-5%) ist größer als bei den meisten anderen Typstämmen, nur *Mariniluteicoccus flavus* YIM M13146^T und *Granulicoccus phenolivorans* PG-02^T tolarieren höhere NaCl-Konzentrationen (bis zu 6%). WS 4900^T ist zudem in der Lage noch bei 6 °C zu wachsen und kann somit bei ähnlich niedrigen Temperaturen wie *Propionicimonas paludicola* DSM 15597^T wachsen. Alle anderen Typstämme haben ihr Wachstums-Minimum bei 10-20 °C. Basierend auf den phänotypischen, phylogenetischen und chemotaxonomischen Daten wird daher gefolgert, dass der Stamm WS 4900^T einer neuen Gattung innerhalb der Familie *Propionibacteriaceae* gehören. Innerartliche Diversität zwischen WS 4900^T und den Stämme WS 4684, WS 4769, WS 4882, WS 4883, WS 4901, WS 4902 sowie WS 4904 wurde festgestellt, jedoch weisen alle Stämme, mit Ausnahme von WS 4904 (Abweichung von einem Nukleotid), eine 100% Übereinstimmung der 16S rRNA Sequenz auf. Alle acht Stämme gehören daher zur selben neuen Spezies. Der Typstamm WS 4900^T wurde sowohl bei der DSMZ als auch bei der LMG, der belgischen Stammsammlung der Universität Gent hinterlegt und wird zeitnah als *Lactibacter flavus* publiziert werden.

4.3 Einflüsse der Mikrobiota auf die Rohmilchqualität

Es ist hinlänglich bekannt, dass sowohl die Gesamtkeimzahl als auch die Zusammensetzung der Mikrobiota einen Einfluss auf die Rohmilchqualität haben. Nicht ohne Grund gibt die

deutsche Milchgüteverordnung vor, dass der Grenzwert von 300.000 KbE/ml nicht überschritten werden darf. Um die Rohmilch in Bezug auf die aerobe, mesophile Gesamtkeimzahl zu bewerten, wurde diese von 74 der 99 untersuchten Proben bestimmt. Die Agarplatten wurden hierfür fünf bis sechs Tage bei 30 °C aerob inkubiert. Der Durchschnittswert lag bei log 5,05 KbE/ml, wobei knapp 22 der Proben den in der Güteverordnung angegebenen Grenzwert überschritten und auch im Vergleich zu anderen Publikationen (Fricker *et al*., 2011, Mallet *et al*., 2012, Porcellato *et al*., 2018) waren die in dieser Studie ermittelten Keimzahlen teilweise deutlich höher. Die Ergebnisse waren jedoch vergleichbar zu denen von von Neubeck *et al*. (2015), in deren Studie die durchschnittliche Gesamtkeimzahl der Tankmilchproben der Betriebe bei log 4,9 KbE/ml lag. Die Begründung hierfür könnte zum einem im Probenalter, zum anderen an der Methodik und der damit verbundenen Bebrütungsdauer liegen. Die Proben beinhalteten vier oder sechs sukzessive Gemelke und auch bis Probeneingang vergingen meist nochmals 24 Stunden, sodass zwischen dem ersten Gemelk und dem Ansetzen der Probe mindesten 36 Stunden lagen. In dieser Zeit wurden die Proben zwar kühl gelagert, jedoch konnten sowohl O'Connell *et al*. (2016) als auch Vithanage *et al*. (2016) zeigen, dass während der Kühllagerung ein Wachstum von psychrotoleranten Bakterien stattfindet und es zu einem Anstieg der Keimzahl kommt. Proben in der Studie von Mallet *et al*. (2012) beinhalteten maximal vier Gemelke und wurde noch am gleichen Tag untersucht. Des Weiteren wurden die Platten für die Gesamtkeimzahlbestimmung nur 48 Stunden bebrütet. Werden Platten bereits nach 48 oder 72 Stunden ausgewertet, so kann es unter Umständen sein, dass die in der Milch enthaltenen Keime bei der Auszählung noch nicht berücksichtigt werden können und niedrigere Keimzahlen die Folge sind.

Wie bereits in der Einleitung dargelegt, können einige psychrotolerante Bakterien unerwünschte Hitze-stabile Enzyme produzieren, die, wenn im Endprodukt weiter aktiv sind, zum Verderb des Produktes führen. Im Fokus steht hier insbesondere die Gattung *Pseudomonas*, aber auch *Chryseobacterium* und *Acinetobacter* können einen negativen Einfluss auf das Endprodukt haben und sind daher in der Rohmilch unerwünscht. Da bis dato diese Hitze-stabilen Enzyme technologisch nicht inaktiviert werden können, ist eine Reduzierung des Anteils der unerwünschten Gram-negativen Bakterien von Vorteil. Daher war es auch ein Ziel dieser Arbeit, mögliche Zusammenhänge und Einflussfaktoren auf die Biodiversität herauszufinden.

Eine negative Korrelation (p = <0,0001) konnte zwischen der Biodiversität (Anzahl der detektierten Gattungen) und der Gesamtkeimzahl nachgewiesen werden. Auch Rodrigues *et al*. (2017) stellten eine negative Korrelation zwischen dem Shannon Index und der Gesamtkeimzahl fest. Dies ist wohl dem Wachstum psychotoleranter Organismen geschuldet und einer damit verbundenen Verschiebung der Mikrobiota, wie es auch De Jonghe *et al*. (2011) zeigen konnten. Wenn die Mehrheit der Isolate nur durch eine Gattung, wie *Pseudomonas*, repräsentiert wird, können andere vorhandene Gattungen nicht oder nur mit wenigen Isolaten nachgewiesen werden. Eine Korrelation zwischen der Anzahl detektierter Gattungen und dem Anteil Gram-negativer Bakterien konnte jedoch nicht gefunden werden, wenngleich auch die beiden Proben, welche einen Anteil von 100% an Gram-negativen Bakterien hatten, die geringste Biodiversität aufwiesen und nur zwei Gattungen detektiert wurden (Daten nicht gezeigt). Des Weiteren konnte kein signifikanter Zusammenhang zwischen der Gesamtkeimzahl und dem Anteil an Gram-negativen, obligat aeroben Bakterien festgestellt werden, obwohl beobachtet werden konnte, dass Proben mit einer höheren Gesamtkeimzahl durchschnittlich einen höheren Anteil an Gram-negativen Bakterien hatten und Proben mit niedrigen Gesamtkeimzahlen einen höheren Anteil an Gram-positiven Bakterien aufwiesen. Für den Zusammenhang zwischen der Gesamtkeimzahl und Gram-negativen Bakterien machten Rodrigues *et al*. (2017) eine ähnliche Beobachtung, da sie feststellten, dass der Anteil an *Acinetobacter* und *Enterobacteriaceae* mit steigender Gesamtkeimzahl zunahm. Da trotz Kühllagerung psychrotolerante Bakterien in der Lage sind zu wachsen, war von Interesse, ob ein Zusammenhang zwischen der Gesamtkeimzahl und dem Probenalter beseht und auch die Jahreszeit einen Einfluss hat. Eine Korrelation konnte in Bezug auf das Probenalter bzw. die Jahreszeit und der Gesamtkeimzahl nicht nachgewiesen werden. Tendenzen waren jedoch erkennbar, da vier Tage alte Proben durchschnittlich eine höhere Keimzahl hatten und in den Sommermonaten die Gesamtkeimzahl durchschnittlich höher war. Vithanage *et al*. (2016) fanden einen signifikanten Zusammenhang zwischen der Zahl an psychrotoleranten Bakterien und der aeroben, mesophilen Gesamtkeimzahl, ebenso wie zwischen Gesamtkeimzahl und der Jahreszeit. Auch Mallet *et al*. (2012) fanden saisonale Unterschiede, so war der Anteil der Gram-positiven Bakterien im Winter höher als im Vergleich zum Frühling. Des Weiteren fanden sie heraus, dass die Gesamtkeimzahl bei Proben mit vier sukzessiven Gemelken höher war als in Proben mit zwei sukzessiven Gemelken. Dass keine signifikanten Zusammenhänge nachgewiesen werden konnten, liegt in der enormen Varianz innerhalb von Proben des gleichen Alters oder der gleichen Gesamtkeimzahl begründet. Diese Streuung wurde aber nicht nur

zwischen den Betrieben, sondern auch innerhalb eines Betriebes festgestellt. Leriche und Fayolle (2012) analysierten Milch von landwirtschaftlichen Betrieben, die Käse unter dem Etikett "geschützte Ursprungsbezeichnung" herstellten. Die strengen Herstellungsrichtlinien beinhalten auch die Verarbeitung der Milch direkt nach dem Melken und obwohl die Milch nicht gekühlt gelagert wurde, konnten große Variationen in der Zahl an *Pseudomonas* zwischen verschiedenen Proben beobachtet werden. Die längere Kühllagerung kann daher nur ein Grund für die hohe Zahl an Gram-negative Bakterien sein. Es muss noch andere Faktoren neben dem Probenalter oder der Jahreszeit geben, die einen deutlich stärkeren Einfluss auf die Rohmilchmikrobiota haben, zumindest in den ersten Tagen der Kühllagerung. So konnten Verdier-Metz *et al*. (2009) zeigen, dass die Rohmilchmikrobiota durch Melkpraktiken beeinflusst werden. Rohmilch von Bauernhöfen, die beim Melken ein großes Augenmerk auf die Hygiene legten, war mehrheitlich von Gram-positiven Nicht-Milchsäurebakterien gekennzeichnet, während die Rohmilchmikrobiota von Höfen mit weniger intensiven Hygienepraktiken eine ausbalancierte Mischung an Gram-positiven und -negativen Bakterien aufwiesen. De Jonghe *et al*. (2011) analysiert die Veränderungen der Gesamtkeimzahl und der Zahl an *Pseudomonas* über eine simulierte Lagerung auf dem Milchviehbetrieb und weiter über den Transport zur Molkerei und schließlich im Silotank der Molkerei. In den ersten drei Tagen der Lagerung (Lagerung auf dem Hof) erhöhte sich die Gesamtkeimzahl nicht, obwohl das Wachstum von *Pseudomonas* bereits begonnen hatte. Der Anstieg der Gesamtkeimzahl wurde erst später beim Transport und bei der Lagerung der Rohmilch in der Molkerei beobachtet. Der Hauptfaktor, der die Zusammensetzung der Mikrobiota der Tankmilch auf Betriebsseite bestimmt, scheint vielmehr der Eintrag der Bakterien in die Milch während des Melkens zu sein. Ein weiterer Faktor ist wie von O'Connell *et al*. (2016) beschrieben die Lagertemperatur. Bereits ein Temperaturanstieg von 4 °C auf 6 °C hat einen enormen Anstieg der Zahl an psychrotoleranten Bakterien zur Folge.

Um die Anzahl an Gram-negativen psychrotoleranten Bakterien zu reduzieren, ist es aber auch wichtig zu wissen, wo das Reservoir der unerwünschten Keime ist. Vacheyrou *et al*. (2011) analysierten mögliche Quellen der Rohmilchmikrobiota und fanden *Acinetobacter* in Luft- und Heuproben. Allerdings analysierten sie nicht die Melkanlage und die Tanks, die auch eine mögliche Kontaminationsquelle für wasserassoziierte Bakterien wie *Pseudomonas* und *Acinetobacter* sein können. Leriche und Fayolle (2012) bestimmten den Gehalt an *Pseudomonas* in der Rohmilch und im Wasser, welches zum Spülen und Desinfizieren der Melkanlagen benutzt wurde. Sie fanden niedrige Zahlen in der Rohmilch selbst, erhöhte Zahlen

nach dem Durchspülen jedoch noch vor dem Desinfizieren der Melkanlage. Darüber hinaus fanden sie erhöhte Zahlen in den Melkmaschinenfiltern und in den Zitzengummis und konnten damit die Hauptreservoire für *Pseudomona*s nachweisen.

Um langfristig die Rohmilchqualität zu verbessern, bedarf es einer stabilen Mikrobiota mit einem niedrigen Gehalt an Gram-negativen Bakterien. Es ist daher von großem Nutzen, die Stabilität und Variabilität der Rohmilchmikrobiota der einzelnen Höfe zu kennen. Um diese zu bestimmen, wurden die Isolate der einzelnen Proben pro Betrieb in sechs taxonomische Großgruppen eingeteilt. Dabei konnten nicht nur Varianzen zwischen den Betrieben beobachtet werden, sondern bereits innerhalb der vier bzw. fünf Proben eines Betriebes. Betriebe mit einer stabilen Mikrobiota waren die Ausnahme. Große Variationen zwischen den Höfen konnten unter anderem auch Leriche und Fayolle (2012) und Mallet *et al*. (2012) feststellen. Unterschiede gab es aber auch bezüglich der Anzahl der detektierten Gattungen (Biodiversität) und dies nicht nur quantitativ, sondern auch qualitativ. Über die Hälfte der Gattungen wurden nur zu einem einzigen Probenahmezeitpunkt nachgewiesen. Durchschnittlich nur 6% der Gattungen wurden in allen fünf Proben detektiert und selbst die Anzahl an Isolaten je Gattung variierte. Betrieb 4 hatte im Durchschnitt die meisten Gattungen pro Probe, jedoch nicht die höchste Biodiversität, wenn man die Kurven der Rarefactionanalyse betrachtet. Ein Grund könnte sein, dass Betrieb 4 eine relativ stabile Mikrobiota hatte. Bei einer stabilen Mikrobiota werden immer die gleichen Gattungen gefunden, dies führt aber in der Summe zu weniger Gattungen. Im Gegensatz dazu kann eine hohe Biodiversität eine möglicherweise bestehende Stabilität verdecken, insbesondere wenn nur 50 Isolate ausgewählt wurden, da bei einer großen Biodiversität die Wahrscheinlichkeit geringer ist, immer die gleichen Gattungen zu detektieren. In beiden Fällen gibt die durchschnittliche Anzahl der Gattungen pro Probe jedoch einen Hinweis. Unterschiede in der Zusammensetzung der Mikrobiota wurden bereits in anderen Studien beobachtet, so konnten Desmasures und Gueguen (1997) beispielsweise Variationen in der Häufigkeit von *Pseudomonas* zwischen 0% und 100% in unterschiedlichen Proben feststellen. Sie konnten aber auch zeigen, dass insbesondere die für die Käseherstellung wichtigen Bakterien, wie Hefen und Lactobazillen, relativ stabil waren bzw. der Anteil an Staphylokokken und Coryneformen Bakterien über den untersuchten Zeitraum von zwei Jahren nicht so stark variierten. Weiter stellten sie fest, dass es zwar vorübergehende Variationen während bestimmter Perioden gab, aber sobald diese vorbei waren, die Zusammensetzung der Mikrobiota annähernd der von davor entsprach. Sie schlussfolgerten, dass es leicht ist, die

Rohmilchmikrobiota von jedem Erzeuger zu katalogisieren und dass jede Rohmilch unterschiedliche mikrobiologische Eigenschaften haben kann, die bei der Herstellung von Rohmilchprodukten berücksichtigt werden sollte. Für unsere Arbeit trifft diese Aussage eher nur für die dominierenden Gattungen bzw. für die wenigen Betriebe mit einer stabilen Mikrobiota zu. Es zeigt aber auch, dass es möglich ist, eine stabilen Mikrobiota zu haben. Für die Erfassung der Stabilität und Variabilität der Rohmilchmikrobiota ebenso wie für die Erfassung der gesamten Biodiversität eines Betriebes sind geeignete Analysemethoden unabdingbar, denn erst wenn wir die Gesamtheit der Rohmilchmikrobiota kennen, kann die Qualität der Rohmilch verbessert werden.

