

Aus dem Institut für Mikrobiologie und Biotechnologie  
des Max Rubner-Instituts,  
Bundesforschungsinstitut für Ernährung und Lebensmittel

***Pseudomonas* spp. in norddeutscher Rohmilch:  
Bestimmung von Eintragsrouten,  
Charakterisierung der Biofilmbildung und der Peptidaseaktivität**

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Agrar- und Ernährungswissenschaftlichen Fakultät  
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von  
M.Sc. Stefanie Gieschler  
aus Ostfildern

Kiel, 2022

---

Dekan: Prof. Dr. Karl H. Mühling  
1. Berichterstatter: Prof. Dr. Charles M.A.P. Franz  
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Karin Schwarz  
Tag der mündlichen Prüfung: 29. Juni 2022

Veröffentlicht mit Genehmigung der Agrar- und Ernährungswissenschaftlichen Fakultät  
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

## Zusammenfassung

Ein Ziel dieser Arbeit war die Analyse der Prävalenz von *Pseudomonas* spp. in norddeutscher Rohmilch hinsichtlich hofspezifischer Einflussfaktoren sowie potentieller Eintragsrouten auf den Erzeugerhöfen, um den Keimeintrag in Rohmilch reduzieren zu können. Dies könnte eine Verringerung der Qualitätsverluste von Milch und Milchprodukten durch proteolytische Enzyme, die von *Pseudomonas* spp. gebildet werden, bewirken. Hierfür wurden 521 Rohmilchproben von 38 Erzeugerhöfen hinsichtlich *Pseudomonas*- und Gesamtkeimzahlen analysiert. Im Mittel lag die *Pseudomonas*-Keimzahl in Rohmilch bei  $3,4 \pm 1,3 \log \text{KbE/ml}$  und eine durchschnittliche Gesamtkeimzahl von  $4,7 \pm 0,6 \log \text{KbE/ml}$  wurde ermittelt. Die Keimzahlen wurden mit 12 hofspezifischen Parametern in Zusammenhang gebracht, die per Fragebogen ermittelt wurden. Die Analyse ergab unter anderem bei den Hofparametern „Produktionsart“, „Spülsystem“, „Rohmilch-Kühlung“ und „Tierhaltung“ signifikante Unterschiede hinsichtlich der *Pseudomonas*-Keimzahl. Keine Korrelation wurde zwischen den Faktoren „Jahreszeit“, „Abholungsintervall“, „Melksystem“, „Euterhygiene“ und der *Pseudomonas*-Keimzahl festgestellt. Potentielle Eintragsrouten von *Pseudomonas* spp. auf den Erzeugerhöfen wurden im Rahmen von 8 Hofbegehungen untersucht. Dabei wurden jeweils 4 Höfe mit durchschnittlichen *Pseudomonas*-Keimzahlen über bzw. unter  $4 \log \text{KbE/ml}$  in Rohmilch beprobt. Die Probenahme umfasste Bereiche des Rohmilchtanks, der Melkanlage, des Melkzeugs sowie verschiedene Wasserproben. Zusätzlich wurden die Luftkeimgehalte im Bereich des Melkstands erfasst. Von allen Probenahmestellen wurden *Pseudomonas*- und Gesamtkeimzahlen bestimmt und für die Auswertung nach Hof und Probenahmestellen gegenübergestellt. Die ermittelten *Pseudomonas*-Werte der Messungen des Luftkeimgehaltes im Bereich des Melkstands und der Wasserproben (Kalt-/ Warmwasser Melksystem-/ Tankreinigung) ergaben geringe *Pseudomonas*-Gehalte, wodurch ein Eintrag auf diesen Wegen unwahrscheinlich ist. *Pseudomonas*-Keimzahlen über  $4 \log \text{KbE/cm}^2$  wurden unter anderem am Zapfhahn, am Entlüftungsdeckel und an der Halterung der Zitzenbecher ermittelt. Hohe *Pseudomonas*-Keimzahlen weisen insbesondere an Dichtungen aus Gummi, z. B. des Zapfhahns, des Tankdeckels und des Melkzeug-Sammelstücks auf begünstigtes Wachstum von Biofilmen an diesen Stellen hin.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die Analyse der Fähigkeit zur Biofilmbildung von *Pseudomonas* spp. und die Bestimmung der Peptidaseaktivität zur Beurteilung des Verderbspotentials. Hier wurde das proteolytische Potential von planktonischen Zellen und Biofilm-assoziierten Zellen gegenübergestellt. Zunächst wurde die gebildete Biofilmmasse mittels Kristallviolett-Assay von *Pseudomonas* spp. in 96-Well-Mikrotiterplatten sowie auf Edelstahl- und Gummi-Oberfläche quantifiziert und Keimzahlen in *Pseudomonas*-Mono-Biofilmen bei einer 6-tägigen Inkubation bei  $6 \text{ }^\circ\text{C}$  in Milchmedium ermittelt. Die Biofilmbildung stellte sich dabei als stammspezifisch und abhängig von der Oberfläche sowie von der Konzentration des

Milchmediums dar, was auch rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen zur Analyse der Biofilm-Morphologie von *Pseudomonas* spp. bestätigten. Rohmilch-assoziierte Multi-Spezies-Biofilme auf Edelstahl- und Gummi-Oberfläche zeigten anhand der Rasterelektronenmikroskopie temperaturspezifisches und oberflächenabhängiges Wachstum auf. Auch die Peptidaseaktivität von *Pseudomonas* spp. erwies sich beim Nachweis auf Magermilch-Agar sowie im Fluorescamin-Assay von *Pseudomonas*-Biofilmen als spezies- und isolatabhängig. Weiterhin wurde die Bildung von Peptidasen in *Pseudomonas*-Mono-Biofilmen zusammen mit einer erhöhten Aktivität im Vergleich zur planktonischen Wuchsform nachgewiesen. Die Ergebnisse zeigen, dass Biofilme einen weiteren Eintragsweg von *Pseudomonas* spp. in die Rohmilch darstellen und durch die erhöhte Peptidase-Bildung in dieser Wuchsform zum Milchverderb beitragen können.

## Summary

One aim of this work was to analyze the prevalence of *Pseudomonas* spp. in raw milk from northern Germany with regard to farm-specific influencing factors as well as potential entry routes on farms in order to reduce the microbial entry into raw milk. This finally will lead to a reduction of quality losses of milk and milk products due to proteolytic enzymes produced by *Pseudomonas* spp. For this purpose, 521 raw milk samples from 38 producer farms were analyzed for *Pseudomonas* and total bacterial counts. On average, *Pseudomonas* plate counts in raw milk were  $3.4 \pm 1.3$  log cfu/ml and total plate counts of  $4.7 \pm 0.6$  log cfu/ml were determined. The bacterial counts were related to 12 farm-specific parameters determined by a questionnaire. The analysis revealed significant differences with respect to *Pseudomonas* counts for the farm parameters including “production type”, “rinsing system”, “raw milk cooling” and “animal husbandry”. No significant relationship was found for the factors “season”, “collection interval”, “milking system”, “udder hygiene” and *Pseudomonas* count. Potential entry routes of *Pseudomonas* spp. on producer farms were investigated during 8 farm inspections. In each case, 4 farms with average *Pseudomonas* counts above or below 4 log cfu/ml in raw milk were sampled. Sampling included areas of the raw milk tank, milking area, milking equipment and various water samples. In addition, airborne bacteria levels were recorded in the milking parlor area. *Pseudomonas* and total bacterial counts were determined at all sampling points and compared between farm and sampling point. The determined *Pseudomonas* numbers of airborne measurements in the area of the milking parlor and the water samples (cold/warm water from milking system/tank cleaning) showed low numbers, making an entry via these routes unlikely. *Pseudomonas* counts above 4 log cfu/cm<sup>2</sup> were detected at the spigot, vent cover and teat cup holder, among other locations. In particular, high *Pseudomonas* counts on seals made of rubber, e.g., the spigot, the tank lid and the teat cup collector, indicate favored growth of biofilms at these sites.

Another objective of this work was to analyze the biofilm formation ability of *Pseudomonas* spp. and its spoilage potential by determining peptidase activity. To assess the risk posed by biofilms in the spoilage of shelf stable dairy products, the proteolytic potential of planktonic cells was compared to that of biofilm-associated cells. First, the biofilm mass produced was quantified by crystal violet assay of *Pseudomonas* spp. in 96-well microtiter plates and on stainless steel and rubber surfaces, and bacterial counts were determined in mono-biofilms during a 6-day incubation at 6 °C in milk medium. Biofilm formation was found to be strain-specific and dependent on surface material as well as on milk medium concentration. Scanning electron micrographs analyzing the biofilm morphology of *Pseudomonas* spp. on stainless steel also showed strain-specific biofilm formation. Raw milk-associated multi-species biofilms on stainless steel and rubber surfaces showed temperature-specific and surface-dependent growth by scanning

electron microscopy. The peptidase activity of *Pseudomonas* spp. was also found to be species- and isolate-dependent when detected on skim milk agar and using the fluorescamine assay of *Pseudomonas* biofilms. Furthermore, the formation of peptidases was detected in *Pseudomonas* mono-biofilms at a higher level when compared to planktonic growth. The results indicate that biofilms represent another entry route of *Pseudomonas* spp. into raw milk and may contribute to milk spoilage through increased peptidase production in this growth form.

# Inhaltsverzeichnis

<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>I</b>
<b>Summary</b> .....	<b>III</b>
<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	<b>V</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>VIII</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>X</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>XIII</b>
<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>1 Rohmilch – Historie und Neuzeit</b> .....	<b>1</b>
1.1 Mikrobiota in roher Kuhmilch.....	2
1.2 Verderbniserreger und -erscheinung in der milchverarbeitenden Industrie.....	3
1.3 Rechtsvorschriften zur Hygiene und Güteuntersuchung von Rohmilch .....	6
<b>2 <i>Pseudomonas</i> spp.</b> .....	<b>6</b>
2.1 Namensgebung und Klassifizierung von <i>Pseudomonas</i> spp.....	6
2.2 Charakteristika und Eigenschaften von <i>Pseudomonas</i> spp. ....	7
2.3 <i>Pseudomonas</i> spp. in Rohmilch .....	8
<b>3 Biofilm</b> .....	<b>10</b>
3.1 Definition, Vorkommen, Bildung, Einflussfaktoren .....	10
3.2 Biofilme in der Lebensmittelkette Milch.....	13
3.3 Biofilme von <i>Pseudomonas</i> spp.....	14
<b>Forschungsziel der Arbeit</b> .....	<b>16</b>
<b>Material und Methoden</b> .....	<b>17</b>
<b>1 Nährmedien</b> .....	<b>17</b>
<b>2 Chemikalien und Lösungen, Verbrauchsmaterial und Geräte</b> .....	<b>19</b>
<b>3 Bakterienstämme</b> .....	<b>21</b>
<b>4 Bestimmung der Eintragsrouten von <i>Pseudomonas</i> spp. in Rohmilch</b> .....	<b>24</b>
4.1 Analyse des Zusammenhangs zwischen hofseitigen Einflussfaktoren und <i>Pseudomonas</i> - Keimzahlen in Rohmilch.....	24
4.1.1 Logistik der Rohmilchproben .....	24
4.1.2 Erfassung hofspezifischer Informationen.....	24
4.1.3 Bestimmung der Gesamtkeimzahl mittels Durchflusszytometrie.....	24
4.1.4 Kulturelle Bestimmung der <i>Pseudomonas</i> -Keimzahl.....	25
4.2 Identifikation der Eintragsrouten von <i>Pseudomonas</i> spp. in Rohmilch .....	25
4.2.1 Auswahl der Erzeugerhöfe.....	25

4.2.2	Planung und Durchführung der Hofbeprobungen.....	26
4.2.3	Mikrobiologische Untersuchungen.....	27
<b>5</b>	<b>Charakterisierung von <i>Pseudomonas</i> spp. hinsichtlich der Biofilmbildung und der Peptidaseaktivität.....</b>	<b>29</b>
5.1	Analyse der Biofilmbildung von <i>Pseudomonas</i> spp.....	29
5.1.1	Bakterienanzucht und -kultivierung.....	29
5.1.2	Einstellung der Inokulationsdosis.....	29
5.1.3	Bestimmung der Zellzahl mittels Durchflusszytometrie.....	30
5.1.4	Quantifizierung der Biofilmmasse in Mikrotiterplatten.....	30
5.1.5	Sterilisation der Edelstahl- und Gummi-Plättchen.....	31
5.1.6	Analyse der Biofilmbildung auf Edelstahl- und Gummi-Oberfläche.....	32
5.1.7	Quantifizierung der Biofilmmasse auf Edelstahl- und Gummi-Oberfläche.....	32
5.1.8	Bestimmung der Keimzahl des Biofilms auf Edelstahl- und Gummi-Oberfläche.....	33
5.2	Charakterisierung von <i>Pseudomonas</i> spp. hinsichtlich der Peptidaseaktivität in Biofilmen.....	33
5.2.1	Bakterienanzucht und Kälteadaptation.....	33
5.2.2	Analyse der Peptidaseaktivität von <i>Pseudomonas</i> spp. auf Magermilch-Agar.....	33
5.2.3	Quantifizierung der Peptidaseaktivität von <i>Pseudomonas</i> spp. mittels Fluorescamin-Assay.....	34
5.2.3.1	Aufbau des Fluorescamin-Assays.....	34
5.2.3.2	Erstellen einer Standardreihe mit Leucylglycin für das Fluorescamin-Assay.....	35
5.2.3.3	Durchführung des Fluorescamin-Assays.....	35
5.2.3.4	Umrechnung auf Femtokatal pro koloniebildende Einheit.....	36
5.3	Rasterelektronenmikroskopie (REM) von Biofilmen.....	38
5.3.1	Anlegen des Biofilms.....	38
5.3.2	Präparation und Versand der Proben für die REM-Analytik.....	38
5.3.3	Keimzahlbestimmungen von Rohmilch-assoziierten Multi-Spezies-Biofilmen.....	39
<b>6</b>	<b>Statistische Auswertungen.....</b>	<b>40</b>
	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>41</b>
<b>1</b>	<b>Bestimmung der Eintragsrouten von <i>Pseudomonas</i> spp. in Rohmilch.....</b>	<b>41</b>
1.1	Analyse des Zusammenhangs zwischen hofseitigen Einflussfaktoren und <i>Pseudomonas</i> -Keimzahlen in Rohmilch.....	41
1.1.1	Auswertung der Fragebögen mit hofspezifischen Informationen.....	41
1.1.2	Analyse durchschnittlicher Keimzahlen in Rohmilch.....	42
1.1.3	Identifikation potentieller Einflussfaktoren auf die <i>Pseudomonas</i> -Keimzahl in Rohmilch.....	43
1.2	Identifikation der Eintragsrouten von <i>Pseudomonas</i> spp. in Rohmilch.....	48
1.2.1	Auswahl der Erzeugerhöfe.....	48
1.2.2	Analyse der <i>Pseudomonas</i> -Keimzahlen potentieller Eintragswege.....	48
1.2.3	Analyse der Gesamtkeimzahlen potentieller Eintragswege.....	50
1.2.4	Analyse der Luftkeimgehalte als potentieller Eintragsweg.....	52



---

<b>2</b>	<b>Charakterisierung von <i>Pseudomonas</i> spp. hinsichtlich der Biofilmbildung und der Peptidaseaktivität .....</b>	<b>53</b>
2.1	Analysen zur Biofilmbildung von <i>Pseudomonas</i> spp. ....	53
2.1.1	Quantifizierung der Biofilmmasse in Mikrotiterplatten.....	53
2.1.2	Quantifizierung der Biofilmmasse auf Edelstahl-Plättchen.....	56
2.1.3	Vergleich der Biofilmmasse in Mikrotiterplatten und auf Edelstahl-Oberfläche.....	58
2.1.4	Keimzahl der Biofilme auf Edelstahl-Oberfläche .....	59
2.1.5	Vergleich der quantifizierten Biofilmmasse auf Edelstahl- und Gummi-Oberfläche .....	60
2.2	Rasterelektronenmikroskopie (REM) von Biofilmen .....	61
2.2.1	Rohmilch-assoziierte Multi-Spezies-Biofilme auf Edelstahl- und Gummi-Oberfläche .....	61
2.2.1.1	REM-Analyse von Rohmilch-assoziierten Multi-Spezies-Biofilmen.....	61
2.2.1.2	Analyse der bakteriellen Biofilm-Zusammensetzung mittels Keimzahlbestimmungen ...	64
2.2.2	Mono-Spezies-Biofilme von <i>Pseudomonas</i> spp. auf Edelstahl-Oberfläche .....	65
2.3	Charakterisierung von <i>Pseudomonas</i> spp. hinsichtlich der Peptidaseaktivität in Biofilmen .....	69
2.3.1	Bestimmung der Peptidaseaktivität von <i>Pseudomonas</i> spp. auf Magermilch-Agar .....	69
2.3.1.1	Kategorisierung der Peptidaseaktivität .....	69
2.3.1.2	Proteolytischer Index .....	69
2.3.2	Quantifizierung der Peptidaseaktivität mittels Fluorescamin-Assay .....	71
2.3.2.1	Peptidaseaktivität Biofilm-assoziiierter Zellen auf Edelstahl-Oberfläche und planktonischer Zellen im Vergleich .....	71
2.3.2.2	Peptidaseaktivität Biofilm-assoziiierter Zellen auf Edelstahl- und Gummi-Oberfläche im Vergleich .....	74
	<b>Diskussion .....</b>	<b>76</b>
<b>1</b>	<b>Bestimmung der Eintragsrouten von <i>Pseudomonas</i> spp. in Rohmilch.....</b>	<b>76</b>
1.1	Zusammenhang zwischen <i>Pseudomonas</i> -Keimzahlen und hofseitigen Einflussfaktoren.....	76
1.2	Identifikation der Eintragsrouten von <i>Pseudomonas</i> spp. in Rohmilch .....	80
<b>2</b>	<b>Charakterisierung von <i>Pseudomonas</i> spp. hinsichtlich der Biofilmbildung und der Peptidaseaktivität .....</b>	<b>83</b>
2.1	Analyse der Biofilmbildung von <i>Pseudomonas</i> spp. ....	83
2.2	Rasterelektronenmikroskopie von Biofilmen.....	86
2.3	Charakterisierung von <i>Pseudomonas</i> spp. hinsichtlich der Peptidaseaktivität in Biofilmen .....	89
	<b>Schlussfolgerung und Ausblick.....</b>	<b>93</b>
	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>XIV</b>
	<b>Anhang.....</b>	<b>XXXIII</b>
	<b>Danksagung.....</b>	<b>XXXVI</b>
	<b>Liste der Veröffentlichungen und Konferenzbeiträge.....</b>	<b>XXXVII</b>

## Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Erläuterung
∅	Durchmesser bzw. Durchschnitt (arithmetisches Mittel)
Δr	Delta r
°C	Grad Celcius
>	Größer
≥	Größer/ ist gleich
<	Kleiner
≤	Kleiner/ ist gleich
±	Plusminus
%	Prozent
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
(M)	Mittels MALDI Biotyper® identifizierte Rohmilch-Isolate
v/v	Volumenprozent
α	Alpha
AHL	N-Acylhomoserinlactone
AI-2	Autoinducer-2-Moleküle
AiF-FV	Arbeitsgemeinschaft industrieller Forschungsvereinigungen
AIP	Autoinduzierte Peptide
AISI	<i>American Iron and Steel Institute (engl.)</i> , amerikanischer Fachverband der Stahlindustrie
ANOVA	<i>Analysis of Variance (engl.)</i> , Varianzanalyse (dt.)
API	<i>Analytical Profile Index (engl.)</i> , Schnellbestimmungssystem zur Identifizierung von Bakterien
a <sub>w</sub>	<i>Activity of Water (engl.)</i> , Wasseraktivität (dt.)
β	Beta
bzw.	Beziehungsweise
Ca <sup>2+</sup>	Calciumion
CASO	Caseinpepton-Sojamehlpepton
CFC	Cephalothin, Fusidinsäure, Cetrimid
cm <sup>2</sup>	Quadratcentimeter
DIN EN ISO	Deutsches Institut für Normung, Europäische Norm, <i>International Organization for Standardization (engl.)</i> ; Internationale Organisation für Normung (dt.)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
dt.	Deutsch
EG	Europäische Gemeinschaft
EPDM	Ethylen-Propylen-Dien-Monomer
EPS	Extrazelluläre, polymere Substanzen
emend.	<i>Emendavit (lat.)</i> , Verbesserung (dt.)
engl.	Englisch
ESEM	<i>Environmental scanning electron microscope (engl.)</i> , spezielle Variante des Rasterelektronenmikroskops
ESL	<i>Extended shelf-life (engl.)</i> , verlängerte Haltbarkeitsdauer (dt.)
et al.	<i>Et alteri (lat.)</i> , und andere (dt.)
fkatal	Femtokatal
FT-IR	Fourier-Transformations-Infrarot (-Spektroskopie)
FV	Forschungsvereinigung
g	Gramm
H-Milch	Haltbarmilch

HDSM	Hexamethyldisilazan
HSD	<i>Honestly significant difference (engl.)</i> , ehrlich signifikanter Unterschied (dt.)
κ	Kappa
KbE	Koloniebildende Einheit
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
kV	Kilovolt
L.	<i>Listeria</i>
l	Liter
lat.	Latein
LBV	Lebensmittel- und Verfahrenstechnik
log	Logarithmus
Min.	Mindestens
M	Molar
MALDI-TOF MS	<i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry (engl.)</i> , Matrixunterstützte Laserdesorptions-/ Ionisations-Flugzeit-Massenspektrometrie (dt.)
Man.	Manuell
Max.	Maximal
mg	Milligramm
Mio.	Million
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
MM	Milchmedium
mmol	Millimol
n	Anzahl
nm	Nanometer
Nr.	Nummer
OD	Optische Dichte
p	<i>Probabilitas (lat.)</i> , Wahrscheinlichkeit (dt.)
P.	<i>Pseudomonas</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction (engl.)</i> , Polymerase-Kettenreaktion (dt.)
pH	pH-Wert
pkat	Picokatal
Post-Hoc	<i>Post hoc ergo propter hoc (lat.)</i> . danach, also deswegen (dt.)
REM	Rasterelektronenmikroskop
Reag. Ph. Eur.	<i>Reagenz Pharmacopoeia Europaea (lat.)</i> , Europäischer Standard für Medikamentenstoffe (dt.)
rpm	<i>Revolutions per minute (engl.)</i> , Umdrehungen pro Minute (dt.)
rRNA	Ribosomale Ribonukleinsäure
s.o.	Siehe oben
sp.	<i>Species (lat.)</i> , Spezies (dt.)
spp.	<i>Species pluralis (lat.)</i> , mehrere Spezies (dt.)
TUM	Technische Universität München
TYGS	<i>Type Strain Genome Server (engl.)</i> , Hochdurchsatz-Webserver für genom-basierte Taxonomie
u. a.	Unter anderem
UHT	<i>Ultra high temperature (engl.)</i> , Ultrahocherhitzung (dt.)
v/v	Volumenprozent
VRBD	<i>Crystal-violet neutral-red bile dextrose (engl.)</i> , Kristallviolett-Neutralrot-Galle-Glucose (dt.)

## Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b> Darstellung eines Modells zur Entwicklung und Neubildung von Biofilmen. (1) Erster, reversibler Kontakt der Bakterienzellen mit dem Substratum, (2) gefolgt von zunehmend irreversibler Bindung, (3) wobei mikrobielles Wachstum und Produktion extrazellulärer polymerer Substanzen (EPS) zur Ausbildung von Mikrokolonien (4) führt. Mit der Zeit erfolgt die Ausbildung eines reifen Biofilms (5), wobei Biofilmmaterial in sog. Plateau-Phase durch Erosion, <i>sloughing</i> oder Schwärmerzellen (5) neugebildet und abgelöst wird. Abbildung von Sauer (2003), modifiziert nach Stoodley et al. (2002).....	11
<b>Abbildung 2:</b> Schematische Übersicht zur Bestimmung der Peptidaseaktivität Biofilm-assoziiertes und planktonischer Zellen mittels Fluorescamin-Assay.....	37
<b>Abbildung 3:</b> <i>Pseudomonas</i> - und Gesamtkeimzahlen (log KbE/ml) der Rohmilchproben von insgesamt 38 Erzeugerhöfen, ermittelt per kultureller Keimzahlbestimmung ( <i>Pseudomonas</i> -Keimzahl, n = 521) und mittels BactoCounts (Gesamtkeimzahl, n = 519).....	43
<b>Abbildung 4:</b> <i>Pseudomonas</i> - und Gesamtkeimzahlen (log KbE/ml) von 521 bzw. 519 Rohmilchproben der 38 Erzeugerhöfen in Abhängigkeit der Produktionsart (A), des Spülsystems des Melkstands (B), der Milchstapelung (C), der Rohmilch-Kühlung (D), der Tierhaltung (E) und der Wasserversorgung (F) mit signifikanten Unterschieden; * p ≤ 0,05; ** p ≤ 0,01 (Dunn`s Test mit Bonferroni Korrektur). Je Parameter folgt hinter der Anzahl der untersuchten Proben (n) die Hofanzahl in Klammer. Signifikante Unterschiede mit gestrichelter Klammer sind zu vernachlässigen.....	45
<b>Abbildung 5:</b> <i>Pseudomonas</i> - und Gesamtkeimzahlen (log KbE/ml) von 521 bzw. 519 Rohmilchproben von 38 Erzeugerhöfen in Abhängigkeit der Jahreszeit (A), des Abholungsintervalls (B), des Melksystems (C) und der Euterhygiene (D) ohne signifikante Unterschiede. Je Parameter folgt hinter der Anzahl der untersuchten Proben (n) die Hofanzahl in Klammer.....	47
<b>Abbildung 6:</b> Durchschnittliche <i>Pseudomonas</i> -Keimzahlen der analysierten Rohmilch, Produktionsart und Melksystem der 8 beprobten Höfe (H1-H8) zur Identifikation der Eintragsrouten von <i>Pseudomonas</i> spp. auf den Höfen in die Rohmilch.....	48
<b>Abbildung 7:</b> Darstellung der Ergebnisse der Hofbegehungen der <i>Pseudomonas</i> -Keimzahlen (log KbE/cm <sup>2</sup> bzw. ml) je Hof und je Probenahmestelle als Heat Map. Die Keimzahlen wurden farblich in Kategorien eingeteilt: Grün: < 2; gelb: 2 – 4; rot: > 4 log KbE/cm <sup>2</sup> bzw. ml. Nicht vorhandene oder durch die Bauart des Melksystems bedingt nicht zugängliche Probenahmestellen wurden mit „-“ gekennzeichnet. Die Einheit der Keimzahlen der mit „ <sup>a</sup> “ gekennzeichneten Bereiche ist log KbE/ml und bei „ <sup>b</sup> “ gekennzeichnete Bereiche log KbE/cm <sup>2</sup> .....	50
<b>Abbildung 8:</b> Darstellung der Ergebnisse der Hofbegehungen anhand der Gesamtkeimzahlen (log KbE/cm <sup>2</sup> bzw. ml) je Hof und Probenahmestelle als Heat Map. Die Keimzahlen wurden farblich in Kategorien eingeteilt: Grün: < 2; gelb: 2 – 5; rot: > 5 log KbE/cm <sup>2</sup> bzw. ml. Nicht vorhandene oder durch die Bauart des Melksystems bedingt nicht zugängliche Probenahmestellen wurden mit „-“ gekennzeichnet. Die Einheit der Keimzahlen der mit „ <sup>a</sup> “ gekennzeichneten Bereiche ist log KbE/ml und bei „ <sup>b</sup> “ gekennzeichnete Bereiche log KbE/cm <sup>2</sup> .....	51
<b>Abbildung 9:</b> In der Nähe des Melkstands gemessene <i>Pseudomonas</i> - und Gesamt-Luftkeimgehalte (log KbE/10 l) von 8 Erzeugerhöfen (inklusive der Betriebsstätten A und B von Hof 8) im Rahmen der Identifikation potentieller Eintragsrouten von <i>Pseudomonas</i> spp. in Rohmilch.....	52