5. SCHLUSSFOLGERUNG

Um die Mannigfaltigkeit der Biodiversität eines Betriebes möglichst genau erfassen zu können, ist die Kombination aus kulturabhängigen und -unabhängigen Analysen am geeignetsten. Die Inkubation der Agarplatten für mindesten fünf Tage ist notwendig, um auch Bakterien mit hohen Generationszeiten zu erfassen. Bei der kulturabhängigen Methode sollte eine möglichst große Stichprobengröße von mehreren Hundert Isolaten analysiert werden, um auch weniger dominate Arten nachweisen zu können. Um die Effizienz zu steigern, sollten nicht nur ein Medium und eine Kultivierungsbedingung gewählt werden, sondern eine Kombination aus unterschiedlichen Medien, Temperaturen und an- bzw. aeroben Bedingungen. Hochdurchsatzmethoden, wie die NGS Methodik können die erfasste Biodiversität um all jene Bakterien erweitern, die kulturell nur schwer oder nicht kultivierbar sind. Die DNA-Extraktion, die Wahl der Primer sowie der gesamte PCR Ansatz sind entscheidend für die detektierte Biodiversität. Voraussetzung ist eine gute Reproduzierbarkeit, die in dieser Arbeit gezeigt werden konnte. Die durchgeführte Aufarbeitung der Rohmilch ermöglicht den Aufschluss sowohl von Gram-positiven als auch Gram-negativen Bakterienzellen. Sie war jedoch recht aufwendig. Auch konnte eine Selektivität bestimmer Phyla festgestellt werden. Daher besteht in diesen Punkten noch ein Verbesserungspotenzial. Die Anzahl der erhaltenen Reads war ausreichend, um beide Proben miteinander vergleichen zu können.

Die Mikrobiota der gekühlten Rohmilch wird oft von unerwünschten Gram-negativen Bakterien, wie *Pseudomonas*, dominiert. Obwohl sie psychrotolerant sind und unter gekühlten Temperaturen wachsen, konnte keine direkte Korrelation zwischen ihrem Anteil und dem Probenalter festgestellt werde. Eine Verkürzung der Lagerdauer würde nicht zwangsläufig zur Minderung der Anzahl unerwünschten Gram-negativen Bakterien führen. Auch die Gesamtkeimzahl und die Jahreszeit haben keinen signifikanten Einfluss auf den Anteil an Gram-negativen Bakterien. In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass die Mikrobiota von einige Höfen einen extrem niedrigen Anteil an *Pseudomonas* aufwiesen, wie etwa die Betriebe 4 und 6. Ein Grund hierfür könnte das Hygienemanagement sein. Bei (sehr) guter Zitzen- und Euterhygiene und auch (sehr) guter Hygiene der Melkausrüstung kann die Gesamtkeimzahlen als auch der Anteil Gram-negativer Bakterien positiv beeinflusst werden. Dies hätte zur Folge, dass die Mikrobiota von den Gram-positiven Bakterien der frischen Milch beherrscht wird. Aufgrund der Tatsache, dass die meisten Gram-positiven Bakterien während

der Kaltlagerung nicht wachsen, führt dies zu einer Stabilisierung der Mikrobiota während der Kaltlagerung. Ein kontinuierlich wirksames Hygienemanagement auf dem landwirtschaftlichen Betrieb würde darüber hinaus eine stabile Mikrobiota über einen längeren Zeitraum sicherstellen. Es sollte sich daher verstärkt auf die Hygiene-Management-Praktiken auf Betriebsebene konzentriert werden, um langfristig den Anteil an Gram-negative Bakterien zu reduzieren. Dies hätte zudem den positiven Effekt, dass sich die Belastung an hitzebeständigen Enzymen reduzieren würde.

LITERATURVERZEICHNIS

Acosta-Martínez, V., S. Dowd, Y. Sun, und V. Allen. (2008). Tag-encoded pyrosequencing analysis of bacterial diversity in a single soil type as affected by management and land use. *Soil Biology and Biochemistry* 40(11):2762-2770.

Akasaka, H., A. Ueki, S. Hanada, Y. Kamagata, und K. Ueki. (2003). *Propionicimonas paludicola* gen. nov., sp. nov., a novel facultatively anaerobic, Gram-positive, propionate-producing bacterium isolated from plant residue in irrigated rice-field soil. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 53(6):1991-1998.

Alegria, A., P. Szczesny, B. Mayo, J. Bardowski, und M. Kowalczyk. (2012). Biodiversity in Oscypek, a traditional Polish cheese, determined by culture-dependent and -independent approaches. *Applied and environmental microbiology* 78(6):1890-1898.

Alessandria, V., I. Ferrocino, F. De Filippis, M. Fontana, K. Rantsiou, D. Ercolini, und L. Cocolin. (2016). Microbiota of an Italian Grana-Like Cheese during Manufacture and Ripening, Unraveled by 16S rRNA-Based Approaches. *Applied and environmental microbiology* 82(13):3988-3995.

Almeida, M., A. Hebert, A. L. Abraham, S. Rasmussen, C. Monnet, N. Pons, C. Delbes, V. Loux, J. M. Batto, P. Leonard, S. Kennedy, S. D. Ehrlich, M. Pop, M. C. Montel, F. Irlinger, und P. Renault. (2014). Construction of a dairy microbial genome catalog opens new perspectives for the metagenomic analysis of dairy fermented products. *BMC genomics* 15:1101.

Altenburger, P., P. Kämpfer, A. Makristathis, W. Lubitz, und H.-J. Busse. (1996). Classification of bacteria isolated from a medieval wall painting. *Journal of biotechnology* 47(1):39-52.

Altschul, S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers, und D. J. Lipman. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215(3):403-410.

Anonymus. (2017). Next-Generation Sequencing Illumina, Inc.

Bae, H.-S., W. M. Moe, J. Yan, I. Tiago, M. S. da Costa, und F. A. Rainey. (2006a). *Brooklawnia cerclae* gen. nov., sp. nov., a propionate-forming bacterium isolated from chlorosolvent-contaminated groundwater. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 56(8):1977-1983.

Bae, H.-S., W. M. Moe, J. Yan, I. Tiago, M. S. da Costa, und F. A. Rainey. (2006b). *Propionicicella superfundia* gen. nov., sp. nov., a chlorosolvent-tolerant propionate-forming, facultative anaerobic bacterium isolated from contaminated groundwater. *Systematic and applied microbiology* 29(5):404-413.

Barbano, D. M., Y. Ma, und M. V. Santos. (2006). Influence of raw milk quality on fluid milk shelf life. *Journal of Dairy Science* 89 Suppl 1:E15-19.

Baumgartner, C. und E. Märtlbauer. (2016). Qualitätskontrolle der Anlieferungsmilch. Seite 125-140 in *Milchkunde und Milchhygiene*. E. Märtlbauer und H. Becker, ed. Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart.

Baur, C., M. Krewinkel, B. Kranz, M. von Neubeck, M. Wenning, S. Scherer, M. Stoeckel, J. Hinrichs, T. Stressler, und L. Fischer. (2015). Quantification of the proteolytic and lipolytic activity of microorganisms isolated from raw milk. *International Dairy Journal* 49:23-29.

Bava, L., M. Zucali, M. Brasca, L. Zanini, und A. Sandrucci. (2009). Efficiency of cleaning procedure of milking equipment and bacterial quality of milk. *Italian Journal of Animal Science* 8(Supplement 2):387-389.

Bera, A., S. Herbert, A. Jakob, W. Vollmer, und F. Götz. (2005). Why are pathogenic staphylococci so lysozyme resistant? The peptidoglycan O-acetyltransferase OatA is the major determinant for lysozyme resistance of *Staphylococcus aureus*. *Molecular Microbiology* 55(3):778-787.

Boubendir, A., D. I. Serrazanetti, M. A. Hamidechi, L. Vannini, und M. E. Guerzoni. (2016). Changes in bacterial populations in refrigerated raw milk collected from a semi-arid area of Algeria. *Annals of Microbiology* 66(2):777-783.

Brown, S. M. (2013). Introduction to DNA Sequencing. Seite 1-25 in *Next-Generation DNA Sequencing Informatics*. S. M. Brown, ed. Cold Spring Harbor, New York.

Buehner, K. P., S. Anand, G. D. Djira, und A. Garcia. (2014). Corrigendum to "Prevalence of thermoduric bacteria and spores on 10 Midwest dairy farms"1. *Journal of Dairy Science* 97(12):8009-8016.

Callon, C., F. Duthoit, C. Delbes, M. Ferrand, Y. Le Frileux, R. De Cremoux, und M. C. Montel. (2007). Stability of microbial communities in goat milk during a lactation year: molecular approaches. *Systematic and applied microbiology* 30(7):547-560.

Caporaso, J. G., C. L. Lauber, W. A. Walters, D. Berg-Lyons, C. A. Lozupone, P. J. Turnbaugh, N. Fierer, und R. Knight. (2011). Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108(Suppl 1):4516-4522.

Colwell, R. K. (2008). Biodiversity: Concept, Measurement, und Challenge. Seite 83-119 in *Conservation Biology*: Foundations, Concepts, Applications. Springer Netherlands, Dordrecht.

D'Amico, D. J. und C. W. Donnelly. (2010). Microbiological quality of raw milk used for small-scale artisan cheese production in Vermont: effect of farm characteristics and practices. *Journal of Dairy Science* 93(1):134-147.

Dalmasso, M., S. Prestoz, V. Rigobello, und Y. Demarigny. (2008). Evolution of the Raw Cow Milk Microflora, Especially Lactococci,Enterococci, Leuconostocs and Lactobacilli over a Successive 12 Day Milking Regime. *International Journal of Dairy Science* 3(117-130).

De Jonghe, V., A. Coorevits, K. Van Hoorde, W. Messens, A. Van Landschoot, P. De Vos, und M. Heyndrickx. (2011). Influence of storage conditions on the growth of *Pseudomonas* species in refrigerated raw milk. *Applied and environmental microbiology* 77(2):460-470.

de Oliveira Pinto, C. L., S. G. Machado, M. L. Martins, und M. C. Dantas Vanetti. (2015). Identification of proteolytic psychrotrophic bacteria isolated from refrigerated raw milk and characterization of its spoilage potential. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes* 70(2):105-116.

Delbes, C., L. Ali-Mandjee, und M. C. Montel. (2007). Monitoring bacterial communities in raw milk and cheese by culture-dependent and -independent 16S rRNA gene-based analyses. *Applied and environmental microbiology* 73(6):1882-1891.

Desmasures, N., F. Bazin, und M. Gueguen. (1997). Microbiological composition of raw milk from selected farms in the Camembert region of Normandy. *Journal of applied microbiology* 83(1):53-58.

Desmasures, N. und M. Gueguen. (1997). Monitoring the microbiology of high quality milk by monthly sampling over 2 years. *The Journal of dairy research* 64(2):271-280.

Dowd, S. E., Y. Sun, P. R. Secor, D. D. Rhoads, B. M. Wolcott, G. A. James, und R. D. Wolcott. (2008). Survey of bacterial diversity in chronic wounds using pyrosequencing, DGGE, and full ribosome shotgun sequencing. *BMC microbiology* 8:43.

Doyle, C. J., D. Gleeson, P. W. O'Toole, und P. D. Cotter. (2017). Impacts of Seasonal Housing and Teat Preparation on Raw Milk Microbiota: a High-Throughput Sequencing Study. *Applied and environmental microbiology* 83(2):e02694-16.

Elmoslemany, A. M., G. P. Keefe, I. R. Dohoo, und R. T. Dingwell. (2009). Microbiological quality of bulk tank raw milk in Prince Edward Island dairy herds. *Journal of Dairy Science* 92(9):4239-4248.

Ercolini, D., F. Russo, I. Ferrocino, und F. Villani. (2009). Molecular identification of mesophilic and psychrotrophic bacteria from raw cow's milk. *Food microbiology* 26(2):228-231.

Ercolini, D., F. De Filippis, A. La Storia, und M. Iacono. (2012). "Remake" by high-throughput sequencing of the microbiota involved in the production of water buffalo mozzarella cheese. *Applied and environmental microbiology* 78(22):8142-8145.

EuropeanUnion. (2004). Verordnung (EG) 853/2004 Amtsblatt der Europäischen Union.

FAO. (2017). Milk, whole fresh cow producers. Vol. 2017.

Fehlings, K. und C. Baumgartner. (2016). Eutergesundheit. Seite 89-114 in *Milchkunde und Milchhygiene*. E. Märtlbauer und H. Becker, ed. Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart.

Ferrari, B., T. Winsley, M. Ji, und B. Neilan. (2014). Insights into the distribution and abundance of the ubiquitous candidatus Saccharibacteria phylum following tag pyrosequencing. *Scientific reports* 4(3957).

Fricker, M., B. Skanseng, K. Rudi, B. Stessl, und M. Ehling-Schulz. (2011). Shift from farm to dairy tank milk microbiota revealed by a polyphasic approach is independent from geographical origin. *International journal of food microbiology* 145 Suppl 1:S24-30.

GDV. 1999-2017. *Klima im Container*. G. d. D. V. e.V., ed, Berlin.

Giannino, M. L., M. Marzotto, F. Dellaglio, und M. Feligini. (2009). Study of microbial diversity in raw milk and fresh curd used for Fontina cheese production by culture-independent methods. *International journal of food microbiology* 130(3):188-195.

Glück, C., E. Rentschler, M. Krewinkel, M. Merz, M. von Neubeck, M. Wenning, S. Scherer, M. Stoeckel, J. Hinrichs, T. Stressler, und L. Fischer. (2016). Thermostability of peptidases secreted by microorganisms associated with raw milk. *International Dairy Journal* 56:186-197.

Gupta, V. K., S. Paul, und C. Dutta. (2017). Geography, Ethnicity or Subsistence-Specific Variations in Human Microbiome Composition and Diversity. *Frontiers in microbiology* 8:(1162).

Hall, B. G. (2013). Building phylogenetic trees from molecular data with MEGA. *Molecular biology and evolution* 30(5):1229-1235.

Hantsis-Zacharov, E. and M. Halpern. (2007). Culturable psychrotrophic bacterial communities in raw milk and their proteolytic and lipolytic traits. *Applied and environmental microbiology* 73(22):7162-7168.

Haselbach, A.-C. (2014). Aktuelle deutschlandweite Umfrage. in *Mittelstand Nachrichten* ARKM Online Verlag, Gummersbach.

Hassan, A. N. und J. F. Frank. (2011). Microorganisms associated with milk Seite 447-457 in *Encyclopedia of Dairy Sciences* (Second Edition). Academic Press, San Diego.

Helm, D., H. Labischinski, und D. Naumann. (1991). Elaboration of a procedure for identification of bacteria using Fourier-Transform IR spectral libraries: a stepwise correlation approach. *Journal of microbiological methods* 14(2):127-142.

Holm, C., L. Jepsen, M. Larsen, und L. Jespersen. (2004). Predominant microflora of downgraded Danish bulk tank milk. *Journal of Dairy Science* 87(5):1151-1157.

Hou, Q., H. Xu, Y. Zheng, X. Xi, L. Y. Kwok, Z. Sun, H. Zhang, und W. Zhang. (2015). Evaluation of bacterial contamination in raw milk, ultra-high temperature milk and infant formula using single molecule, real-time sequencing technology. *Journal of Dairy Science* 98(12):8464-8472.

Jayarao, B. M. und L. Wang. (1999). A study on the prevalence of gram-negative bacteria in bulk tank milk. *Journal of Dairy Science* 82(12):2620-2624.

Kable, M. E., Y. Srisengfa, M. Laird, J. Zaragoza, J. McLeod, J. Heidenreich, und M. L. Marco. (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):e00836-16.

Kim, O. S., Y. J. Cho, K. Lee, S. H. Yoon, M. Kim, H. Na, S. C. Park, Y. S. Jeon, J. H. Lee, H. Yi, S. Won, und J. Chun. (2012). Introducing EzBioCloud-e: a prokaryotic 16S rRNA gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 62(3):716-721.

Kim, M., H.-S. Oh, S.-C. Park, und J. Chun. (2014). Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 64(2):346-351.

Kümmerle, M., S. Scherer, und H. Seiler. (1998). Rapid and reliable identification of food-borne yeasts by Fourier-transform infrared spectroscopy. *Applied and environmental microbiology* 64(6):2(207-2214.

Lafarge, V., J. C. Ogier, V. Girard, V. Maladen, J. Y. Leveau, A. Gruss, und A. Delacroix-Buchet. (2004). Raw cow milk bacterial population shifts attributable to refrigeration. *Applied and environmental microbiology* 70(9):5644-5650.

Lagkouvardos, I., K. Klaring, S. S. Heinzmann, S. Platz, B. Scholz, K. H. Engel, P. Schmitt-Kopplin, D. Haller, S. Rohn, T. Skurk, und T. Clavel. (2015). Gut metabolites and bacterial community networks during a pilot intervention study with flaxseeds in healthy adult men. *Molecular nutrition & food research* 59(8):1614-1628.