<b>Abbildung 10:</b> Quantifizierung der Biofilmmasse von <i>Pseudomonas</i> -Isolaten in Mikrotiterplatten nach 6 Tagen bei 6 °C in 10, 50 und 100 %igem Milchmedium mit einer Inokulationsdosis von $6 \pm 0,5$ log KbE/ml gemessen durch die Extinktion bei 550 nm der angefärbten Biofilmmasse (abzüglich des Blank-Wertes).....	54
<b>Abbildung 11:</b> Mittelwerte der quantifizierten Biofilmmassen von <i>Pseudomonas</i> -Isolaten in Mikrotiterplatten nach 6 Tagen bei 6 °C in 10, 50 und 100 %igem Milchmedium aus Abbildung 10. Signifikante Unterschiede sind mit Sternen markiert: *, $p \leq 0,05$ ; **, $p \leq 0,01$ (Tukey HSD Test).....	55
<b>Abbildung 12:</b> Quantifizierung der Biofilmmasse von <i>Pseudomonas</i> -Isolaten auf Edelstahl-Plättchen nach 6 Tagen bei 6 °C in 10, 50 und 100 %igem Milchmedium mit einer Inokulationsdosis von $6 \pm 0,5$ log KbE/ml gemessen an der Extinktion bei 550 nm der angefärbten Biofilmmasse (abzüglich des Blank-Wertes). (M) = Mittels MALDI Biotyper® identifizierte Rohmilch-Isolate.....	56
<b>Abbildung 13:</b> Mittelwerte der quantifizierten Biofilmmassen von <i>Pseudomonas</i> -Isolaten auf Edelstahl-Plättchen nach 6 Tagen bei 6 °C in 10, 50 und 100 %igem Milchmedium aus Abbildung 12. Signifikante Unterschiede sind mit Sternen markiert: *, $p \leq 0,05$ ; **, $p \leq 0,01$ (Tukey HSD Test).....	57
<b>Abbildung 14:</b> Vergleich der quantifizierten Biofilmmasse von fünf <i>Pseudomonas</i> -Isolaten in Mikrotiterplatten (Kunststoff) und auf Edelstahl-Oberfläche nach 6 Tagen bei 6 °C in 10, 50 und 100 %igem Milchmedium mit einer Inokulationsdosis von $6 \pm 0,5$ log KbE/ml. Signifikante Unterschiede sind mit Sternen markiert: *, $p \leq 0,05$ ; **, $p \leq 0,01$ (Tukey HSD Test).....	58
<b>Abbildung 15:</b> Mit Glasperlen-Methode ermittelte Keimzahlen der auf Edelstahl-Oberfläche gewachsenen Biofilme von <i>Pseudomonas</i> -Isolaten nach 6 Tagen bei 6 °C in 10, 50 und 100 %igem Milchmedium mit einer Inokulationsdosis von $6 \pm 0,5$ log KbE/ml. (M) = Mittels MALDI Biotyper® identifizierte Rohmilch-Isolate.. ..	59
<b>Abbildung 16:</b> Vergleich der quantifizierten Biofilmmasse von 10 <i>Pseudomonas</i> -Isolaten auf Edelstahl- und Gummi-Oberfläche nach 6 Tagen bei 6 °C in 100 %igem Milchmedium mit einer Inokulationsdosis von $4 \pm 0,5$ log KbE/ml. Signifikante Unterschiede sind mit Sternen markiert: *, $p \leq 0,05$ ; **, $p \leq 0,01$ (Tukey HSD Test).....	60
<b>Abbildung 17:</b> Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von Rohmilch-Biofilmen auf Edelstahl- (A-D) und Gummi-Oberfläche (E-H) für 6 Tage bei 6 °C inkubiert. Gelbe Pfeile (A, B, E, F) zeigen „Biofilmiseln“, grüne Pfeile (D, H) in Biofilm-Matrix eingeschlossene Casein-Micellen und rote Pfeile (G, H) weisen auf netzartige, fadenförmige Adhäsine auf und zwischen Zellen hin. ....	62
<b>Abbildung 18:</b> Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von Rohmilch-Biofilmen auf Edelstahl- und Gummi-Oberfläche für 6 Tage bei 20 °C inkubiert. Gelbe Pfeile (A, F) zeigen „Biofilmrasen“, rote Pfeile (D, H) weisen auf netzartige, fadenförmige Adhäsine auf und zwischen Zellen hin und weißer Pfeil (H) zeigt schleimartige EPS-Bildung.....	63
<b>Abbildung 19:</b> Gegenüberstellung der Keimzahlen (log KbE/ml bzw. $\text{cm}^2$ ) verschiedener Keimgruppen in Rohmilch-Biofilmen auf Edelstahl- und Gummi-Oberfläche für 6 Tage bei 6 und 20 °C inkubiert. <sup>a</sup> = Keimzahl in log KbE/ml, <sup>b</sup> = Keimzahl in log KbE/ $\text{cm}^2$ , * = Keimzahl < 1 log KbE/ $\text{cm}^2$ .....	64
<b>Abbildung 20:</b> Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von Mono-Spezies-Biofilmen von <i>P. kielensis</i> (M) und <i>P. baltica</i> (M) nach 6-tägiger Inkubation bei 6 °C auf Edelstahl-Oberfläche mit einer Inokulationsdosis von $4 \pm 0,5$ log KbE/ml. Gelbe Pfeile (D) zeigen schleimartige Strukturen, vermutlich EPS, während rote Pfeile (H) auf Zellen mit einer Art Schleimkapsel überzogen zeigen. Grüne Pfeile (D) deuten auf Casein-Micellen auf Zell- und Edelstahl-Oberfläche hin. ....	67

<b>Abbildung 21:</b> Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von Mono-Spezies-Biofilmen von <i>P. fluorescens</i> L1-82 und <i>P. protegens</i> L1-102 nach 6-tägiger Inkubation bei 6 °C auf Edelstahl-Oberfläche mit einer Inokulationsdosis von $4 \pm 0,5 \log \text{ KbE/ml}$ . Gelbe Pfeile (H) zeigen fadenförmige, netzartige Biofilm-Matrix auf, während rote Pfeile (D) auf stark ausgeprägte EPS hinweisen. Grüner Pfeil zeigt in Biofilm-Matrix eingeschlossene Casein-Micelle.....	68
<b>Abbildung 22:</b> Analyse der Peptidaseaktivität durch Screening auf Magermilch-Agar von 38 <i>Pseudomonas</i> -Isolaten mithilfe der Auswertung nach Maier et al. (2020). <i>L. innocua</i> L1-63 wies als Negativ-Kontrolle keine Peptidaseaktivität auf und wurde in dargestellter Auswertung nicht berücksichtigt. ....	69
<b>Abbildung 23:</b> Peptidaseaktivität von <i>Pseudomonas</i> -Isolaten anhand des proteolytischen Index nach Hamdani et al. (2019) dargestellt. (M) = Mittels MALDI Biotyper® identifizierte Rohmilch-Isolate.....	70
<b>Abbildung 24:</b> Ergebnisse der Quantifizierung der Peptidaseaktivität von Biofilm-assoziierten und planktonischen Zellen mittels Fluorescamin-Assay mit einer Casein-Spaltung für $24 \pm 1$ Stunden bei 20 °C. Die gemessene Peptidaseaktivität ist in Femtokatal pro koloniebildende Einheit (fkat/KbE) angegeben. Oberes Säulendiagramm zeigt die Peptidaseaktivität der planktonischen Zellen auf, während das untere Diagramm die Quantifizierungsergebnisse der Peptidaseaktivität von Biofilm-assoziierten Zellen darstellt. Dabei sind die unterschiedlichen Skalierungen der y-Achsen zu beachten. <i>L. innocua</i> L1-63 lag als Negativ-Kontrolle unterhalb der Detektionsgrenze des Assays. (M) = Mittels MALDI Biotyper® identifizierte Rohmilch-Isolate. ....	71
<b>Abbildung 25:</b> Mittelwerte der Peptidaseaktivität Biofilm-assoziiertes und planktonischer Zellen quantifiziert mittels Fluorescamin-Assay mit einer Casein-Spaltung für $24 \pm 1$ Stunden bei 20 °C aus Abbildung 24. Signifikante Unterschiede sind mit Sternen markiert: *, $p \leq 0,05$ ; **, $p \leq 0,01$ (Tukey HSDTest). ....	72
<b>Abbildung 26:</b> Quotienten der Peptidaseaktivität Biofilm-assoziiertes und planktonischer Zellen aus den in Abbildung 24 dargestellten Quantifizierungs-Ergebnissen mittels Fluorescamin-Assay zur Einschätzung des Aktivitätsvermögens Biofilm-assoziiertes Zellen. (M) = Mittels MALDI Biotyper® identifizierte Rohmilch-Isolate. ....	73
<b>Abbildung 27:</b> Ergebnisse der Quantifizierung der Peptidaseaktivität Biofilm-assoziiertes Zellen auf Edelstahl- und Gummi-Plättchen mittels Fluorescamin-Assay mit einer Casein-Spaltung für $24 \pm 1$ Stunden bei 20 °C. Die gemessene Peptidaseaktivität ist in Femtokatal pro koloniebildende Einheit (fkat/KbE) angegeben. Oberes Säulendiagramm zeigt die Peptidaseaktivität der planktonischen Zellen auf, während das untere Diagramm die Quantifizierungsergebnisse der Peptidaseaktivität von Biofilm-assoziiertes Zellen darstellt. Dabei sind die unterschiedlichen Skalierungen der y-Achsen zu beachten.....	74
<b>Abbildung 28:</b> Quotienten der Peptidaseaktivität Biofilm-assoziiertes und planktonischer Zellen im Vergleich auf Edelstahl- und Gummi-Oberfläche aus den in Abbildung 27 dargestellten Quantifizierungs-Ergebnissen mittels Fluorescamin-Assay zur Einschätzung des Aktivitätsvermögens auf unterschiedlichen Oberflächen. ....	75

## Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b> Eine Auswahl enzymatischer Verderbsmöglichkeiten von Milch und Milchprodukten durch Verderbniserreger.....	5
<b>Tabelle 2:</b> Rezepturen der verwendeten Nährmedien.....	17
<b>Tabelle 3:</b> Rezepturen der verwendeten Chemikalien und Lösungen.....	19
<b>Tabelle 4:</b> Auflistung der <i>Pseudomonas</i> -Isolate für die Versuche zur Charakterisierung der Biofilmbildung und der Peptidaseaktivität von Biofilmen-assoziierten im Vergleich zu planktonischen Zellen.....	22
<b>Tabelle 5:</b> Auflistung der im Rahmen der 8 Hofbegehungen beprobten Bereiche und Stellen sowie die Art der Probe. M: Milch; S: Sonderprobe; T: Tupfer, angefeuchtet mit steriler Ringer-Lösung (Viertelstark); S/T: Wahl der Beprobungsart fand in Abhängigkeit zur Art des Melkstands statt, bspw. Tupferabstrich der Melkroboter-Bürste; W: Wasser.....	27
<b>Tabelle 6:</b> Einteilung der Peptidaseaktivität in Kategorien nach Maier et al. (2020) und Berechnung des proteolytischen Index nach Hamdani et al. (2019). .....	34
<b>Tabelle 7:</b> Inkubationsbedingungen von Plate-Count-Agar und ausgewählten Selektivnährböden zur Analytik von Rohmilch-assoziierten Multi-Spezies-Biofilmen.....	39
<b>Tabelle 8:</b> Auswertung der hofspezifischen Parameter nach Abfrage der 38 beprobten Erzeugerhöfe zur Analyse des Zusammenhangs zwischen hofseitigen Einflussfaktoren und <i>Pseudomonas</i> -Keimzahlen in Rohmilch. Die häufigste Nennung ist unterstrichen.....	41
<b>Tabelle 9:</b> Fragebogen zur Erfassung hofspezifischer Parameter der 38 Erzeugerhöfe zur Analyse möglicher Einflussfaktoren auf die <i>Pseudomonas</i> - und Gesamtkeimzahl mit dazugehörigen Erläuterungen für die Milcherzeuger. ....	XXXIII
<b>Tabelle 10:</b> Verbrauchs- und sonstige Materialien. ....	XXXIV
<b>Tabelle 11:</b> Geräte .....	XXXIV

## Einleitung

### 1 Rohmilch – Historie und Neuzeit

Seit ungefähr 9000 bis 6500 v. Chr. verzehren die Menschen Milch tierischen Ursprungs (Rosenstock et al. 2021; Helmer und Vigne 2007; Bellwood 2005). Aufgrund der vorherrschenden genetischen Laktoseintoleranz konsumierten Völker der Jungsteinzeit vermutlich keine Frischmilch, sondern Varianten von laktosereduzierter fermentierter Milch, Käse, Joghurt und Butter (Rosenstock et al. 2021; Leonardi et al. 2012). Alte Tongefäße, menschliche Zahnreste aus dieser Zeit und Analysen von Tierknochen belegen die frühe Verwendung von Milch tierischen Ursprungs (Grillo et al. 2020; Charlton et al. 2019; Debuno Spiteri et al. 2016). Dabei zeigten neuere genetische Studien die Persistenz des Enzyms Laktase in Europa vor 4000 Jahren, was den Verzehr von nicht-fermentierter, roher Milch ermöglichte (Charlton et al. 2019; Iain et al. 2015). Milch gilt daher als einer der Urquellen der Nahrung und wird aus einer Vielzahl von tierischen Quellen, wie Kühen, Ziegen, Schafen und Büffeln, aber auch vom Menschen zur Säuglingsernährung, gewonnen (Boquien 2018; Quigley et al. 2013). Der hohe Nährstoffgehalt der Milch umfasst Proteine, Fette, Kohlenhydrate, Vitamine, Mineralien und essentielle Aminosäuren (Quigley et al. 2013; O'Callaghan et al. 2012).

Mitte des 19. Jahrhunderts wurde die Milcherzeugung im Zuge der Industrialisierung in Städte verlagert. Milchvieh wurde dort unter unhygienischen Bedingungen und Mangelernährung in Kombination mit fehlenden Weiden, schmutzigem Wasser und infolge schlechter Tiergesundheit gehalten (Heckman 2019; Hartley 1842). Bakterielle Krankheitserreger konnten sich in Rohmilch vermehren, die nun Quelle für Krankheiten wie Tuberkulose und Typhus war (Currier und Widness 2018). Anstatt Zeit und Energie in die Erzeugung „sauberer“ Milch durch gesunde Kühe zu investieren, wurde die Hitzebehandlung durch Pasteurisierung eingeführt, um Bakterien abzutöten und „sichere“ Milch in den Städten zu gewährleisten (Heckman 2019).

Heutzutage führen gängige Verfahren zur Verlängerung der Haltbarkeit von Milch mittels Kurzzeiterhitzung (72-75 °C, 15-30 Sekunden) und Ultrahocherhitzen (135-155 °C, 2-4 Sekunden) zu einer Haltbarkeit von wenigen Tagen und einigen Monaten, wohingegen sog. ESL-Milch (125-127 °C, 2-4 Sekunden; optional Kurzzeiterhitzung mit Mikrofiltration kombiniert) mehr als 20 Tage gekühlt haltbar ist (Kaufmann et al. 2010; Vrese 2010). Durch die thermischen Verfahren werden die in Milch enthaltenen Bakterien abgetötet, während wichtige Vitamine erhalten bleiben (Kaufmann et al. 2010; Vrese 2010). Neben fertiger Trinkmilch gewinnt frische Rohmilch aufgrund der steigenden Nachfrage nach regionalen, unverarbeiteten Lebensmitteln wieder an Bedeutung. Die Ab-Hof Vermarktung von Rohmilch über Ausgabeautomaten ermöglicht das Abzapfen frischer Rohmilch und kommt dieser Nachfrage nach. Dabei übersteigt die Rohmilch der sog. Milchtankstellen regelmäßig einen der mikrobiologischen Referenzwerte (Böhnlein et al. 2021; Pöther et al. 2019). Krankheitsausbrüche können die Folge nicht



abgekochter Rohmilch sein, wenn lebensmittelbedingte Krankheitserreger, wie *Campylobacter jejuni* und *Arcobacter butzleri*, enthalten sind (Böhnlein et al. 2021). Ein neutraler pH-Wert, hohe Wasseraktivität und der hohe Nährstoffgehalt bieten vielen Mikroorganismen Grundlage für Wachstum, wodurch die mikrobielle Zusammensetzung in Rohmilch reichhaltig und vielfältig ist (Yuan et al. 2019; Quigley et al. 2013).

## 1.1 Mikrobiota in roher Kuhmilch

Die mikrobielle Gemeinschaft in roher Kuhmilch ist aufgrund der Zusammensetzung verschiedener taxonomischer Gruppen von Mikroorganismen vielfältig und komplex (Parente et al. 2020). Mikroorganismen mit der höchsten Abundanz in Rohmilch gehören den Phyla Firmicutes (Ordnung *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Lachnospiraceae*, *Ruminococcaceae*, *Enterococcus*, *Clostridiales*, *Aerococcus*), Actinobacteria (Ordnung *Corynebacterium*, *Bifidobacterium*, *Propionibacterium*), Bacteroidetes (*Prevotella*, *Bacteroidales*, *Flavobacteriaceae*, *Sphingobacterium*) und Proteobacteria (Ordnung *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*) an (Falardeau et al. 2019; Cremonesi et al. 2018; Derakhshani et al. 2018). Gram-positive Bakterien wie *Bacillus*, *Microbacterium* und *Staphylococcus* sowie eine Vielzahl an Milchsäurebakterien, wie *Lactococcus*, *Streptococcus* und *Leuconostoc* sind in Rohmilch vertreten (Skeie et al. 2019; Yuan et al. 2019; Neubeck et al. 2015; Quigley et al. 2013). Neben gesundheitsfördernden Bakterien, wie *Lactobacillus* und *Bifidobacterium*, können auch krankheitsverursachende Bakterien, wie *Listeria*, *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Campylobacter* und *Mycobacterium* Teil der Mikrobiota darstellen (Ndahetuye et al. 2020; Quigley et al. 2013). In frischer Rohmilch dominieren Gram-positive Bakterien, wohingegen bei Kühltemperaturen Gram-negative Mikroorganismen die Mehrheit der Mikrobiota bilden (Machado et al. 2017). Dazu zählen die Gattungen *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Hafnia*, *Rahnella*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Enterobacter*, *Stenotrophomonas*, *Aeromonas*, *Acromobacter*, *Alcaligenes*, *Chryseobacterium* und *Flavobacterium* (Sun et al. 2022; Machado et al. 2017; Vithanage et al. 2016; Samarzija et al. 2012). Eine weitere Gruppe, der in Rohmilch vorkommenden Mikroorganismen, bilden die thermodurischen Psychrotrophen. Psychrotrophe Bakterien zeichnen sich durch Wachstum bei Temperaturen unter 7 °C aus und gelten bei Wachstum nach dem Erhitzen der Milch zusätzlich als thermostabil (Vithanage et al. 2016; Champagne et al. 1994). Gram-positive Sporenbildner, wie *Bacillus*, *Brevibacillus* und *Clostridium*, sowie Gram-positive vegetative Mikroorganismen, wie *Microbacterium*, *Streptococcus* und *Corynebacterium*, zählen zu dieser Gruppe (Vithanage et al. 2016; Chavan et al. 2011; Champagne et al. 1994). *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica* und *Bacillus cereus* werden den pathogenen Psychrotrophen zugeordnet (Champagne et al. 1994). Lange

galt die aus gesunden Euterzellen gewonnene Milch als steril (Tolle 1980). Nach heutigem Stand ist unklar, ob es eine Mikrobiota der gesunden Milchdrüse gibt oder ob diese das Ergebnis einer Kontamination der Milchgewinnung ist (Parente et al. 2020; Derakhshani et al. 2018). Dabei stellen u. a. die Zitze (Zitzenkanal, Zitzenoberfläche), das Melkgeschirr, die Luft der Melkumgebung und das Wasser zur Reinigung von Melkgeschirrs/-anlage, das Futter und Heu des Milchviehs und Schmutz mögliche bakterielle Eintragsquellen dar (Reguillo et al. 2018; Doyle et al. 2017b; Vacheyrou et al. 2011; Verdier-Metz et al. 2009). Darüber hinaus wurden Einflüsse von Mastitis-Erkrankungen, antimikrobielle Behandlungen und unterschiedliche Therapiemaßnahmen während der Trockenstehzeit auf die Rohmilch-Mikrobiota untersucht (Bonsaglia et al. 2017; Kuehn et al. 2013). Vithanage et al. (2016) stellten eine lagerzeit- und temperaturabhängige Mikrobiota der Rohmilch fest. Bei einer 10-tägigen Lagerung der Milch bei Temperaturen  $\leq 4$  °C dominierten die Gattung *Pseudomonas* und vereinzelte *Bacillus*-Isolate, während der Anteil an *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Staphylococcus* sowie Milchsäurebakterien und Vertretern der Familie der *Enterobacteriaceae* abnahm. Bei Temperaturen  $\geq 6$  °C nahm das Wachstum Gram-positiver, mesophiler Mikroorganismen, u. a. wie Lactobacilli, *Enterococcus*, *Streptococcus* und *Micrococcus*, und einiger Gram-negativer Gattungen der *Enterobacteriaceae* zu (Vithanage et al. 2016). Hefen, u. a. der Gattung *Candida* und *Kluyveromyces*, sowie Schimmelpilze der Gattung *Aspergillus*, *Fusarium* und *Penicillium* sind ebenfalls Teil der Milchmikrobiota (Moravkova et al. 2021; Gethins et al. 2016; Jodral et al. 1993).

## 1.2 Verderbniserreger und -erscheinung in der milchverarbeitenden Industrie

Gram-negative Psychrotrophe, wie *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Hafnia*, *Klebsiella*, *Stenotrophomonas*, *Serratia*, und *Aeromonas* sowie Gram-positive *Bacillus* spp. sind für die Produktion proteolytischer Enzyme in Rohmilch verantwortlich (Vithanage et al. 2016; Baur et al. 2015a; Samarzija et al. 2012). Gram-negative psychrotrophe Bakterien bilden Zink-Metalloproteasen, wie AprX, der Serralysin-Unterfamilie, während *Bacillus* spp. Substilisins und Thermolysin der Serin-Unterfamilie produzieren (Stoeckel et al. 2016; Vithanage 2017; Jonghe et al. 2011; Dufour et al. 2008; Häse und Finkelstein 1993). Die Gattung *Pseudomonas* gilt dabei als der Hauptverursacher für enzymatisch bedingten Verderb von Rohmilch und der damit einhergehenden verminderten Milchqualität (Oliveira et al. 2015; Baur et al. 2015a). Weitere für den Verderb von Milch verantwortliche Gattungen sind u. a. *Acinetobacter*, *Chryseobacterium*, *Clostridium*, *Bacillus* und andere sporenbildende oder thermodurische Mikroorganismen (Yuan et al. 2019; Quigley et al. 2013).

Die für den Milchverderb relevanten bakteriellen Peptidasen AprX, Substilisins und Thermolysin sind durch *aprx*, *npr* und *apre* Gene codiert (Montanhini et al. 2013; Dufour et al. 2008; Jan et al.

2000; Tran et al. 1991). Neben Proteasen werden lipolytische Enzyme, wie Lipasen, Esterasen und Phospholipasen, von psychrotrophen Mikroorganismen produziert (Vithanage et al. 2016; Neubeck et al. 2015; Jonghe et al. 2011). Dabei dominiert *Pseudomonas* spp. den Anteil Kälte-toleranter Bakterien in Rohmilch und ist damit als Verderbniserreger von Milch von großer Bedeutung (Murphy et al. 2016; Marchand et al. 2009a). Die alkaline, caseinolytische Metallopeptidase AprX ist bislang die einzige bekannte Peptidase, welche von *Pseudomonas* spp. gebildet wird (Caldera et al. 2016; Dufour et al. 2008; Maier et al. 2020). So belegen viele Autoren die Verbindung zwischen aprx-positiven *Pseudomonas*-Isolaten mit proteolytischer Aktivität (Maier et al. 2020; Meng et al. 2018; Woods et al. 2001).

Durch thermische Behandlung der Rohmilch, wie Erhitzung bei Ultra-Hoch-Temperatur (UHT), werden Mikroorganismen abgetötet. Allerdings bilden proteolytisch aktive Bakterien thermostabile Peptidasen, die durch die Hitzebehandlung nicht vollständig inaktiviert werden. So wiesen Baur et al. (2015b) eine Restaktivität von  $88,0 \pm 7,7$  % der von *P. fluorescens* sekretierten Peptidase in UHT-behandelter Milch (138 °C für 18 Sekunden) nach. Schon kleine Konzentrationen aktiver Peptidasen führen während der Lagerung von erhitzter Milch vor Ablauf der Mindesthaltbarkeit zu verschiedenen Produktschäden, wie Bildung unerwünschter Bitterstoffe und Gelierung (Stoeckel et al. 2016; Baur et al. 2015a; Marchand et al. 2009a). Baur et al. (2015b) wiesen eine Sedimentierung des Milchproteins bereits bei einer Enzymkonzentration von 1 pkat/ml nach 4-wöchiger Lagerung nach.

Durch Hydrolysierung von Triacylglyceriden (TAG) führen Lipasen in UHT-Produkten durch die freigesetzten Fettsäuren zur Bildung von Fehlparomen, wie Ranzigkeit (Andersson und Danielsson 1981), und sind somit, im Vergleich zu weiteren lipolytischen Enzymen, für die Forschung von Interesse. Esterasen spielen durch die Hydrolyse von kurzen Acylglyceriden, ebenso wie Phospholipasen C, welche Phospholipide der Milchfettkugeln-Membran (MFGM) hydrolysieren, für den durch Lipolyse bedingten Verderb eine untergeordnete Rolle (Machado et al. 2017; Chrisope und Marshall 1976). Eine Übersicht über den enzymatisch bedingten Verderb in Milch und Milchprodukten in Folge von Verderbniserregern gibt Tabelle 1. Milchsäurebakterien, wie *Lactococcus*, *Lactobacillus* und *Leuconostoc*, sind u. a. in der Käseherstellung zur Ausbildung eines typischen Geschmacks erwünscht. Allerdings tragen übermäßige Mengen durch Bildung von Fehlparomen ebenfalls zum Verderb der Milcherzeugnisse bei (Tilocca et al. 2020; Hassan und Frank 2011). Hauptsächlich finanzielle Verluste, aber auch Produktrückrufe und ein negatives Markenimage können die Folge durch enzymatisch bedingten Verderb sein (Vithanage 2017). Durch die gestiegene internationale Nachfrage ist die Stabilität von H-Milch und somit die Haltbarkeit während der Lagerung und des Transports von wesentlicher Bedeutung (Vithanage 2017; Chavan et al. 2011). Im Jahr 2020 wurden mit circa 15,8 Mio. Tonnen die Hälfte der in Deutschland gewonnenen Milch exportiert (Milchindustrie-Verband e.V. 2021b). Da es bislang keine effektive technologische Strategie zur vollständigen Inaktivierung der

hitzeresistenten Enzyme gibt, besteht die Notwendigkeit den Eintrag der enzymbildenden Mikroorganismen in die Rohmilch zu reduzieren.

Tabelle 1: Eine Auswahl enzymatischer Verderbsmöglichkeiten von Milch und Milchprodukten durch Verderbniserreger.

Art des Verderbs	Milch oder Milchzeugnis	Erscheinung des Verderbs	Mikroorganismus	Publikation
Proteolyse	Milch	Bildung von Bitterstoffen, Partikel-/ Sedimentbildung, Aufrahmung, Gellierung	<i>Pseudomonas</i> sp.	Stoeckel et al. (2016),
			<i>Pseudomonas weihenstephanensis</i> ,	
			<i>Pseudomonas proteolytica</i>	
			<i>Pseudomonas</i> sp. nov.	Glück et al. (2016),
			<i>Enterococcus faecalis</i>	Biscola et al. (2016),
Lipolyse	Joghurt, saure Sahne	Ranziges, seifiges, pappiges, metallisches, fruchtiges Aroma	<i>Bacillus subtilis</i> ,	Jonghe et al. (2010),
			<i>Bacillus cereus</i> Gruppe,	
			<i>Paenibacillus polymyxa</i>	
			<i>Bacillus licheniformis</i> , <i>Bacillus pumilus</i> ,	Mehta et al. (2019)
			<i>Paenibacillus polymyxa</i> , <i>Bacillus subtilis</i>	
Lipolyse	Milch	Ranziges, seifiges, pappiges, metallisches, fruchtiges Aroma	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Andersson und Danielsson (1981),
			<i>Pseudomonas</i> spp.	Capodifoglio et al. (2016)
			<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus pumilus</i> , <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Jonghe et al. (2010),
			<i>Bacillus licheniformis</i> , <i>Bacillus pumilus</i> ,	Mehta et al. (2019)
			<i>Paenibacillus xylanilyticus</i> , <i>Paenibacillus polymyxa</i>	

### 1.3 Rechtsvorschriften zur Hygiene und Güteuntersuchung von Rohmilch

Die Hygienevorschriften für die Rohmilcherzeugung, die Milcherzeugerbetriebe und Kriterien für Rohmilch erfolgen gemäß Verordnung (EG) Nr. 853/2004 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 29. April 2004 mit spezifischen Hygienevorschriften für Lebensmittel tierischen Ursprungs in Abschnitt IX Kapitel 1. Demnach muss Rohmilch nach dem Melken auf nicht mehr als 8 °C und ab zweitägiger Abholung auf nicht mehr als 6 °C gekühlt werden.

Auf nationaler Ebene trat im Jahr 2021 die Verordnung zur Förderung der Güte von Rohmilch, kurz Rohmilchgüteverordnung (RohmilchGütV), in Kraft und löste damit die Milch-Güteverordnung (1980) über die Güteprüfung und Bezahlung der Anlieferungsmilch ab. Laut Rohmilchgüteverordnung (2021) § 3 Absatz 1 Nr. 5 müssen Abnehmer die Beschaffenheit der Anlieferungsmilch hinsichtlich Fett- und Eiweißgehaltes, Gefrierpunkt und Gehalt somatischer Zellen sowie bakteriellen Status anhand der Gesamtkeimzahl und Vorhandenseins an Hemmstoffen untersuchen. Monatlich erfolgen für die Feststellung der Gesamtkeimzahl mindestens zwei Untersuchungen nach amtlichen Verfahren nach § 64 Absatz 1 des Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuch (LFGB). Zu den amtlichen Verfahren zur Erfassung der Gesamtkeimzahlen zählen die Koloniezählung bei 30 °C mittels Gussplattenverfahren gemäß ASU L 00.00-88/1 und die durchflusszytometrische Zählung gemäß ASU L 01.01-7. Die Güteuntersuchung hinsichtlich des bakteriellen Status sollte keinen Nachweis von Hemmstoffen und eine Gesamtkeimzahl nicht höher als 100 000 (5 log) KbE/ml ergeben. Zudem sollte eine somatische Zellzahl von 400 000 (5,6 log) Zellen/ml nicht überstiegen werden. Wird einer dieser Gütemerkmale überschritten, folgt eine Minderung des Kaufpreises um mindestens 2 bis 3 Cent je Kilogramm Rohmilch.