Lagkouvardos, I., D. Joseph, M. Kapfhammer, S. Giritli, M. Horn, D. Haller, und T. Clavel. (2016). IMNGS: A comprehensive open resource of processed 16S rRNA microbial profiles for ecology and diversity studies. *Scientific reports* 6:33721.

Lagkouvardos, I., S. Fischer, N. Kumar, und T. Clavel. (2017). Rhea: a transparent and modular R pipeline for microbial profiling based on 16S rRNA gene amplicons. *PeerJ* 5:e2836.

Leriche, F. und K. Fayolle. (2012). No seasonal effect on culturable pseudomonads in fresh milks from cattle herds. *Journal of Dairy Science* 95(5):2299-2306.

Li, R. W., E. E. Connor, C. Li, R. L. Baldwin Vi, und M. E. Sparks. (2012). Characterization of the rumen microbiota of pre-ruminant calves using metagenomic tools. *Environmental microbiology* 14(1):129-139.

Lo, R., M. S. Turner, M. Weeks, und N. Bansal. (2016). Culture-independent bacterial community profiling of carbon dioxide treated raw milk. *International journal of food microbiology* 233:81-89.

Lucking, G., M. Stoeckel, Z. Atamer, J. Hinrichs, und M. Ehling-Schulz. (2013). Characterization of aerobic spore-forming bacteria associated with industrial dairy processing environments and product spoilage. *International journal of food microbiology* 166(2):270-279.

Machado, S. G., D. M. S. Bazzolli, und M. C. D. Vanetti. (2013). Development of a PCR method for detecting proteolytic psychrotrophic bacteria in raw milk. *International Dairy Journal* 29(1):8-14.

Machado, S. G., F. L. da Silva, D. M. Bazzolli, M. Heyndrickx, P. M. Costa, und M. C. Vanetti. (2015). *Pseudomonas* spp. and *Serratia liquefaciens* as Predominant Spoilers in Cold Raw Milk. *Journal of food science* 80(8):M1842-1849.

Machado, S. G., F. Bagliniere, S. Marchand, E. Van Coillie, M. C. Vanetti, J. De Block, und M. Heyndrickx. (2017). The Biodiversity of the Microbiota Producing Heat-Resistant Enzymes Responsible for Spoilage in Processed Bovine Milk and Dairy Products. *Frontiers in microbiology* 8:302.

Mallet, A., M. Guéguen, F. Kauffmann, C. Chesneau, A. Sesboué, und N. Desmasures. (2012). Quantitative and qualitative microbial analysis of raw milk reveals substantial diversity influenced by herd management practices. *International Dairy Journal* 27(1-2):13-21.

Marchand, S., K. Heylen, W. Messens, K. Coudijzer, P. De Vos, K. Dewettinck, L. Herman, J. De Block, und M. Heyndrickx. (2009). Seasonal influence on heat-resistant proteolytic capacity of *Pseudomonas lundensis* and *Pseudomonas fragi*, predominant milk spoilers isolated from Belgian raw milk samples. *Environmental microbiology* 11(2):467-482.

Masoud, W., M. Takamiya, F. K. Vogensen, S. Lillevang, W. A. Al-Soud, S. J. Sørensen, und M. Jakobsen. (2011). Characterization of bacterial populations in Danish raw milk cheeses made with different starter cultures by denaturating gradient gel electrophoresis and pyrosequencing. *International Dairy Journal* 21(3):142-148.

Masoud, W., F. K. Vogensen, S. Lillevang, W. Abu Al-Soud, S. J. Sorensen, und M. Jakobsen. (2012). The fate of indigenous microbiota, starter cultures, *Escherichia coli*, *Listeria innocua* and *Staphylococcus aureus* in Danish raw milk and cheeses determined by pyrosequencing and quantitative real time (qRT)-PCR. *International journal of food microbiology* 153(1-2):192-202.

Maszenan, A. M., R. J. Seviour, B. K. C. Patel, P. Schumann, und G. N. Rees. (1999). *Tessaracoccus bendigoensis* gen. nov., sp. nov., a Gram-positive coccus occurring in regular packages or tetrads, isolated from activated sludge biomass. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 49(2):459-468.

Maszenan, A. M., H. L. Jiang, J.-H. Tay, P. Schumann, R. M. Kroppenstedt, und S. T.-L. Tay. (2007). *Granulicoccus phenolivorans* gen. nov., sp. nov., a Gram-positive, phenol-degrading coccus isolated from phenol-degrading aerobic granules. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 57(4):730-737.

Mayo, B., C. T. Rachid, A. Alegria, A. M. Leite, R. S. Peixoto, und S. Delgado. (2014). Impact of next generation sequencing techniques in food microbiology. *Current genomics* 15(4):293-309.

Mellmann, A., K. Becker, C. von Eiff, U. Keckevoet, P. Schumann, und D. Harmsen. (2006). Sequencing and staphylococci identification. *Emerging infectious diseases* 12(2):333-336.

Miller, R. A., D. J. Kent, K. J. Boor, N. H. Martin, und M. Wiedmann. (2015). Different management practices are associated with mesophilic and thermophilic spore levels in bulk tank raw milk. *Journal of Dairy Science* 98(7):4338-4351.

MIV. (2016). Fakten Milch. B. Börgermann, ed. Milchindustrie-Verband, Berlin.

Mollet, C., M. Drancourt, und D. Raoult. (1997). *rpoB* sequence analysis as a novel basis for bacterial identification. *Molecular Microbiology* 26(5):1005-1011.

Montel, M. C., S. Buchin, A. Mallet, C. Delbes-Paus, D. A. Vuitton, N. Desmasures, und F. Berthier. (2014). Traditional cheeses: rich and diverse microbiota with associated benefits. *International journal of food microbiology* 177:136-154.

Murphy, M. A., M. R. Shariflou, und C. Moran. (2002). High quality genomic DNA extraction from large milk samples. *The Journal of dairy research* 69(4):645-649.

Neviani, E., B. Bottari, C. Lazzi, und M. Gatti. (2013). New developments in the study of the microbiota of raw-milk, long-ripened cheeses by molecular methods: the case of Grana Padano and Parmigiano Reggiano. *Frontiers in microbiology* 4:36.

O'Connell, A., P. L. Ruegg, K. Jordan, B. O'Brien, und D. Gleeson. (2016). The effect of storage temperature and duration on the microbial quality of bulk tank milk. *Journal of Dairy Science* 99(5):3367-3374.

O' Donnell, M. M., H. M. B. Harris, R. P. Ross, und P. W. O'Toole. (2017). Core fecal microbiota of domesticated herbivorous ruminant, hindgut fermenters, and monogastric animals. *MicrobiologyOpen* 6(5).

Oberreuter, H., H. Seiler, und S. Scherer. (2002). Identification of coryneform bacteria and related taxa by Fourier-transform infrared (FT-IR) spectroscopy. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 52(1):91-100.

Ogier, J. C., V. Lafarge, V. Girard, A. Rault, V. Maladen, A. Gruss, J. Y. Leveau, und A. Delacroix-Buchet. (2004). Molecular fingerprinting of dairy microbial ecosystems by use of temporal temperature and denaturing gradient gel electrophoresis. *Applied and environmental microbiology* 70(9):5628-5643.

Oikonomou, G., V. S. Machado, C. Santisteban, Y. H. Schukken, und R. C. Bicalho. (2012). Microbial diversity of bovine mastitic milk as described by pyrosequencing of metagenomic 16S rRNA. *PloS one* 7(10):e47671.

Pikuta, E. V., R. J. Menes, A. M. Bruce, Z. Lyu, N. B. Patel, Y. Liu, R. B. Hoover, H. J. Busse, P. A. Lawson, und W. B. Whitman. (2016). *Raineyella antarctica* gen. nov., sp. nov., a psychrotolerant, d-amino-acid-utilizing anaerobe isolated from two geographic locations of the Southern Hemisphere. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 66(12):5529-5536.

Porcellato, D., M. Aspholm, S. B. Skeie, M. Monshaugen, J. Brendehaug, und H. Mellegård. (2018). Microbial diversity of consumption milk during processing and storage. *International journal of food microbiology* 266(Supplement C):21-30.

Powers, E. M. (1995). Efficacy of the Ryu nonstaining KOH technique for rapidly determining gram reactions of food-borne and waterborne bacteria and yeasts. *Applied and environmental microbiology* 61(10):3756-3758.

Pudasaini, S., J. Wilson, M. Ji, J. van Dorst, I. Snape, A. S. Palmer, B. P. Burns, und B. C. Ferrari. (2017). Microbial Diversity of Browning Peninsula, Eastern Antarctica Revealed Using Molecular and Cultivation Methods. *Frontiers in microbiology* 8(591).

Quigley, L., O. O'Sullivan, T. P. Beresford, R. P. Ross, G. F. Fitzgerald, und P. D. Cotter. (2011). Molecular approaches to analysing the microbial composition of raw milk and raw milk cheese. *International journal of food microbiology* 150(2-3):81-94.

Quigley, L., R. McCarthy, O. O'Sullivan, T. P. Beresford, G. F. Fitzgerald, R. P. Ross, C. Stanton, und P. D. Cotter. (2013a). The microbial content of raw and pasteurized cow milk as determined by molecular approaches. *Journal of Dairy Science* 96(8):4928-4937.

Quigley, L., O. O'Sullivan, C. Stanton, T. P. Beresford, R. P. Ross, G. F. Fitzgerald, und P. D. Cotter. (2013b). The complex microbiota of raw milk. *FEMS microbiology reviews* 37(5):664-698.

Raats, D., M. Offek, D. Minz, und M. Halpern. (2011). Molecular analysis of bacterial communities in raw cow milk and the impact of refrigeration on its structure and dynamics. *Food microbiology* 28(3):465-471.

Rasolofo, E. A., D. St-Gelais, G. LaPointe, und D. Roy. (2010). Molecular analysis of bacterial population structure and dynamics during cold storage of untreated and treated milk. *International journal of food microbiology* 138(1-2):108-118.

Rodrigues, M. X., S. F. Lima, S. G. Canniatti-Brazaca, und R. C. Bicalho. (2017). The microbiome of bulk tank milk: Characterization and associations with somatic cell count and bacterial count. *Journal of Dairy Science* 100(4):2536-2552.

Scheldeman, P., A. Pil, L. Herman, P. De Vos, und M. Heyndrickx. (2005). Incidence and diversity of potentially highly heat-resistant spores isolated at dairy farms. *Applied and environmental microbiology* 71(3):1480-1494.

Scheldeman, P., L. Herman, S. Foster, und M. Heyndrickx. (2006). *Bacillus sporothermodurans* and other highly heat-resistant spore formers in milk. *Journal of applied microbiology* 101(3):542-555.

Schmidt, V. S., V. Kaufmann, U. Kulozik, S. Scherer, und M. Wenning. (2012). Microbial biodiversity, quality and shelf life of microfiltered and pasteurized extended shelf life (ESL) milk from Germany, Austria and Switzerland. *International journal of food microbiology* 154(1-2):1-9.

Scholz, C. F. und M. Kilian. (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. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 66(11):4422-4432.

Schumann, P. (2011). 5 - Peptidoglycan Structure. Seite 101-129 in *Methods in Microbiology*. Volume 38. R. Fred und O. Aharon, ed. Academic Press.

Seaby, R. und P. Henderson. (2006). Species diversity and richness version 4. Pisces Conservation Ltd., Lymington, England:123.

Shade, A. und J. Handelsman. (2012). Beyond the Venn diagram: the hunt for a core microbiome. *Environmental microbiology* 14(1):4-12.

Staneck, J. L. und G. D. Roberts. (1974). Simplified approach to identification of aerobic actinomycetes by thin-layer chromatography. *Applied microbiology* 28(2):226-231.

Stoeckel, M., M. Lidolt, V. Achberger, C. Glück, M. Krewinkel, T. Stressler, M. von Neubeck, M. Wenning, S. Scherer, L. Fischer, und J. Hinrichs. (2016). Growth of *Pseudomonas weihenstephanensis*, *Pseudomonas proteolytica* and *Pseudomonas* sp. in raw milk: Impact of residual heat-stable enzyme activity on stability of UHT milk during shelf-life. *International Dairy Journal* 59:20-28.

Stolz, A., H.-J. Busse, und P. Kämpfer. (2007). *Pseudomonas knackmussii* sp. nov. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 57(3):572-576.

Sugawara, Y., A. Ueki, K. Abe, N. Kaku, K. Watanabe, und K. Ueki. (2011). *Propioniciclava tarda* gen. nov., sp. nov., isolated from a methanogenic reactor treating waste from cattle farms. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 61(9):2298-2303.

Suzuki, M. T. und S. J. Giovannoni. (1996). Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR. *Applied and environmental microbiology* 62(2):625-630.

Tamura, K., G. Stecher, D. Peterson, A. Filipski und S. Kumar. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular biology and evolution* 30(12):2725-2729.

Tindall, B. J. (1990a). A Comparative Study of the Lipid Composition of *Halobacterium saccharovorum* from Various Sources. *Systematic and applied microbiology* 13(2):128-130.

Tindall, B. J. 1(990b). Lipid composition of *Halobacterium lacusprofundi*. *FEMS microbiology letters* 66(1):199-202.

Trentini, W. C. (1978). Biology of the Genus *Caryophanon*. *Annual Review of Microbiology* 32(1):123-123.

Vacheyrou, M., A. C. Normand, P. Guyot, C. Cassagne, R. Piarroux, und Y. Bouton. (2011). Cultivable microbial communities in raw cow milk and potential transfers from stables of sixteen French farms. *International journal of food microbiology* 146(3):253-262.

Verbarg, S., A. Fruhling, S. Cousin, E. Brambilla, S. Gronow, H. Lunsdorf, und E. Stackebrandt. (2008). *Biostraticola tofi* gen. nov., sp. nov., a novel member of the family *Enterobacteriaceae*. *Current microbiology* 56(6):603-608.

Verdier-Metz, I., V. Michel, C. Delbes, und M. C. Montel. (2009). Do milking practices influence the bacterial diversity of raw milk? *Food microbiology* 26(3):305-310.

Verdier-Metz, I., G. Gagne, S. Bornes, F. Monsallier, P. Veisseire, C. Delbes-Paus, und M. C. Montel. (2012). Cow teat skin, a potential source of diverse microbial populations for cheese production. *Applied and environmental microbiology* 78(2):326-333.

Vithanage, N. R., M. Dissanayake, G. Bolge, E. A. Palombo, T. R. Yeager, und N. Datta. (2016). Biodiversity of culturable psychrotrophic microbiota in raw milk attributable to refrigeration conditions, seasonality and their spoilage potential. *International Dairy Journal* 57:80-90.

von Neubeck, M., C. Baur, M. Krewinkel, M. Stoeckel, B. Kranz, T. Stressler, L. Fischer, J. Hinrichs, S. Scherer, und M. Wenning. (2015). Biodiversity of refrigerated raw milk microbiota and their enzymatic spoilage potential. *International journal of food microbiology* 211:57-65.

von Neubeck, M., C. Huptas, C. Glück, M. Krewinkel, M. Stoeckel, T. Stressler, L. Fischer, J. Hinrichs, S. Scherer, und M. Wenning. (2016). *Pseudomonas helleri* sp. nov. and *Pseudomonas weihenstephanensis* sp. nov., isolated from raw cow's milk. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 66(3):1163-1173.

von Neubeck, M., C. Huptas, C. Glück, M. Krewinkel, M. Stoeckel, T. Stressler, L. Fischer, J. Hinrichs, S. Scherer, und M. Wenning. (2017). *Pseudomonas lactis* sp. nov. and *Pseudomonas paralactis* sp. nov., isolated from bovine raw milk. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 67(6):1656-1664.

Weber, M., J. Geissert, M. Kruse, und A. Lipski. (2014). Comparative analysis of bacterial community composition in bulk tank raw milk by culture-dependent and culture-independent methods using the viability dye propidium monoazide. *Journal of Dairy Science* 97(11):6761-6776.

Wenning, M., F. Breitenwieser, R. Konrad, I. Huber, U. Busch, und S. Scherer. (2014). Identification and differentiation of food-related bacteria: A comparison of FTIR spectroscopy and MALDI-TOF mass spectrometry. *Journal of microbiological methods* 103:44-52.

Xu, P., W.-J. Li, S.-K. Tang, Y.-Q. Zhang, G.-Z. Chen, H.-H. Chen, L.-H. Xu, und C.-L. Jiang. (2005). *Naxibacter alkalitolerans* gen. nov., sp. nov., a novel member of the family '*Oxalobacteraceae*' isolated from China. International journal of systematic and evolutionary microbiology 55(3):1149-1153.

Yokota, A. (2014). The Family *Iamiaceae*. Seite 391-395 in *The Prokaryotes: Actinobacteria*. E. Rosenberg, E. F. DeLong, S. Lory, E. Stackebrandt, und F. Thompson, ed. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg.

Zangerl, P. (2016). Verderb durch Mikroorganismen. Seite 296-321 in *Milchkunde und Milchhygiene*. E. Märtlbauer und H. Becker, ed. Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart.

Zhang, D.-F., H.-F. Wang, Z.-J. Xiong, X.-P. Tian, L. Liu, X.-M. Zhang, Z. Jiang, S. Zhang, und W.-J. Li. (2014). *Mariniluteicoccus flavus* gen. nov., sp. nov., a new member of the family *Propionibacteriaceae*, isolated from a deep-sea sediment. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 64(3):1051-1056.

Zhao, J., L. A. Carmody, L. M. Kalikin, J. Li, J. F. Petrosino, P. D. Schloss, V. B. Young, und J. J. LiPuma. (2012). Impact of Enhanced *Staphylococcus* DNA Extraction on Microbial Community Measures in Cystic Fibrosis Sputum. *PloS one* 7(3):e33127.

DANKSAGUNG

Mein ausdrücklicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. Siegfried Scherer für die Überlassung des Themas, für die persönliche Betreuung und für das in mich gesetzte Vertrauen.

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

Danken möchte ich in erster Linie meiner Betreuerin, Dr. Mareike Wenning, für ihre ausgiebige Unterstützung. Dank ihrer herausragenden Expertise und konstruktiven Kritik konnte sie mich immer wieder bei der Durchführung der Analysen und der Erstellung dieser Disseration unterstützen. Vielen Dank Mareike für deine Zeit und Mühen, die Du in meine Arbeit investiert hast.

Auch mein früherer Vorgesetzter Herr Dr. Markus Albrecht hat maßgeblich daran mitgewirkt, dass diese Dissertation nun in dieser Form vorliegt. Vielen Dank, dass Sie mir die Möglichkeit gegeben haben, diese Dissertation beim Milchprüfring Baden-Württemberg e.V. an zu fertigen.

Ein besonderer Dank gilt meinen Kommilitonen Dr. Etienne Doll und Mario von Neubeck, durch deren Hilfe und Anregungen meine Arbeit kontinuierlich verbessert wurde. Bei Lisa Rieder, Sonja Dandl, Charon Fuhrmann und Petra Hartberger möchte ich mich für ihre Hilfsbereitschaft bedanken.

Danken möchte ich außerdem meinen Freunden und Bekannten, insbesondere Dr. Anja Mayr, die mir immer wieder Mut zu gesprochen haben. Ebenso gilt mein Dank Dr. Anne Bückle für das Korrekturlesen.

Tief verbunden und dankbar bin ich meinem Lebensgefährten Patrick, für seine Unterstützung und sein Verständnis.

Mein ganz besonderer Dank aber gilt meinen Eltern, die mich immer unterstützt haben und ohne die ich nicht da wäre, wo ich heute bin. Ihnen widme ich diese Arbeit.

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

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

Analyse der bakteriellen Biodiversität von boviner Rohmilch mittels kultureller und kulturunabhängiger Verfahren

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

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

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

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

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

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

Stuttgart, den _____ _____

Franziska Thekla Breitenwieser

LISTE DER VORVERÖFFENTLICHUNGEN

Präsentationen

“Mikrobielle Biodiversität in Rohmilch”, 13. Fachsymposium Lebensmittelmikrobiologie, Stuttgart, Deutschland, März 2012

„Biodiversity of raw milk microbiota on the example of two individual farms”, Dairy Conference 2013, Stuttgart, Deutschland, September 2013

“Stabilität und Variabilität von Rohmilchmikrobiota”, 16. Fachsymposium Lebensmittelmikrobiologie, Stuttgart, Deutschland, März 2016

Poster

“Betrachtung der Rohmilch-Mikroflora einzelner Höfe über den Verlauf mehrer Monate“, 12. Fachsymposium Lebensmittelmikrobiologie, Ostseebad Damp, Deutschland, Mai 2011

“Biodiversität von Rohmilchmikrobiota am Beispiel von zwei Einzelhöfen“, 14. Fachsymposium Lebensmittelmikrobiologie, Tutzing, Deutschland, April 2013

CURRICULUM VITAE

Franziska Thekla Breitenwieser

Persönliche Daten:

Geburtsdatum und -ort:	17.06.1985, München
Staatsangehörigkeit**:**	deutsch

Ausbildung:

11/2009 – 02/2017	**externe Promotion**, TU München, ZIEL - Institute for Food & Health, Lehrstuhl für Mikrobielle Ökologie in Zusammenarbeit mit Milchprüfring Baden-Württemberg e.V., Kirchheim unter Teck Doktorarbeit: „Analyse der bakteriellen Biodiversität von boviner Rohmilch mittels kultureller und kulturunabhängiger Verfahren“
10/2007 – 10/2009	**Masterstudium** Biologie, TU München Masterarbeit: „Identifizierung und Differenzierung Lebensmittel-relevanter Bakterien: ein Vergleich zwischen FT-IR Spektorskopie und MALDI-TOF Massenspektrometrie“
10/2004 - 09/2007	**Bachelorstudium** Biologie, TU München Bachelorarbeit: „Vergleich verschiedener molekularbiologischer Methoden zum Nachweis thermophiler *Campylobacter* spp. in Lebensmitteln“
09/1995 - 06/2004	**Abitur**, Werner-Heisenberg-Gymnasium, Garching bei München

Berufserfahrung

seit 04/2017	Microbiology specialist Food Safety, Tetra Holdings GmbH, Stuttgart
1/2009 – 02/2017	Leitung der Abteilung Mikrobiologie, Milchprüfring Baden-Württemberg e.V., Kirchheim unter Teck

ANHANG

Anhang Tabelle 1 Detailinformationen zu den einzelnen Rohmilchproben aller 21 Betriebe. 107

Anhang Tabelle 2 Verwendet Barcode-Primer für den MiSeq-Lauf und Übersicht über die Anzahl durchgeführter Ansätze pro Probe. 110

Anhang Tabelle 3 Ergebnisse der Qubit Messung und eingesetztes Volumen im MiSeq-Lauf. 110

Anhang Tabelle 4 Anzahl der erfassten Isolate pro Gattung und Probe bei der Analyse mit einer Stichprobengröße von 50 Isolaten 111

Anhang Tabelle 5 Prozentualer Anteil an Isolaten bzw. Reads pro detektierter Familie erfasst mittels kulturabhängiger - und kulturunabhängiger Analyse für Betriebe 4 und 6. 117

Anhang Tabelle 6 Ergebnisse der Substratverwertung für den Typstamm WS 4900^{T} und aller weiteren Stämme, die dieser potentiell neuen Gattung angehören. 119

Anhang Tabelle 7 Prozentualer Anteil der Isolate an den detektierten Arten mittels kulturabhängiger Analyse mit einer Stichprobengröße von 500 Isolaten für Betrieb 4. 121

Anhang Tabelle 8 Prozentualer Anteil der Isolate an den detektierten Arten mittels kulturabhängiger Analyse mit einer Stichprobengröße von 500 Isolaten für Betrieb 6. 123

Anhang Tabelle 9 Prozentualer Anteil der Isolate an den detektierten Arten mittels kulturabhängiger Analyse mit einer Stichprobengröße von 1500 Isolaten für Betrieb 4. 126

Anhang Tabelle 10 Prozentualer Anteil der Isolate an den detektierten Arten mittels kulturabhängiger Analyse mit einer Stichprobengröße von 1500 Isolaten für Betrieb 6. 129

Anhang Abbildung 1 Prozentualer Anteil der verschiedenen taxonomischen Großgruppen innerhalb der Mikrobiota aller 21 Betriebe.. 132

Anhang Abbildung 2 Verteilung des prozentualen Anteils der häufigsten Gattungen an der Mikrobiota für alle 21 Betriebe bei gemeinsamer Betrachtung aller Proben pro Betrieb 135

Anhang Tabelle 1 Detailinformationen zu den einzelnen Rohmilchproben aller 21 Betriebe. Probenahmedatum, Abholfrequenz in Tagen, Probenalter in Tagen bei Beginn der Analyse im Labor, Jahreszeit, somatische Zellzahl (SZZ) pro ml, Keimzahl pro ml und die Anzahl detektierter Gattungen. kA: keine Daten verfügbar.

Probe	Probenahme-datum	Abhol-frequenz [d]	Probenalter [d]	Jahreszeit	SZZ *10³/ml	Keimzahl KbE/ml	Anzahl Gattungen
1-1	17.11.2009	3	4	Herbst	201	kA	8
1-2	15.03.2010	3	4	Frühling	162	kA	8
1-3	06.10.2010	3	4	Herbst	84	5,20E+05	17
1-4	06.10.2011	3	4	Herbst	124	4,20E+06	9
2-1	03.12.2009	3	4	Winter	300	kA	15
2-2	03.03.2010	3	4	Frühling	273	kA	16
2-3	20.10.2010	3	4	Herbst	1186	6,10E+05	5
2-4	06.10.2011	3	4	Herbst	299	3,60E+05	10
4-1	13.10.2010	3	4	Herbst	222	5,30E+04	14
4-2	26.10.2010	3	4	Herbst	kA	8,80E+04	15
4-3	05.06.2012	2	2	Sommer	260	5,45E+04	11
4-4	29.10.2012	2	3	Herbst	363	1,20E+04	15
4-5	29.01.2013	2	2	Winter	497	8,50E+04	10
5-1	03.12.2009	3	4	Winter	160	kA	11
5-2	09.03.2010	3	3	Frühling	195	kA	8
5-3	20.10.2010	3	4	Herbst	128	5,00E+06	2
5-4	17.11.2011	3	4	Herbst	196	1,70E+04	12
6-1	09.12.2009	3	4	Winter	253	kA	15
6-2	05.06.2012	2	2	Sommer	317	2,98E+04	15
6-3	06.11.2012	2	3	Herbst	258	3,60E+04	12
6-4	29.01.2013	2	2	Winter	237	1,20E+05	13
6-5	24.02.2013	2	2	Winter	218	2,40E+04	13
7-1	17.11.2009	3	4	Herbst	184	kA	10
7-2	13.01.2010	3	4	Winter	261	kA	7
7-3	03.03.2010	2	3	Frühling	141	kA	14
7-4	12.10.2010	3	4	Herbst	kA	5,20E+04	17
7-5	11.10.2011	2	3	Herbst	kA	2,90E+04	14
8-1	26.11.2009	3	4	Herbst	144	kA	8
8-2	07.01.2010	3	4	Winter	kA	kA	16
8-3	15.02.2010	3	4	Winter	191	kA	7
8-4	07.10.2010	2	2	Herbst	kA	2,50E+05	11
8-5	16.11.2011	2	2	Herbst	239	2,85E+04	14
9-1	03.12.2009	3	4	Winter	271	kA	16
9-2	20.01.2010	3	4	Winter	201	kA	15
9-3	09.03.2010	3	3	Frühling	209	kA	12
9-4	06.10.2010	3	4	Herbst	317	4,50E+04	17
9-5	10.10.2011	3	4	Herbst	kA	1,60E+04	9

Probe	Probenahme-datum	Abhol-frequenz [d]	Probenalter [d]	Jahreszeit	SZZ *10³/ml	Keimzahl KbE/ml	Anzahl Gattungen
10-1	10.05.2010	3	4	Frühling	275	kA	11
10-2	30.06.2010	3	4	Sommer	283	2,50E+06	9
10-3	25.10.2010	3	4	Herbst	kA	1,10E+05	14
10-4	29.05.2011	3	4	Frühling	277	3,60E+05	9
10-5	23.05.2012	3	4	Frühling	173	5,30E+04	13
11-1	10.05.2010	3	4	Frühling	299	kA	11
11-2	30.06.2010	3	4	Sommer	407	1,00E+06	8
11-3	25.10.2010	3	4	Herbst	kA	6,00E+04	16
11-4	29.05.2011	3	4	Frühling	330	6,20E+05	5
11-5	06.03.2012	2	3	Frühling	444	6,00E+05	4
12-1	10.05.2010	3	4	Frühling	282	kA	11
12-2	25.10.2010	3	4	Herbst	kA	5,30E+04	20
12-3	28.06.2011	3	4	Sommer	280	1,90E+05	8
12-4	22.12.2011	3	4	Winter	kA	3,60E+04	14
13-1	13.09.2010	3	4	Herbst	kA	1,50E+05	11
13-2	03.11.2010	3	4	Herbst	262	6,50E+04	6
13-3	28.06.2011	3	4	Sommer	187	4,20E+05	7
13-4	06.03.2012	3	4	Frühling	232	7,95E+04	8
14-1	07.06.2010	3	3	Sommer	153	kA	10
14-2	09.07.2010	3	4	Sommer	230	8,00E+04	5
14-3	26.10.2010	3	4	Herbst	kA	1,40E+05	14
14-4	12.05.2011	3	3	Frühling	kA	1,70E+04	12
14-5	15.02.2012	3	4	Winter	235	2,50E+04	10
15-1	01.07.2010	3	4	Sommer	195	2,50E+06	4
15-2	20.10.2010	3	4	Herbst	223	1,80E+06	2
15-3	12.05.2011	3	3	Frühling	kA	6,00E+04	12
15-4	10.01.2012	3	4	Winter	196	4,30E+04	16
16-1	07.06.2010	3	3	Sommer	240	kA	9
16-2	01.07.2010	3	4	Sommer	206	3,00E+06	6
16-3	20.10.2010	3	4	Herbst	181	1,90E+05	7
16-4	12.05.2011	3	3	Frühling	kA	2,00E+05	12
16-5	10.01.2012	3	4	Winter	139	7,70E+04	7
17-1	16.06.2010	3	4	Sommer	332	kA	15
17-2	17.10.2010	3	4	Herbst	102	2,80E+05	13
17-3	07.11.2010	3	4	Herbst	85	6,70E+04	10
17-4	12.05.2011	3	3	Frühling	kA	1,20E+05	10
17-5	15.02.2012	3	4	Winter	182	1,60E+05	11
18-1	16.06.2010	3	4	Sommer	83	kA	11
18-2	21.09.2010	2	3	Herbst	kA	kA	3
18-3	8.11.2010	2	3	Herbst	191	2,50E+04	14

Probe	Probenahme-datum	Abhol-frequenz [d]	Probenalter [d]	Jahreszeit	SZZ *10³/ml	Keimzahl KbE/ml	Anzahl Gattungen
18-4	03.05.2011	2	3	Frühling	kA	2,70E+05	5
18-5	21.12.2011	2	3	Winter	150	1,30E+05	12
19-1	16.11.2010	3	4	Herbst	111	3,40E+05	8
19-2	28.12.2010	3	4	Winter	261	1,90E+05	7
19-3	18.05.2011	3	4	Frühling	kA	5,30E+04	12
19-4	27.09.2011	3	4	Herbst	kA	2,20E+05	6
19-5	10.01.2012	3	4	Winter	203	1,90E+05	4
20-1	22.11.2010	2	3	Herbst	127	5,00E+03	15
20-2	28.12.2010	2	3	Winter	258	3,00E+05	5
20-3	20.06.2011	2	3	Sommer	148	3,31E+05	6
20-4	26.09.2011	2	3	Herbst	kA	4,90E+04	14
20-5	23.04.2012	2	3	Frühling	178	8,50E+04	12
21-1	22.11.2010	2	3	Herbst	86	2,60E+05	7
21-2	20.06.2011	2	3	Sommer	211	2,60E+05	8
21-3	26.09.2011	2	3	Herbst	kA	3,90E+04	8
21-4	17.11.2011	2	3	Herbst	61	3,60E+04	18
21-5	15.02.2012	2	3	Winter	333	8,40E+04	14
22-1	16.04.2010	2	2	Frühling	105	kA	15
22-2	03.08.2010	2	2	Sommer	kA	9,90E+04	6
22-3	04.10.2010	2	3	Herbst	49	5,80E+03	14
22-4	10.05.2011	2	2	Frühling	kA	2,30E+04	10
22-5	24.08.2011	2	3	Sommer	101	2,00E+04	6

Anhang Tabelle 2 Verwendet Barcode-Primer für den MiSeq-Lauf und Übersicht über die Anzahl durchgeführter Ansätze pro Probe.