Da der Gehalt an *Pseudomonas* spp. in Rohmilch gemäß Rohmilchgüteverordnung (2021) kein Gütemerkmal darstellt, ist die Ermittlung der *Pseudomonas*-Keimzahl folglich kein Teil der Untersuchungsverfahren zur Güteuntersuchung. Somit bleibt ein Abschlag auf den Kaufpreis bei mit *Pseudomonas* spp. belasteter Rohmilch aus und eine Einschätzung eines späteren enzymatisch bedingten Verderbs von Milch und Milchprodukten ist nicht möglich.

## 2 *Pseudomonas* spp.

### 2.1 Namensgebung und Klassifizierung von *Pseudomonas* spp.

Ende des 19. Jahrhunderts wurde die Namensgebung der Gattung *Pseudomonas* vom deutschen Botaniker Walter Migula geprägt (Palleroni 2010; Migula 1900, 1897), wobei im Jahr 1923 erstmalig im *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* über diese Gattung berichtet wurde. Der Name leitet sich vom Griechischem *pseudês* = *false* (engl.) und *monas* = *a unit* (engl.) ab

(DSMZ 2021; Palleroni 2010). Bis Mitte des 20. Jahrhunderts erfolgte eine fehlerhafte Klassifizierung von mehr als 800 Arten zur Gattung *Pseudomonas*. Es wird vermutet, dass zu jener Zeit alle Gram-negativen, strikt aeroben, nicht-sporenbildenden, motilen Bakterien der Gattung *Pseudomonas* zugeordnet wurden (Scales et al. 2014; Anzai et al. 2000). Erst nach Entwicklung erster biomolekularer Analysemethoden bis hin zur Durchführung polyphasischer taxonomischer Studien mit Methoden zur Analyse von Mikroorganismen war eine Identifizierung verschiedener phylogenetischer Gruppen möglich (Anzai et al. 2000).

## 2.2 Charakteristika und Eigenschaften von *Pseudomonas* spp.

Die Ordnung *Pseudomonadales* ist der Klasse *Gammaproteobacteria* untergeordnet, zu der die Familie der *Pseudomonaceae* zählt. Dazu gehört die Gattung *Pseudomonas* mit über 200 Spezies-Beschreibungen (DSMZ 2021). Bei *Pseudomonas* spp. handelt es sich um Gram-negative, motile, nicht-fermentative, obligat aerobe und nicht-sporenbildende Stäbchen, die häufig psychrotrophe und überwiegend Oxidase- und Katalase-positive Charakteristika aufweisen (Caldera et al. 2016; Palleroni 2015; Heller et al. 1990). Einige *Pseudomonas*-Spezies bilden Pigmente, wie Pyoverdin und Pyocyanin (Scales et al. 2014). *P. fluorescens* bildet hauptsächlich Pyoverdin, welches Martin et al. (2011) mit blau-fluoreszierender Erscheinung auf Käse untersuchten.

Das Wachstumsoptimum von *Pseudomonas* spp. liegt zwischen 25 und 35 °C, wobei ein speziesabhängiges Wachstum bei Kühltemperaturen zwischen 0 und 7 °C sowie bei Temperaturen bis zu 45 °C möglich ist (Andreani und Fasolato 2017; Caldera et al. 2016; Moreno und Rojo 2014). Der minimale  $a_w$ -Wert für *Pseudomonas* spp. beträgt 0,97, zudem liegt der optimale pH-Wert über 5,8, wobei eine Vermehrung unter pH 4,5 nicht möglich ist (Dimassi et al. 2020; Andreani und Fasolato 2017; Palleroni 2015; Fontana 2007).

*Pseudomonas* spp. ist ein ubiquitär vorkommender Mikroorganismus, der in Erdboden, Pflanzen, Feuchtbereichen und Prozesswasser nachgewiesen wurde (Mena und Gerba 2009; Sørensen und Nybroe 2004; Heller et al. 1990). Zudem dominiert *Pseudomonas* spp. als Verderbniserreger in zahlreichen Lebensmitteln, wie Fleisch, Fisch, Gemüse, Käse und Milch (Stellato et al. 2017; Caldera et al. 2016; Pinto et al. 2015; Macé et al. 2012; Marchand et al. 2009a; Dogan und Boor 2003).

Der kulturabhängige Nachweis von *Pseudomonas* spp. zur Bestimmung der Keimzahl in Milch und Milcherzeugnissen erfolgt gemäß ISO/TS 11059:2009-08. Hierfür wird Agar mit Cephalothin, Fusidinsäure und Ceftrimid (CFC) eingesetzt und die auf der Oberfläche gewachsenen Kolonien nach einer Inkubation bei  $25 \pm 1$  °C für  $48 \pm 2$  Stunden gemäß DIN EN ISO 13720 ausgezählt. Präsumtive *Pseudomonas*-Isolate können dann biochemisch mit API® ID-Teststreifen (API 20NE,

API 50CH), molekularbiologisch über PCR-basierte Methoden (Beispiel *rpoB*, *rpoD* Gen) oder physikalisch über FT-IR-Spektroskopie sowie MALDI-TOF MS identifiziert werden (Gieschler et al. 2021; Caldera et al. 2016; Neubeck et al. 2015). Ein kulturunabhängiges Verfahren zum Nachweis von *Pseudomonas* spp. stellt die Hochdurchsatz-Sequenzierung (*Next Generation Sequencing*) dar (Pereira et al. 2018).

Die Gattung *Pseudomonas* umfasst derzeit 256 publizierte Spezies und ist damit die artenreichste Gattung innerhalb der Gruppe Gram-negativer Bakterien (DSMZ 2021). Die stetig wachsende Zahl an phylogenetischen Neubeschreibungen lassen auf ein Artenreichtum mit einer Vielzahl unbekannter *Pseudomonas*-Spezies und noch unerforschem, potentiellen Verderbspotential schließen (Gieschler et al. 2021; Duman et al. 2021; Zhao et al. 2021; Hofmann et al. 2020a, 2020b). Die Identifizierung von *Pseudomonas* spp. mittels 16S rRNA-Sequenzanalyse ermöglicht eine taxonomische Einordnung auf Gattungsebene. Allerdings ist eine Spezieszuordnung anhand des 16S rRNA Gens aufgrund der hohen Konservierung dieses ribosomalen Gens nicht möglich, sodass zusätzliche Analysen zur korrekten phylogenetischen Zuordnung empfohlen werden (Caldera et al. 2016; Gomila et al. 2015). Beispielsweise führten Gieschler et al. (2021) für die phylogenetische Beschreibung von *P. kielensis* sp. nov. und *P. baltica* sp. nov. aus Rohmilch mehrere Untersuchungen durch. Neben der Analyse der *rpoB*-Genfragmentsequenzen unter Verwendung einer in-house-Datenbank, bestehend aus 221 *rpoB*-Sequenzen von *Pseudomonas*-Typstämmen, erfolgte die Bestimmung der Werte digitaler DNA-DNA Hybridisierung (dDDH) mittels bioinformatischer Plattform der DSMZ „TYGS“ und die Bestimmung durchschnittlicher Nukleotid-Identität (ANI), sodass Verwandtschaften zu bekannten Spezies analysiert werden konnten.

### 2.3 *Pseudomonas* spp. in Rohmilch

In Rohmilch kann die Gattung *Pseudomonas* bis zu 50 % der psychrotrophen Bakterien betragen und dabei über andere Gattungen wie *Aeromonas*, *Listeria*, *Staphylococcus* und *Enterococcus* sowie die Familie der *Enterobacteriaceae* dominieren (Neubeck et al. 2015; Sørhaug und Stepaniak 1997; Reinheimer et al. 1990; Cousin 1982). Die Kombination aus langen Lagerzeiten und niedrigen Temperaturen stellt einen Selektionsvorteil für psychrotrophe Bakterien, wie *Pseudomonas* spp., in Rohmilch dar (Cousin 1982). Mehreren Autoren zufolge können folgende Vertreter der Gattung *Pseudomonas* häufig in Rohmilch vorkommen: *P. proteolytica*, *P. lundensis*, *P. lactis*, *P. fragi*, *P. protegens*, *P. gessardii* und *P. fluorescens*. Aber auch *P. poae*, *P. brennerii*, *P. veronii*, *P. putida*, *P. stutzeri*, *P. psychrophila* und *P. syringae* werden regelmäßig aus Rohmilch isoliert (Rossi et al. 2018; Caldera et al. 2016; Vithanage et al. 2016; Neubeck et al. 2015; Marchand et al. 2009b; Dogan und Boor 2003). *P. aeruginosa*, als opportunistischer

Krankheitserreger für Mensch und Tier, ist bei Mastitis-Ausbrüchen bei Milchkühen und als enzymatischer Verderbserreger in der Matrix Milch ebenfalls von Bedeutung (Schauer et al. 2021; Bader und Abdulaal 2017; Yagoub et al. 2008). Einige *Pseudomonas*-Stämme weisen auch eine Hitzeresistenz auf und gelten damit als thermodurisch. So ermittelten Aguirre et al. (2009) bei *P. fluorescens* in Vollmilch bei einer Temperatur von 53 °C einen D-Wert von 1,16 Minuten und einen z-Wert von 4,74 °C. Neben der Produktion lipolytischer Enzymen stellt *Pseudomonas* spp. durch Bildung thermostabiler Peptidasen ein Risiko eines enzymatischen Verderbs von Milch dar. *Pseudomonas* spp. neigt dazu Peptidasen allein oder in Kombination mit Lipasen zu exprimieren, wohingegen die Minderheit an *Pseudomonas*-Stämmen ausschließlich lipolytisch aktiv ist (Neubeck et al. 2015). Dabei ist die proteolytische und lipolytische Aktivität abhängig vom *Pseudomonas*-Stamm (Dogan und Boor 2003). Die Hitzestabilität proteolytischer und lipolytischer Enzyme wurde bereits im Einleitungs-Abschnitt 1.2 erläutert. Von *Pseudomonas* spp. produzierte Peptidasen und Lipasen werden während der thermischen Behandlung von Milch nicht oder nur unvollständig inaktiviert (Glück et al. 2016). Nach Andersson et al. (1979) ergab die Erhitzung von Magermilch auf 140 °C für 2 Minuten eine 90 %ige Inaktivierung der Lipase von *Pseudomonas fluorescens*. Stoeckel et al. (2016) stellten nach Erhitzung von Vollmilch auf 140 °C für 1,2 Minuten eine 10 %ige Restenzymaktivität der Peptidasen von *Pseudomonas sp.* und *P. proteolytica* fest. Die hitzeresistente Zink-Metallopeptidase AprX, welche ein Molekulargewicht zwischen 45 und 50 kDa besitzt, hydrolysiert  $\alpha_{S1-}$ ,  $\alpha_{S2-}$ ,  $\beta$ - und  $\kappa$ -Casein und wird durch das *aprX-lipA2* Operon codiert (Maier et al. 2020; Baglinière et al. 2013; Marchand et al. 2009b; Woods et al. 2001). *Pseudomonas*-Stämme mit einem *aprX* Gen besitzen häufig weitere Gene, welche einen Peptidase-Inhibitor (AprI), ein Typ-I-Sekretionsystem (AprDEF), zwei putative Autotransporter (PrtA und PrtB) und eine Lipase (LipA) codieren (Maier et al. 2020; Woods et al. 2001). Maier et al. (2020) ermittelten 22 unterschiedliche Operon-Typen, wobei 31 % der untersuchten *Pseudomonas*-Typstämme (n = 185) dem Operon-Typ 1 (*aprXIDEFprtABlipA2*) zuzuordnen waren. Bisher sind Isolate der *Pseudomonas*-Spezies *P. proteolytica*, *P. lactis*, *P. protegens*, *P. gessardii* und *P. fluorescens* mit starker Peptidaseaktivität assoziiert, wohingegen *P. lundensis* und *P. fragi*-Isolate als moderat und schwach proteolytisch eingestuft werden (Maier et al. 2020; Jonghe et al. 2011; Dogan und Boor 2003). Ein weiteres bedeutsames Charakteristikum von *Pseudomonas* spp. ist die Fähigkeit zur Ausbildung von Biofilmen, um neben planktonischer auch in sessiler Wuchsform vorzukommen (Rossi et al. 2018).



## 3 Biofilm

### 3.1 Definition, Vorkommen, Bildung, Einflussfaktoren

Als Biofilme werden multizelluläre Komplexe aus Mikroorganismen bezeichnet, die in einer selbst produzierten Matrix aus extrazellulären polymeren Substanzen (EPS) eingebettet und irreversibel an einer Aufwuchsoberfläche (Substratum) sowie untereinander gebunden sind (Donlan 2002). Nach Flemming und Wuertz (2019) befinden sich 40 bis 80 % der Zellen auf der Erde in Biofilmen, sodass Biofilme die Hauptform bakteriellen Lebens darstellen.

Die Entstehung von Biofilmen basiert auf der Anheftung von Mikroorganismen an einer Aufwuchsoberfläche. Nach anfänglichem, reversiblen Kontakt wird die Adhäsion zwischen planktonischen Zellen und Substratum aufgrund zunehmender Wechselwirkungen zwischen Bestandteilen der Zelloberfläche und dem Substratum irreversibel (Flemming und Wingender 2001). Eine wichtige Rolle für die Anheftung der Zellen besitzen hierbei Strukturen der Zelloberfläche mit Funktion zur Überwindung von Abstoßungskräften und als Adsorptionsmittel, wie Flagellen, Fimbrien, Pili und weitere Proteine, zum Beispiel Antigen 43. (Ozer et al. 2021; Otton et al. 2017; Wang et al. 2017; Donlan 2002; Danese et al. 2000; Austin et al. 1998). Genau betrachtet erfolgt die anfängliche Adhäsion an einen aus organischen Makromolekülen bestehenden *conditioning film* auf dem Substratum (Flemming und Wingender 2001). Die anschließende mikrobielle Akkumulationsphase ist durch bakterielles Wachstum und Ausbildung von Mikrokolonien bestimmt. Während dieser Phase erfolgt die Produktion extrazellulärer polymerer Substanzen (EPS), die den Raum zwischen Bakterien formen, diese fest im Zellverband der Mikrokolonien fixieren und die 3-dimensionale Anordnung der Mikroorganismen durch hydrophobe und ionische Wechselwirkungen ermöglichen. Schließlich bildet sich ein reifer Biofilm aus, der in der sog. Plateau-Phase durch Neubildung und Ablösung von Biofilmmaterial geprägt ist (Muhammad et al. 2020; Costa et al. 2018; Flemming und Wingender 2001). Durch Wirkung von Scherkräften können einzelne Bakterienzellen („Erosion“) oder ganze Biofilmfetzen, sog. *sloughing*, abgelöst werden. Als Schwärmerzellen werden Bakterienzellen bezeichnet, die aktiv die Biofilmgemeinschaft verlassen (Flemming und Wingender 2001).

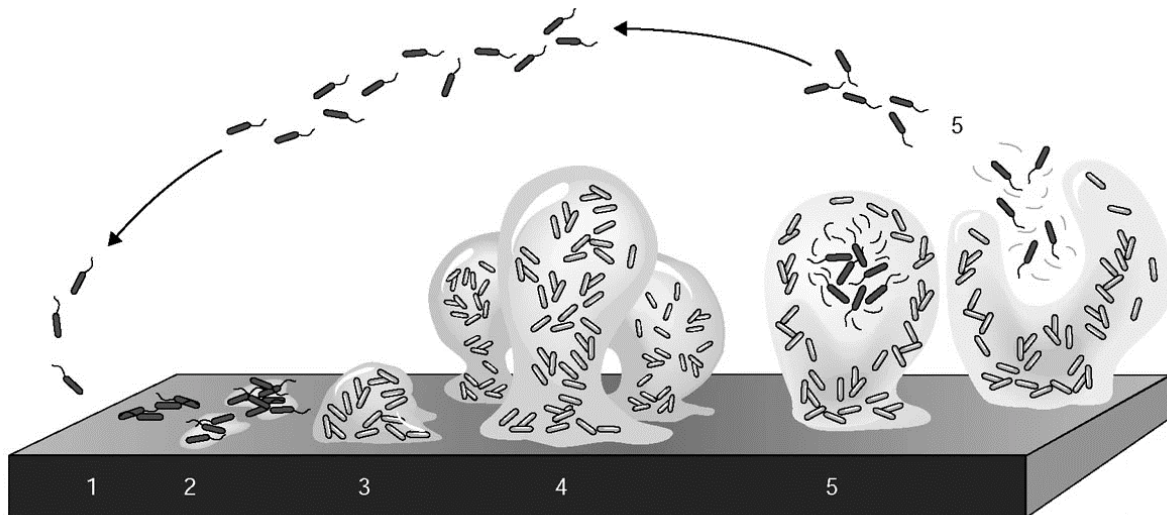


Abbildung 1: Darstellung eines Modells zur Entwicklung und Neubildung von Biofilmen. (1) Erster, reversibler Kontakt der Bakterienzellen mit dem Substratum, (2) gefolgt von zunehmend irreversibler Bindung, (3) wobei mikrobielles Wachstum und Produktion extrazellulärer polymerer Substanzen (EPS) zur Ausbildung von Mikrokolonien (4) führt. Mit der Zeit erfolgt die Ausbildung eines reifen Biofilms (5), wobei Biofilmmaterial in sog. Plateau-Phase durch Erosion, sloughing oder Schwärmerzellen (5) neugebildet und abgelöst wird. Abbildung von Sauer (2003), modifiziert nach Stoodley et al. (2002).

Innerhalb des Biofilms sind die Zellen durch die EPS-Matrix sowie von Zellen in den äußeren Biofilmschichten vor Umwelteinflüssen und Reinigungsmitteln sowie anderen mikrobiellen Substanzen geschützt (Peng et al. 2002). Neben mikrobiellen Zellen bilden extrazelluläre Substanzen den Hauptbestandteil der Biofilm-Matrix. Diese sind aus Polysacchariden, sekretierten Proteinen, Nukleinsäuren, Lipiden und weiteren polymerischen Verbindungen zusammengesetzt (Donlan 2002; Flemming und Wingender 2001). Neben der Einbettung in die EPS-Matrix bieten eine verlangsamte Wachstumsrate und spezifische Genexpression Biofilm-assoziierten Zellen durch Veränderung der Zellstruktur und der Stoffwechselaktivitäten zusätzlich Schutz (Mah und O'Toole 2001; Flemming und Wingender 2001; Lewis 2001). Biofilm-assoziierte Zellen können eine bis zu 1000-fach höhere Toleranz gegenüber Bioziden und Antibiotika im Vergleich zur planktonischen Wuchsform aufweisen, wobei der Reifegrad des Biofilms Einfluss auf die Wirksamkeit der Substanzen nimmt (Bas et al. 2017; Olson et al. 2002; Ceri et al. 1999). Weitere physiologische Veränderungen Biofilm-assoziiierter Zellen, die zur gesteigerten Biozid-Resistenz beitragen, sind die Induktion der allgemeinen Stressantwort, gesteigerte Expression von *Multidrug*-Effluxpumpen, die Aktivierung von *Quorum Sensing*-Systemen oder veränderte Profile von Außenmembran-Proteinen (Mah und O'Toole 2001).

Bei der Anheftung bakterieller Zellen an ein Substratum nehmen die Mikroorganismen selbst Einfluss auf die Biofilmentstehung. Dabei ist die Zellanheftung in Abhängigkeit von Bakterienspezies, Zellzahl, Hydrophobizität, Ladung der Zelloberfläche und Bildung von Exopolymeren sowie spezifischen zellulären Strukturen, wie Adhäsine (Teixeira et al. 2005; Flemming und Wingender 2001). Ein weiterer Einflussfaktor stellt die Aufwuchsoberfläche dar.

Die Bedeutung der Hydrophobizität bei der Zellanheftung wurde bereits in vielen Studien untersucht (Forson et al. 2020; Lee et al. 2015; Teixeira et al. 2005; Pereira et al. 2000). Dabei gilt nach van Oss und Giese (1995) ein Festkörper als hydrophob, wenn die freie Energie der Wechselwirkung zwischen seinen Oberflächenmolekülen in Gegenwart von Wasser negativ ist, andernfalls gilt er als hydrophil. Auch Oberflächeneigenschaften, wie Rauheit und Porosität, Ladung und Spannung sowie das Vorhandensein zweiwertiger Kationen wie  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$  spielen bei der Anheftung der Zellen eine Rolle (Pereira et al. 2000). Zuletzt nimmt das Medium, durch Temperatur, pH-Wert, gelöste an-/ organische Stoffe, Viskosität und hydrodynamische Parameter, wie Scherkräfte, Turbulenz und Druck, Einfluss auf die Bildung mikrobieller Biofilme (Flemming und Wingender 2001).

Das Vorkommen von Biofilmen ist ubiquitär, da sie auf den verschiedensten Oberflächen und Habitaten vorzufinden sind. In Krankenhäusern spielen Biofilme auf Medizinprodukten und auf lebendem Gewebe durch anhaltende Infektionen eine Rolle (Percival et al. 2015; Dongari-Bagtzoglou 2008). Aber auch über die Biofilmbildung im Trinkwasserverteilungsnetz sowie in natürlichen Wassersystemen wurde berichtet (Liu et al. 2016; Neu und Lawrence 1997). Biofilme in der Lebensmittelindustrie bergen ein erhebliches Risiko für die Lebensmittelqualität und -sicherheit als Ursache für (Kreuz-) Kontaminationen und können dabei die Gesundheit der Verbraucher gefährden und zu finanziellen Verlusten für die Industrie führen (Dantas et al. 2018; Kostaki et al. 2012). Biofilmbildende Krankheits- und Verderbniserreger mit bedeutsamer Abundanz im Lebensmittelsektor sind *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., Shigatoxinproduzierende *Escherichia coli* (STEC), *Vibrio parahaemolyticus*, *Clostridium perfringens*, *Campylobacter jejuni*, *Bacillus* spp., *Staphylococcus aureus*, *Shewanella putrefaciens*, *Cronobacter* spp., *Geobacillus stearothermophilus* und *Pseudomonas* spp. (Mazaheri et al. 2021; Liu et al. 2021; Zhong et al. 2020; Ling et al. 2020; Milho et al. 2019; Rossi et al. 2018; Milojević et al. 2017; Kwon et al. 2017; Han et al. 2016; Charlebois et al. 2014; Bagge et al. 2001; Flint et al. 2001). Dabei dominieren sog. Multi-Spezies-Biofilme das ubiquitäre Vorkommen von Bakterien in dieser Wuchsform. In Multi-Spezies-Biofilmen können unterschiedliche Bakterienspezies ein kompetitives, synergistisches oder neutrales Verhalten, bspw. im Umgang mit Nährstoffressourcen, aufweisen (Jahid und Ha 2014; Elias und Banin 2012). In den meisten Fällen weisen Multi-Spezies-Biofilme im Vergleich zu Mono-Spezies-Biofilmen eine höhere Resistenz gegenüber antimikrobiellen Mitteln auf, wobei das Alter des Biofilms und die EPS-Bildung Einflussfaktoren darstellen (Pang et al. 2020; Bowler et al. 2012).

### 3.2 Biofilme in der Lebensmittelkette Milch

Biofilme spielen auf verschiedenen Stufen der Milchproduktion und -verarbeitung eine Rolle und können durch ihre Persistenz und damit als einhergehende Kontaminationsquelle die Qualität und Sicherheit von Milch und Milchprodukten beeinträchtigen (Shi und Zhu 2009; Teixeira et al. 2005). Beginnend mit dem Melkequipment, meist aus Gummi-, Edelstahl- und Kunststoff-Teilen, besteht hierbei ein erstes Risiko zur Anheftung von Bakterienzellen bis zur Ausbildung eines reifen Biofilms (Teixeira et al. 2005). Teixeira et al. (2005) gingen nach vorangegangener Reinigung der Melkanlage durch Isolation von *Pseudomonas aeruginosa* (n = 10), *Lactobacillus lactis* (n = 3), *Staphylococcus sciuri* (n = 9) und *Enterococcus faecalis* (n = 3) in einem Gummi-Schlauch zwischen Zitzenbecher und des Melkzeug-Sammelstücks von einer kritischen Stelle zur Biofilmbildung aus und analysierten das Adhäsionsvermögen auf unterschiedlichen industriellen Oberflächen. Auf eine Biofilmbildung im Melkapparat schlossen auch Scheldeman et al. (2005) anhand der Isolierung identischer Spezies im Melkzeug und in Rohmilch sowie einer hohen Anzahl potentiell hitzebeständiger Sporen im Inneren des Melkapparates nach Reinigung der Melkanlage. Auch die Innenseite der Sammeltankwägen, für den Rohmilch-Transport zwischen Erzeugerhof und Molkerei, können nach Teh et al. (2011) ein Reservoir für Bakterien darstellen. Dabei wurden 153 Isolate auf das Vermögen zur Bildung von Biofilmen und thermostabilen Enzymen hin untersucht. Neben *Staphylococcus* spp. und *Streptococcus* spp. wurde die Fähigkeit zur Biofilmbildung bei *Serratia* spp., *Bacillus coagulans* und *Pseudomonas* spp. mit Keimzahlen zwischen 2,7 und 7,6 log KbE/cm<sup>2</sup> sowie die Produktion thermostabiler Enzyme nachgewiesen. Milchrückstände durch mangelhafte Reinigung im Inneren der Sammeltankwägen können das Überleben der Mikroorganismen und die bakterielle Anheftung fördern (Teh et al. 2011). Neben dem Vermögen zur Biofilmbildung im Inneren des Milchsammeltankwagens schlossen Teh et al. (2011) von Biofilmen auf eine potentielle Quelle enzymatisch bedingten Verderbs von Milch und Milcherzeugnissen. Untersuchungen von Frølund et al. (1995) zu Biofilmen aus Schlamm ergaben bis zu 32-fach höhere Enzymaktivitäten gemischter Schlamm-Biofilme im Vergleich zur planktonischer Wuchsform der Zellen. Auch die Grenzfläche zwischen Luft und Flüssigkeit kann die Biofilmbildung begünstigen (Wijman et al. 2007), wie sie häufig durch die Milchlagerung in Tanks auftritt. Neben der Bildung von Enzymen im Zellverbund können nach Wijman et al. (2007) auch Sporen in Biofilmen produziert und anschließend in die Umgebung der Lebensmittelproduktion abgegeben werden (Wijman et al. 2007). Der Plattenwärmeaustauscher im Rahmen der Pasteurisation von Milch stellte sich nach Bouman et al. (1982) als Kontaminationsquelle für *Streptococcus thermophilus* heraus. Ein Großteil der Systeme in der Milchproduktion und -verarbeitung sind geschlossen, sodass organische Reste infolge unzureichender *cleaning-in-place* (CIP)-Systemen oder in Rillen und Winkeln der Melkanlage und diverser Rohrleitungen Anheftungsmaterial und Nahrungsgrundlage

für Bakterien darstellen und dadurch die Bildung von Biofilmen fördern. Allerdings sind diese kritischen Stellen schwer zu erreichen und zu identifizieren (Zou und Liu 2018; Cleto et al. 2012; Schlegelová et al. 2010; Verran et al. 2008). Unter *cleaning-in-place* wird ein Verfahren zur ortsgebundenen Reinigung und Desinfektion (optional) von u. a. geschlossener, komplexer Systeme, wie Rohrleitungen in der Lebensmittel- und pharmazeutischen Industrie, verstanden (Walton 2008). Für die Reinigung können sich anhand des sog. Sinner'schen Kreises verschiedene Variationsmöglichkeiten der Faktoren Temperatur, Zeit, Chemikalie und mechanische Wirkung ergeben, sodass das Reinigungsverfahren unter Berücksichtigung des Anlagensystems (Design, Rauigkeit, Material) und der Verschmutzung (Art, Zustand und Menge) sowie weiterer Faktoren, wie bspw. Wasserhärte, angepasst werden kann (Jürgen Loehrke GmbH 2021; Gabrić et al. 2016; Teh et al. 2014; Wildbrett 2006; Sinner 1960).