Probe	Index 1	Index 2	Ansatz	reverse Primer	forward Primer
Betrieb 6-1	CGAAGTAT	TAGTGTAG	12-fach	785R-ovh-HTS-SB702	341F-ovh-HTS-SC508
Betrieb 6-2	TAGCAGCT	TAGTGTAG	12-fach	785R-ovh-HTS-SB703	341F-ovh-HTS-SC508
Betrieb 6-3	TCTCTATG	TAGTGTAG	10-fach	785R-ovh-HTS-SB704	341F-ovh-HTS-SC508
Betrieb 6-4	CGAGAGTT	AAGCAGCA	12-fach	785R-ovh-HTS-SA701	341F-ovh-HTS-SD501
Betrieb 6-5	TAGTCTCC	AAGCAGCA	10-fach	785R-ovh-HTS-SA707	341F-ovh-HTS-SD501
Betrieb 6-6	CGAGCGAC	AAGCAGCA	12-fach	785R-ovh-HTS-SA708	341F-ovh-HTS-SD501
Betrieb 4-1	ACGCTACT	AAGCAGCA	6-fach	785R-ovh-HTS-SA703	341F-ovh-HTS-SD501
Betrieb 4-2	ACTCACTG	AAGCAGCA	6-fach	785R-ovh-HTS-SA704	341F-ovh-HTS-SD501
Betrieb 4-3	TGAGTACG	AAGCAGCA	10-fach	785R-ovh-HTS-SA705	341F-ovh-HTS-SD501

Anhang Tabelle 3 Ergebnisse der Qubit Messung und eingesetztes Volumen im MiSeq-Lauf. Pro Probe wurden 2 nM bakterielle DNA benötigt.

Probe	Messung 1 [ng/µl]	Messung 2 [ng/µl]	Messung 3 [ng/µl]	Mittelwert [ng/µl]	Menge bakterieller DNA [nM]	eingesetztes Volumen Probe [µl]	eingesetztes Volumen Wasser [µl]
Betrieb 6-1	0,636	0,659	0,66	0,652	1,753	4,56	
Betrieb 6-2	0,574	0,584	0,584	0,581	1,562	5,12	
Betrieb 6-3	0,477	-	0,498	0,488	1,311	6,10	
Betrieb 6-4	0,498	0,507	0,506	0,504	1,355	5,91	
Betrieb 6-5	0,547	0,559	0,555	0,554	1,489	5,37	
Betrieb 6-6	-	0,677	0,683	0,680	1,829	4,37	
Betrieb 4-1	0,722	0,73	0,736	0,729	1,962	4,08	
Betrieb 4-2	0,787	0,803	0,803	0,798	2,145	9,32	0,678
Betrieb 4-3	0,646	0,656	0,662	0,655	1,761	4,54	

Anhang Tabelle 4 Anzahl der erfassten Isolate pro Gattung und Probe (Betrieb-Probennummer) bei der Analyse mit einer Stichprobengröße von 50 Isolaten (n=99). Je dunkler eine Zelle hinterlegt ist, desto mehr Isolate wurden von der entsprechenden Gattung isoliert. Gattungsname in Klammer: am nächsten verwandte Gattung.

	1-1	1-2	1-3	1-4	2-1	2-2	2-3	2-4	4-1	4-2	4-3	4-4	4-5	5-1	5-2	5-3	5-4	6-1	6-2	6-3	6-4	6-5	7-1	7-2	7-3	7-4	7-5	8-1	8-2	8-2	8-4	8-5	9-1	9-2	9-3	9-4	9-5	10-1	10-2	10-3	10-4	10-5	11-1	11-2	11-3	11-4	11-5
Pseudomonas	27	36	1			3		1	2					6	36	5	6	2		1		1	22	18	19	1		9	23	38	1			1	4	25	22	12	21	20			29	1	6		
Acinetobacter			17	1			35	4				1		1	7	45		5	1	2				14	1		2	16		6	16	1	2					16	17	2	37	10		2	1	31	
Corynebactreium	11	4	11	1	14	6			12	9	6	5	4	17	1		9	8	11	24	2	21	4	3	8	12	6		3		3		2	3	1		1	3	1	6		1	2		1	1	1
Staphylococcus	1	1			14	12	1	5	3	5	16	12	22	7	1			1		1	16	3	9	1	1	4	9	3	3		13	2	1	3	1	5	8			3	1	1		10	6			
Lactococcus			1				3	4									19	5	3			1	2			1	1			2	2	6							5	1	4		6	28		9	
Microbactrium				11					2			5					1	1								1			1		13		2	5	1	5		1						12		
Chryseobacterium			1	10			11	30		12				2			1	5		4		1			1	1			3						2				1		1	4			6	20
Janibacter			1						14	7	14	10	5								9		2		7	9	9	1		1			4		1	1	7				1		1	1				
Streptococcus												1	3						12		1	3					1						2					2	1		1	1		2	3	27
Kocuria		1	2	20		1		1				2		4			2	13	2	1		2	2		1	2					2	4	2	1				1				1		1			
Hefe /Schimmel					1	7					1						1									2					2		11	20	21						1					
Aerococcus	6		3			4								6			2	2	3	5	2	12					1			1		1					1				2	1					
Brevibacterium	1	1			2					1		2	1		1				4		1		4	1	1	2	5	1							3	1			1		1			1				
Arthrobacter			1		1	2			1			1							3				1						1			4		7							15						
Brachybacterium			1		2				1	3	2	4	3	2	1						2		2	2	4	5	4		1				2		1					4		2		1				
Rhodococcus		2		1							1			2											1	2			1						1			1		1	1					
Stenotrophomonas	2				1			2						2				1							1						1	1		2									3			
Lactobacillus													8								2						1						1			1										
Enterococcus				2	1	1								1					2									2			1		2	1	1			2								
Pseudoclavibacter			1							1					1														4		1		2	1	1										
Brevundimonas													1								10																	1		1	3				4		1
Rothia						1													2			1											11												
Dietzia			2								1														1	2			1							2										
Isoptericola									2	1	2		2								1													1	2	1	1									
Ornithinimicrobium											1						2				1		2										1														
Bacillus	1							1				1	1						1																												
Enterobacter																												10		1								1									
Luteimonas									2	3	2	2																						1												
Frigobacterium																																										12			1		
Halomonas																								11																							
Ochrobactrum																																															
Sphingobacterium												1							1							1			2		2									1						
Alcaligenes																		1																				3		1							
Gordonia																									1													1		1	1		1				
Jeotgalicoccus			2			1		1																		1			1			1													
gen. nov. *(Facklamia)*										2												1																								
Moraxella				2	3	1											2																										1				
Cellulomonas					1			1		1																1	3																			

Fortsetzung Anhang Tabelle 4

	1-1	1-2	1-3	1-4	2-1	2-2	2-3	2-4	4-1	4-2	4-3	4-4	4-5	5-1	5-2	5-3	5-4	6-1	6-2	6-3	6-4	6-5	7-1	7-2	7-3	7-4	7-5	8-1	8-2	8-2	8-4	8-5	9-1	9-2	9-3	9-4	9-5	10-1	10-2	10-3	10-4	10-5	11-1	11-2	11-3	11-4	11-5
Micrococcus																	1	1																													
Rhizobium						2									1																													3			
Brochothrix																																															
Leuconstoc							2																				2									1										
Macrococcus																																															
Sphingomonas									1																				2														2			
Carnobacterium																																														
Luteococcus																			3	1		1																							
gen. nov. *(Trichococcus)*			1																						1										1										
Clavibacter																																														
Escherichia																				1														1										
Facklamia																			1																										
Klebsiella																																														
Mesorhizobium									2																									1											
gen. nov. *(nicht eindeutig)*		1																																												
Paenibacillus																		1														1	1													
Aeromonas																														1																
Curtobacterium																																										1				
Delftia						1														1																									
Knoellia																																											1			
Leucobacter					2	1																																							
Nesternkonia																																														
gen. nov. *(Auraticoccus)*																																				1										
Paracocccus																																	1											1		
Plantibacter																													1																
Propionibacterium									1																								1											
Tessaracoccus																																														
Acidovorax																																														
Flavobacterium																																2														
Hafnia																																							1		1					
Naumannella					2																																									
gen. nov. *(Isoptericola)*			1							1																																				
gen. nov. *(Sphingobacterium)*																					1																										

Fortsetzung Anhang Tabelle 4

	1-1	1-2	1-3	1-4	2-1	2-2	2-3	2-4	4-1	4-2	4-3	4-4	4-5	5-1	5-2	5-3	5-4	6-1	6-2	6-3	6-4	6-5	7-1	7-2	7-3	7-4	7-5	8-1	8-2	8-2	8-4	8-5	9-1	9-2	9-3	9-4	9-5	10-1	10-2	10-3	10-4	10-5	11-1	11-2	11-3	11-4	11-5
Serratia	1	1																																													
Aeromicrobium																																1																
Agreia																																													1			
Agrococcus																																																
Aquamicrobium					1																																											
Cellulosimicrobium																																	1															
Citrobacter																																						1										
Elizabethkingia																																																
Epilithonimonas																													1																		
Herminiimonas																																1															
Kytococcus			1																																													
Mycobacterium																										1																						
gen. nov. *(Chryseobacterium)*																																																
gen. nov. *(Flavobacterium)*																																																
gen. nov. *(Georgenia)*																																																
gen. nov. *(Novosphingobium)*																		1																																
gen. nov. *(Propionibacterium)*																																																
gen. nov. *(Pseudomonas)*					1																																											
Novosphingobium																																																
Ornithinicoccus											1																																					
Ottowia																																																
Phyllobacterium																																																
Pseudoxanthomonas																																																
Psychrobacter																																																
Rathayibacter																		1																															
Roseomonas										1																																						
Tepidimonas																																																
Terrabacter																																																
Tetragenococcus																																																
Thermomonas																																				1												
Wautersiella																																																

Fortsetzung Anhang Tabelle 4

	12-1	12-2	12-3	12-4	13-1	13-2	13-3	13-4	14-1	14-2	14-3	14-4	14-5	15-1	15-2	15-3	15-4	16-1	16-2	16-3	16-4	16-5	17-1	17-2	17-3	17-4	17-5	18-1	18-2	18-3	18-4	18-5	19-1	19-2	19-3	19-4	19-5	20-1	20-2	20-3	20-4	20-5	21-1	21-2	21-3	21-4	21-5	22-1	22-2	22-3	22-4	22-5
Pseudomonas	2		5		21	13	2	19	7	45		23	35	39	46		14	16	21	27	8	2	3	1	31		10	35	11	2	35		31	1	13	4	14	7		37		8	37		1	3	7	19	2		22	4
Acinetobacter		2	19				2	10	23			1		1	4	27		6		1	11	33		9		12			37	1	9		4		6		1	2	2	2				6	42		6	3	29	8	2	8
Corynebactreium	1	12	1	13	4			6	5	1	23	3	1			2	1					2	1	2	2	1	3	5	2	12	2	10		1		1		9			10	17				1		7		6	1	9
Staphylococcus		4		10	2	8	17		2	2	6	3	4			1	1						5	4		1	26	1		1		6	4		1		3	2		1	3				1	1	4			1	
Lactococcus	32		13				7										4			2	10			3		23	2							4	16	19	11				4			13		1			2	
Microbactrium				1		21					5	1	1			5		18	4	2	8	3	5	22	3	2		1		2		1			1		1				1		1	1	3	1	1	3	1	21
Chryseobacterium	1	1									1	8												1						2			2			13					4	8		15			6	1				
Janibacter	2	7		3					4	1	1	5	1			1	3						18	2	5	4	1							4						1											
Streptococcus		1		1	2		6	4					3	3			1															1	13	1	5	4	43	2			4				1						
Kocuria			1		12	1		2		1	1						1	1	2		2			1	1			1		4		6						4	1			2		5		5	5	1		11	1	
Hefe /Schimmel	2		1			4	6													2	2	2				1				8		4			1			2			3		1							2
Aerococcus	2				1				1																		1	2									3			10				1		1				
Brevibacterium	1			5				2	2		1										1		1		2	1					13										1				1					
Arthrobacter				1												3	6										2	1				1					2			8	3									
Brachybacterium		2		1	1						1	2	1			1					1																								1		1			
Rhodococcus		1									2											4	1						1	2													14	11					
Stenotrophomonas		1	5				3		1							1							2					1															2		1	2	6		6	
Lactobacillus	1	2		2					2								1						2										1	2					1					9				
Enterococcus													1	5					1				1								1	2					4	2			1	1							
Pseudoclavibacter				1													6				1																				7	3							
Brevundimonas		2																																													1				
Rothia																4				1	2																															
Dietzia					1						1	1				2		1					1				1						2										1				1					
Isoptericola									1		1												1		1		1																									
Ornithinimicrobium				1																			1	1		4	2																								
Bacillus																		1					2							3		2									1											
Enterobacter																															2																				
Luteimonas		1										1												1																								1				
Frigobacterium																																																				
Halomonas																	1																										1									
Ochrobactrum								1																																				1	1	1					8	
Sphingobacterium											1	1									2																															
Alcaligenes		6																																																	
Gordonia				1							4																														1										
Jeotgalicoccus																	1											1												1										
gen. nov. *(Facklamia)*					3																							1				1					1			1									
Moraxella																																																		
Cellulomonas											1																																							

Fortsetzung Anhang Tabelle 4

	12-1	12-2	12-3	12-4	13-1	13-2	13-3	13-4	14-1	14-2	14-3	14-4	14-5	15-1	15-2	15-3	15-4	16-1	16-2	16-3	16-4	16-5	17-1	17-2	17-3	17-4	17-5	18-1	18-2	18-3	18-4	18-5	19-1	19-2	19-3	19-4	19-5	20-1	20-2	20-3	20-4	20-5	21-1	21-2	21-3	21-4	21-5	22-1	22-2	22-3	22-4	22-5
Micrococcus																	1	2												1										1													
Rhizobium																																													1								
Brochothrix																																3										1	1	1								
Leuconstoc	1																																																				
Macrococcus			6																																																		
Sphingomonas		1																																																			
Carnobacterium																																											5									
Luteococcus																																																				
gen. nov. *(Trichococcus)*												1																										1															
Clavibacter																								1																									3					
Escherichia																																																				2
Facklamia													1																													1						1					
Klebsiella																																		3														1					
Mesorhizobium				1																																																	
gen. nov. *(nicht eindeutig)*																																						1			2											
Paenibacillus																																							1													
Aeromonas																																																	2			
Curtobacterium																							1	1																														
Delftia																																																	1			
Knoellia																																						1								1					
Leucobacter																																																				
Nesternkonia																																																	3			
gen. nov. *(Auraticoccus)*																																																	2			
Paracocccus																					1																																
Plantibacter	1	1																																																		
Propionibacterium																														1																					
Tessaracoccus																																		3																	
Acidovorax		1																					1																													
Flavobacterium																																																			
Hafnia																																																			
Naumannella																																																			
gen. nov. *(Isoptericola)*																																																			
gen. nov. *(Sphingobacterium)*					1																																														

Fortsetzung Anhang Tabelle 4

	12-1	12-2	12-3	12-4	13-1	13-2	13-3	13-4	14-1	14-2	14-3	14-4	14-5	15-1	15-2	15-3	15-4	16-1	16-2	16-3	16-4	16-5	17-1	17-2	17-3	17-4	17-5	18-1	18-2	18-3	18-4	18-5	19-1	19-2	19-3	19-4	19-5	20-1	20-2	20-3	20-4	20-5	21-1	21-2	21-3	21-4	21-5	22-1	22-2	22-3	22-4	22-5
Serratia																																																					
Aeromicrobium																																																					
Agreia																																																					
Agrococcus																																													1							
Aquamicrobium																																																				
Cellulosimicrobium																																																				
Citrobacter																																																				
Elizabethkingia																																																		1		
Epilithonimonas																																																			
Herminiimonas																																																			
Kytococcus																																																			
Mycobacterium																																																			
gen. nov. *(Chryseobacterium)*		1																																																		
gen. nov. *(Flavobacterium)*																										1																											
gen. nov. *(Georgenia)*																									1																											
gen. nov. *(Novosphingobium)*																																																				
gen. nov. *(Propionibacterium)*																																			1																		
gen. nov. *(Pseudomonas)*																																																				
Novosphingobium																								1																												
Ornithinicoccus																																																			
Ottowia																																																1				
Phyllobacterium																																																			1	
Pseudoxanthomonas																																														1						
Psychrobacter																																										1										
Rathayibacter																																																			
Roseomonas																																																			
Tepidimonas																																																		1		
Terrabacter																	1																																				
Tetragenococcus																																															1				
Thermomonas																																																			
Wautersiella		1																																																	

Anhang Tabelle 5 Prozentualer Anteil an Isolaten bzw. Reads pro detektierter Familie erfasst mittels kulturabhängiger - (1500 Isolate) und kulturunabhängiger Analyse (Illumina Sequenzierung) für Betriebe 4 und 6.