### 3.3 Biofilme von *Pseudomonas* spp.

*Pseudomonas* spp. ist in der Matrix Milch als Verderbniserreger und Produzent thermostabiler Peptidasen bekannt (Glück et al. 2016; Capodifoglio et al. 2016; Baglinière et al. 2013; Dogan und Boor 2003). Die Fähigkeit zur Biofilmbildung von *Pseudomonas* spp. wurde von einigen Autoren beleuchtet, wobei isolat-, stamm-, nährstoff- und temperaturabhängiges Wachstum beobachtet wurde. (Rossi et al. 2018; Otton et al. 2017; Aswathanarayan und Vittal 2014). Cleto et al. (2012) beprobten nach der Anlagenreinigung den Milchtank, ein Verbindungsstück zwischen Tank und Transferpumpe, die Haltezelle zum Pasteur und die Pasteurisierungsanlage. Neben *Serratia* spp., *Staphylococcus* und *Stenotrophomonas* spp. wurden 37 % der Isolate als *Pseudomonas* spp. identifiziert. Dabei dominierten *Pseudomonas*-Isolate in der Pasteurisierungsanlage und im Verbindungsstück zwischen Tank und Transferpumpe. Die Fähigkeit und Kategorisierung zur Biofilmbildung wurde mittels Kristallviolett-Assay und Cut-Off-Berechnungen nach Stepanović et al. (2000) im Mikrotiterplatten-Format untersucht. Dabei wiesen über die Hälfte (53 %) der untersuchten *Pseudomonas*-Isolate moderates bis hohes Vermögen zur Biofilmbildung auf (Cleto et al. 2012). Flach et al. (2014) isolierten *Pseudomonas* spp. ebenfalls im Inneren des Milchtanks sowie im Homogenisator und am Milchablassventil, woraufhin die Fähigkeit zur Biofilmbildung ähnlich wie Cleto et al. (2012) analysiert wurde. Dabei wiesen 45,5 % der *Pseudomonas*-Isolate Vermögen zur Biofilmbildung auf. Teh et al. (2011) quantifizierten die Biofilmbildung von *Pseudomonas*-Isolaten aus dem Inneren eines Rohmilch-Sammeltankwagens auf Plättchen aus rostfreiem Edelstahl, welches ein häufig in der Lebensmittelverarbeitung eingesetztes Material ist (Teixeira et al. 2005). Die Analysen ergaben Keimzahlen zwischen  $5,2 \pm 0,3$  und  $7,1 \pm 0,8$  log KbE/cm<sup>2</sup> von *Pseudomonas*-Biofilmen nach Inkubation bei 25 °C für 24 Stunden in rekonstituierter Magermilch. Die Auswahl

an Ergebnissen lassen auf ein Vorhandensein von *Pseudomonas*-Biofilmen in Milchbetrieben schließen (Flach et al. 2014; Cleto et al. 2012; Teh et al. 2011). In Studien, die das Verderbnispotential einzelner *Pseudomonas*-Isolate untersuchten, wurde meist *in vitro* mit planktonischen Zellen und nicht mit sessilen, Biofilm-assoziierten Zellen gearbeitet (Meng et al. 2018; Stoeckel et al. 2016; Capodifoglio et al. 2016; Flach et al. 2014; Nicodème et al. 2005; Dogan und Boor 2003). Erst in den letzten 10 Jahren beschäftigten sich vermehrt Studien mit Verderbnis-verursachenden Enzymen in Biofilmen, welche bis dato als Quelle für enzymatischen Verderb in lebensmittelproduzierenden Betrieben vernachlässigt wurden (Elegbeleye und Buys 2022; Teh et al. 2013; Teh et al. 2012).

## Forschungsziel der Arbeit

Die hygienisch einwandfreie Beschaffenheit bildet neben ernährungsphysiologischer und sensorischer Qualität die Grundlage für die Wertschöpfung milchwirtschaftlicher Erzeugnisse. Dabei sind lange Haltbarkeiten von z. B. H-Milch durch den globalisierten Handel gefordert. Allerdings führt enzymatischer Proteinabbau häufig zu sensorischen und textuellen Veränderungen der Milch noch vor Ablauf des Mindesthaltbarkeitsdatums. Eine vollständige Inaktivierung der Peptidasen psychrotropher *Pseudomonas* spp. ist nach derzeitigem Stand der Technologie nicht gewährleistet. Daher müssen andere Strategien zur Reduktion des Keimeintrags mit *Pseudomonas* spp. in Rohmilch entwickelt werden. Hieraus ergaben sich folgende Fragestellungen:

1. Gibt es einen Zusammenhang zwischen hofspezifischen Parametern und *Pseudomonas*-Keimzahlen in Rohmilch?
2. Können Eintragsrouten auf den Erzeugerhöfen identifiziert werden, die maßgeblich für eine hohe *Pseudomonas*-Belastung in Rohmilch sein können?

Biofilme, als häufigste Form mikrobiellen Wachstums, stellen ein Reservoir für *Pseudomonas* spp. auf allen Stufen der Milchproduktion dar. Es wird vermutet, dass Biofilme in der Milcherzeugung und -verarbeitung eine Quelle für Verderbnis-verursachende Enzyme darstellen, allerdings ist das Verderbspotential von Biofilm-assoziierten Enzymen, wie Peptidasen, bislang noch weitgehend unerforscht. Zur Einschätzung des Risikos, welches Biofilme für Milchbetriebe bergen können, wurden folgende Fragestellungen bearbeitet:

3. Sind *Pseudomonas*-Stämme aus Rohmilch in der Lage auf verschiedenen Oberflächen Biofilme zu bilden?
4. Sind *Pseudomonas*-Stämme in derartigen Biofilmen proteolytisch aktiv und besitzen eine Relevanz beim Verderb von Rohmilch?

Ergänzend dazu sollte mittels Rasterelektronenmikroskopie die Morphologie von Mono-Spezies-Biofilmen von *Pseudomonas* spp. und Rohmilch-assoziierten Multi-Spezies-Biofilmen analysiert werden.

## Material und Methoden

### 1 Nährmedien

Die Rezepturen der verwendeten Nährmedien sind in Tabelle 2 aufgelistet. Zur Herstellung der Nährmedien wurde Reinstwasser (ELGA LabWater, UK) verwendet. Mit Ausnahme der Milchmedien (100, 50 und 10 %) und des VRBD-Agars wurden alle Nährmedien, die Agar-Agar enthielten, bei 121 °C für 15 Minuten autoklaviert. Zudem wurde zur Herstellung der Milchmedien (50 und 10 %) autoklaviertes Reinstwasser verwendet.

Tabelle 2: Rezepturen der verwendeten Nährmedien.

Nährmedium		Zusammensetzung	Hersteller
Casein-Soja-Pepton (CASO) -Agar pH 7,3 ± 0,2	15 g/l	Pepton aus Casein	Merck KgaA, Deutschland (Fertigmedium)
	5 g/l	Pepton aus Sojamehl	
	5 g/l	Natriumchlorid	
	15 g/l	Agar-Agar	
Casein-Soja-Pepton (CASO) -Bouillon pH 7,3 ± 0,2	17 g/l	Pepton aus Casein	Merck KgaA, Deutschland (Fertigmedium)
	3 g/l	Pepton aus Sojamehl	
	2,5 g/l	Glucose	
	5 g/l	Natriumchlorid	
Cephalothin-Fusidinsäure-Cetrimid (CFC) -Agar pH 7,1 ± 0,2	2,5 g/l	di-Kaliumhydrogenphosphat	Thermo Fisher Scientific Inc., USA (Fertigmedium)
	16 g/l	Pepton aus Gelatine	
	10 g/l	Caseinhydrolysat	
	10 g/l	Kaliumsulfat	
	1,4 g/l	Magnesiumchlorid	
	11 g/l	Agar-Agar	
	5 ml/l	Glycerol (86 %)	
		<i>Lösen der Bestandteile durch Kochen, Autoklavieren</i>	
50 mg/l	Cephalothin	Thermo Fisher Scientific Inc., USA (Fertigsupplement)	
10 mg/l	Natrium Fusidat		
10 mg/l	Cetrimid		
	<i>Zugabe der restlichen Bestandteile</i>		
Hefeextrakt-Glucose-Chloramphenicol (YGC) -Agar pH 7,0 ± 0,2	5 g/l	Hefeextrakt	Merck KgaA, Deutschland (Fertigmedium)
	20 g/l	Glucose	
	0,1 g/l	Chloramphenicol	
	14,9 g/l	Agar-Agar	
Kristallviolett-Galle-Glucose (VRBD) -Agar pH 7,4 ± 0,2	7 g/l	Pepton aus Gelatine	Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland (Fertigmedium)
	3 g/l	Hefeextrakt	
	1,5 g/l	Gallensalz	
	5 g/l	Natriumchlorid	
	30 mg/l	Neutralrot	
	2 mg/l	Kristallviolett	
	10 g/l	Glucose	
	13 g/l	Agar-Agar	



Fortsetzung von Tabelle 2

<b>Nährmedium</b>			<b>Zusammensetzung</b>	<b>Hersteller</b>
Magermilch-Agar (1 %)	Part 1	4,5 g/l	Pepton aus Casein	VWR International (Fertigmedium)
		0,9 g/l	Glucose	
		2,25 g/l	Hefeextrakt	
		13,5 g/l	Agar-Agar	
		900 ml/l	Reinstwasser	
			<i>Autoklavieren</i>	
	Part 2	10 g/l	Magermilchpulver	Merck KgaA, Deutschland
		90 ml/l	Reinstwasser	
			<i>Autoklavieren bei 121 °C für 5 Minuten, Mischen von Part 1 und Part 2</i>	
Milchmedium (100, 50, 10 %)			H-Milch (3,5 % Fett)	Fude + Serrahn Milchprodukte GmbH & Co. KG, Deutschland
			Ringer-Lösung (Viertelstark)	
Plate-Count (PC) -Agar pH 7,0 ± 0,2		5 g/l	Pepton aus Casein	Merck KgaA, Deutschland (Fertigmedium)
		1 g/l	Glucose	
		2,5 g/l	Hefeextrakt	
		14 g/l	Agar-Agar	
Trypton-Galle-x-Glucuronid (TBX) -Agar pH 7,0 ± 0,2		20 g/l	Caseinpepton	Merck KgaA, Deutschland (Fertigmedium)
		1,5 g/l	Gallensalze Nr. 3	
		75 mg/l	5-Brom-4-Chlor-3-Indol-β- Glucuronid	
		10 g/l	Agar-Agar	

## 2 Chemikalien und Lösungen, Verbrauchsmaterial und Geräte

In Tabelle 3 sind die verwendeten Chemikalien und Lösungen sowie deren Rezepturen aufgelistet. In den Arbeiten benötigte Verbrauchsmaterialien sowie Geräte sind dem Anhang aus Tabelle 10 und Tabelle 11 zu entnehmen.

Tabelle 3: Rezepturen der verwendeten Chemikalien und Lösungen.

Chemikalien und Lösungen	Zusammensetzung	Hersteller
Accucheck Counting Beads (10 %)	Accucheck Counting Beads	Thermo Fisher Scientific Inc., USA
	Ringer-Lösung (Viertelstark)	s. Zusammensetzung
Azidiol	Gebrauchsfertig	AppliChem GmbH, Deutschland
Dinatriumhydrogenphosphat-Puffer (1 M) pH 7,4	Dinatriumhydrogenphosphat (≥ 99,0 %)	Sigma-Aldrich, USA
	Reinstwasser, autoklaviert	ELGA LabWater, UK
Glycerol (86 %)	Gebrauchsfertig	Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland
Essigsäure (30 %)	Essigsäure (100 %)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland
	Reinstwasser, autoklaviert	ELGA LabWater, UK
Ethanol (25, 50, 70, 75, 90, ≥ 99,9 %)	Ethanol (≥ 99,9 %)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland
	Reinstwasser, autoklaviert	ELGA LabWater, UK
Fixierlösung für die REM-Analytik	1 Vol.-Teil Natrium-Phosphat-Puffer (1 M) 1 Vol.-Teil Glutaraldehyd-Lösung (25 %) 8 Vol.-Teile Reinstwasser; 0,1 µm sterilfiltriert	s. Zusammensetzung Agar Scientific Ltd, UK ELGA LabWater, UK
Fluorescamin-Stocklösung (10 mg/ml)	Fluorescamin Aceton	Sigma-Aldrich, USA Merck KgaA, Deutschland
Fluorescamin-Endlösung (0,2 mg/ml)	Fluorescamin-Stocklösung (10 mg/ml) Aceton	s. Zusammensetzung
Kristallviolett-Lösung (5 %)	Kristallviolett-Lösung (10 %) Reinstwasser, autoklaviert	Merck KgaA, Deutschland ELGA LabWater, UK
Hexamethyldisilazan	Gebrauchsfertig	Honeywell International Inc., USA
IBC Kontroll-Standard (1 Vial/ 60 ml)	IBC Control Standard IBC Controll Standard Buffer Solution	Bentley Instruments Inc., USA
IBCm Inkubationsreagenz	18 Vol.-Teile IBCm Component 1 1 Vol.-Teil IBCm Component 2 1 Vol.-Teil IBCm Component 3 Filtration: 0,2 µm	Bentley Instruments Inc., USA
Leucylglycin (10 mM)	Leucylglycin Phosphatpuffer (0,1 M), pH 8,0	Sigma-Aldrich, USA s. Zusammensetzung
Leucylglycin (0,5 mM; 0,25 mM; 0,125 mM, 0,0625 mM)	Leucylglycin (10 mM) Phosphatpuffer (0,1 M), pH 8,0	s. Zusammensetzung
Methanol (≥ 99,9 %)	Gebrauchsfertig	Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland
Microsphere Working Solution	Gebrauchsfertig	Bentley Instruments Inc., USA

Fortsetzung von Tabelle 3

<b>Chemikalien und Lösungen</b>	<b>Zusammensetzung</b>	<b>Hersteller</b>
Natriumdihydrogenphosphat-Puffer (1 M) pH 7,4	Natriumdihydrogenphosphat Reinstwasser, autoklaviert	Sigma-Aldrich, USA ELGA LabWater, UK
Natrium-Phosphat-Puffer (1 M) pH 7,4	Dinatriumhydrogenphosphat-Puffer (1 M), pH 7,4 Natriumdihydrogenphosphat-Puffer (1 M), pH 7,4	s. Zusammensetzung s. Zusammensetzung
Natrium-Phosphat-Puffer (0,1 M) pH 7,4	Natrium-Phosphat-Puffer (1 M), pH 7,4 Reinstwasser, autoklaviert	s. Zusammensetzung ELGA LabWater, UK
Phosphatpuffer (0,1 M) pH 8,0	6 ml/l Kaliumdihydrogenphosphat (1 M)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland
	94 ml/l Dikaliumhydrogenphosphat (1 M)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland
	900 ml/l Reinstwasser, autoklaviert	ELGA LabWater, UK
Propidiumjodid Stocklösung (20 mM)	Propidiumjodid (≥ 95 %)	Sigma-Aldrich, USA
	Dimethylsulfoxid (≥ 99,8 %)	VWR International, USA
Ringer-Lösung (Viertelstark, 2 Stk/l)	Ringertabletten	Merck KgaA, Deutschland
	Reinstwasser	ELGA LabWater, UK
Syto 13 Stocklösung (5 mM) in Dimethylsulfoxid (≥ 99,9 %)	<i>Gebrauchsfertig</i>	Thermo Fisher Scientific Inc., USA
Trichloressigsäure (24 %)	Trichloressigsäure (100 %)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland
	Reinstwasser, autoklaviert	ELGA LabWater, UK

### 3 Bakterienstämme

Für die Analysen zur Charakterisierung der Biofilmbildung von *Pseudomonas* (*P.*) spp. in 96-Well-Mikrotiterplatten aus Kunststoff sowie auf Edelstahl- und Gummi-Oberfläche und der Peptidaseaktivität Biofilm-assoziiierter und planktonischer Zellen wurden die in Tabelle 4 aufgelisteten Stämme verwendet. Neben Typstämmen wurden zudem *Pseudomonas*-Stämme eingesetzt, welche im Rahmen des Projektes AiF-FV 16588 N an der Technischen Universität München (TUM) u. a. aus Rohmilch isoliert wurden. Weitere *Pseudomonas*-Isolate aus Rohmilch wurden mittels MALDI Biotyper® (Bruker Daltonics GmbH & Co.KG, Deutschland) zusammen mit dem Institut für Sicherheit und Qualität bei Fleisch des Max Rubner-Instituts identifiziert und sind mit „(M)“ hinter der Stammbezeichnung gekennzeichnet. *P. kielensis*, *P. baltica* und *P. rustica* wurden im Rahmen der zuletzt genannten Arbeiten kürzlich neu beschrieben (Fiedler et al. 2022; Gieschler et al. 2021). Zur Charakterisierung der Peptidaseaktivität von Biofilmen wurde *Listeria* (*L.*) *innocua* als Negativ-Kontrolle eingesetzt.

Tabelle 4: Auflistung der *Pseudomonas*-Isolate für die Versuche zur Charakterisierung der Biofilmbildung und der Peptidaseaktivität von Biofilmen-assoziierten im Vergleich zu planktonischen Zellen.

Stammnummer	Spezies	DSM Nummer	Herkunft	Referenz	Biofilmbildung			Peptidaseaktivität	
					Mikrotiterplatten	Edelstahl-/Gummi-Oberfläche	Magermilch-Agar	Fluorescamin-Assay	
L1-81	<i>P. fluorescens</i>	50090 <sup>T</sup>	Vorfiltrertank eines Wasserwerks	Migula (1895)	X	X <sup>E</sup>	X		
L1-82	<i>P. fluorescens</i>		Rohmilch	TUM: AIF-FV 16588 N	X		X		
L1-83	<i>P. fluorescens</i>		Rohmilch	TUM: AIF-FV 16588 N	X	X <sup>E</sup> , X <sup>E+G</sup>	X	X	
L1-84	<i>P. fragi</i>	3456 <sup>T</sup>	unbekannt	Gruber (1905)	X		X		
L1-85	<i>P. fragi</i>		Rohmilch	TUM: AIF-FV 16588 N	X		X	X	
L1-86	<i>P. fragi</i>		Rohmilch	TUM: AIF-FV 16588 N	X		X		
L1-87	<i>P. fragi</i>		Milchhalbfabrikat	TUM: AIF-FV 16588 N	X		X		
L1-88	<i>P. gessardii</i>	17152 <sup>T</sup>	Mineralwasser	Verhille et al. (1999) emend. van den Beld et al. (2016)	X	X <sup>E</sup>	X	X	
L1-89	<i>P. gessardii</i>		Rohmilch	TUM: AIF-FV 16588 N	X	X <sup>E+G</sup>	X	X	
L1-90	<i>P. gessardii</i>		Milchhalbfabrikat	TUM: AIF-FV 16588 N	X	X <sup>E+G</sup>	X	X	
L1-91	<i>P. lactis</i>		Rohmilch	TUM: AIF-FV 16588 N	X	X <sup>E+G</sup>	X	X	
L1-92	<i>P. lactis</i>		Rohmilch	TUM: AIF-FV 16588 N	X	X <sup>E+G</sup>	X	X	
L1-93	<i>P. lactis</i>	29167 <sup>T</sup>	Rohmilch	Neubeck et al. (2017)	X	X <sup>E</sup> , X <sup>E+G</sup>	X	X	
L1-94	<i>P. lundensis</i>	6252 <sup>T</sup>	Abgepacktes Rindfleisch	Molin et al. (1986)	X	X <sup>E</sup>	X		
L1-95	<i>P. lundensis</i>		Rohmilch	TUM: AIF-FV 16588 N	X		X	X	
L1-96	<i>P. lundensis</i>		Milchhalbfabrikat	TUM: AIF-FV 16588 N	X		X	X	
L1-97	<i>P. lundensis</i>		Rohmilch	TUM: AIF-FV 16588 N	X		X		
L1-98	<i>P. meridiana</i>		Rohmilch	TUM: AIF-FV 16588 N	X		X	X	
L1-99	<i>P. meridiana</i>		Rohmilch	TUM: AIF-FV 16588 N	X		X	X	
L1-100	<i>P. protegens</i>		Rohmilch	TUM: AIF-FV 16588 N	X		X		
L1-101	<i>P. protegens</i>		Rohmilch	TUM: AIF-FV 16588 N	X	X <sup>E+G</sup>	X	X <sup>a</sup>	
L1-102	<i>P. protegens</i>		Rohmilch	TUM: AIF-FV 16588 N	X		X	X	
L1-103	<i>P. proteolytica</i>	15321 <sup>T</sup>	Matte aus Cyanobakterien	Reddy et al. (2004) emend. van den Beld et al. (2016)	X	X <sup>E</sup> , X <sup>E+G</sup>	X	X	
L1-104	<i>P. proteolytica</i>		Rohmilch	TUM: AIF-FV 16588 N	X		X	X	
L1-105	<i>P. proteolytica</i>		Rohmilch	TUM: AIF-FV 16588 N	X	X <sup>E+G</sup>	X	X <sup>a</sup>	

X<sup>E</sup> bzw. X<sup>E+G</sup>: *Pseudomonas*-Stämme, die zur Quantifizierung der Biofilmmasse auf Edelstahl- (X<sup>E</sup>, s. Material und Methoden 5.1.7) bzw. auf Edelstahl- im Vergleich zu Gummi-Oberfläche (X<sup>E+G</sup>, s. Material und Methoden 5.1.7) eingesetzt wurden.

X<sup>a</sup>: *Pseudomonas*-Isolate zur Quantifizierung der Peptidaseaktivität Biofilm-assoziiierter Zellen auf Edelstahl- und Gummi-Oberfläche.

Fortsetzung von Tabelle 4

Stammnummer	Spezies	DSM Nummer	Herkunft	Referenz	Biofilmbildung			Peptidaseaktivität	
					Mikrotiterplatten	Edelstahl-/Gummi-Oberfläche	Magermilch-Agar	Magermilch-Agar	Fluorescamin-Assay
L1-106	<i>P. proteolytica</i>		Rohmilch	TUM: AiF-FV 16588 N	X		X	X	X
L1-107	<i>P. proteolytica</i>		Sahne	TUM: AiF-FV 16588 N	X	X <sup>E+G</sup>	X	X	X
L1-177	<i>P. haemolytica</i>	108987 <sup>T</sup>	Rohmilch	Hofmann et al. (2020a)		X <sup>E</sup>	X		
L1-195	<i>P. weihenstephanensis</i>	29166 <sup>T</sup>	Rohmilch	Von Neubeck et al. (2016)			X		
L1-205	<i>P. saxonica</i>	108989 <sup>T</sup>	Magermilch-Konzentrat	Hofmann et al. (2020b)		X <sup>E</sup>	X		
M19	<i>P. iridis (M)</i>		Rohmilch	Eigenisolat		X <sup>E</sup>	X		X
M37	<i>P. kielsensis (M)</i>	111668 <sup>T</sup>	Rohmilch	Gieschler et al. (2021)		X <sup>E</sup>	X		
M47	<i>P. lundensis (M)</i>		Rohmilch	Eigenisolat		X <sup>E</sup>	X		X
M59	<i>P. rustica (M)</i>	112348 <sup>T</sup>	Rohmilch	Fiedler et al. (2022)		X <sup>E</sup>	X		X
M60	<i>P. baltica (M)</i>	111761 <sup>T</sup>	Rohmilch	Gieschler et al. (2021)		X <sup>E</sup>	X		
M70	<i>P. sp. (M)</i>		Rohmilch	Eigenisolat		X <sup>E</sup>	X		X
M72	<i>P. bubulae (M)</i>		Rohmilch	Eigenisolat		X <sup>E</sup>	X		X
M132	<i>P. carnis (M)</i>		Rohmilch	Eigenisolat			X		X
L1-63	<i>L. innocua</i>	20649 <sup>T</sup>	Kuhhirn	Seeliger (1981)	X	X	X		X

X<sup>E</sup> bzw. X<sup>E+G</sup>: *Pseudomonas*-Stämme, die zur Quantifizierung der Biofilmbildung der Biofilmmasse auf Edelstahl- (X<sup>E</sup>, s. Material und Methoden 5.1.7) bzw. auf Edelstahl- im Vergleich zu Gummi-Oberfläche (X<sup>E+G</sup>, s. Material und Methoden 5.1.7) eingesetzt wurden.

(M) = Mittels MALDI Biotyper<sup>®</sup> identifizierte Rohmilch-Isolate.

## 4 Bestimmung der Eintragsrouten von *Pseudomonas* spp. in Rohmilch

### 4.1 Analyse des Zusammenhangs zwischen hofseitigen Einflussfaktoren und *Pseudomonas*-Keimzahlen in Rohmilch

#### 4.1.1 Logistik der Rohmilchproben

Es wurden zwischen Juni 2019 und Dezember 2020 521 Rohmilchproben von 38 Erzeugerhöfen zweier Molkereien in Norddeutschland monatlich auf die *Pseudomonas*- und Gesamtkeimzahl hin untersucht.

Dafür erhielten die für die beiden Molkereien zuständigen Milchkontrollverbände Transportgefäße mit 105,6 µl Azidiol-Aliquots zur Konservierung des Probenmaterials. In Anschluss an die Milchabholung des Sammelwagens wurden je Erzeugerhof circa 32 ml Rohmilch in die Transportgefäße abgefüllt und an das Max Rubner-Institut in Kiel per Express-Versand gekühlt gesendet.

Nach Ankunft der Rohmilchproben erfolgte zügig die Messung der Temperatur mittels Infrarot-Thermometer Traceable® (VWR, USA).

#### 4.1.2 Erfassung hofspezifischer Informationen

Um einen Zusammenhang zwischen hofseitigen Einflussfaktoren und *Pseudomonas*- bzw. Gesamtkeimzahlen herstellen zu können, wurden alle Erzeugerhöfe um Auskunft zu hofspezifischen Parametern gebeten. Die Erhebung der Daten der einzelnen Erzeugerhöfe wurde über die jeweilige Molkerei abgewickelt und die Informationen anonymisiert dem Max Rubner-Institut in Kiel zur Verfügung gestellt. Der Bogen zur Erfassung möglicher Einflussfaktoren auf *Pseudomonas*- bzw. Gesamtkeimzahlen in Rohmilch ist dem Anhang in Tabelle 9 beigefügt.

#### 4.1.3 Bestimmung der Gesamtkeimzahl mittels Durchflusszytometrie

Die durchflusszytometrische Zählung der Bakterien in Rohmilch erfolgte mithilfe des halbautomatischen Analysators BactoCount IBCm (Bentley Instruments Inc., USA). Die Messungen wurden am Institut für Sicherheit für Milch und Fisch des Max Rubner-Instituts in Kiel durchgeführt. Hierfür wurde 1 ml der Rohmilchprobe und 2 ml der Inkubationsreagenz-Lösung in auf 50 °C vorgewärmten Edelstahl-Behältern manuell überführt. Bestandteile der Inkubationsreagenz-Lösung waren ein Milch-klärender Puffer (IBCm BactoCount Kit *Component 1*), ein proteolytisches Enzym (*Component 2*) und ein Fluoreszenzmarker (*Component 3*). Dadurch wurden somatische Zellen lysiert und Fettkügelchen sowie Proteine abgebaut. Zudem wurden Bakterienzellwände permeabel, was die Anfärbung der DNA durch den Fluoreszenzmarker ermöglichte. Insgesamt erfolgte die Inkubation des Proben-Reagenz-

Gemisches für 10 Minuten, wobei das Gemisch zweimal mittels Ultraschallsonde behandelt wurde, um den mechanischen Abbau störender Partikel zu fördern sowie Bakterien zu vereinzeln und Zellwände zu zerstören (Bentley Instruments, Inc. 2014). Anschließend wurde das Gemisch in das Durchflusszytometer überführt. Durch den Kontakt mit einem starken Laserstrahl fluoreszierte die markierte Bakterien-DNA. Das Fluoreszenzsignal wurde von einem Optikset eingefangen, gefiltert und mit einem Detektor gemessen. Mithilfe der BactoCount eigenen Software wurden die verarbeiteten Fluoreszenzimpulse in einzelne Bakterienzahlen (IBC) und nach Anwendung einer Umrechnungsgleichung in koloniebildende Einheiten (KbE pro  $\mu\text{l}$ ) konvertiert (Bentley Instruments, Inc. 2019). Vor Einsatz des Gerätes wurde das Optikset mittels *Microsphere Working Solution* und die Inkubationsreagenz mittels IBCm Kontroll-Standard kalibriert.

#### 4.1.4 Kulturelle Bestimmung der *Pseudomonas*-Keimzahl

Zur kulturellen Bestimmung der *Pseudomonas*-Keimzahl in Rohmilch wurde eine Verdünnungsreihe im Verhältnis von 1:10 in Ringer-Lösung (Viertelstark) hergestellt. Je Verdünnungsstufe wurden 100  $\mu\text{l}$  der verdünnten Rohmilch auf CFC-Agar aufgetragen und für 2 Tage bei 25 °C inkubiert. Für die Bestimmung der *Pseudomonas*-Keimzahl wurde die Formel zur Berechnung des gewogenen arithmetischen Mittelwertes herangezogen, wobei die Bestimmungsgrenze auf CFC-Agar zwischen 10 und 150 auszählbaren Kolonien lag (VDLUFA e.V. 2003). Die errechnete *Pseudomonas*-Keimzahl wurde als logarithmierte koloniebildende Einheiten pro Milliliter (log KbE/ml) angegeben.

## 4.2 Identifikation der Eintragsrouten von *Pseudomonas* spp. in Rohmilch

### 4.2.1 Auswahl der Erzeugerhöfe

Zur Identifikation der Eintragsrouten von *Pseudomonas* spp. in Rohmilch wurden Erzeugerhöfe anhand der durchschnittlichen *Pseudomonas*-Keimzahlen, die im Rahmen der monatlichen Keimzahlbestimmungen ermittelt wurden (s. Material und Methoden 4.1), ausgewählt. Dabei wurde ein Zeitraum von 12 Monaten betrachtet und insgesamt 8 Höfe für die Analysen bestimmt. Je 4 Erzeugerhöfe mit durchschnittlich höheren *Pseudomonas*-Keimzahlen über 4 log KbE/ml und durchschnittlichen niedrigeren *Pseudomonas*-Keimzahlen in Rohmilch mit Keimgehalten unter 4 log KbE/ml wurden ausgewählt und an denselben Probenahmestellen (s. Material und Methoden 4.2.2) untersucht. Zudem wurde bei der Hofauswahl neben den durchschnittlichen *Pseudomonas*-Keimzahlen in Rohmilch die Produktionsart und das Melksystem der Höfe berücksichtigt.



#### 4.2.2 Planung und Durchführung der Hofbeprobungen

Die Beprobung umfasste verschiedene Probenahmestellen im Bereich des Rohmilchtanks, der Melkanlage, des Melkzeugs und verschiedene Wasserproben. Die Probenahmestellen je Bereich und die Art der Probenahme sind in Tabelle 5 dargestellt.

Die Hofbegehungen mit Probenahme erfolgte bei allen Höfen nach Reinigung des Melksystems, sodass die gleiche Ausgangssituation für alle Höfe vorlag. Nach Verwerfen des Vorlaufs wurden je 30 ml der flüssigen Proben, wie Rohmilch (M) und Wasser unterschiedlicher Stellen (W), mit 99 µl Azidiol bis zur Aufarbeitung im Labor unter Kühlbedingungen konserviert, um das Wachstum von Mikroorganismen während des Transports zu verhindern. Für die Beprobung von Oberflächen im Bereich des Rohmilchtanks, der Melkanlage und des Melkzeugs wurden mit steriler Ringer-Lösung (Viertelstark) angefeuchtete Tupfer (T) eingesetzt und eine Fläche von circa einem Quadratcentimeter (cm<sup>2</sup>) beprobt. Sonderproben (S), wie der Milchfilter der Melkanlage des Probenahmetages, wurden vom jeweiligen Landwirt nach dem Melkvorgang gekühlt aufbewahrt.

Tabelle 5: Auflistung der im Rahmen der 8 Hofbegehungen beprobten Bereiche und Stellen sowie die Art der Probe. M: Milch; S: Sonderprobe; T: Tupfer, angefeuchtet mit steriler Ringer-Lösung (Viertelstark); S/T: Wahl der Beprobungsart fand in Abhängigkeit zur Art des Melkstands statt, bspw. Tupferabstrich der Melkroboter-Bürste; W: Wasser.

Bereich	Probenahmestelle	Probenart
Rohmilch	-	M
Rohmilchtank	Zapfhahn	T
	Deckel Zapfhahn	T
	Dichtung Zapfhahn	T
	Tankdeckel	T
	Dichtung Tankdeckel	T
	Öffnung Entlüftung	T
	Entlüftungsdeckel	T
Melkanlage	Rohr Milchzufuhr	T
	Halterung für Rohr Milchzufuhr	T
	Milchabscheider	T
	Deckel Milchabscheider	T
	Zulauf Milchabscheider	T
	Milchfilter nach Melken	S
Melkzeug	Halterung Milchfilter	T
	Sammelstück Melkzeug	T
	Dichtung Sammelstück Melkzeug	T
	Zitzenbecher	T
	Halterung Zitzenbecher	T
Wasser	Reinigungsutensilien Zitzen	S/T
	Kaltwasser Tankreinigung	W
	Warmwasser Tankreinigung	W
	Kaltwasser Melksystemreinigung	W
	Warmwasser Melksystemreinigung	W
	Wasser Nachspülung Melksystem	W

Zusätzlich wurde mithilfe des Luftkeimsammlers Air IDEAL<sup>®</sup> 3P<sup>®</sup> (BioMerieux, Frankreich) der *Pseudomonas*- und Gesamtkeimgehalt der Umgebungsluft im Bereich des Melkens bestimmt. Für die Bestimmung des *Pseudomonas*-Luftkeimgehaltes wurden 500 l und 1000 l Luftvolumen auf CFC-Agar und für den Gesamtkeimgehalt 5 l und 10 l Luftvolumen auf CASO-Agar eingezogen.

#### 4.2.3 Mikrobiologische Untersuchungen

Für den Vergleich des mikrobiellen Status der Erzeugerhöfe wurde von allen Probenahmestellen kulturelle *Pseudomonas*- und Gesamtkeimzahlbestimmungen durchgeführt. Dabei ist zu berücksichtigen, dass in der gesamten Arbeit unter dem Begriff „Gesamtkeimzahl“ die aerobe mesophile Keimzahl zu verstehen ist. Für die Bestimmung des Keimgehalts der Tupferproben wurden die Tupfer mit einer sterilen Laborschere gekürzt und mit je 1,5 ml Ringer-Lösung (Viertelstark) mechanisch mittels Vortexers behandelt. Anschließend wurde hieraus 1 ml Suspension zur Bestimmung der Keimzahlen verwendet. Das gleiche Volumen wurde für die Bestimmung des Keimgehalts der Rohmilch- und Wasserproben eingesetzt. Sonderproben, wie die Milchfilter der Höfe und einige Reinigungsutensilien der Zitzen (Einmal- oder waschbare

Tücher), wurden in 100 ml Ringer-Lösung (Viertelstark) im Stomacher®-Laborhomogenisator (Seward Ltd., UK) behandelt und aus dem Gemisch 1 ml zur weiteren Analyse entnommen.

Die *Pseudomonas*-Keimzahlbestimmung erfolgte wie in Abschnitt 4.1.4 beschrieben. Für die Bestimmung der Gesamtkeimzahl wurde eine Verdünnungsreihe im Verhältnis von 1:10 mit Ringer-Lösung (Viertelstark) hergestellt. Für die jeweilige Verdünnungsstufe wurden je 100 µl auf CASO-Agar aufgetragen und anschließend für 5 Tage bei 30 °C inkubiert und ausgewertet. Für die Bestimmung der Gesamtkeimzahl wurde die Formel zur Berechnung des gewogenen arithmetischen Mittelwertes herangezogen, wobei die Bestimmungsgrenze auf CASO-Agar zwischen 10 und 300 auszählbaren Kolonien lag (in Anlehnung an DIN EN ISO 4833-1:2013-12). Die *Pseudomonas*- und Gesamtkeimzahlen wurden je nach Bereich und Probenahmestelle als logarithmierte koloniebildende Einheiten pro Quadratzentimeter bzw. Milliliter ( $\log \text{KbE}/\text{cm}^2$  bzw.  $\text{ml}$ ) angegeben. Die CASO- und CFC-Agarplatten zur Bestimmung des Luftkeimgehalts im Melkbereich wurden wie zuvor beschrieben inkubiert und der Keimgehalt als logarithmierte koloniebildende Einheiten pro 10 Liter Luftvolumen ( $\log \text{KbE}/10 \text{ l}$ ) angegeben.

## 5 Charakterisierung von *Pseudomonas* spp. hinsichtlich der Biofilmbildung und der Peptidaseaktivität

### 5.1 Analyse der Biofilmbildung von *Pseudomonas* spp.

#### 5.1.1 Bakterienanzucht und -kultivierung

Mittels einer Impföse wurde Material von bei  $-80\text{ °C}$  in 86 %igen Glycerol eingefrorenen *Pseudomonas*-Stämmen entnommen und in je 10 ml CASO-Bouillon für  $24 \pm 1$  Stunden bei  $30\text{ °C}$  inkubiert. Anschließend wurden 100  $\mu\text{l}$  der jeweiligen Kultur in 10 ml CASO-Bouillon überimpft und für 22 - 24 Stunden bei  $30\text{ °C}$  erneut inkubiert.

#### 5.1.2 Einstellung der Inokulationsdosis

Die Versuche zur Charakterisierung der Biofilmbildung von *Pseudomonas*-Stämmen in 96-Well-Mikrotiterplatten und auf Edelstahl-Oberfläche wurden mit einer Inokulationsdosis von 6 log KbE/ml angesetzt. Hierfür wurde zunächst die Zellzahl der frischen Kultur mittels Durchflusszytometrie (s. Material und Methoden 5.1.3) bestimmt und anschließend mit Ringer-Lösung (Viertelstark) auf 7 log KbE/ml eingestellt. Um in den Biofilm-Versuchen mit Milchmedium Anteile an CASO-Bouillon aus der Bakterienkultivierung auszuschließen, wurden 2,6 ml Kultur bei 5.000 rpm für 3 min abzentrifugiert und das Pellet in 1 ml des jeweiligen Milchmediums resuspendiert. Nach Überimpfen des resuspendierten Pellets in 25 ml des jeweiligen Milchmediums, wurde die eingestellte Ausgangskeimzahl von  $6 \pm 0,5$  log KbE/ml über kulturelle Keimzahlbestimmung überprüft. Hierfür wurde eine Verdünnungsreihe im Verhältnis von 1:10 mit Ringer-Lösung (Viertelstark) hergestellt. Für die jeweilige Verdünnungsstufe wurden je 100  $\mu\text{l}$  auf CASO-Agar aufgetragen und anschließend für  $24 \pm 1$  Stunden bei  $37\text{ °C}$  inkubiert und ausgewertet. Für die Bestimmung der Keimzahl wurde die Formel zur Berechnung des gewogenen arithmetischen Mittelwertes herangezogen, wobei die Bestimmungsgrenze auf CASO-Agar zwischen 10 und 300 auszählbaren Kolonien lag (in Anlehnung an DIN EN ISO 4833-1:2013-12).

Nach Abnahme des Volumens für die Keimzahlbestimmung verblieben 25 ml Milchmedium mit einer Inokulationsdosis von  $6 \pm 0,5$  log KbE/ml für die Biofilm-Versuche. Für die Quantifizierung der Biofilmmasse auf Edelstahl- und Gummi-Oberfläche im Vergleich und rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von Mono-Spezies-Biofilmen wurde eine Inokulationsdosis von  $4 \pm 0,5$  log KbE/ml in 25 ml Milchmedium eingesetzt.

### 5.1.3 Bestimmung der Zellzahl mittels Durchflusszytometrie

Die Inokulationsdosis für die Biofilm-Versuche wurde mithilfe des Durchflusszytometers FACSCalibur™ (BD Bioscience, USA) und in Anlehnung an das Live/Dead-Assay nach Low et al. (2020) eingestellt. Intakte Zellen werden hierbei mit dem Nukleinsäure-Farbstoff Syto 13 angefärbt, wobei Propidiumjodid nur in Zellen mit beschädigter Zellwand eindringen kann. Ein Flüssigkeitssystem führt die angefärbten Zellen in einen laminaren Probenstrom, welcher durch einen Laserstrahl analysiert wird (Stiefel et al. 2015).

Für die Anfärbung der Zellen wurde zunächst eine Färbelösung (1:4000) angesetzt. Dazu wurden 1 µl Syto 13 (5 mM), 1 µl Propidiumjodid (20 mM) und 4 ml Ringer-Lösung (Viertelstark) miteinander vermischt. Als nächstes wurden Bakterienkultur und CASO-Bouillon zur Biofilm-Analyse bzw. 100 %iges Milchmedium für das Fluorescamin-Assay mit Ringer-Lösung (Viertelstark) 1:50 vorverdünnt. Anschließend wurden 10 µl der vorverdünnten Bakterienkultur mit 490 µl der Färbelösung 1:50 verdünnt, woraufhin eine Inkubation von 10 Minuten bei Raumtemperatur folgte. Als Blank wurden 10 µl Ringer-Lösung (Viertelstark) und vorverdünnte CASO-Bouillon bzw. vorverdünntes 100 %iges Milchmedium mit 490 µl Färbelösung versetzt und ebenfalls für 10 Minuten inkubiert. Zuletzt wurden die Ansätze mittels FACSCalibur™ (BD Bioscience, USA) analysiert und Lichtsignale durch das elektronische System zuletzt in digitale Signale umgewandelt. Nach Bearbeitung der Signale am Computer mithilfe der Software Cellquest Pro™ wurde in Kombination mit vorheriger Kalibrierung mithilfe von *Accucheck Counting Beads* und unter Berücksichtigung von Umrechnungs- und Verdünnungsfaktoren die Zellzahl pro Milliliter berechnet. Frühere Vergleichsuntersuchungen zwischen FACSCalibur™ und kultureller Keimzahlbestimmung ergaben, dass bei der Bestimmung der Zellzahl pro ml von *Pseudomonas* spp. auf koloniebildende Einheiten (KbE) pro ml geschlossen werden kann.

### 5.1.4 Quantifizierung der Biofilmmasse in Mikrotiterplatten

Die Untersuchungen zur Quantifizierung der Biofilmmasse bei der Beurteilung des Biofilmbildungsvermögens fanden mittels Kristallviolett-Assay in Anlehnung an O'Toole (2011) statt. Hierbei wurde vorhandene organische Biofilmsubstanz auf der Oberfläche mittels Kristallviolett-Lösung angefärbt. Kristallviolett als Färbelösung eignet sich aufgrund der Bindung an negativ geladene extrazelluläre Moleküle, was Zelloberflächenmoleküle und Polysaccharide der extrazellulären Matrix des reifen Biofilms miteinschließt (Li et al. 2003).

Nach Einstellen der Inokulationsdosis des jeweiligen Stamms in 10, 50 oder 100 %igem Milchmedium, wurden 2 x 8 Wells der 96-Well-Mikrotiterplatte aus Kunststoff mittels Mehrkanalpipette mit 100 µl pro Well pipettiert. Zur Bestimmung des Blank-Wertes wurden 1 x 8 Wells mit 100 µl pro Well des unbeimpften Milchmediums pipettiert. Anschließend erfolgte die Inkubation statisch für 6 Tage bei 6 °C, was zur Anheftung und zum Wachstum der Bakterien

bis hin zur Bildung eines Biofilms führen sollte. Nach Abpipettieren der Bakteriensuspension wurde die 96-Well-Mikrotiterplatte vorsichtig in einer mit Zellstoff ausgelegten Stahlwanne ausgeklopft und mit 250 µl sterilem Reinstwasser pro Well gewaschen. Dieser Waschschrift erfolgte zweimal und diente zur Entfernung der nicht gebundenen Zellen. Zur Abtötung und Fixierung von Zellen im Biofilm, wurden daraufhin 200 µl  $\geq 99,9\%$ iges Methanol pro Well pipettiert und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss erfolgte, wie zuvor beschrieben, ein zweimaliger Waschschrift. Um vorhandenes Biofilmmaterial photometrisch messen zu können, erfolgte die Anfärbung mittels 5 %iger Kristallviolett-Lösung. Hierfür wurden 125 µl 5 %ige Kristallviolett-Lösung pro Well pipettiert und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Entfernung von nicht gebundener Färbelösung, erfolgte ein dreimaliger Waschschrift. Mit der Öffnung nach unten zeigend und auf einem Papiertuch liegend wurden die 96-Well-Mikrotiterplatten ohne Deckel für  $2 \pm 0,5$  Stunden unter der Werkbank getrocknet. Anschließend wurden 125 µl 30 %ige Essigsäure pro Kavität pipettiert und für 15 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Wipptisch inkubiert, sodass im Biofilm fixiertes Kristallviolett gelöst wurde. Eine photometrische Auswertung erfolgte durch Messung der Extinktion im Mikroplatten-Reader SPARK® (TECAN Group Ltd., Schweiz) bei einer Wellenlänge von 550 nm.

Die Untersuchungen wurden mindestens dreimal unabhängig voneinander durchgeführt und die Biofilmbildung als Mittelwert der gemessenen Extinktion bei einer Wellenlänge von 550 nm abzüglich des Blank-Wertes (unbeimpftes Milchmedium) dargestellt.

#### 5.1.5 Sterilisation der Edelstahl- und Gummi-Plättchen

Für die Biofilm-Analysen wurden sterile Plättchen aus rostfreiem Edelstahl (AISI 316-2B; 40 x 20 x 1 mm, Metall-Industriewerk Hofmann GmbH, Deutschland) und lebensmittelechtem Gummi (EPDM; 40 x 20 x 3 mm, Nord-Industriegummi GmbH & Co. KG, Deutschland) eingesetzt. Die bei der Rasterelektronenmikroskopie von Biofilmen verwendeten Plättchen betragen die Maße 15 x 10 x 1 bzw. x 3 mm. Edelstahl AISI 316-2B ist für den Einsatz in der Lebensmittelindustrie geeignet und kommt daher auch häufig in der milchverarbeitenden Industrie vor (Rittal Systems Ltd. 2021, ISSF 2010), während Gummi aus EPDM als Dichtungsmaterial von Rohren in der Milchindustrie geläufig ist (DTS-PRO-SYS GmbH 2021). In Anlehnung an Nguyen und Yuk (2013) wurden die Edelstahl-Plättchen für 15 Minuten mit 70 %igem Ethanol (vergällt) behandelt und Gummi-Plättchen mit Spülmittel gereinigt. Nach anschließendem Abspülen mit Reinstwasser, erfolgte die Trocknung der Plättchen unter der Werkbank. Zuletzt wurden die Edelstahl-Plättchen für 3,5 Stunden im Heißluft-Sterilisator (Memmert GmbH & Co. KG, Deutschland) bei 160 °C erhitzt und die Gummi-Plättchen für 20 Minuten bei 121 °C im Feststoff-Programm autoklaviert.

### 5.1.6 Analyse der Biofilmbildung auf Edelstahl- und Gummi-Oberfläche

Die Versuche zur Biofilmbildung auf Edelstahl wurden in 10, 50 oder 100 %igen Milchmedium mit einer Inokulationsdosis von  $6 \pm 0,5 \log \text{KbE/ml}$  durchgeführt (s. Material und Methoden 5.1.2), wohingegen die vergleichenden Untersuchungen zum Biofilmbildungsvermögen auf Edelstahl- und Gummi-Oberfläche in 100 %igem Milchmedium bei einer Inokulationsdosis von  $4 \pm 0,5 \log \text{KbE/ml}$  mit kälteadaptierten Kulturen (s. Material und Methoden 5.2.1) stattfanden. Nach Zugabe eines Edelstahl- oder Gummi-Plättchens in eine Schraubröhre mit 25 ml beimpften Milchmedium folgte die statische Inkubation für 6 Tage bei 6 °C.

### 5.1.7 Quantifizierung der Biofilmmasse auf Edelstahl- und Gummi-Oberfläche

Modifiziert nach O'Toole (2011) wurde die Biofilmmasse zur Einschätzung des Vermögens zur Biofilmbildung auf Edelstahl- und Gummi-Oberfläche in der gleichen Abfolge, wie in Abschnitt 5.1.4 bereits für die Biofilmbildung in Mikrotiterplatten-Format beschrieben, quantifiziert. Für die Handhabung der Plättchen ergaben sich daraus angepasste Volumina-Angaben. Nach erfolgter Biofilmbildung wurden lose Zellen mit Reinstwasser vorsichtig abgewaschen und die vorhandenen Biofilm-assoziierten Zellen in 25 ml  $\geq 99,9$  %igen Methanol für 15 Minuten fixiert. Nach erneutem Waschen mit Reinstwasser, erfolgte die Anfärbung der Biofilm-assoziierten Zellen in 25 ml 5 %iger Kristallviolett-Lösung bei Raumtemperatur für 15 Minuten. Nicht gebundene Färbelösung wurde anschließend mit Reinstwasser abgespült und die Edelstahl- und Gummi-Plättchen mit dem angefärbten Biofilm für  $2 \pm 0,5$  Stunden bei Raumtemperatur unter der Werkbank getrocknet. Anschließend wurde an die Biofilm-Matrix gebundenes Kristallviolett mit 8 ml 30 %iger Essigsäure und einer Inkubation von 15 Minuten auf einem Wipptisch gelöst und photometrisch quantifiziert. Hierfür wurden 125  $\mu\text{l}$  der Probe in 2 x 8 Wells der 96-Well-Mikrotiterplatte pipettiert und die Extinktion im Mikroplatten-Reader SPARK® (Tecan Group Ltd., Schweiz) bei einer Wellenlänge von 550 nm gemessen.

Als Negativ-Kontrolle (Blank) wurden im Kristallviolett-Assay Edelstahl- und Gummi-Plättchen in unbeimpftem Milchmedium eingesetzt. Die Versuche wurden mindestens zweimal unabhängig voneinander durchgeführt und die quantifizierte Biofilmmasse als Mittelwert der gemessenen Extinktion bei einer Wellenlänge von 550 nm abzüglich des Blank-Wertes dargestellt. Für die Vergleichbarkeit der Biofilmmasse auf Edelstahl- und Gummi-Oberfläche wurde die Biofilmmasse pro  $\text{cm}^2$  berechnet.

### 5.1.8 Bestimmung der Keimzahl des Biofilms auf Edelstahl- und Gummi-Oberfläche

Die Keimzahl eines auf Edelstahl- oder Gummi-Plättchen gewachsenen *Pseudomonas*-Biofilms wurde in Anlehnung an Ban und Kang (2016) bestimmt. Hierfür wurde ein bewachsenes Plättchen in 25 ml Ringer-Lösung (Viertelstark) mit 3 g Glasperlen ( $\varnothing$  2 mm) überführt. Daraufhin wurde das der Biofilm für eine Minute bei maximaler Geschwindigkeit des Vortexers mechanisch abgeschlagen und die Keimzahl aus der Ringer-Lösung (Viertelstark) mit abgeschlagenem Biofilm auf CASO-Agar bestimmt. Die kulturelle Keimzahlbestimmung ist 5.1.2 zu entnehmen. Als Kontrolle wurde die Keimzahl eines Plättchens nach der Inkubation in unbeimpftem Milchmedium ermittelt.

Die Bestimmung der Biofilm-Keimzahl wurde im Doppelansatz mindestens zweimal unabhängig voneinander durchgeführt und die Mittelwerte der Keimzahlen ( $\log \text{KbE}/\text{cm}^2$ ) berechnet.

## 5.2 Charakterisierung von *Pseudomonas* spp. hinsichtlich der Peptidaseaktivität in Biofilmen

### 5.2.1 Bakterienanzucht und Kälteadaptation

Die Bakterienanzucht für die Analysen zur Charakterisierung der Peptidaseaktivität von *Pseudomonas* spp. sind aus Abschnitt 5.1.1 zu entnehmen. Für die Kälteadaptation der Zellen wurde zunächst 1 ml der Bakterienkultur bei 8.000 rpm für 5 Minuten bei 4 °C zentrifugiert und das Pellet in frischem 100 %igen Milchmedium resuspendiert, worauf eine Inkubation für  $24 \pm 1$  Stunden bei 6 °C folgte.

### 5.2.2 Analyse der Peptidaseaktivität von *Pseudomonas* spp. auf Magermilch-Agar

Es wurden 10  $\mu\text{l}$  der kälteadaptierten Kultur mittig auf den 1 %igen Magermilch-Agar getropft. Darauf folgte die Inkubation für 6 Tage bei 6 °C zur Lyse des Caseins durch peptidaseaktive Stämme. Im Anschluss an die Inkubation wurde der Radius bzw. Durchmesser der gewachsenen Kolonie und im Falle von gespaltenen Milchcasein die Lysezone, welche sich um die Kolonie gebildet hatte, gemessen.

Das Vorhandensein einer Lysezone um die gewachsene Kolonie führte zu einer Kategorisierung der *Pseudomonas*-Isolate hinsichtlich der Peptidaseaktivität. Der gemessene Radius und Durchmesser wurde für zweierlei Auswertungen verwendet: Für die Berechnung von  $\Delta r$  nach Maier et al. (2020) und des proteolytischen Index nach Hamdani et al. (2019). Tabelle 6 zeigt beide Methoden zur Auswertung der Peptidaseaktivität auf Magermilch-Agar.



Tabelle 6: Einteilung der Peptidaseaktivität in Kategorien nach Maier et al. (2020) und Berechnung des proteolytischen Index nach Hamdani et al. (2019).

A: Nach Maier et al. (2020)		B: Nach Hamdani et al. (2019)	
<b><math>\Delta r = r_{\text{Lysezone}} - r_{\text{Kolonie}}</math></b>	<b>Kategorie</b>	<b>Proteolytischer Index =</b>	
$\Delta r = 0 \text{ cm}$	Keine	$\frac{\varnothing \text{ Lysezone} - \varnothing \text{ Kolonie}}{\varnothing \text{ Kolonie}}$	
$0 \text{ cm} < \Delta r < 0,2 \text{ cm}$	Schwach		
$0,2 \text{ cm} < \Delta r < 0,5 \text{ cm}$	Moderat		
$0,5 \text{ cm} < \Delta r < 1 \text{ cm}$	Stark		
$\Delta r > 1 \text{ cm}$	Sehr stark		

### 5.2.3 Quantifizierung der Peptidaseaktivität von *Pseudomonas* spp. mittels Fluorescamin-Assay

#### 5.2.3.1 Aufbau des Fluorescamin-Assays

Die Bakterienanzucht und Kälteadaptation der Zellen erfolgten wie in Abschnitt 5.2.1 beschrieben. Daran schloss sich die Herstellung des Biofilms an, indem zunächst eine Inokulationsdosis von  $4 \pm 0,5 \log \text{ KbE/ml}$  mithilfe des Durchflusszytometers FACSCalibur (BD Bioscience, USA) in 100 %igem Milchmedium eingestellt wurde (s. Material und Methoden 5.1.3, 100 %iges Milchmedium als Blank). Nach Zugabe eines sterilen Edelstahl- oder Gummi-Plättchens in 25 ml Milchmedium (100 %) erfolgte die statische Inkubation für 6 Tage bei 6 °C. Um die Peptidaseaktivität pro Zelle zwischen Biofilm-assoziierten und planktonischen Zellen vergleichen zu können, wurde neben der Fluorescamin-basierten Bestimmung der Peptidaseaktivität auch die Keimzahlbestimmung beider Wuchsformen in einem Parallelansatz durchgeführt. Die Untersuchungen zu Biofilm-assoziierten und planktonischen Zellen wurden zweimal unabhängig voneinander durchgeführt. Als Negativ-Kontrolle (= Leerwert/Blank-Wert) durchliefen Edelstahl- bzw. Gummi-Plättchen in unbeimpften Milchmedium den gesamten Versuchsaufbau. Eine schematische Übersicht der Versuchsdurchführung zur Quantifizierung der Peptidaseaktivität Biofilm-assoziiierter und planktonischer Zellen ist in Abbildung 2 dargestellt.

#### 5.2.3.1 a) Biofilm-assoziierte Zellen: Bestimmung der Keimzahl und der Peptidaseaktivität

Nach der Inkubation wurde die Keimzahl des Biofilms mittels Glasperlen-Methode (s. Material und Methoden 5.1.8) bestimmt. Für die Messung der Peptidaseaktivität von Biofilm-assoziierten Zellen wurde ein weiteres mit Biofilm bewachsenes Edelstahl- oder Gummi-Plättchen mit sterilem Reinstwasser gespült und in 25 ml unbeimpftes 100 %iges Milchmedium überführt. Die Casein-Spaltung durch die im Biofilm vorhandenen Peptidasen erfolgte während der Inkubation für

24 ± 1 Stunden bei 20 °C. Nach der Inkubation wurden 500 µl Probe für das Fluorescamin-Assay eingesetzt (s. Material und Methoden 5.2.3.3).

#### 5.2.3.1 b) Planktonische Zellen: Bestimmung der Keimzahl und der Peptidaseaktivität

Zur Keimzahlbestimmung der planktonischen Zellen aus dem Umgebungsmedium wurden 4,5 ml Suspension zunächst bei 8.000 rpm für 5 Minuten bei Raumtemperatur abzentrifugiert und das Pellet in 4,5 ml unbeimpften 100 %igem Milchmedium resuspendiert. Anschließend wurde 1 ml für die Keimzahlbestimmung (s. Material und Methoden 5.1.2) abgenommen und die verbliebenen 3,5 ml für die Casein-Spaltung für 24 ± 1 Stunden bei 20 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurden aus dieser Suspension 500 µl Probe in das Fluorescamin-Assay überführt.

#### 5.2.3.2 Erstellen einer Standardreihe mit Leucylglycin für das Fluorescamin-Assay

Zur Konzentrationsbestimmung der untersuchten Proben im Mikroplatten-Reader SPARK® (Tecan Group Ltd., Schweiz), wurde eine Standardreihe mit dem Dipeptid Leucylglycin in bekannten Konzentrationen verwendet. Hierfür wurde eine 10 mM Stocklösung aus Leucylglycin in Phosphatpuffer (pH 8,0; 0,1 M) angesetzt und anschließend Verdünnungen in den Konzentrationen 0,5 mM, 0,25 mM, 0,125 mM und 0,0625 mM hergestellt. Die anhand des Standards ermittelte Peptidaseaktivität der Proben wurden in der Einheit Äquivalente Leucylglycin pro mmol/l Milch angegeben.

Die Leucylglycin-Standardreihe aus den genannten Konzentrationen wurde bei jeder Messung im Mikroplatten-Reader SPARK® (Tecan Group Ltd., Schweiz) mitbestimmt.

#### 5.2.3.3 Durchführung des Fluorescamin-Assays

In Anlehnung an Stoeckel et al. (2016) wurde für die Fällung von nicht gespaltenen Milchprotein 500 µl Probe und 500 µl 24 %ige Trichloressigsäure im 1:1-Verhältnis mittels Vortexer vermischt und für eine Stunde bei 22 °C inkubiert. Durch Zentrifugation bei 13.000 rpm für 15 Minuten verblieben freie, lösliche Spaltpeptide im Überstand. Nach Filtration von 1 ml Überstand mittels 0,45 µm Filters wurden 600 µl Phosphatpuffer (pH 8,0; 0,1 M) und 20 µl Filtrat, oder 20 µl Leucylglycin/-Verdünnungen als Standard, vermischt und nach Zugabe von 200 µl Fluorescamin-Lösung erneut vermischt und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. In dieser Zeit lagerte sich das Fluorescamin an Spaltpeptide an. Nach Pipettieren von 200 µl der Suspension pro Well in schwarze 96-Well-Mikrotiterplatten, erfolgte nach exakt 20 Minuten nach Zugabe der Fluorescamin-Lösung zum Proben-Gemisch die Messung im Mikroplatten-Reader SPARK® (Tecan Group Ltd., Schweiz) bei einer Exzitation von 350 nm und einer Emission von 460 nm. Mithilfe der Daten-Analysesoftware Magellan™ und unter Einbezug der Einheit der

Standardkurve wurden die Fluoreszenzwerte in Äquivalente Leucylglycin mmol/l Milch abgelesen. Für die Auswertung der Ergebnisse wurden die gemessenen Werte in die Einheit Femtokatal pro koloniebildende Einheit (fkat/KbE, s. Material und Methoden 5.2.3.4) umgerechnet.