	Betrieb 4		**Betrieb 6**	
	Kultur-unabhängig	Kultur-abhängig	Kultur-unabhängig	Kultur-abhängig
Acetobacteraceae			0,100%	1,089%
Acholeplasmataceae	0,160%			
Acidaminococcaceae	0,234%		0,096%	
Acidimicrobiaceae	0,090%		0,063%	
Acidimicrobineae	0,097%		0,004%	
Actinomycetaceae	0,210%		0,723%	0,091%
Aerococcaceae	3,793%	2,983%	9,278%	6,897%
Alcaligenaceae	0,698%		0,042%	
Bacillaceae	1,339%		1,664%	1,361%
Bacteroidaceae	0,644%		0,113%	
Bdellovibrionaceae			0,088%	
Beutenbergiaceae			0,035%	0,091%
Bifidobacteriaceae	0,180%		2,726%	0,272%
Blastocatellaceae	0,003%		0,086%	
Bogoriellaceae	0,264%	0,136%	0,013%	
Bradyrhizobiaceae	0,007%		0,284%	0,454%
Brevibacteriaceae	0,708%	2,441%	0,240%	0,363%
Brucellaceae	0,003%		0,040%	0,544%
Burkholderiaceae	0,030%		1,168%	
Burkholderiales_incertae_sedis			0,077%	
Carnobacteriaceae	2,357%	0,068%	2,182%	
Caulobacteraceae	0,027%	0,203%	0,431%	1,270%
Cellulomonadaceae	0,414%		0,010%	
Cellvibrionaceae	0,050%			
Chitinophagaceae			0,263%	0,181%
Clostridiaceae	0,651%		0,268%	
Clostridiales_Incertae Sedis XI	0,808%		0,991%	
Clostridiales_Incertae Sedis XII	1,155%		0,144%	
Clostridiales_Incertae Sedis XIII	0,147%		0,084%	
Comamonadaceae	0,260%	0,339%	0,830%	1,180%
Coriobacteriaceae	0,210%		0,153%	
Corynebacteriaceae	9,883%	8,542%	10,672%	12,886%
Cryomorphaceae	0,190%			
Cyclobacteriaceae	0,043%		0,002%	
Cytophagaceae			0,140%	
Demequinaceae	0,147%		0,002%	
Dermabacteraceae	1,205%	3,119%	1,718%	1,996%
Dermacoccaceae	0,010%		0,036%	0,635%
Dermatophilaceae	0,047%			
Desulfobulbaceae	0,043%			
Desulfovibrionaceae	0,080%		0,013%	
Dietziaceae	0,835%	1,559%	0,163%	
Enterobacteriaceae	0,120%	0,203%	0,067%	
Enterococcaceae	0,117%	0,746%	0,452%	1,180%
Erysipelotrichaceae	0,441%		0,249%	
Eubacteriaceae	0,461%		0,372%	
Flavobacteriaceae	6,928%	0,203%	1,588%	3,630%
Gemmatimonadaceae	0,057%			
Halomonadaceae	0,107%		0,025%	
Hyphomicrobiaceae	0,277%		0,008%	0,091%

	Betrieb 4		Betrieb 6	
	Kultur-unabhängig	Kultur-abhängig	Kultur-unabhängig	Kultur-abhängig
Iamiaceae	1,232%		0,019%	
Intrasporangiaceae	6,270%	3,390%	0,253%	0,091%
Jonesiaceae		0,339%		
Lachnospiraceae	5,439%		4,201%	
Lactobacillaceae	0,040%	0,407%	0,830%	1,089%
Leptotrichiaceae	0,083%			
Leuconostocaceae	0,588%	1,627%	0,245%	
Marinilabiliaceae	0,127%		0,006%	
Methylobacteriaceae	0,090%		0,033%	
Microbacteriaceae	1,142%	11,593%	0,987%	31,670%
Micrococcaceae	1,746%	1,017%	5,374%	4,900%
Moraxellaceae	1,366%	0,203%	1,283%	0,544%
Morganellaceae		0,068%		
Mycobacteriaceae				0,363%
Neisseriaceae			0,163%	
Nocardiaceae	0,260%	6,780%	0,224%	0,272%
Nocardioidaceae	0,337%	0,068%	0,048%	1,452%
Oceanospirillaceae	0,257%		0,012%	
Paenibacillaceae		0,068%		0,272%
Parachlamydiaceae			0,033%	
Patulibacteraceae	0,073%		0,002%	0,181%
Peptoniphilaceae	0,007%		0,742%	
Peptostreptococcaceae	0,534%		0,671%	
Phyllobacteriaceae	0,210%		0,035%	0,181%
Planctomycetaceae	0,254%		0,036%	
Planococcaceae	0,270%		14,599%	0,181%
Porphyromonadaceae	0,865%		0,042%	
Prevotellaceae	0,050%		0,004%	
Prolixibacteraceae	0,040%			
Promicromonosporaceae	1,219%	1,831%	0,006%	0,091%
Propionibacteriaceae		0,949%		0,544%
Pseudomonadaceae	3,085%	0,271%	2,899%	1,180%
Rhizobiaceae	0,060%		2,027%	4,809%
Rhodobacteraceae	1,052%	0,068%	0,420%	0,091%
Rhodocyclaceae	2,247%		0,176%	
Rikenellaceae	0,411%		0,073%	
Ruminococcaceae	7,479%		3,595%	
Saccharibacteria_ genera_incertae_sedis	1,129%		1,033%	
Sphaerobacteraceae	2,257%		0,017%	
Sphingobacteriaceae	0,117%	0,068%	0,052%	0,544%
Sphingomonadaceae	0,137%	0,136%	0,972%	
Staphylococcaceae	11,339%	37,966%	5,451%	2,722%
Streptococcaceae	2,755%	6,441%	8,787%	6,171%
Streptomycetaceae	0,043%			
Trueperaceae	0,518%		0,031%	
Tsukamurellaceae				0,091%
Veillonellaceae	0,043%		0,004%	
Verrucomicrobiaceae	0,134%		0,326%	
Victivallaceae	0,037%			
Xanthomonadaceae	2,050%	4,407%	1,896%	7,985%
keine Zuordnung	7,075%	1,763%	4,688%	0,363%

Anhang Tabelle 6 Ergebnisse der Substratverwertung für den Typstamm WS 4900^T und aller weiteren Stämme, die dieser potentiell neuen Gattung angehören.

Substrat	WS 4900^T	WS 4901	WS 4902	WS 4904	WS 4684	WS 4769	WS 4882	WS 4883
Glycerol	+	+	+	+	+	+	+	+
Erythritol	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Arabinose	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Arabinose	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Ribose	-	-	-	+	+	-	+	+
D-Xylose	+	+	+	+	+	+	+	+
L-Xylose	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Adonitol	-	-	-	-	-	-	-	-
Methyl-ßD-Xylopyranose	+	+	+	-	-	-	-	-
D-Galactose	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Fructose	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Mannose	+	+	+	+	+	+	+	+
L-Sorbose	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Rhamnose	-	-	-	-	-	-	-	-
Dulcitol	-	-	-	-	-	-	-	-
Inositol	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Mannitol	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Sorbitol	-	-	-	-	-	-	-	-
Methyl-αD-Mannoside	-	-	-	-	-	-	-	-
Methyl-αD-Glucoside	+	+	+	+	+	+	+	+
N-Acetylglucosamine	-	-	-	+	-	-	-	-
Amygdalin	-	-	-	-	-	-	-	-
Arbutin	+	+	+	+	+	+	+	+
Eisencitrat	+	+	+	+	+	+	+	+
Salicin	+	+	+	+	-	+	+	+
D-Cellobiose	-	-	-	-	-	+	-	-
D-Maltose	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Lactose	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Melibiose	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Sucrose	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Trehalose	+	+	+	+	+	+	+	+
Inulin	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Melezitose	+	+	+	+	+	+	+	+

Substrat	WS 4900^T	WS 4901	WS 4902	WS 4904	WS 4684	WS 4769	WS 4882	WS 4883
D-Raffinose	-	-	-	-	-	-	-	+
Harnstoff	-	-	-	-	-	-	-	-
Glycogen	-	-	-	-	-	-	-	-
Xylit	-	-	-	-	-	-	-	-
Gentiobiose	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Turanose	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Lyxose	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Tagatose	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Fucose	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Fucose	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Arabitol	+	+	+	+	+	+	+	+
L-Arabitol	-	-	-	-	-	-	-	-
Kalium-Gluconat	-	-	-	-	-	-	-	-

Anhang Tabelle 7 Prozentualer Anteil der Isolate an den detektierten Arten mittels kulturabhängiger Analyse mit einer Stichprobengröße von 500 Isolaten für Betrieb 4. Art bzw. Gattungsname in Klammer: am nächsten verwandte Art bzw. Gattung.

	Betrieb 4 **500 Isolate**
Art	**prozentualer Anteil der Isolate**
Staphylococcus equorum	13,5
Staphylococcus vitulinus	12,4
Corynebacterium xerosis	8,8
Janibacter anophelis	7,2
Brachybacterium sp. nov. *(phenoliresistens)*	5,4
Corynebacterium casei	3,6
Acinetobacter sp. nov. *(haemolyticus)*	3,4
Isoptericola halotolerans	3,4
Dietzia aerolata	2,6
Staphylococcus haemolyticus	2,6
Corynebacterium camporealensis	2,4
Brochothrix thermosphacta	2,2
Corynebacterium humireducens	2,2
Leuconostoc mesenteroides	2,2
Streptococcus uberis	2,2
Aerococcus suis	1,8
Chryseobacterium haifense	1,8
Staphylococcus xylosus	1,4
Brachybacterium sp. nov. *(paraconglomeratum)*	1,0
Corynebacterium stationis	1,0
Microbacterium maritypicum/oxydans	1,0
Ornithinimicrobium murale	1,0
Arthrobacter sp. nov. *(kerguelensis)*	0,8
Brachybacterium nesterenkovii	0,8
Brevibacterium senegalense	0,8
Kocuria salsicia	0,8
Luteimonas sp. nov. *(terricola)*	0,8
Brachybacterium saurashtrense	0,6
Facklamia tabacinasalis	0,6
Mesorhizobium sp. nov. *(tamadayense)*	0,6
Bacillus kochii	0,4
Brachybacterium paraconglomeratum	0,4
Chryseobacterium anthropi	0,4
Chryseobacterium bovis	0,4
Corynebacterium efficiens	0,4
Corynebacterium sp. nov. *(pilosum)*	0,4
Jeotgalicoccus psychrophilus	0,4
gen. nov., sp. nov. *(Facklamia)*	0,4
Staphylococcus chromogenes	0,4
Staphylococcus sciuri ssp. carnaticus	0,4
Actinotalea ferrariae	0,2
Aerococcus urinaeequi	0,2
Arthrobacter sp. nov. *(globiformis)*	0,2

Betrieb 4 500 Isolate Art	prozentualer Anteil der Isolate
Brachybacterium ginsengisoli	0,2
Brevibacterium epidermidis	0,2
Brevibacterium luteolum	0,2
Brevibacterium yomogidense	0,2
Cellulomonas phragmiteti	0,2
Corynebacterium sp. nov. *(lubricantis)*	0,2
Corynebacterium sp. nov. *(efficiens)*	0,2
Corynebacterium sp. nov. *(lipophiloflarum)*	0,2
Dietzia alimentaria	0,2
Dietzia auranziaca	0,2
Facklamia miroungae	0,2
Georgenia sp. nov. *(thermotolerans)*	0,2
Globicatella sulfidifaciens	0,2
Jeotgalibaca sp. nov. (dankookensis)	0,2
Lactococcus laudensis	0,2
Mesorhizobium sp. nov. *(thiogangeticum)*	0,2
Microbacterium sp. nov. *(awajiense)*	0,2
Microbacterium sp. nov. *(gubbeenense)*	0,2
Micrococcus sp. nov. (terreus)	0,2
Moraxella osloensis	0,2
Myceligenerans sp. nov. *(halotolerans)*	0,2
Nesterenkonia lacusekhoensis	0,2
Nosocomiicoccus ampullae	0,2
gen. nov., sp. nov. *(Eremococcus)*	0,2
Pseudoclavibacter helvolus	0,2
Staphylococcus hominis	0,2
Staphylococcus sp. nov. *(xylosus)*	0,2
Streptococcus dysgalactiae	0,2
keine Identifizierung möglich	0,6

Anhang Tabelle 8 Prozentualer Anteil der Isolate an den detektierten Arten mittels kulturabhängiger Analyse mit einer Stichprobengröße von 500 Isolaten für Betrieb 6. Art bzw. Gattungsname in Klammer: am nächsten verwandte Art bzw. Gattung.