#### 5.2.3.4 Umrechnung auf Femtokatal pro koloniebildende Einheit

Es erfolgte die Umrechnung der Werte aus der Einheit Äquivalente Leucylglycin mmol pro l in die SI-Einheit der katalytischen Aktivität Femtokatal. Um einen Vergleich zwischen Biofilm-assoziierten und planktonischen Zellen anzustellen, wurde der Quotient der Peptidaseaktivität (Femtokatal) und der jeweiligen Keimzahl (koloniebildende Einheit) ermittelt, sodass die ermittelten Ergebnisse zur Peptidaseaktivität Biofilm-assoziiierter und planktonischer Zellen in Femtokatal (fkat) pro koloniebildende Einheit (KbE) gegenübergestellt werden konnten.

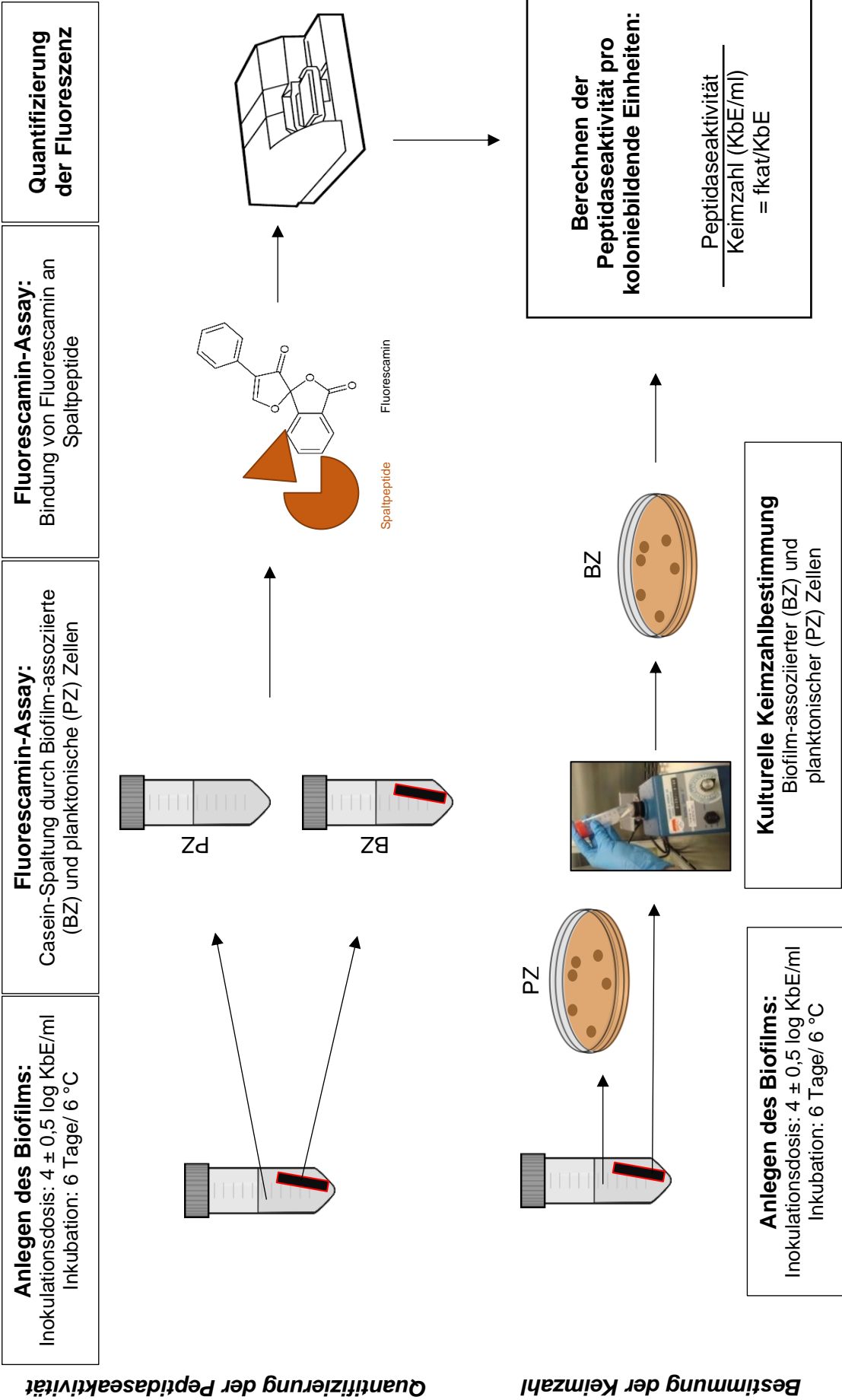


Abbildung 2: Schematische Übersicht zur Bestimmung der Peptidaseaktivität Biofilm-assoziiierter und planktonischer Zellen mittels Fluorescamin-Assay.

### 5.3 Rasterelektronenmikroskopie (REM) von Biofilmen

#### 5.3.1 Anlegen des Biofilms

Für rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von Mono-Spezies-Biofilmen von *Pseudomonas* spp. wurden Edelstahl-Plättchen in 100 %igem Milchmedium mit einer Inokulationsdosis von  $4 \pm 0,5 \log \text{KbE/ml}$  (s. Material und Methoden 5.1.2) inkubiert. Für die REM-Analysen von Multi-Spezies-Biofilmen wurde tagesfrische Rohmilch von einer „Milch-Tankstelle“ in Schleswig-Holstein verwendet. Die Inkubation für die Mono- und Multi-Spezies-Biofilme erfolgte in je 25 ml Medium (100 %iges Milchmedium bzw. Rohmilch) auf Edelstahl- und Gummi-Plättchen für 6 Tage bei je 6 °C. Rohmilch-assoziierte Multi-Spezies-Biofilme wurden zusätzlich bei 20 °C inkubiert und die Biofilm-Keimzahl mittels Glasperlen-Methode bestimmt (s. Material und Methoden 5.3.3).

#### 5.3.2 Präparation und Versand der Proben für die REM-Analytik

Für die REM-Aufnahmen am Institut für Lebensmittel- und Verfahrenstechnik (LBV) des Max Rubner-Instituts erfolgten die Fixierung und Entwässerung des Biofilmmaterials auf den Plättchen in Anlehnung an Danylec et al. (2018). Hierfür wurde eine Fixierlösung hergestellt, dessen Zusammensetzung aus Tabelle 3 zu entnehmen ist. Nach der Ausbildung des Biofilms (s. Material und Methoden 5.3.1) wurden die Plättchen in je 50 ml Fixierlösung für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Daraufhin folgte ein Waschschrift in 16 ml 0,1 M Natrium-Phosphat-Puffer und zweimal in 16 ml sterilem Reinstwasser. Anschließend erfolgte die Entwässerung des fixierten Biofilms mittels Ethanol-Reihe (25, 50, 75, 90 und  $\geq 99,9$  %, unvergällt). Hierbei wurden die einzelnen Plättchen für je 30 Minuten in 16 ml Ethanol mit aufsteigender Konzentration inkubiert, wobei zweimal mit  $\geq 99,9$  %igem Ethanol behandelt wurde. Nach dem Versand der fixierten und entwässerten Plättchen an das Institut LBV, erfolgte dort die Trocknung der Biofilme auf Edelstahl-Plättchen mittels der Kritisch-Punkt-Apparatur CPD 030 (Bal-Tec AG, Liechtenstein). Die getrockneten Proben wurden jeweils mit leitfähigem Kohlenstoffkleber (Leitpaste-C-Paste) auf einen Stiftprobenteller aus Aluminium geklebt, über Nacht getrocknet und 30 Sekunden lang mit Platin besputtert (Quorum Technologies Ltd, UK). Für Biofilme auf Gummi-Plättchen wurde ein anderes Trocknungsverfahren angewandt, da das Gummi-Material aufgrund seiner Porosität während der Trocknung mittels Kritisch-Punkt-Apparatur nicht stabil genug wäre und sich aufblähen würde. Stattdessen wurden die Gummi-Plättchen nach der Ethanol-Reihe mit 4 ml Hexamethyldisilazan (HDSM) als Trocknungsmittel für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde das HDSM abpipettiert und die Proben 2 Stunden im Abzug getrocknet. Zuletzt wurden die Gummi-Plättchen ebenfalls mit Leit-C-Paste aufgeklebt und zusätzlich an den Rändern mit Kupfer-Klebeband fixiert, um die Leitfähigkeit der Probe während der REM-Analyse besser zu gewährleisten. Vor dem Besputtern wurden die Proben unter

ständiger Luftzufuhr über Nacht im Abzug getrocknet. Die Aufnahmen der Biofilme auf Edelstahl- und Gummi-Oberfläche erfolgten mit dem Everhart-Thornley-Detektor im Feldemissions-Rasterelektronenmikroskop Quanta™ 250 FEG (FEI, Tschechische Republik) mit einer Beschleunigungsspannung von 10 kV unter Hochvakuumbedingungen.

### 5.3.3 Keimzahlbestimmungen von Rohmilch-assoziierten Multi-Spezies-Biofilmen

Die Zusammensetzung der Biofilme in Abhängigkeit von Materialart und Inkubationstemperatur wurde neben der rasterelektronenmikroskopischen Analyse zusätzlich anhand kultureller Keimzahlbestimmungen auf Selektivnährböden und Plate-Count-Agar für den Gesamtkeimgehalt untersucht. Es wurden Nährböden mit selektivem Wachstum für *Pseudomonas* spp., *Enterobacteriaceae*, *Escherichia coli* sowie Hefen und Schimmel ausgewählt. In Vorbereitung wurden die Plättchen mittels Glasperlen-Methode behandelt und die Keimzahl der abgeschlagenen Biofilme bestimmt (s. Material und Methoden 5.1.8). Die Inkubationszeiten und -temperaturen der eingesetzten Nährböden sind Tabelle 7 zu entnehmen.

Tabelle 7: Inkubationsbedingungen von Plate-Count-Agar und ausgewählten Selektivnährböden zur Analytik von Rohmilch-assoziierten Multi-Spezies-Biofilmen.

Gruppe von Mikroorganismen	Nährboden	Inkubationszeit	Inkubations-temperatur
Gesamtheit der aeroben, mesophilen Keime	Plate-Count (PC) Agar	48 bis 72 Stunden	30 °C
<i>Pseudomonas</i> spp.	Cephalothin-Fusidinsäure-Cetrimid (CFC) Agar	48 Stunden	25 °C
<i>Enterobacteriaceae</i>	Kristallviolett-Neutralrot-Galle-Glucose (VRBD) Agar	72 Stunden	30 °C
<i>Escherichia coli</i>	Trypton-Galle-x-Glucuronid (TBX) Agar	18 bis 24 Stunden	41,5 °C
Hefen und Schimmel	Hefeextrakt-Glucose-Chloramphenicol (YGC) Agar	3 und 5 Tage	25 °C

Die Bestimmung der Biofilm-Keimzahl nach 6-tägiger Inkubation bei 6 °C wurde im Doppelansatz durchgeführt und die Mittelwerte der Keimzahlen ( $\log \text{KbE}/\text{cm}^2$ ) berechnet. Der Keimgehalt der eingesetzten Rohmilch an Tag 0 wurde einmalig bestimmt ( $\log \text{KbE}/\text{ml}$ ).

## 6 Statistische Auswertungen

Die Analyse von signifikanten Unterschieden zwischen hofseitigen Einflussfaktoren auf die *Pseudomonas*- bzw. Gesamtkeimzahl in Rohmilch erfolgte wie bei Alanis et al. (2021) zunächst mittels Kruskal-Wallis-Test. Für anschließende Mehrfachvergleiche wurde der Dunn`s Test mit Bonferroni Korrektur als Post-Hoc-Test angewandt. Die Extinktionswerte aus dem Kristallviolett-Assay in Mikrotiterplatten und auf Edelstahl- und Gummi-Plättchen sowie Ergebnisse der quantifizierten Peptidaseaktivität Biofilm-assoziiierter und planktonischer Zellen mittels Fluorescamin-Assay wurden wie bei Sindi et al. (2019) und Pipattanachat et al. (2021) mittels ANOVA (einfaktorieller Varianzanalyse) analysiert, gefolgt von Tukey-HSD-Post-Hoc-Test (paarweiser Vergleich). Die statistischen Auswertungen wurden mithilfe des Statistikprogramms JMP® durchgeführt, wobei p-Werte signifikante (\*;  $p \leq 0,05$ ) und hoch signifikante (\*\*;  $p \leq 0,01$ ) Unterschiede aufzeigten (Gerstman 2015).

## Ergebnisse

### 1 Bestimmung der Eintragsrouten von *Pseudomonas* spp. in Rohmilch

#### 1.1 Analyse des Zusammenhangs zwischen hofseitigen Einflussfaktoren und *Pseudomonas*-Keimzahlen in Rohmilch

##### 1.1.1 Auswertung der Fragebögen mit hofspezifischen Informationen

In Tabelle 8 sind die abgefragten hofspezifischen Parameter der 38 Erzeugerhöfe in absoluten und relativen Zahlen (in %) dargestellt. Von den beprobten Betrieben waren 73,7 % konventionelle und 26,3 % ökologische Milcherzeuger. Bei 94,8 % der Betriebe erfolgte eine 2-tägige Abholung der Rohmilch und 68,4 % der Erzeuger nutzten einen manuellen Melkstand. Den Angaben zu Folge wurde das Melksystem am häufigsten mit 76,3 % über die Zirkulation von Säure und Lauge (ca. 60 °C) gereinigt. Mit 94,8 % dominierte die Milchstapelung im Tank, wobei mit 50,0 % die Durchlaufkühlung von Rohmilch überwog. Die meisten Höfe bevorzugten für die Euterhygiene eine Trockenreinigung (39,4 %), gefolgt von der automatischen Reinigung mittels Bürste des Melkroboters (23,7 %). Das Milchvieh wurde bei 68,5 % aller Höfe ausschließlich im Laufstall gehalten, wobei 28,9 % der Erzeugerhöfe eine Kombination aus Laufstall- und Weidehaltung angaben. Das Wasser erhielten 81,6 % aller Höfe über ihren kommunalen Wasserversorger und 10,5 % über einen eigenen Brunnen.

Tabelle 8: Auswertung der hofspezifischen Parameter nach Abfrage der 38 beprobten Erzeugerhöfe zur Analyse des Zusammenhangs zwischen hofseitigen Einflussfaktoren und *Pseudomonas*-Keimzahlen in Rohmilch. Die häufigste Nennung ist unterstrichen.

Hofparameter / Möglicher Einflussfaktor	Absolute Hof-Anzahl	Relative Hof-Anzahl (in %)
<b>Art des Betriebes</b>		
<u>Konventionell</u>	<u>28</u>	<u>73,7</u>
Ökologisch	10	26,3
<b>Intervall der Milchabholung</b>		
Täglich	2	5,2
<u>Zweitägig</u>	<u>36</u>	<u>94,8</u>
<b>Melksystem</b>		
<u>Manueller Melkstand</u>	<u>26</u>	<u>68,4</u>
Melkroboter	9	23,7
Rohrmelkanlage	3	7,9
<b>Spülsystem Melkstand</b>		
Kaltwasser, ca. 40 °C per Hand	1	2,6
Heißwasser > 70 °C	7	18,5
<u>Zirkulation Säure/Lauge, ca. 60 °C</u>	<u>29</u>	<u>76,3</u>
Zirkulation Säure/Lauge + Heißwasser	1	2,6



Fortsetzung Tabelle 8

Hofparameter / Möglicher Einflussfaktor	Absolute Hof-Anzahl	Relative Hof-Anzahl (in %)
<b>Milchstapelung</b>		
Wanne	1	2,6
Tank	<u>36</u>	<u>94,8</u>
Wanne + Tank	1	2,6
<b>Kühlung</b>		
Durchlauf	<u>19</u>	<u>50,0</u>
Im Tank	15	39,5
Durchlauf + im Tank	4	10,5
<b>Euterhygiene</b>		
Trocken (z. B. mit Holzwolle)	<u>15</u>	<u>39,4</u>
Einwegtücher (feucht)	8	21,1
Waschbare Tücher (feucht)	6	15,8
Bürste Melkroboter	9	23,7
<b>Tierhaltung</b>		
Laufstall	<u>26</u>	<u>68,5</u>
Anbindestall + Weide	1	2,6
Laufstall + Weide	11	28,9
<b>Wasserversorgung</b>		
Eigener Brunnen	4	10,5
Kommunaler Wasserversorger	<u>31</u>	<u>81,6</u>
Eigener Brunnen und kommunaler Wasserversorger	3	7,9
<b>Liefermenge pro Jahr (Liter)</b>		
50.000 – 100.000	3	7,9
100.000 – 1.000.000	14	36,8
<u>1.000.000 – 5.090.250</u>	<u>21</u>	<u>55,3</u>
Im Durchschnitt: 1.343.643		
<b>Gesamtkeimzahl Ø 12 Monate (Zellen/ml)</b>		
6.000 – 10.000	12	31,6
<u>10.000 – 30.000</u>	<u>18</u>	<u>47,4</u>
30.000 – 70.000	8	21,0
Im Durchschnitt: 20.684		
<b>Somatische Zellzahl Ø 12 Monate (Zellen/ml)</b>		
85.000 – 100.000	2	5,3
100.000 – 200.000	15	39,5
<u>200.000 – 350.000</u>	<u>21</u>	<u>55,2</u>
Im Durchschnitt: 213.421		

Die durchschnittliche Liefermenge von Rohmilch pro Jahr betrug bei den beprobten Erzeugerhöfen 1.343.643 Liter (Min.: 50.000 l, Max.: 5.090.250 l). Die durchschnittliche Gesamtkeimzahl aller Höfe über 12 Monate lagen bei 20.684 Zellen/ml (Min.: 6.000 Zellen/ml, Max.: 70.000 Zellen/ml) und die durchschnittliche somatische Zellzahl bei 213.421 Zellen/ml (Min.: 85.000 Zellen/ml, Max.: 350.000 Zellen/ml).

### 1.1.2 Analyse durchschnittlicher Keimzahlen in Rohmilch

Die *Pseudomonas*- und Gesamtkeimzahlen von 521 bzw. 519 Rohmilchproben der 38 Erzeugerhöfe sind in Abbildung 3 dargestellt. Es wurden *Pseudomonas*-Keimzahlen zwischen

1,4 und über 6,7 log KbE/ml ermittelt. Der Mittelwert lag bei  $3,4 \pm 1,3$  log KbE/ml und somit etwas höher als der Median (3,1 log KbE/ml). Die Gesamtkeimzahlen schwankten zwischen 3,3 und 7,1 log KbE/ml, wobei der Mittelwert bei  $4,7 \pm 0,6$  log KbE/ml und der Median bei 4,6 log KbE/ml lag.

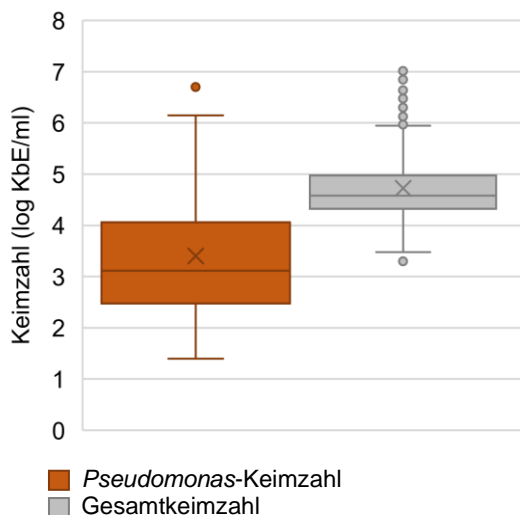


Abbildung 3: Pseudomonas- und Gesamtkeimzahlen (log KbE/ml) der Rohmilchproben von insgesamt 38 Erzeugerhöfen, ermittelt per kultureller Keimzahlbestimmung (Pseudomonas-Keimzahl,  $n = 521$ ) und mittels BactoCounts (Gesamtkeimzahl,  $n = 519$ ).

Bei 31,7 % (165/521) der untersuchten Proben lagen die *Pseudomonas*-Keimzahlen in Rohmilch am häufigsten zwischen 2 und 3 log KbE/ml, gefolgt von *Pseudomonas*-Gehalten zwischen 3 und 4 log KbE/ml bei 27,2 % (142/521) aller Proben. *Pseudomonas*-Keimzahlen zwischen 4 und 5 log KbE/ml wurden bei 17,5 % (91/521) der Rohmilchproben ermittelt, während 11,3 % (59/521) der Proben unter 2 log KbE/ml lagen. Bei 6,5 % (34/521) aller Proben lagen die *Pseudomonas*-Gehalte zwischen 5 und 6 log KbE/ml und bei 5,8 % (30/521) der Rohmilchproben über 6 log KbE/ml. Als Schwellenwert für einen hohen *Pseudomonas*-Gehalt in Rohmilch wurde das 80. Perzentil der Daten (4,2 log KbE/ml) definiert. Demnach wiesen 21,3 % (111/521) aller Proben *Pseudomonas*-Keimzahlen von  $\geq 4,2$  log KbE/ml auf. Hinsichtlich der Gesamtkeimzahlen lagen 70,7 % (367/519) aller Rohmilchproben zwischen 4 und 5 log KbE/ml, gefolgt von 20,6 % (107/519) der Proben mit Keimzahlen zwischen 5 und 6 log KbE/ml. Bei 6,0 % (31/519) der untersuchten Proben wurden Gesamtkeimgehalte über 6 log KbE/ml in Rohmilch ermittelt und bei 2,7 % (14/519) aller Proben Gesamtkeimzahlen zwischen 3 und 4 log KbE/ml.

### 1.1.3 Identifikation potentieller Einflussfaktoren auf die *Pseudomonas*-Keimzahl in Rohmilch

Für die Identifikation möglicher hofspezifischer Einflussfaktoren auf die *Pseudomonas*-Keimzahl in Rohmilch wurden die per Fragebogen abgefragten Parameter in Zusammenhang mit den *Pseudomonas*- und Gesamtkeimzahlen gebracht. Die Analysen ergaben in Abhängigkeit der Parameter „Produktionsart“, „Spülsystem des Melkstands“, „Milchstapelung“, „Rohmilch-

Kühlung“, „Tierhaltung“ und „Wasserversorgung“ signifikante Unterschiede hinsichtlich der *Pseudomonas*- und/oder Gesamtkeimzahlen. Die Ergebnisse dazu sind in Abbildung 4 (A-F) dargestellt.

Bei den konventionell betriebenen Erzeugerhöfen wurden signifikant höhere *Pseudomonas*- und Gesamtkeimzahlen im Vergleich zu Betrieben mit ökologischer Milchgewinnung ermittelt (Abbildung 4, A). Dabei lagen 26,6 % der Rohmilchproben der konventionellen Betriebe über dem *Pseudomonas*-Schwellenwert von 4,2 log KbE/ml, bei den ökologischen Milcherzeugern waren es lediglich 4,6 % aller Rohmilchproben.

Die Analyse der unterschiedlichen Spülsystemen zur Reinigung des Melkstands ergab signifikant höhere *Pseudomonas*-Keimzahlen bei Höfen mit einer Säure/Lauge-Zirkulation im Vergleich zu Betrieben, die mit Heiß- oder Kaltwasser bzw. mittels Kombination aus Heißwasser und Säure/Laugen-Zirkulation reinigten (Abbildung 4, B). Mit 22,5 % aller Rohmilchproben bei Höfen mit Säure/Lauge-Zirkulation wurden am häufigsten *Pseudomonas*-Gehalte über dem Schwellenwert von 4,2 log KbE/ml ermittelt. Dabei muss beachtet werden, dass es sich jeweils um einen Erzeugerhof handelt, der Kaltwasser (ca. 40 °C per Hand) bzw. kombiniert aus zirkulierender Säure/Lauge und Heißwasser zur Reinigung des Melkstands einsetzt. Aus diesem Grund sind die signifikanten Unterschiede zu einmalig genannten Reinigungsarten des Melkstands als vernachlässigbar anzusehen.

Die Untersuchungen zu den verschiedenen Arten der Milchstapelung ergaben signifikant höhere *Pseudomonas*-Keimzahlen bei Höfen mit Tank im Vergleich zu Höfen mit Wanne oder mit Tank-Wannen-Kombination, wobei 21,4 % der Proben von Höfen mit Tank zur Milchstapelung *Pseudomonas*-Keimzahlen über dem Schwellenwert von 4,2 log KbE/ml aufwiesen (Abbildung 4, C). Zudem ergab die Auswertung signifikant höhere Gesamtkeimzahlen bei Höfen mit Tank im Vergleich zu Höfen mit Wanne zur Milchstapelung (Abbildung 4, C). Die ermittelten signifikanten Unterschiede sind ebenso zu vernachlässigen, da es sich um je einen Erzeugerhof handelt, der mittels Wanne bzw. einer Kombination aus Wanne und Tank die Milchstapelung durchführt.

Die Analyse zu den verschiedenen Arten der Rohmilch-Kühlung ergab signifikant höhere *Pseudomonas*-Keimzahlen bei Höfen mit Durchlauf- oder Tankkühlung im Vergleich zu Höfen mit einer kombinierten Durchlauf- und Tankkühlung (Abbildung 4, D). Mit 23,6 % und 20,7 % lagen die untersuchten Proben am häufigsten bei Erzeugerhöfen mit Tank- oder Durchlaufkühlung über dem *Pseudomonas*-Schwellenwert von 4,2 log KbE/ml. In Bezug zur Tierhaltung ergaben die Untersuchungen signifikant höhere *Pseudomonas*- und Gesamtkeimzahlen bei Höfen mit Tierhaltung im Laufstall im Vergleich zu Höfen mit kombinierter Laufstall- und Weidehaltung (Abbildung 4, E). Auch wurden signifikant höhere *Pseudomonas*- und Gesamtkeimzahlen bei Höfen, die das Milchvieh kombiniert im Anbindestall und auf der Weide hielten, im Vergleich zu Höfen mit kombinierter Laufstall- und Weidehaltung, ermittelt. Dabei sind signifikant höhere *Pseudomonas*- und Gesamtkeimzahlen hinsichtlich der Tierhaltung durch Kombination von

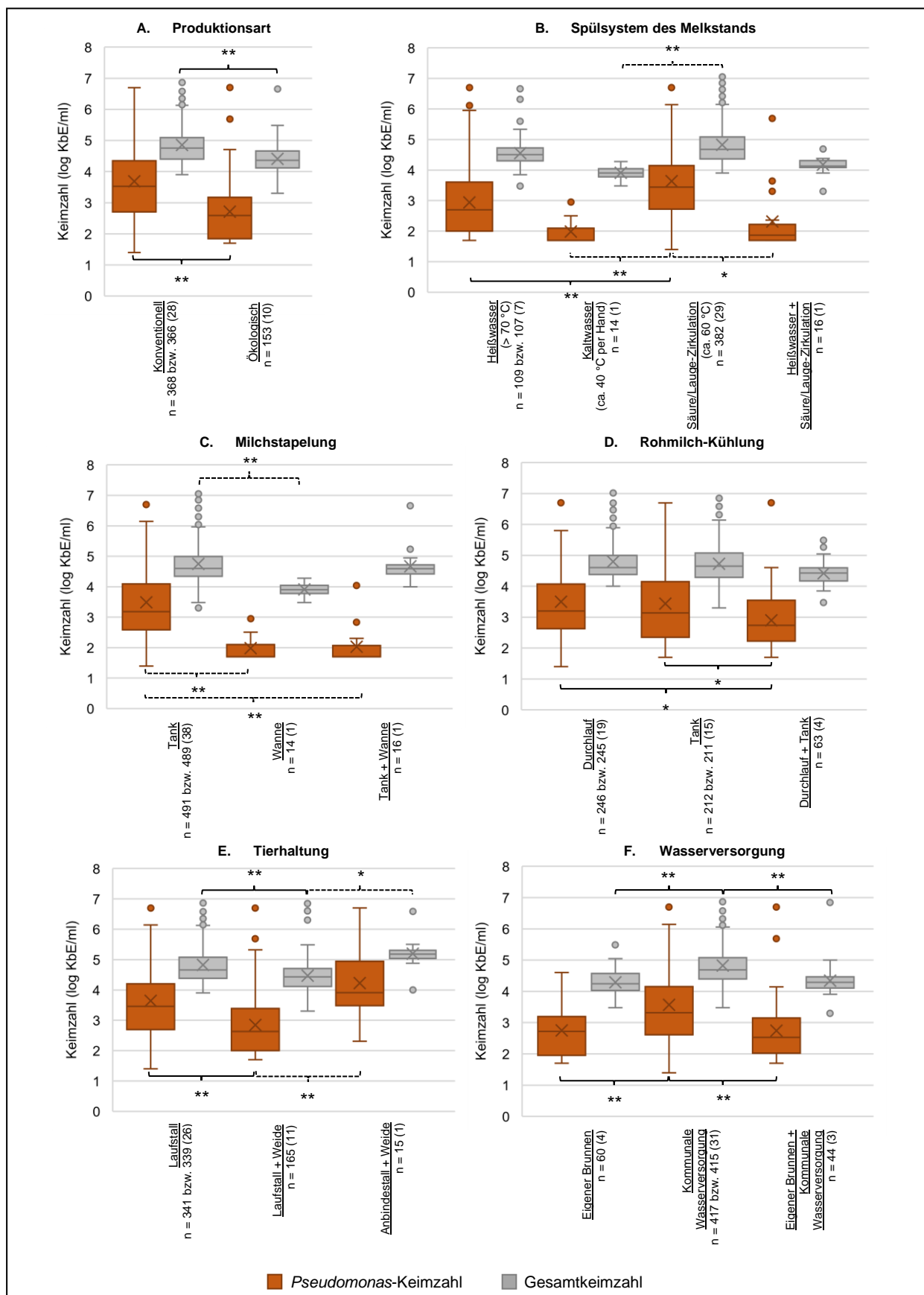


Abbildung 4: Pseudomonas- und Gesamtkeimzahlen (log KbE/ml) von 521 bzw. 519 Rohmilchproben der 38 Erzeugerhöfen in Abhängigkeit der Produktionsart (A), des Spülsystems des Melkstands (B), der Milchstapelung (C), der Rohmilch-Kühlung (D), der Tierhaltung (E) und der Wasserversorgung (F) mit signifikanten Unterschieden; \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$  (Dunn's Test mit Bonferroni Korrektur). Je Parameter folgt hinter der Anzahl der untersuchten Proben (n) die Hofanzahl in Klammer. Signifikante Unterschiede mit gestrichelter Klammer sind zu vernachlässigen.