	Betrieb 6 **500 Isolate**
Art	**prozentualer Anteil der Isolate**
Corynebacterium xerosis	10,4
Knoellia sp. nov. *(flava/sinensis)*	7,8
Streptococcus dysgalactiae ssp. dsygalactiae	4,8
Chryseobacterium sp. nov. *(treverense)*	4,2
Kocuria atrinae	3,2
Streptococcus uberis	3,0
Aerococcus urinaeequi	2,6
Janibacter limosus	2,4
Kocuria carniphila	2,4
Chryseobacterium haifense	2,2
Corynebacterium camporealensis	2,2
Microbacterium lacticum	2,0
Microbacterium maritypicum/oxydans	2,0
Chryseobacterium bovis	1,8
Lactococcus raffinolactis	1,8
Propionibacterium jensenii	1,6
Corynebacterium flavescens	1,4
Luteococcus sp. nov. *(sediminum)*	1,4
Corynebacterium frankenforstense	1,2
Enterococcus faecalis	1,2
Moraxella osloensis	1,2
Ottowia sp. nov. *(beijingensis)*	1,2
Corynebacterium variabile	1,0
Dietzia alimentaria	1,0
Luteimonas sp. nov. *(aestuarii)*	1,0
Rothia endophytica	1,0
Thermomonas sp. nov. *(brevis)*	1,0
Aerococcus suis	0,8
Brevundimonas intermedia	0,8
Corynebacterium sp. nov. *(epidermidicanis)*	0,8
gen. nov., sp. nov. *(Propioniciclava)*	0,8
Pseudomonas lundensis	0,8
Psychrobacter sanguinis	0,8
Brevibacterium pityocampae	0,6
Brevundimonas lenta	0,6
Kocuria salsicia	0,6
Lactococcus laudensis	0,6
Leuconostoc lactis	0,6
Microbacterium flavescens	0,6
Nocardioides daeguensis	0,6
Sphingobacterium daejeonense	0,6
Staphylococcus haemolyticus	0,6
Acinetobacter parvus	0,4

Betrieb 6 500 Isolate	
Art	**prozentualer Anteil der Isolate**
Acinetobacter sp. nov. *(haemolyticus)*	0,4
Brachybacterium nesterenkovii	0,4
Brevibacterium celere	0,4
Chryseobacterium sp. nov. *(aahli)*	0,4
Chryseobacterium ureilyticum	0,4
Corynebacterium amycolatum	0,4
Corynebacterium humireducens	0,4
Facklamia tabacinasalis	0,4
Gordonia bronchialis	0,4
Jeotgalicoccus psychrophilus	0,4
Knoellia sp. nov. *(subterranea)*	0,4
Lactobacillus paracasei	0,4
Leucobacter iarius	0,4
Luteococcus japonicus	0,4
Microbacterium yannicii	0,4
gen. nov., sp. nov. *(Auraticoccus)*	0,4
Staphylococcus chromogenes	0,4
Acinetobacter lwoffii	0,2
Acinetobacter breziniae	0,2
Acinetobacter johnsonii	0,2
Acinetobacter sp. nov. *(harbinensis)*	0,2
Aerococcus sp. nov. *(suis)*	0,2
Aeromicrobium flavum	0,2
Agrococcus jenensis	0,2
Arthrobacter sp. nov. *(soli)*	0,2
Bosea vestrisii	0,2
Brachybacterium muris	0,2
Branchiibius hedensis	0,2
Brevibacterium luteolum	0,2
Brevibacterium senegalense	0,2
Brevibacterium sp. nov. *(daeguensis)*	0,2
Brevundimonas mediterranea	0,2
Brevundimonas staleyi	0,2
Chryseobacterium hominis	0,2
Chryseobacterium sp. nov. *(haifense)*	0,2
Chryseobacterium sp. nov. *(limigenitum)*	0,2
Comamonas koreensis	0,2
Corynebacterium sp. nov. *(doosanense)*	0,2
Corynebacterium bovis	0,2
Corynebacterium confusum	0,2
Corynebacterium sp. nov. *(pilosum)*	0,2
Corynebacterium ulceribovis	0,2
Corynebacterium urealyticum	0,2
Enterobacter ludwigii	0,2
Globicatella sulfidifaciens	0,2
Gordonia aichiensis	0,2

Betrieb 6 500 Isolate **Art**	**prozentualer Anteil der Isolate**
Kurthia gibsonii	0,2
Lactococcus lactis ssp. lactis	0,2
Mesorhizobium sp. nov. *(robiniae)*	0,2
Microbacterium xylanilyticum	0,2
Nosocomiicoccus ampullae	0,2
gen. nov., sp. nov. *(Sphingobacterium)*	0,2
gen. nov., sp. nov. *(Eremococcus)*	0,2
gen. nov., sp. nov. *(Modestobacter)*	0,2
Prolinoborus sp. nov. *(fasciculus)*	0,2
Pseudoclavibacter chungangensis	0,2
Pseudomonas sp. nov. *(alcaligenes)*	0,2
Pseudoxanthomonas mexicana	0,2
Psychrobacter faecalis	0,2
Rhzorhapis sp. nov. *(suberifaciens)*	0,2
Rothia nasimurium	0,2
Shinella zoogloeoides	0,2
Sphingopyxis bauzanensis	0,2
Staphylococcus epidermidis	0,2
Staphylococcus hominis	0,2
Trueperella sp. nov. *(pyogenes)*	0,2
Weissella thailandensis	0,2
nicht gewachsen/ keine Identfizierung möglich	3,0
keine Zuordnung zu einer Art möglich	2,8

Anhang Tabelle 9 Prozentualer Anteil der Isolate an den detektierten Arten mittels kulturabhängiger Analyse mit einer Stichprobengröße von 1500 Isolaten für Betrieb 4. Art bzw. Gattungsname in Klammer: am nächsten verwandte Art bzw. Gattung.

Betrieb 4 **1500 Isolate**	
Art	**prozentualer Anteil der Isolate**
Staphylococcus vitulinus	12,95
Staphylococcus haemolyticus	11,80
Microbacterium lacticum	9,90
Gordonia caeni	6,24
Pseudoxanthomonas mexicana	4,41
Corynebacterium xerosis	4,34
Janibacter anophelis	3,19
Staphylococcus xylosus	2,98
Staphylococcus sciuri	2,71
Corynebacterium stationis/casei	2,37
Streptococcus uberis	2,31
Streptococcus pluranimalium	2,10
Staphylococcus sp. nov. *(hyicus)*	2,03
Brevibacterium epidermidis/iodinum	1,97
Aerococcus urinaeequi/viridans	1,83
Isoptericola halotolerans	1,83
Brachybacterium conglomeratum/paraconglomeratum	1,42
Leuconostoc mesenteroides	1,42
Staphylococcus aureus	1,42
Staphylococcus equorum	1,36
Brachybacterium sp. nov. *(paraconglomeratum)*	1,15
Dietzia aurantiaca	1,02
Aerococcus suis	0,88
Staphylococcus chromogenes	0,88
Enterococcus faecalis	0,75
Lactococcus lactis	0,75
Corynebacterium confusum	0,61
Lactococcus raffinolactis	0,61
Staphylococcus sp. nov. *(haemolyticus)*	0,61
Dietzia aerolata	0,54
Pseudoclavibacter helvolus	0,54
Brevibacterium senegalense/yomogidense	0,47
Staphylococcus epidermidis	0,47
Citricoccus sp. nov. *(alkalitolerans/parietis/zhacaiensis)*	0,34
Corynebacterium camporealensis	0,34
Jonesia denitrificans	0,34
Luteococcus japonicus	0,34
Luteococcus sanguinis	0,34
Corynebacterium bovis	0,27
Lactobacillus paracasei	0,27
Microbacterium maritypicum/oxydans	0,27
Staphylococcus sp. nov. *(xylosus)*	0,27
Streptococcus infantarius/lutetiensis/equinus	0,27

Art	Betrieb 4 1500 Isolate prozentualer Anteil der Isolate
Brachybacterium gingsengisoli	0,20
Corynebacterium sp. nov. *(argentoratense)*	0,20
Klebsiella granulomatosis/pneumoniae	0,20
Kocuria carniphila	0,20
Kocuria palustris	0,20
Lactococcus piscium	0,20
Lactococcus plantarum	0,20
Leuconostoc pseudomesenteroides	0,20
Ottowia sp. nov. *(beijingensis)*	0,20
Agrococcus casei	0,14
Arsenicicoccus bolidensis	0,14
Brachybacterium sp. nov. *(gingsengisoli)*	0,14
Chryseobacterium haifense	0,14
Corynebacterium glutamicum	0,14
Facklamia tabascinasalis	0,14
Georgenia sp. nov. *(muralis)*	0,14
Gordonia alkanivorans	0,14
Microbacterium hominis	0,14
Microbacterium lacus	0,14
Microbacterium testaceum	0,14
gen. nov., sp. nov. *(Propioniciclava tarda)*	0,14
Ottowia sp. nov. *(pentelensis)*	0,14
Phenylobacterium haematophilum	0,14
Psychrobacter pulmonis	0,14
Rhodococcus qingshengii/jialingiae/baikanurensis	0,14
Sphingopyxis witflariniensis	0,14
Staphylococcus hominis	0,14
Staphylococcus simulans	0,14
Acinetobacter parvus	0,07
Aerococcus sp. nov. *(suis)*	0,07
Agrococcus baldri	0,07
Arthrobacter phenanthrenivrans/kerguelensis	0,07
Arthrobacter cryoconiti	0,07
Arthrobacter sp. nov. *(phenonthrenivorans/oryzae/subteranus/kerugelensis)*	0,07
Brachybacterium alimentarium/sacelli	0,07
Brachybacterium sp. nov. *(phenoliresistens)*	0,07
Brachybacterium sp. nov. (sacelli)	0,07
Brevundimonas bullata	0,07
Chryseobacterium indoltheticum	0,07
Corynebacterium amycolatum	0,07
Corynebacterium aurimucosum	0,07
Corynebacterium freneyi/hansenii	0,07
Corynebacterium tuberculostearicum	0,07
Curtobacterium flaccumfaciens	0,07
Gordonia sp. nov. *(caeni)*	0,07

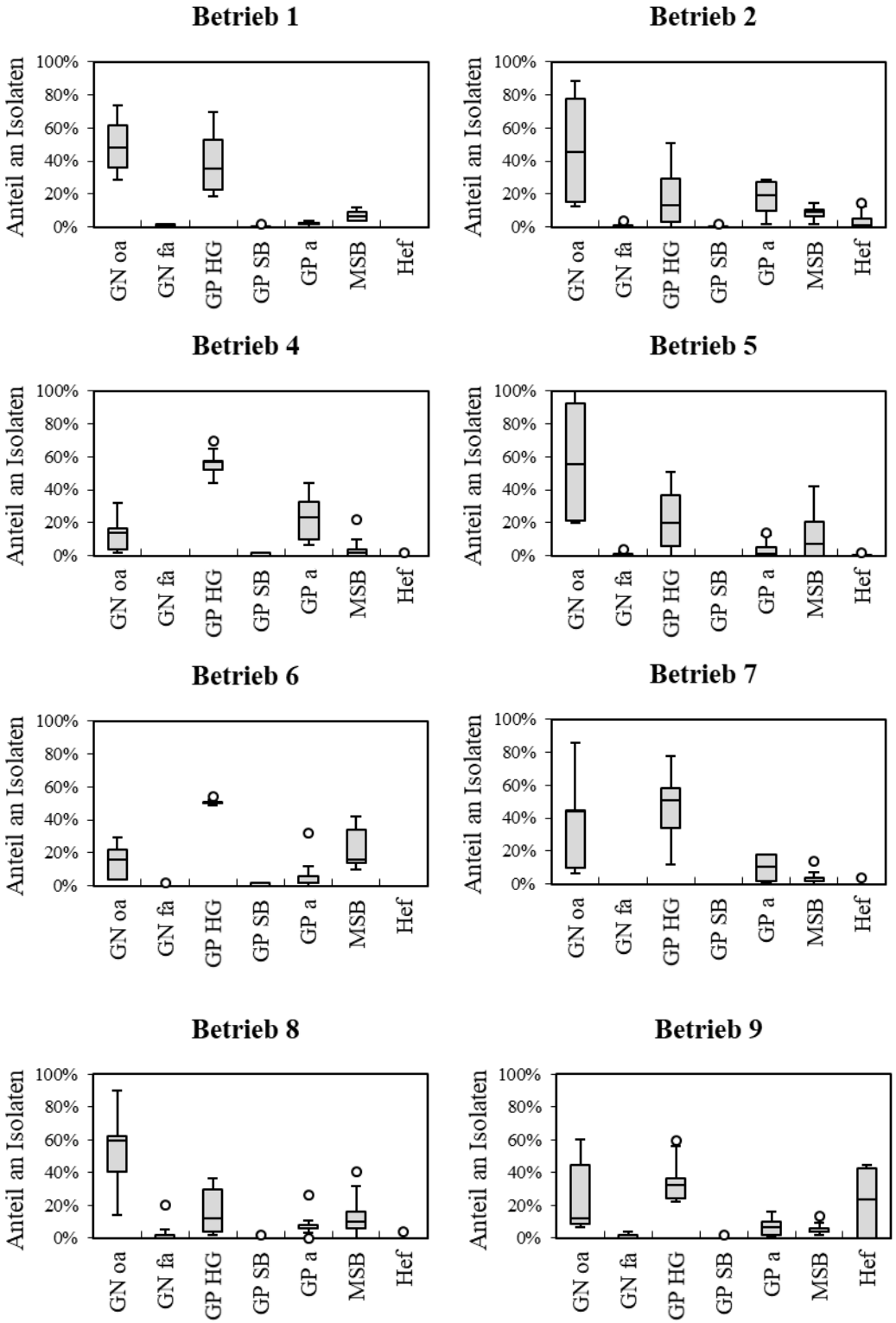
Art	Betrieb 4 1500 Isolate prozentualer Anteil der Isolate
Gordonia terrae	0,07
Janibacter terrae	0,07
Jeotgalibaca sp. nov. *(dankookensis)*	0,07
Kocuria salsicia	0,07
Lactobacillus oligofermentans	0,07
Lactobacillus parabuchneri	0,07
Luteococcus sp. nov. *(sanguinis)*	0,07
Microbacterium gubbeenense	0,07
Nocardioides sp. nov. *(konjugensis)*	0,07
gen. nov., sp. nov. *(Aerococcus suis)*	0,07
Paenibacillus amylolyticus	0,07
Paracoccus alcaliphilus	0,07
Plantibacter flavus	0,07
Proteus mirabilis	0,07
Pseudomonas aeruginosa	0,07
Pseudomonas azotoformans/libanensis	0,07
Pseudomonas trivalis/poae	0,07
Rhodococcus cerastii	0,07
Rhodococcus fascians	0,07
Sphingobacterium deajeonaese	0,07
Staphylococcus cohnii	0,07
Staphylococcus sp. nov. *(auricularis)*	0,07
Staphylococcus sp. nov. *(equorum)*	0,07
Tessaraococcus sp. nov. *(flavescens)*	0,07
keine Zuordnung zu einer Art möglich	0,20
keine Identfizierung möglich	1,69

Anhang Tabelle 10 Prozentualer Anteil der Isolate an den detektierten Arten mittels kulturabhängiger Analyse mit einer Stichprobengröße von 1500 Isolaten für Betrieb 6. Art bzw. Gattungsname in Klammer: am nächsten verwandte Art bzw. Gattung.

Betrieb 6 **1500 Isolate**	
Art	**prozentualer Anteil der Isolate**
Microbacterium yannicii	13,61
Microbacterium lacticum/saccharophilum	9,62
Stenotrophomonas maltophilia	6,99
Corynebacterium xerosis/freneyi	5,35
Aerococcus urinaeequi/viridans	4,54
Kocuria salsicia	3,81
Streptococcus uberis	3,81
Chryseobacterium ureilyticum	3,45
Shinella zoogloeoides	3,36
Corynebacterium frankenforstense	3,27
Pseudoclavibacter sp. nov. *(caeni)*	3,09
Streptococcus dysgalactiae ssp dysgalactiae	2,00
Aerococcus suis	1,72
Brachybacterium sp. nov. *(sacelli)*	1,54
Corynebacterium variabile	1,54
Leucobacter komagatae/aridicollis	1,45
Brevundimonas vesicularis/nasdae	1,27
Microbacterium maritypicum/oxydans	1,27
Acidovorax wautersii	1,18
Bacillus licheniformis/aerius	1,18
Acetobacter orientalis	1,09
Rhizobium radiobacter	1,09
Nocardioides sp. nov. *(kongjuensis)*	1,00
Corynebacterium amycolatum	0,91
Enterococcus faecalis	0,82
Agromyces mediolanus/soli	0,64
Corynebacterium confusum	0,64
Pseudomonas aeruginosa	0,64
Staphylococcus hominis	0,64
Stenotrophomonas terrae	0,64
Dermacoccus sp. nov. *(barathri/abyssi)*	0,54
Kocuria atrinae	0,54
Pseudoclavibacter helvolus	0,54
Staphylococcus cohnii	0,54
Tesseracoccus sp. nov. *(flavescens)*	0,54
Bosea robiniae	0,45
Microbacterium sp. nov. *(dextranolyticum)*	0,45
Corynebacterium falsenii	0,36
Jeotgalicoccus marinus	0,36
Lactobacillus parabuchneri	0,36
Lactobacillus paracasei	0,36
Mycobacterium abscessus/chelonae	0,36
Nocardioides daeguensis	0,36

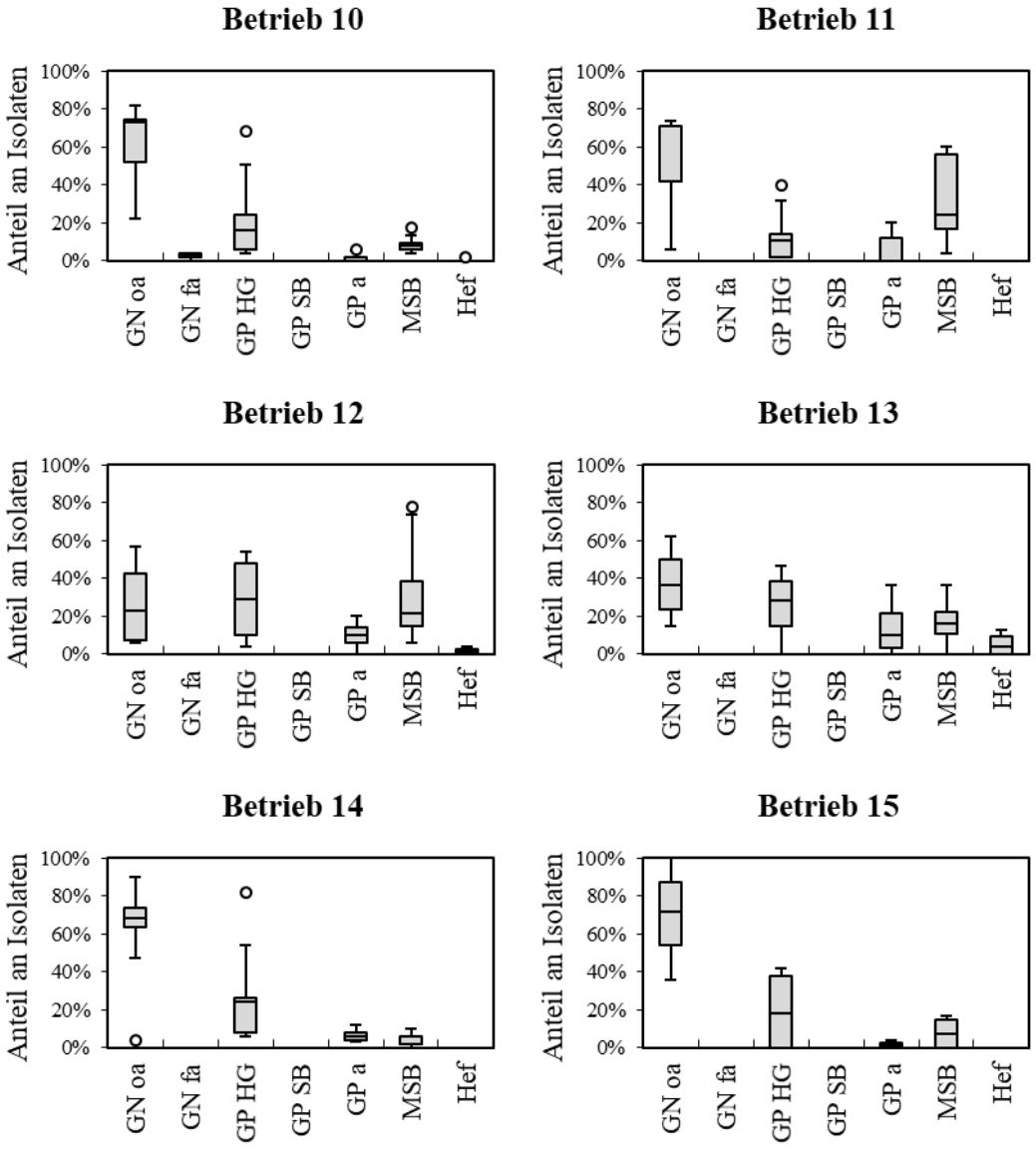
Betrieb 6 1500 Isolate	
Art	**prozentualer Anteil der Isolate**
Shinella granuli	0,36
Acinetobacter bereziniae/guillouiae	0,27
Bifidobacterium psychraerophilum	0,27
Brachybacterium nesterenkovii	0,27
Corynebacterium humireducens	0,27
Globicatella sulfidifaciens	0,27
Microbacterium dextranolyticum/natoriense	0,27
Microbacterium hominis	0,27
Pseudoclavibacter chungangensis	0,27
Staphylococcus haemolyticus	0,27
Staphylococcus sciuri	0,27
Stenotrophomonas nitritireducens	0,27
Acinetobacter johnsonii	0,18
Aerococcus sp. nov. *(suis)*	0,18
Aquamicrobium lusatiense	0,18
Bacillus sonorensis	0,18
Corynebacterium bovis	0,18
Enterococcus malodoratus	0,18
Facklamia hominis	0,18
Flavobacterium sp. nov. *(mizutaii)*	0,18
Gordonia sputi	0,18
Kocuria palustris	0,18
Lactococcus garvieae	0,18
gen. nov., sp. nov. *(Corynebacterium doosanense)*	0,18
Ochrobactrum rhizosphaerae	0,18
Ochrobactrum sp. nov. *(anthropi/cytisi/lupini)*	0,18
Ochrobactrum thiophenivorans/cytisi	0,18
Patulibacter ginsengiterrae	0,18
Pseudomonas alcaligenes	0,18
Pseudomonas peli	0,18
Pseudomonas sp. nov. *(alcaligenes)*	0,18
Sphingobacterium daejoenense	0,18
Staphylococcus epidermidis	0,18
Staphylococcus jettensis	0,18
Acinetobacter junii	0,09
Actinomyces sp. nov. *(odontolyticus)*	0,09
Arthrobacter sp. nov. *(nicotianae/protophormiae)*	0,09
Arthrobacter woluwensis	0,09
Brachybacterium muris	0,09
Brachybacterium squillarum	0,09
Brevibacillus agri	0,09
Brevibacillus inovocatus/brevis	0,09
Brevibacterium epidermidis	0,09
Brevibacterium luteolum	0,09
Brevibacterium senegalense	0,09
Brevibacterium yomogidense	0,09

Betrieb 6 1500 Isolate **Art**	**prozentualer Anteil der Isolate**
Cellulosimicrobium funkei	0,09
Corynebacterium doosanense	0,09
Corynebacterium sp. nov. *(casei)*	0,09
Dermacoccus nishinomiyaensis	0,09
Devosia riboflavina	0,09
Enterococcus viikkiensis/pseudoavium/devriesei	0,09
Gemmobacter sp. nov. *(aquatilis)*	0,09
Janibacter alkaliphilus	0,09
Kocuria carniphila	0,09
Kocuria kristinae	0,09
Lactobacillus dextrinicus	0,09
Lactobacillus gasseri	0,09
Lactobacillus harbinensis	0,09
Lactobacillus pentosus/plantarum	0,09
Lactococcus lactis ssp lactis	0,09
Lysinibacillus sp. nov. *(halotolerans)*	0,09
Macrococcus sp. nov. *(caseolyticus)*	0,09
Microbacterium sp. nov. *(flavum)*	0,09
Niabella sp. nov. *(terrae)*	0,09
Niabella sp. nov. *(yanshanensis)*	0,09
gen. nov., sp. nov. *(Nocardioides solisilvae)*	0,09
gen. nov., sp. nov. *(Sphingobacterium paludis)*	0,09
Paenibacillus barengoltzii	0,09
Pseudoxanthomonas mexicana	0,09
Rhodococcus qingshengii/jialingae	0,09
Rummeliibacillus suwonensis	0,09
Salana multivorans	0,09
Sphingobacterium hotanense	0,09
Sphingobacterium nemaocida	0,09
Sphingobacterium caeni	0,09
Staphylococcus arlettae	0,09
Staphylococcus xylosus	0,09
Streptococcus pluranimalium	0,09
Tetragenococcus sp. nov. *(solitarius)*	0,09
Tsukamurella carboxydivorans/ spumae/sunchonensis/pseudopumae	0,09
Zimmermannella sp. nov. *(alba)*	0,09
keine Identifizierung möglich	0,36



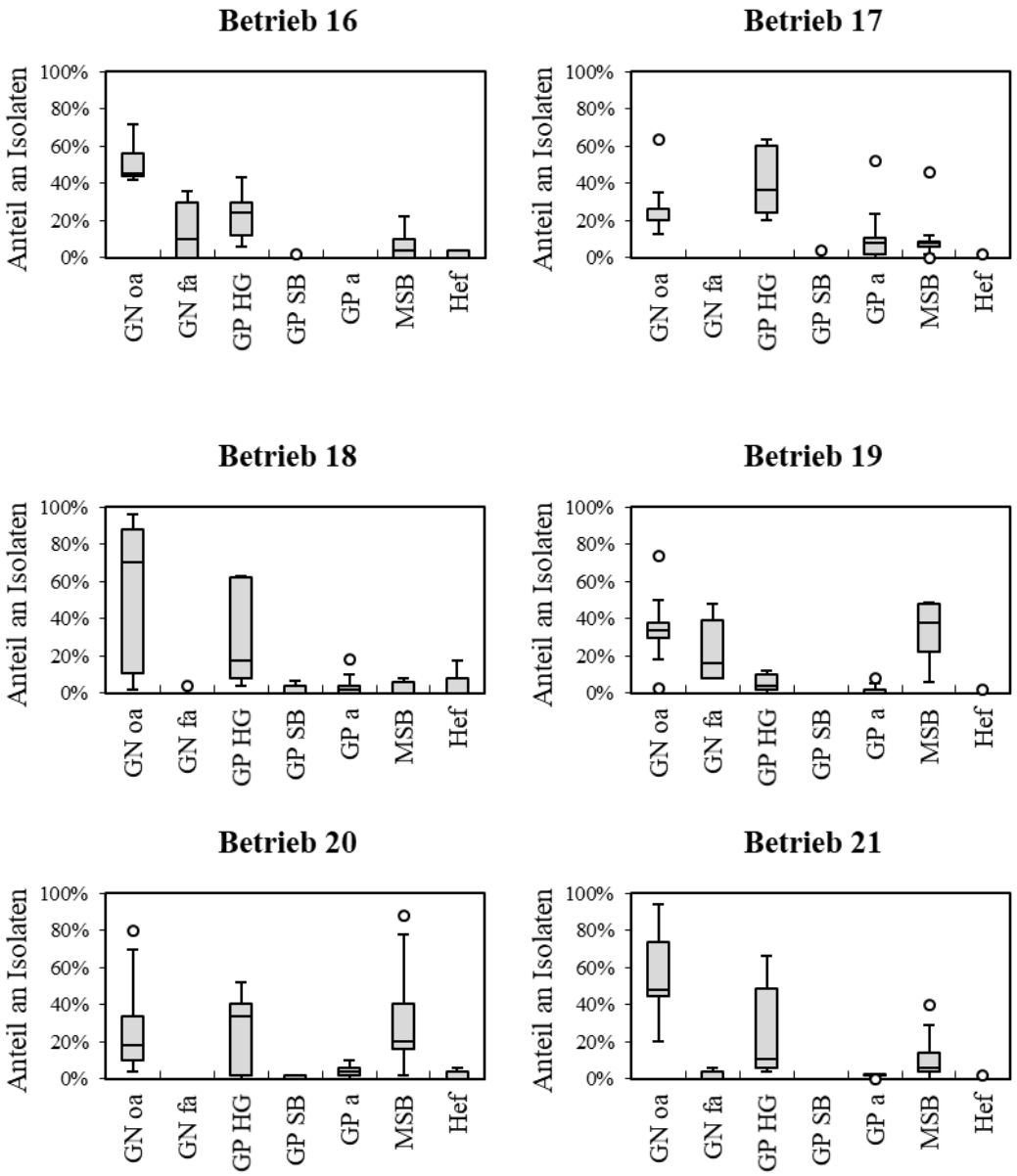
Anhang Abbildung 1 Prozentualer Anteil der verschiedenen taxonomischen Großgruppen innerhalb der Mikrobiota aller 21 Betriebe. Die Kästchen repräsentieren das erste Quartil, den Median und das dritte Quartil, die Whisker repräsentieren milde Ausreißer (1,5 x Interquartil-bereich) und die offenen Kreise repräsentieren extremere Ausreißer. GN oa: Gram-negativ, obligat aerobe; GN fa: Gram-negativ, fakultativ anaerobe; GP HG: Gram-positiv, High GC; GP SB: Gram-positiv, Sporenbildner; GP a: Gram-positiv, andere; MSB= Milchsäurebakterien; Hef: Hefen.

Fortsetzung Anhang Abbildung 1



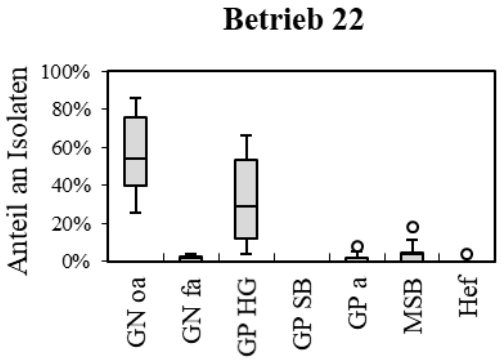
GN oa: Gram-negativ, obligat aerobe; GN fa: Gram-negativ, fakultativ anaerobe; GP HG: Gram-positiv, High GC; GP SB: Gram-positiv, Sporenbildner; GP a: Gram-positiv, andere; MSB= Milchsäurebakterien; Hef: Hefen

Fortsetzung Anhang Abbildung 1

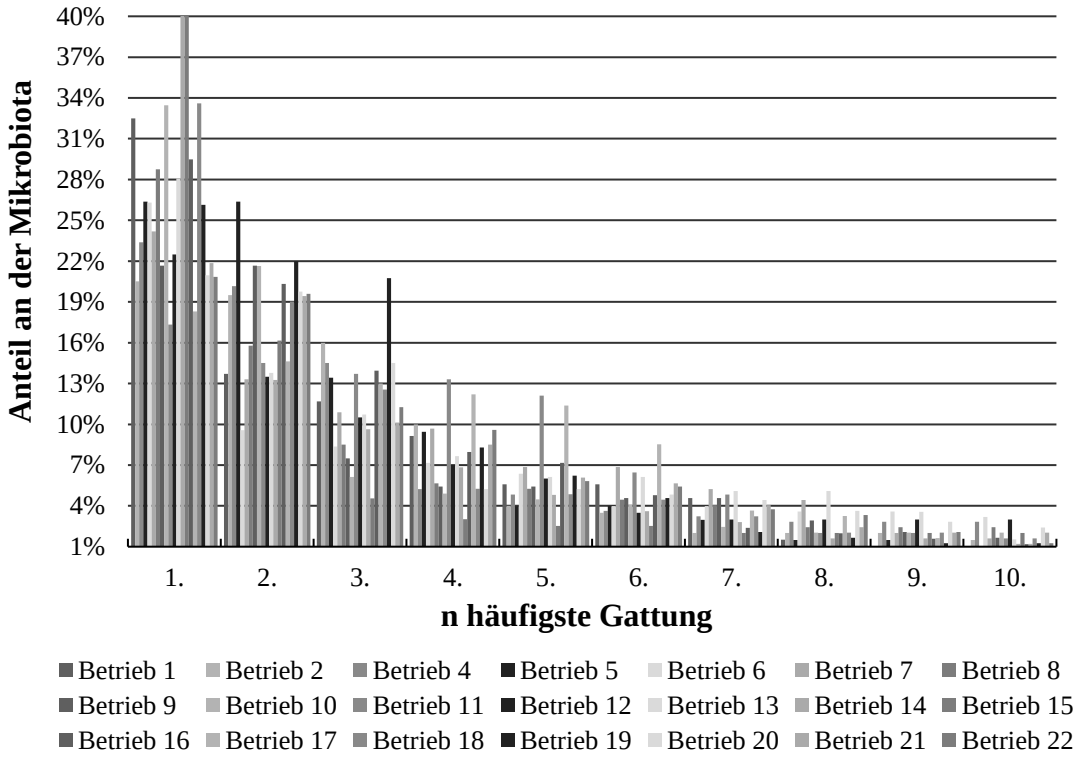


GN oa: Gram-negativ, obligat aerobe; GN fa: Gram-negativ, fakultativ anaerobe; GP HG: Gram-positiv, High GC; GP SB: Gram-positiv, Sporenbildner; GP a: Gram-positiv, andere; MSB= Milchsäurebakterien; Hef: Hefen

Fortsetzung Anhang Abbildung 1



GN oa: Gram-negativ, obligat aerobe; GN fa: Gram-negativ, fakultativ anaerobe; GP HG: Gram-positiv, High GC; GP SB: Gram-positiv, Sporenbildner; GP a: Gram-positiv, andere; MSB= Milchsäurebakterien; Hef: Hefen



Anhang Abbildung 2 Verteilung des prozentualen Anteils der häufigsten Gattungen an der Mikrobiota für alle 21 Betriebe bei gemeinsamer Betrachtung aller Proben pro Betrieb. n: Häufigkeit der Gattung.