Anbindestall und Weide aufgrund eines einzigen Erzeugers, der diese Art der Tierhaltung betreibt, zu vernachlässigen. Mit über einem Drittel (33,3%) der untersuchten Rohmilchproben lagen die *Pseudomonas*-Keimzahlen bei Höfen mit kombinierter Tierhaltung aus Anbindestall und Weide über dem Schwellenwert von 4,2 log KbE/ml.

Zu den verschiedenen Arten der Wasserversorgung ergaben die Analysen signifikant höhere *Pseudomonas*- und Gesamtkeimzahlen bei Höfen mit einer kommunalen Wasserversorgung im Vergleich zu Höfen mit einem eigenen Brunnen und Höfen mit einer kombinierten Brunnen- und kommunalen Wasserversorgung (Abbildung 4, F). Insgesamt lagen 23,7 % aller Rohmilchproben der Höfe mit kommunaler Wasserversorgung über dem *Pseudomonas*-Schwellenwert von 4,2 log KbE/ml.

In Abhängigkeit zur Jahreszeit und der Parameter „Abholungsintervall“, „Melksystem“ und „Euterhygiene“ ergaben die Analysen keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der *Pseudomonas*- und Gesamtkeimzahlen (Abbildung 5, A-D). In Bezug zur Jahreszeit lagen 23,8 % aller in den Wintermonaten gezogenen Rohmilchproben über dem *Pseudomonas*-Schwellenwert von 4,2 log KbE/ml, gefolgt von den Frühlings-Proben mit 22,7 %, Herbst- (18,6 %) und Sommer-Proben (16,8 %). Bei 23,1 % und 20,0 % aller Rohmilchproben bei Höfen mit täglicher und zweitägiger Milchabholung wurden *Pseudomonas*-Keimzahlen über 4,2 log KbE/ml ermittelt. Beziehend auf die verschiedenen Arten an Melksystemen wurden bei Betrieben mit Melkroboter bei 26,0 % aller Rohmilchproben *Pseudomonas*-Keimzahlen über 4,2 log KbE/ml gemessen, gefolgt von Höfen mit manuellem Melkstand (19,1 %) und mit Rohrmelkanlage (11,9 %). Bei Höfen, welche die Euter mittels Bürste des Melkroboters reinigen ließen, lagen 26,0 % aller Rohmilchproben über einem *Pseudomonas*-Gehalt von 4,2 log KbE/ml. Bei Höfen mit trockener Euterhygiene lagen 23,7 % über dem Schwellenwert, gefolgt von Höfen mit Nutzung von Einweg- (17,4 %) oder waschbaren Tücher (7,1 %).

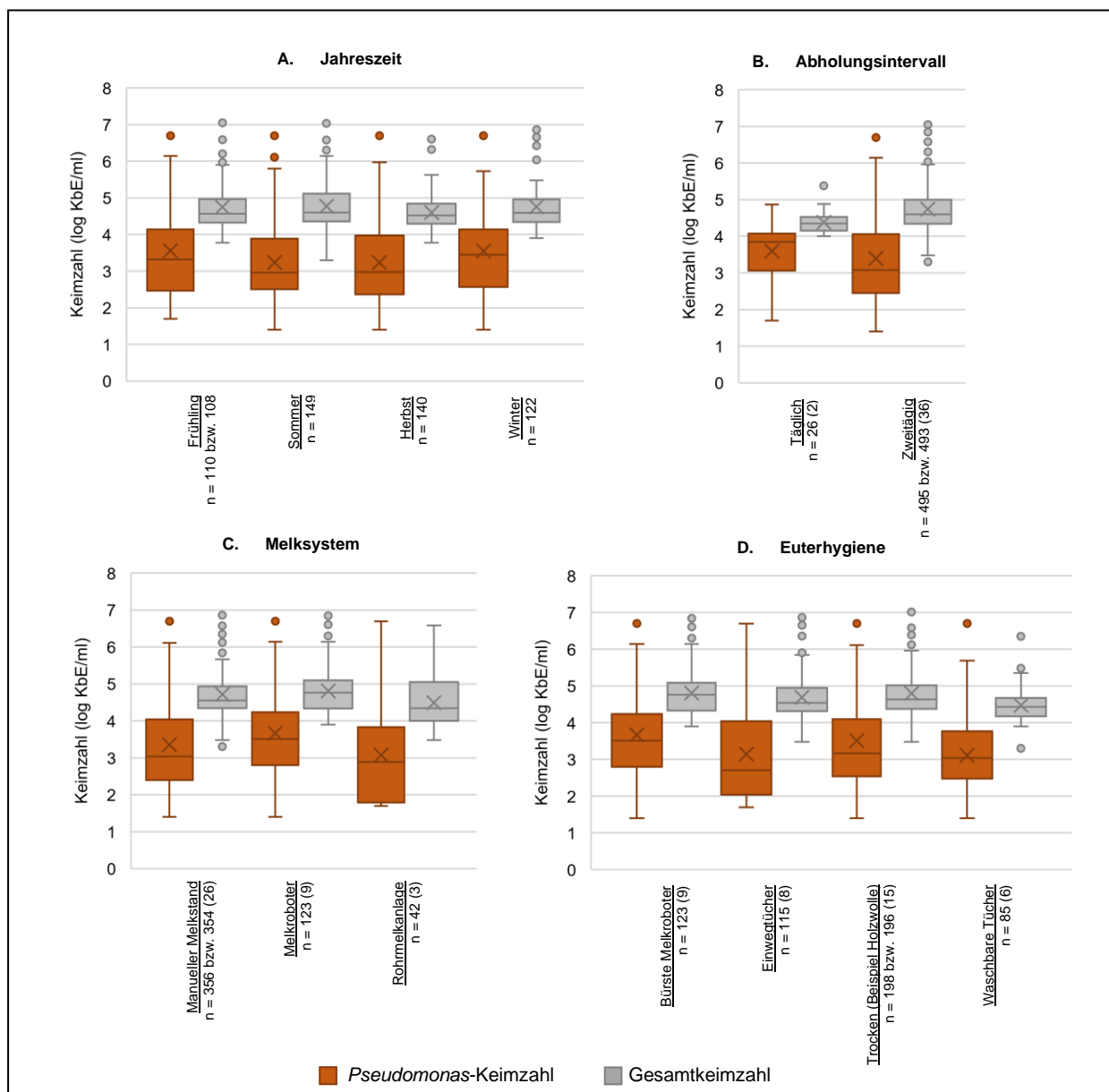


Abbildung 5: Pseudomonas- und Gesamtkeimzahlen (log KbE/ml) von 521 bzw. 519 Rohmilchproben von 38 Erzeugerhöfen in Abhängigkeit zur Jahreszeit (A), des Abholungsintervalls (B), des Melksystems (C) und der Euterhygiene (D) ohne signifikante Unterschiede. Je Parameter folgt hinter der Anzahl der untersuchten Proben (n) die Hofanzahl in Klammer.

## 1.2 Identifikation der Eintragsrouten von *Pseudomonas* spp. in Rohmilch

### 1.2.1 Auswahl der Erzeugerhöfe

Ein Überblick zu durchschnittlichen *Pseudomonas*-Keimzahlen in Rohmilch, Produktionsart und Melksystem der beprobten 8 Erzeugerhöfe ist in Abbildung 6 dargestellt.

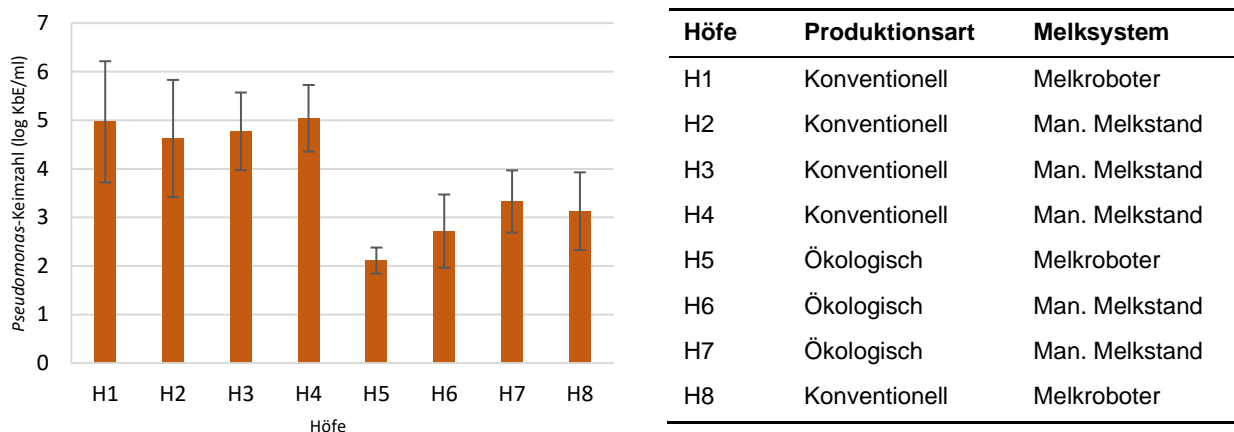


Abbildung 6: Durchschnittliche *Pseudomonas*-Keimzahlen der analysierten Rohmilch, Produktionsart und Melksystem der 8 beprobten Höfe (H1-H8) zur Identifikation der Eintragsrouten von *Pseudomonas* spp. auf den Höfen in die Rohmilch.

Aufgrund der durchschnittlichen *Pseudomonas*-Keimzahlen in Rohmilch zwischen 4,26 und 5,04 log KbE/ml zählen die Höfe H1 bis H4 zu den *Pseudomonas*-auffälligen Höfen. Bei den Höfen H5 bis H8 wurden durchschnittliche *Pseudomonas*-Keimzahlen zwischen 2,11 und 3,33 log KbE/ml in Rohmilch erfasst. Insgesamt waren 5 von 8 (62,5 %) der beprobten Erzeugerhöfe konventionelle Betriebe. Über ein Drittel (37,5 %) der beprobten Höfe produzierten ökologisch. Zwei unterschiedliche Melksysteme waren im Rahmen der Hofbegehungen vertreten: der manuelle (Man.) Melkstand (62,5 %) und der Melkroboter (37,5 %). Hof 8 bestand aus zwei Betriebsstätten, welche beide im Rahmen der Begehungen berücksichtigt wurden (A und B).

### 1.2.2 Analyse der *Pseudomonas*-Keimzahlen potentieller Eintragswege

Die Ergebnisse zur Bestimmung der *Pseudomonas*-Keimzahl (log KbE/cm<sup>2</sup> bzw. ml) unterschiedlicher Probenahmestellen im Rahmen der 8 Hofbegehungen sind in Abbildung 7 als Heat Map dargestellt. Die Kategorisierung erschließt sich aus der folgenden Farbgebung: Grün = *Pseudomonas*-Keimzahlen unter 2 log KbE/cm<sup>2</sup> bzw. ml, gelb = *Pseudomonas*-Keimzahlen zwischen 2 und 4 log KbE/cm<sup>2</sup> bzw. ml, rot = *Pseudomonas*-Keimzahlen über 4 log KbE/cm<sup>2</sup> bzw. ml. Bei *Pseudomonas*-auffälligen Höfen (H1 bis H4) waren in Rohmilch *Pseudomonas*-Keimzahlen zwischen 2,60 und 4,45 log KbE/ml nachweisbar, wohingegen bei *Pseudomonas*-unauffälligen Höfen (H5 bis H8B) Keimgehalte zwischen 2,33 und 5,75 log KbE/ml gemessen wurden. Im Bereich „Rohmilchtank“ lagen bei *Pseudomonas*-unauffälligen Höfen 5,5-

mal häufiger *Pseudomonas*-Keimzahlen über 4 log KbE/cm<sup>2</sup> im Vergleich zu *Pseudomonas*-auffälligen Höfen. Dabei lagen der Mittelwert für diesen Bereich bei *Pseudomonas*-unauffälligen Höfen mit 3,77 log KbE/cm<sup>2</sup> über jenem der *Pseudomonas*-auffälligen Höfen mit 1,23 log KbE/cm<sup>2</sup>. Insbesondere am Zapfhahn (H5, H7), an der Dichtung des Zapfhahns (H5, H7), an der Öffnung des Entlüfters am Rohmilchtank (H6) sowie am Entlüftungsdeckel (H6) waren *Pseudomonas*-Werte über 6 log KbE/cm<sup>2</sup> nachzuweisen. Der Bereich „Melkanlage“ war bei den *Pseudomonas*-unauffälligen Höfen vereinzelt mit Keimzahlen über 2 log KbE/cm<sup>2</sup> höher belastet als bei den *Pseudomonas*-auffälligen Höfen. So wurden bspw. am Milchabscheider und an dessen Deckel *Pseudomonas*-Keimzahlen zwischen 2,75 und 3,73 log KbE/cm<sup>2</sup> ermittelt. Jedoch wurden bei allen Höfen *Pseudomonas*-Keimzahlen, mit Ausnahme von Hof H7, über 6 log KbE/ml im Milchfilter nachgewiesen. Mit 7,93 log KbE/ml wurde beim Erzeugerhof H3 der höchste *Pseudomonas*-Gehalt im Milchfilter gemessen. Im Bereich „Melkzeug“ wurden bei Hof H3 und H4 an der Halterung der Zitzenbecher *Pseudomonas*-Keimzahlen über 4 log KbE/cm<sup>2</sup> ermittelt, wohingegen bei Hof H6 ein *Pseudomonas*-Gehalt von 5,65 log KbE/cm<sup>2</sup> an der Dichtung des Sammelstücks des Melkzeugs nachgewiesen wurde.

Zudem waren die Utensilien zur Zitzenreinigung bei *Pseudomonas*-unauffälligen Höfen mit *Pseudomonas*-Werten von 5,26 log KbE/cm<sup>2</sup> (H8A) und 5,28 log KbE/ml (H6) höher belastet. Der Eintrag von *Pseudomonas* spp. in die Rohmilch über das Wasser (Kalt-/Warmwasser der Tank-/Melksystemreinigung) konnte anhand der ermittelten *Pseudomonas*-Werte von maximal 1 log KbE/ml (H7, Kaltwasser der Melksystemreinigung) im Rahmen der 8 Hofbegehungen ausgeschlossen werden. Allerdings wurden im Wasser der Nachspülung des Melksystems bei den Höfen H2, H4 und H7 *Pseudomonas*-Keimzahlen zwischen 2,43 und 4,46 log KbE/ml ermittelt.



Bereich	Probenahmestelle	<i>Pseudomonas</i> -auffällige Höfe				<i>Pseudomonas</i> -unauffällige Höfe				
		H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8A	H8B
Rohmilch <sup>a</sup>	-	2,83	2,87	4,45	2,60	2,33	2,80	5,75	3,36	-
Rohmilch- tank <sup>b</sup>	Zapfhahn	0,00	0,00	0,00	2,68	6,06	3,62	7,96	3,17	0,00
	Deckel Zapfhahn	0,00	-	-	-	4,30	-	-	-	-
	Dichtung Zapfhahn	-	0,00	2,38	2,83	6,43	3,62	7,26	1,92	4,26
	Tankdeckel	0,00	0,00	0,00	4,76	-	3,80	2,79	0,00	-
	Dichtung Tankdeckel	0,00	0,00	2,89	3,62	-	4,90	5,01	0,00	-
	Öffnung Entlüftung	-	-	-	-	-	7,09	1,83	0,00	0,00
	Entlüftungsdeckel	0,00	0,00	-	4,27	1,48	7,20	5,81	-	-
Melk- anlage <sup>b</sup>	Rohr Milchzufuhr	0,00	-	0,00	1,18	0,00	0,00	1,57	-	-
	Halterung Rohr Milchzufuhr	0,00	-	0,88	1,18	2,23	0,00	1,48	-	-
	Milchabscheider	-	-	0,00	0,00	1,00	0,00	2,75	-	3,73
	Deckel Milchabscheider	0,00	-	4,69	2,44	3,04	-	-	-	-
	Milchfilter <sup>a</sup>	4,58	4,89	7,93	4,01	5,00	4,11	3,79	5,26	5,89
	Halterung Milchfilter	0,00	0,00	0,00	1,88	2,59	0,00	0,00	4,11	-
Melkzeug <sup>b</sup>	Sammelstück Melkzeug	0,00	-	0,00	0,88	1,48	0,00	0,00	-	-
	Dichtung Sammelstück Melkzeug	3,21	-	-	-	0,00	5,65	1,72	-	-
	Zitzenbecher	0,00	0,00	0,00	0,00	2,11	0,00	0,00	0,00	0,00
	Halterung Zitzenbecher	2,57	1,18	5,11	4,64	2,30	0,00	3,63	1,72	1,48
	Reinigungsutensilien Zitze <sup>a/b</sup>	-	-	0,00 <sup>a</sup>	-	-	5,28 <sup>a</sup>	2,00 <sup>a</sup>	5,26 <sup>b</sup>	0,00 <sup>b</sup>
Wasser <sup>a</sup>	Kaltwasser Tankreinigung	0,00	0,00	-	0,00	0,00	0,00	-	-	0,00
	Warmwasser Tankreinigung	0,00	0,00	-	0,00	0,70	0,00	-	-	0,00
	Kaltwasser Melksystemreinigung	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	-	0,00
	Warmwasser Melksystemreinigung	0,00	0,00	0,00	0,70	0,00	0,00	0,00	-	-
	Wasser Nachspülung Melksystem	-	4,46	-	2,57	0,00	0,00	2,43	-	-

Abbildung 7: Darstellung der Ergebnisse der Hofbegehungen der *Pseudomonas*-Keimzahlen (log KbE/cm<sup>2</sup> bzw. ml) je Hof und je Probenahmestelle als Heat Map. Die Keimzahlen wurden farblich in Kategorien eingeteilt: Grün: < 2; gelb: 2 – 4; rot: > 4 log KbE/cm<sup>2</sup> bzw. ml. Nicht vorhandene oder durch die Bauart des Melksystems bedingt nicht zugängliche Probenahmestellen wurden mit „-“ gekennzeichnet. Die Einheit der Keimzahlen der mit „<sup>a</sup>“ gekennzeichneten Bereiche ist log KbE/ml und bei „<sup>b</sup>“ gekennzeichnete Bereiche log KbE/cm<sup>2</sup>.

### 1.2.3 Analyse der Gesamtkeimzahlen potentieller Eintragswege

Die Gesamtkeimzahlen (log KbE/cm<sup>2</sup> bzw. ml) der beprobten Stellen von 8 Erzeugerhöfen im Bereich des Rohmilchtanks, der Melkanlage, des Melkzeugs und der untersuchten Wasserproben sind in Abbildung 8 als Heatmap dargestellt. Die farbliche Kategorisierung erschließt sich folgendermaßen: Grün = Gesamtkeimzahlen unter 2 log KbE/cm<sup>2</sup> bzw. ml, gelb = Gesamtkeimzahlen zwischen 2 und 5 log KbE/cm<sup>2</sup> bzw. ml, rot = Gesamtkeimzahlen über 5 log KbE/cm<sup>2</sup> bzw. ml. Gemäß RohmilchGütV (2021) sollte ein Gesamtkeimgehalt in Rohmilch nicht höher als 5 log KbE/ml nachgewiesen werden, weshalb dieser Wert für die rote Kategorisierung der Daten herangezogen wurde.

Die Gesamtkeimzahlen in Rohmilch der *Pseudomonas*-auffälligen Höfe (H1 bis H4) lagen zwischen 4,31 und 5,64 log KbE/ml, wohingegen bei *Pseudomonas*-unauffälligen Höfen (H5 bis H8A) Gesamtkeimgehalte zwischen 3,46 und 5,33 log KbE/ml in Rohmilch ermittelt wurden. Im Bereich „Rohmilchtank“ lagen bei *Pseudomonas*-unauffälligen Höfen Keimzahlen 3-mal häufiger über 5 log KbE/cm<sup>2</sup>. So wurden unter anderem Gesamtkeimzahlen von 7,58 log KbE/cm<sup>2</sup> (H5) und 8,04 log KbE/cm<sup>2</sup> (H7) am Zapfhahn und Keimgehalte zwischen 6,30 und 7,99 log KbE/cm<sup>2</sup>

(H5, H6, H7) an der Dichtung des Zapfhahns ermittelt. Am Tankdeckel und an dessen Dichtung wurde Gesamtkeimzahlen über 5,00 bis 7,40 log KbE/cm<sup>2</sup> (H6, H7) detektiert. Auch bei *Pseudomonas*-auffälligen Höfen wurden Gesamtkeimzahlen von 5,03 log KbE/cm<sup>2</sup> (H4) und 5,83 log KbE/cm<sup>2</sup> (H3) an der Tankdeckel-Dichtung nachgewiesen. Im Bereich „Melkanlage“ wurden an der Halterung des Milchfilters (H2, H4), am Deckel des Milchabscheiders (H3, H4) und am Milchabscheider selbst (H8B) Gesamtkeimgehalte über 5 log KbE/cm<sup>2</sup> ermittelt. Bei allen Höfen wiesen die Gesamtkeimzahlen zwischen 5,08 und 8,38 log KbE/ml der Milchfilter aller Höfe auf eine starke Kontamination hin.

Bereich	Probenahmestelle	<i>Pseudomonas</i> -auffällige Höfe				<i>Pseudomonas</i> -unauffällige Höfe				
		H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8A	H8B
Rohmilch <sup>a</sup>	-	4,37	4,31	5,64	5,10	3,85	3,46	5,33	5,11	-
Rohmilch-tank <sup>b</sup>	Zapfhahn	1,88	3,62	2,94	4,32	7,58	4,34	8,04	3,75	3,29
	Deckel Zapfhahn	3,90	-	-	-	8,32	-	-	-	-
	Dichtung Zapfhahn	-	3,06	3,65	4,41	7,99	6,30	7,75	2,77	3,98
	Tankdeckel	3,82	1,83	0,00	7,26	-	7,26	5,18	1,92	-
	Dichtung Tankdeckel	0,00	0,00	5,83	5,03	-	7,40	6,05	2,99	-
	Öffnung Entlüftung	-	-	-	-	-	7,97	4,20	5,94	0,00
	Entlüftungsdeckel	5,39	2,41	-	6,96	7,05	7,86	5,41	-	-
Melk-anlage <sup>b</sup>	Rohr Milchzufuhr	1,72	-	1,57	2,88	3,06	3,67	3,29	-	-
	Halterung für Rohr Milchzufuhr	2,29	-	3,80	4,27	4,17	2,11	4,50	-	-
	Milchabscheider	0,00	-	3,42	2,64	3,66	0,00	3,97	-	6,42
	Deckel Milchabscheider	-	-	9,05	5,45	2,78	-	-	-	-
	Milchfilter nach Melken <sup>a</sup>	6,37	7,02	8,38	6,83	6,71	5,08	6,64	6,08	7,64
	Halterung Milchfilter	3,67	6,55	1,72	5,24	4,57	2,86	2,82	4,02	-
Melkzeug <sup>b</sup>	Sammelstück Melkzeug	3,60	-	2,18	3,17	5,53	4,29	6,90	-	-
	Dichtung Sammelstück Melkzeug	6,61	-	-	-	4,99	8,43	5,96	-	-
	Zitzenbecher	3,61	3,11	1,57	3,61	4,81	0,00	3,64	2,02	3,76
	Halterung Zitzenbecher	7,53	3,67	8,42	8,93	6,50	5,32	7,38	3,19	3,57
	Reinigungsutensilien Zitze <sup>ab</sup>	-	-	4,13 <sup>a</sup>	-	-	6,35 <sup>a</sup>	4,62 <sup>a</sup>	5,94 <sup>b</sup>	0,00 <sup>b</sup>
Wasser <sup>a</sup>	Kaltwasser Tankreinigung	1,30	0,00	-	1,00	0,00	1,00	-	-	1,70
	Warmwasser Tankreinigung	0,70	1,00	-	1,30	3,77	0,00	-	-	0,70
	Kaltwasser Melksystemreinigung	1,65	0,70	1,54	1,78	0,00	0,00	2,69	-	2,96
	Warmwasser Melksystemreinigung	1,18	3,05	0,00	2,67	0,00	0,00	3,13	-	-
	Wasser Nachspülung Melksystem	-	7,92	-	4,19	3,57	2,87	4,47	-	-

Abbildung 8: Darstellung der Ergebnisse der Hofbegehungen anhand der Gesamtkeimzahlen (log KbE/cm<sup>2</sup> bzw. ml) je Hof und Probenahmestelle als Heat Map. Die Keimzahlen wurden farblich in Kategorien eingeteilt: Grün: < 2; gelb: 2 – 5; rot: > 5 log KbE/cm<sup>2</sup> bzw. ml. Nicht vorhandene oder durch die Bauart des Melksystems bedingt nicht zugängliche Probenahmestellen wurden mit „-“ gekennzeichnet. Die Einheit der Keimzahlen der mit „<sup>a</sup>“ gekennzeichneten Bereiche ist log KbE/ml und bei „<sup>b</sup>“ gekennzeichnete Bereiche log KbE/cm<sup>2</sup>.

Im Bereich „Melkzeug“ wurde sowohl bei *Pseudomonas*-auffälligen als auch bei *Pseudomonas*-unauffälligen Höfen Gesamtkeimgehalte von über 6 log KbE/cm<sup>2</sup> an der Dichtung des Sammelstücks und an der Halterung der Zitzenbecher (H1, H3, H4, H5, H6, H7) ermittelt. Auch Utensilien zur Reinigung der Zitzen wiesen bei H6 und H8A Gesamtkeimzahlen von über 5 log KbE/ml bzw. cm<sup>2</sup> auf. Die Beprobung des Wassers zur Tank- oder Melksystemreinigung ergab bei *Pseudomonas*-auffälligen Höfen maximale Gesamtkeimgehalte von 3,05 log KbE/ml (H2, Warmwasser Melksystemreinigung) und bei *Pseudomonas*-unauffälligen Höfen maximale Gesamtkeimzahlen von 3,77 log KbE/ml (H7, Warmwasser Tankreinigung). Im Wasser zur Nachspülung des Melksystems wurde bei den Höfen H4, H5, H6 und H7 Gesamtkeimgehalte

zwischen 2,87 und 4,47 log KbE/ml ermittelt, wohingegen bei H2 eine Gesamtkeimzahl von 7,92 log KbE/ml nachgewiesen wurde.

#### 1.2.4 Analyse der Luftkeimgehalte als potentieller Eintragsweg

Die Auswertungen der Luftkeimgehalte der 8 Höfe sind in Abbildung 9 dargestellt. Sowohl die *Pseudomonas*- als auch die Gesamt-Luftkeimgehalte im Melkbereich waren hofspezifisch. Die höchsten Gesamtkeimgehalte in der Luft wurden bei Hof 5 und Hof 8A mit 2,22 und 2,52 log KbE/10 l gemessen. Hof 6 wies mit 1,56 log KbE/10 l die geringsten Gesamtkeimgehalte auf. *Pseudomonas*-Keimgehalte in der Luft wurde lediglich bei Hof 8A mit 0,17 log KbE/10 l im Bereich des Melkstands nachgewiesen.

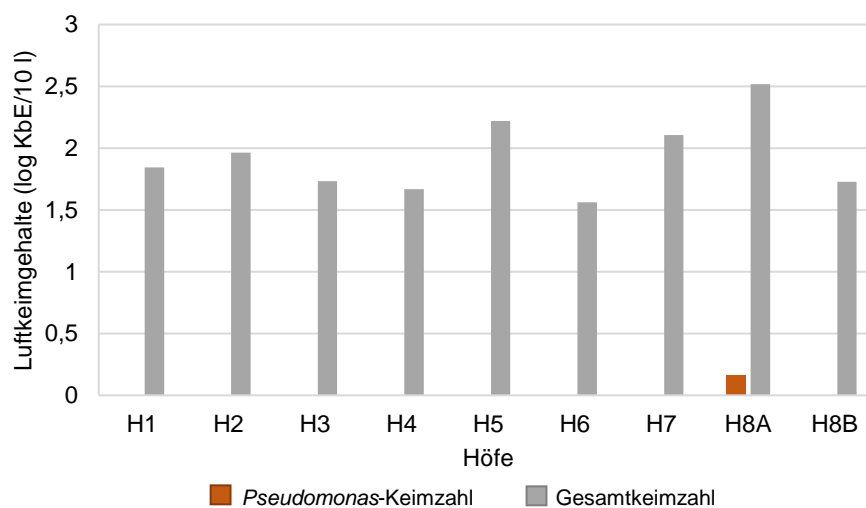


Abbildung 9: In der Nähe des Melkstands gemessene *Pseudomonas*- und Gesamt-Luftkeimgehalte (log KbE/10 l) von 8 Erzeugerhöfen (inklusive der Betriebsstätten A und B von Hof 8) im Rahmen der Identifikation potentieller Eintragsrouten von *Pseudomonas* spp. in Rohmilch.

Aufgrund der als unauffällig einzustufenden *Pseudomonas*-Luftkeimgehalte im Bereich des Melkens ist ein Eintrag von *Pseudomonas* spp. über die Luft in die Rohmilch unwahrscheinlich. In Bezug auf den Gesamtkeimgehalt in der Luft unterschieden sich *Pseudomonas*-auffällige Erzeugerhöfe (H1 bis H4) nicht von *Pseudomonas*-unauffälligen Milcherzeugern (H5 bis H8A).

## 2 Charakterisierung von *Pseudomonas* spp. hinsichtlich der Biofilmbildung und der Peptidaseaktivität

### 2.1 Analysen zur Biofilmbildung von *Pseudomonas* spp.

#### 2.1.1 Quantifizierung der Biofilmmasse in Mikrotiterplatten

Die Ergebnisse zur Quantifizierung der Biofilmmasse im Mikrotiterplatten-Format mittels Kristallviolett-Assay sind in Abbildung 10 dargestellt. Nach 6 Tagen bei 6 °C war die Biofilmbildung der untersuchten *Pseudomonas* (*P.*)-Isolate in 10, 50 und 100 %igem Milchmedium (MM) stamm- und speziesspezifisch. So wiesen beispielsweise alle *P. lactis*-Isolate (L1-91, L1-92, L1-93) in den drei Milchmedien unter den gegebenen Wachstumsbedingungen ein schwaches bis moderat ausgeprägtes Biofilmbildungsvermögen auf. Unterschiede innerhalb der Spezies sind unter anderem bei *P. protegens* L1-100, L1-101, L1-102 zu erkennen. Dabei lassen insbesondere die Extinktionswerte von *P. protegens* L1-102 mit  $3,3146 \pm 0,5873$  (10 % MM) und  $2,7450 \pm 0,8687$  (50 % MM) auf ein starkes Biofilmbildungsvermögen schließen. In 10 %igem Milchmedium wurde am meisten Biofilmmasse bei *P. protegens* L1-102 mit einer Extinktion von  $3,3146 \pm 0,5873$  gemessen. Niedrigere Extinktionswerte zwischen  $0,4710 \pm 0,3280$  und  $0,8081 \pm 0,2748$  lassen bei *P. fluorescens* L1-83, *P. lactis* L1-91 sowie *P. protegens* L1-100 anhand der angefärbten Biofilmmasse auf ein schwaches Biofilmbildungsvermögen schließen. Die Biofilmbildung in 50 %igem Milchmedium ergab bei *P. fluorescens* L1-82, *P. fragi* L1-84, L1-85 und L1-86, *P. gessardii* L1-88, L1-89, L1-90, *P. lactis* L1-91, *P. lundensis* L1-94 und L1-95, *P. protegens* L1-101 im Mittel höhere Extinktionen als in 10 %igem Milchmedium. Dabei wies *P. protegens* L1-102 das höchste Biofilmbildungsvermögen mit einer Extinktion von  $2,7450 \pm 0,8687$  auf. *P. lactis* L1-91 bildete unter den gewählten Wachstumsbedingungen in 100 %igem Milchmedium mit einem mittleren Extinktionswert von  $0,5516 \pm 0,3333$  am meisten Biofilmmasse.

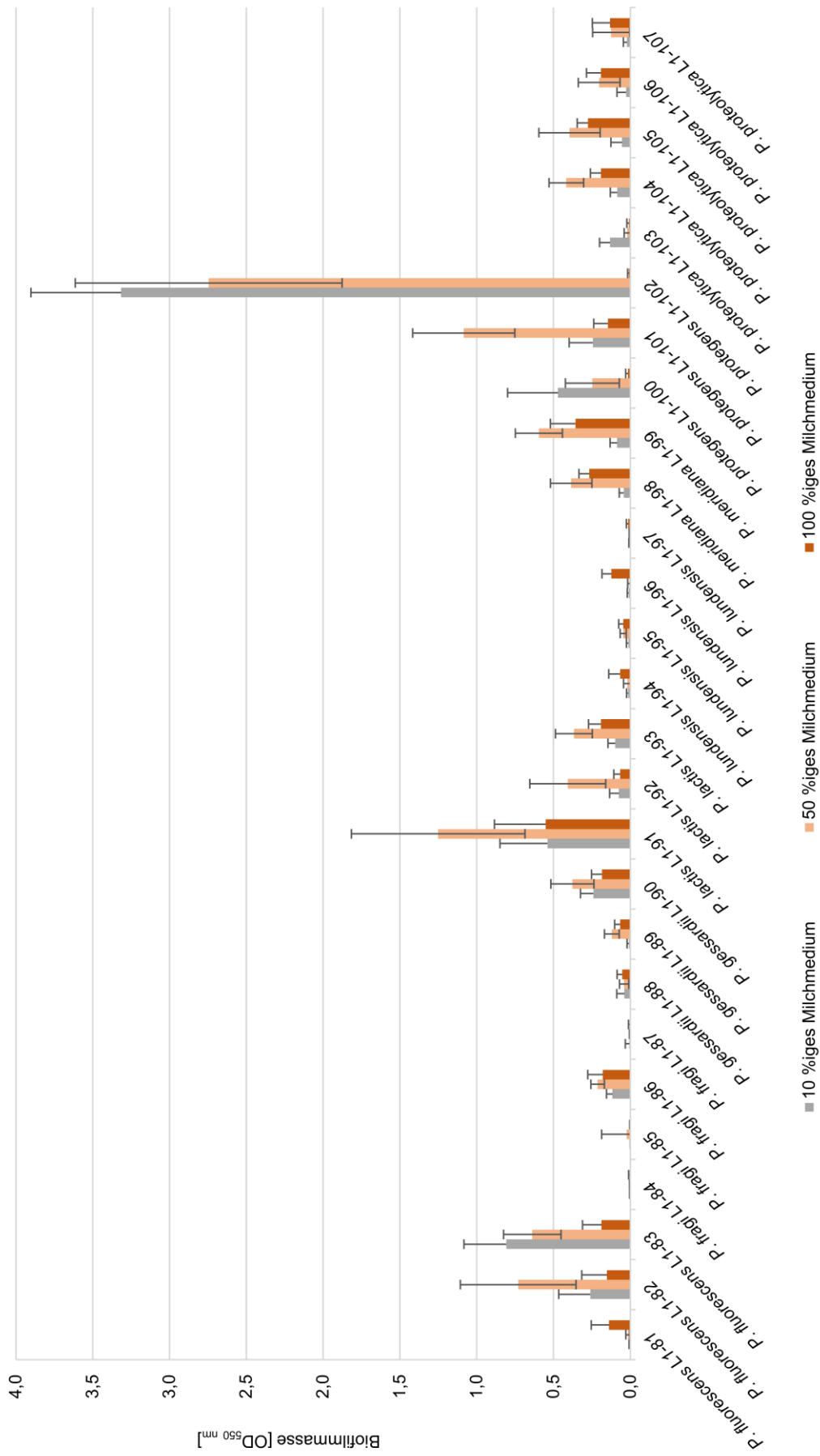


Abbildung 10: Quantifizierung der Biofilmmasse von Pseudomonas-Isolaten in Mikrotiterplatten aus Kunststoff nach 6 Tagen bei 6 °C in 10, 50 und 100 %igem Milchmedium mit einer Inokulationsdosis von  $6 \pm 0,5 \log \text{KbE/ml}$  gemessen durch die Extinktion bei 550 nm der angefärbten Biofilmmasse (abzüglich des Blank-Wertes).

Ein Vergleich der Mittelwerte aller gemessenen Extinktionen in Abbildung 11 verdeutlicht den Unterschied des Biofilmbildungsvermögens in Mikrotiterplatten in Abhängigkeit zur Konzentration des Milchmediums. Im Mittel war das Biofilmbildungsvermögen in 50 %igem Milchmedium mit  $0,3873 \pm 0,6049$  am höchsten, gefolgt vom 10 %igem Milchmedium mit einem mittleren Extinktionswert von  $0,2451 \pm 0,6354$ . Mit einem durchschnittlichem Extinktionswert von  $0,1353 \pm 0,1591$  wurde in 100 %igem Milchmedium das geringste Biofilmbildungsvermögen unter den gegebenen Bedingungen ermittelt. Im Vergleich zum Wachstum in 10 und 100 %igem Milchmedium war die Biofilmbildung im Mittel in 50 %igem Milchmedium auf Kunststoff (Mikrotiterplatte) signifikant höher. Auch die Biofilmbildung in 10 %igem Milchmedium war im Vergleich zum Adhäsionsvermögen in 100 %igem Milchmedium im Mittel signifikant höher.

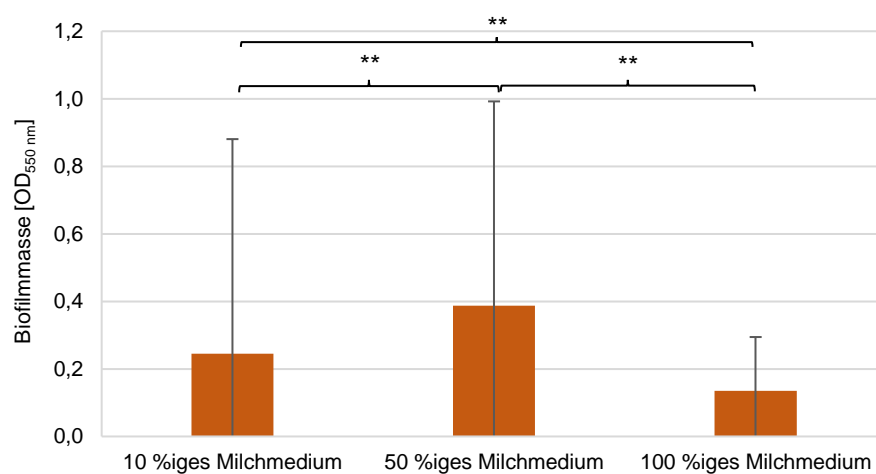


Abbildung 11: Mittelwerte der quantifizierten Biofilmmassen von *Pseudomonas*-Isolaten in Mikrotiterplatten nach 6 Tagen bei 6 °C in 10, 50 und 100 %igem Milchmedium aus Abbildung 10. Signifikante Unterschiede sind mit Sternen markiert: \*,  $p \leq 0,05$ ; \*\*,  $p \leq 0,01$  (Tukey HSD Test).

### 2.1.2 Quantifizierung der Biofilmmasse auf Edelstahl-Plättchen

Die Ergebnisse der quantifizierten Biofilmmasse auf Edelstahl-Plättchen mittels Kristallviolett-Assay sind in Abbildung 12 dargestellt. Nach 6 Tagen bei 6 °C war das Vermögen zur Biofilmbildung der untersuchten *Pseudomonas*-Isolate in 10, 50 und 100 %igem Milchmedium speziesspezifisch. Das höchste Biofilmbildungsvermögen besaß *P. haemolytica* L1-177 in 100 %igem Milchmedium mit einer Extinktion von  $0,2105 \pm 0,0245$ , gefolgt von *P. proteolytica* L1-103 mit einer Extinktion von  $0,1650 \pm 0,0144$ . Die geringste Biofilmmasse wies *P. baltica* (M) in 50 %igem Milchmedium mit einer Extinktion von  $0,0004 \pm 0,0010$  auf. Zudem lassen hohe Standardabweichungen, wie bspw. die Extinktionswerte von *P. lactis* L1-93 in 100 %igem Milchmedium und *P. fluorescens* L1-81 in 10 %igem Milchmedium, auf eine schwache Reproduzierbarkeit des Biofilmbildungsvermögens schließen. Auffällig ist das schwach ausgeprägte Vermögen zur Biofilmbildung bei *P. lundensis* L1-94, *P. saxonica* L1-205, *P. kielensis* (M) und *P. sp.* (M) in allen drei Milchmedien (10, 50, 100 %).

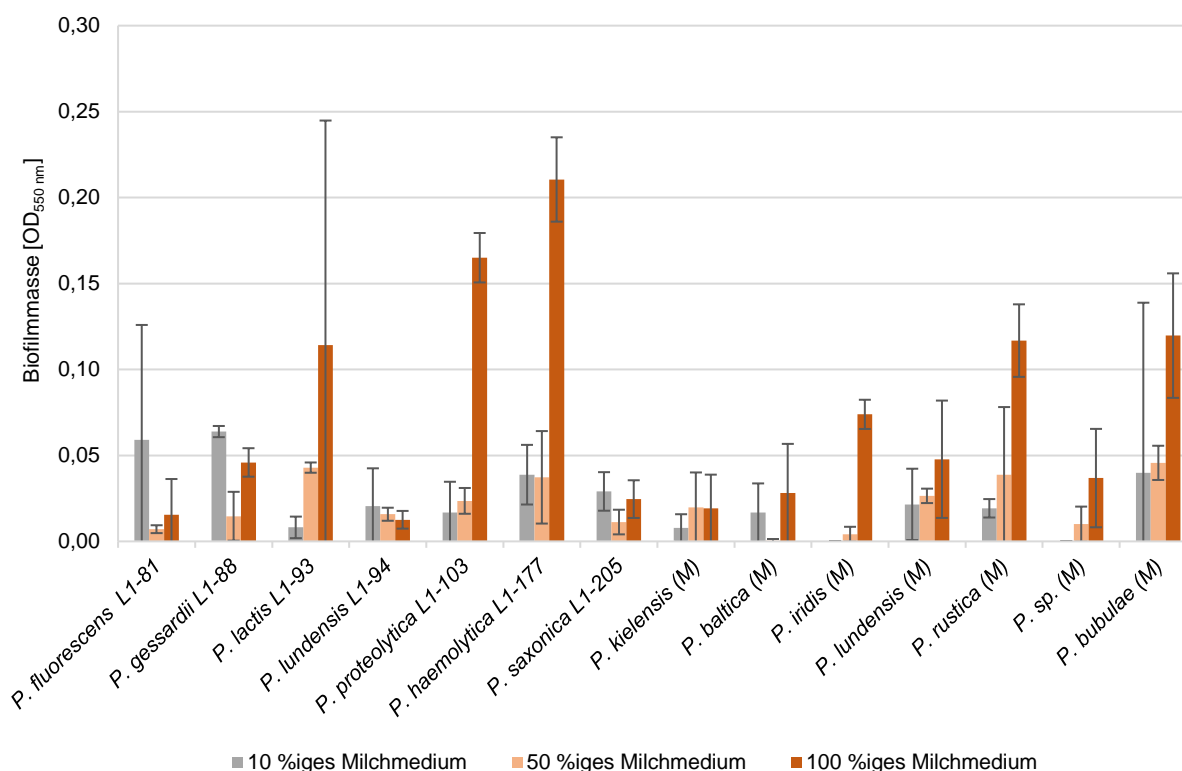


Abbildung 12: Quantifizierung der Biofilmmasse von *Pseudomonas*-Isolaten auf Edelstahl-Plättchen nach 6 Tagen bei 6 °C in 10, 50 und 100 %igem Milchmedium mit einer Inokulationsdosis von  $6 \pm 0,5 \log \text{KbE/ml}$  gemessen an der Extinktion bei 550 nm der angefärbten Biofilmmasse (abzüglich des Blank-Wertes). (M) = Mittels MALDI Biotyper® identifizierte Rohmilch-Isolate.

Ein Vergleich der Mittelwerte aller gemessenen Extinktionen in Abbildung 13 verdeutlicht den Unterschied des Biofilmbildungsvermögens auf Edelstahl-Oberfläche in Abhängigkeit zur Konzentration des Milchmediums. Unter den gegebenen Bedingungen war das

Biofilmbildungsvermögen im Mittel in 100 %igem Milchmedium mit  $0,0763 \pm 0,0758$  am höchsten, gefolgt vom 10 %igem Milchmedium mit einem Mittelwert von  $0,0304 \pm 0,0375$ . Mit einem durchschnittlichem Extinktionswert von  $0,0221 \pm 0,0208$  wurde in 50 %igem Milchmedium die geringste Biofilmmasse gemessen. Die Biofilmbildung in 100 %igem Milchmedium auf Edelstahl-Oberfläche war im Vergleich zum Wachstum in 10 und 50 %igem Milchmedium im Mittel signifikant höher. Es wurde ebenfalls eine signifikant höhere mittlere Biofilmbildung in 10 %igem Milchmedium im Vergleich zum Adhäsionsvermögen in 50 %igem Milchmedium untersucht.

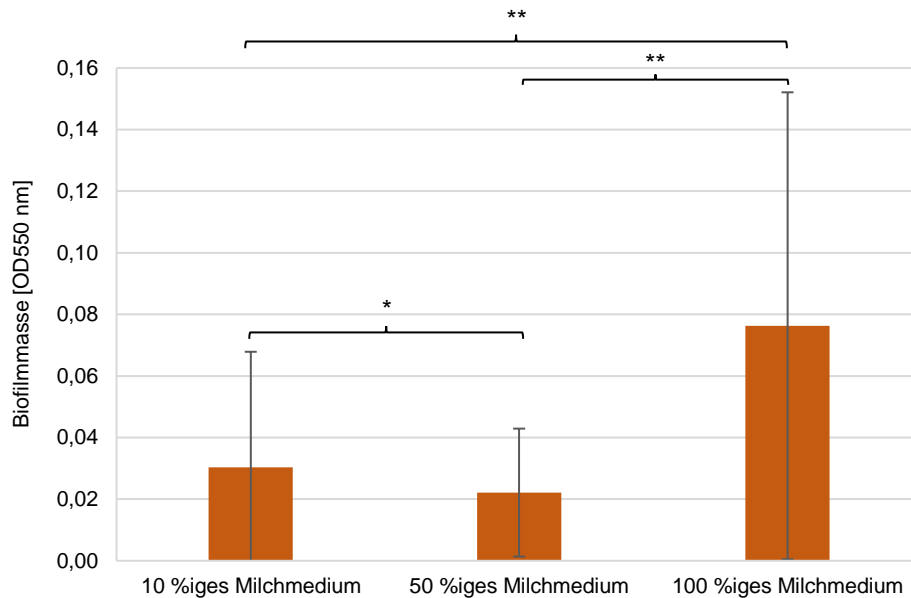


Abbildung 13: Mittelwerte der quantifizierten Biofilmmassen von *Pseudomonas*-Isolaten auf Edelstahl-Plättchen nach 6 Tagen bei 6 °C in 10, 50 und 100 %igem Milchmedium aus Abbildung 12. Signifikante Unterschiede sind mit Sternen markiert: \*,  $p \leq 0,05$ ; \*\*,  $p \leq 0,01$  (Tukey HSD Test).



### 2.1.3 Vergleich der Biofilmmasse in Mikrotiterplatten und auf Edelstahl-Oberfläche

Von fünf *Pseudomonas*-Stämmen (s. Tabelle 4) wurde die Biofilmbildung in Mikrotiterplatten aus Kunststoff und auf Edelstahl-Oberfläche in 10, 50 und 100 %igem Milchmedium für 6 Tage bei 6 °C gegenübergestellt und die Mittelwerte in Abhängigkeit des Milchmediums bestimmt (Abbildung 14).

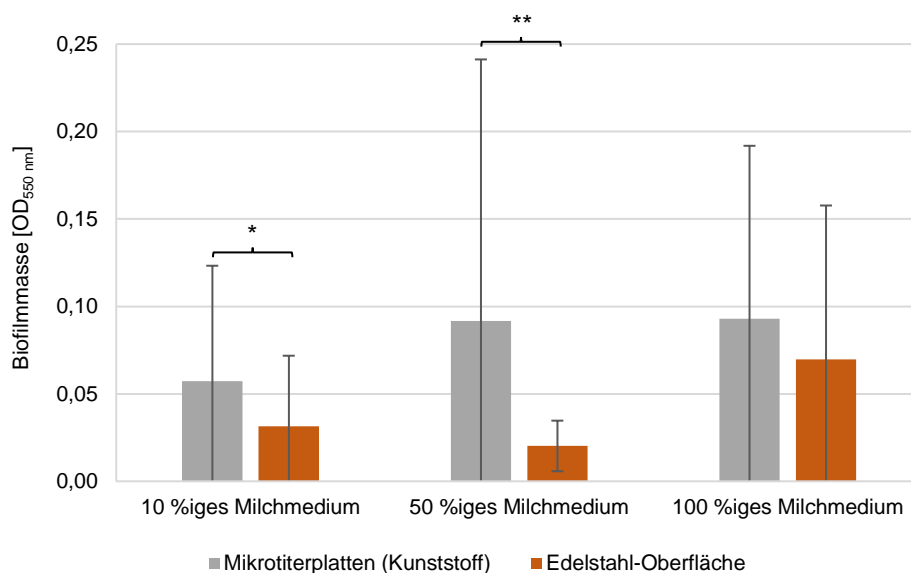


Abbildung 14: Vergleich der quantifizierten Biofilmmasse von fünf *Pseudomonas*-Isolaten in Mikrotiterplatten (Kunststoff) und auf Edelstahl-Oberfläche nach 6 Tagen bei 6 °C in 10, 50 und 100 %igem Milchmedium mit einer Inokulationsdosis von  $6 \pm 0,5 \log \text{KbE/ml}$ . Signifikante Unterschiede sind mit Sternen markiert: \*,  $p \leq 0,05$ ; \*\*,  $p \leq 0,01$  (Tukey HSD Test).

Die Analysen zur Quantifizierung der Biofilmmasse von fünf *Pseudomonas*-Isolate ergab in allen drei Milchmedien im Mittel ein höheres Vermögen zur Biofilmbildung in 96-Well-Mikrotiterplatten aus Kunststoff als auf Edelstahl-Oberfläche. In 10 und 50 %igem Milchmedium wurde in Mikrotiterplatten mit durchschnittlichen Extinktionswerten zwischen  $0,0572 \pm 0,0661$  und  $0,0917 \pm 0,1496$  eine signifikant höhere Biofilmmasse als auf Edelstahl-Oberfläche mit mittleren Extinktionswerten zwischen  $0,0315 \pm 0,0403$  und  $0,0202 \pm 0,0145$  ermittelt. Die Biofilmmasse in Mikrotiterplatten (Kunststoff) war in 100 %igem Milchmedium im Mittel mit  $0,0930 \pm 0,0697$  höher als auf Edelstahl-Oberfläche mit einem durchschnittlichen Extinktionswert von  $0,0697 \pm 0,0880$ , wobei kein signifikanter Effekt nachgewiesen wurde.

### 2.1.4 Keimzahl der Biofilme auf Edelstahl-Oberfläche

Die Ergebnisse der Keimzahlbestimmungen ( $\log \text{KbE}/\text{cm}^2$ ) von Biofilmen auf Edelstahl-Oberfläche mittels Glasperlen-Methode sind in Abbildung 15 dargestellt.

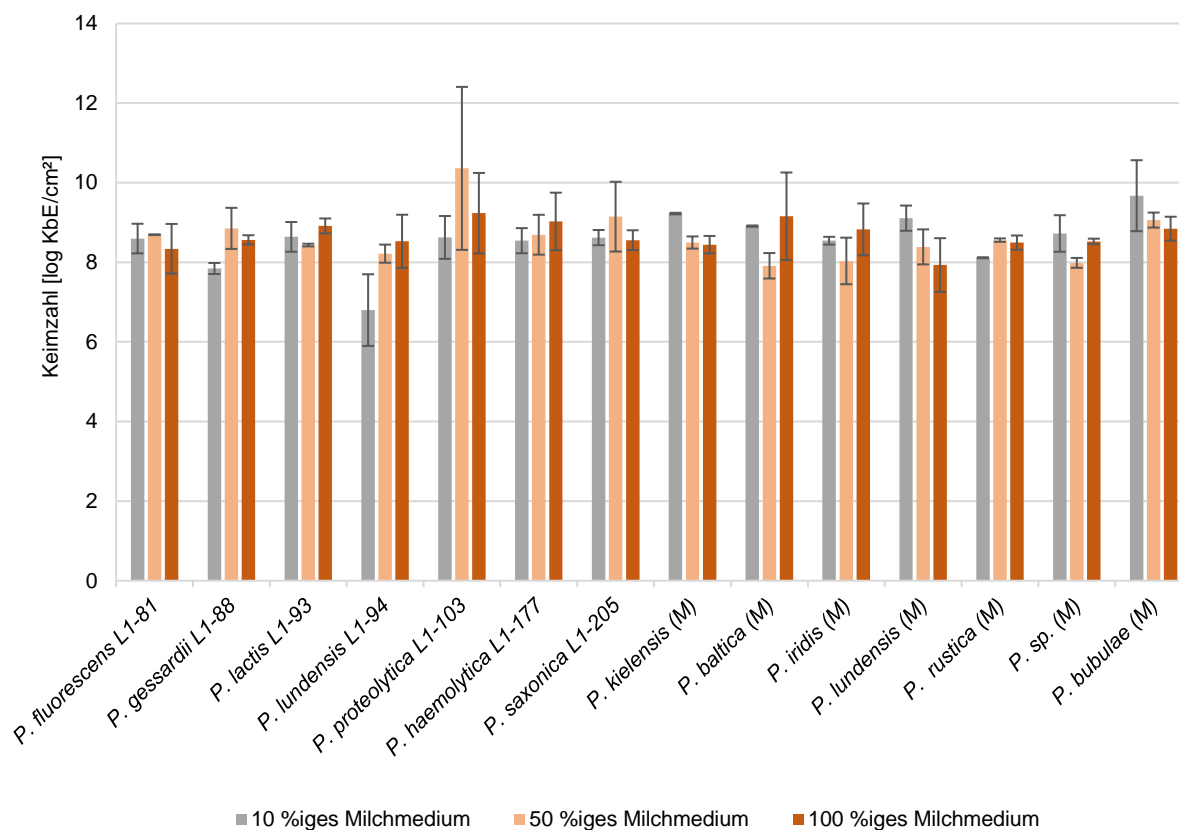


Abbildung 15: Mit Glasperlen-Methode ermittelte Keimzahlen der auf Edelstahl-Oberfläche gewachsenen Biofilme von *Pseudomonas*-Isolaten nach 6 Tagen bei 6 °C in 10, 50 und 100 %igem Milchmedium mit einer Inokulationsdosis von  $6 \pm 0,5 \log \text{KbE}/\text{ml}$ . (M) = Mittels MALDI Biotyper® identifizierte Rohmilch-Isolate.

Die Biofilm-Keimzahlen in 10 %igem Milchmedium lagen zwischen  $6,8 \pm 0,9$  und  $9,7 \pm 0,9 \log \text{KbE}/\text{cm}^2$ , in 50 %igem Milchmedium zwischen  $7,9 \pm 0,3$  und  $10,4 \pm 2,0 \log \text{KbE}/\text{cm}^2$  und in 100 %igem Milchmedium zwischen  $7,9 \pm 0,7$  und  $9,2 \pm 1,0 \log \text{KbE}/\text{cm}^2$ . Die höchste Keimzahl wurde bei *P. proteolytica* L1-103 in 50 %igem Milchmedium mit  $10,4 \pm 2,0 \log \text{KbE}/\text{cm}^2$  gemessen, gefolgt von *P. bubulae* (M) mit  $9,7 \pm 0,9 \log \text{KbE}/\text{cm}^2$  in 10 %igem Milchmedium und von *P. proteolytica* L1-103 in 100 %igem Milchmedium mit  $9,2 \pm 1,0 \log \text{KbE}/\text{cm}^2$ . Mit  $6,8 \pm 0,9 \log \text{KbE}/\text{cm}^2$  wurden bei *P. lundensis* L1-94 in 10 %igem Milchmedium die niedrigsten Keimzahlen gemessen. Im Mittel lagen die Keimzahlen in 10 und 50 %igem Milchmedium bei  $8,6 \pm 0,3$  bzw.  $\pm 0,4 \log \text{KbE}/\text{cm}^2$  und in 100 %igem Milchmedium bei  $8,7 \pm 0,5 \log \text{KbE}/\text{cm}^2$ . Anhand der Ergebnisse wurde deutlich, dass keines der Milchmedien die Biofilmbildung gemessen an den Keimzahlen unter den gegebenen Bedingungen begünstigt bzw. verschlechtert.

### 2.1.5 Vergleich der quantifizierten Biofilmmasse auf Edelstahl- und Gummi-Oberfläche

Die Ergebnisse zur Quantifizierung der Biofilmmasse auf Edelstahl- gegenüber Gummi-Oberfläche in 100 %igem Milchmedium sind in Abbildung 16 dargestellt. Es wurde eine isolatspezifische und oberflächenabhängige Biofilmbildung ermittelt. Am meisten Biofilmmasse wurden bei *P. lactis* L1-91 auf Edelstahl mit einem Extinktionswert von  $0,0725 \pm 0,0696$  und bei *P. protegens* L1-101 auf Gummi-Oberfläche mit  $0,0744 \pm 0,0452$  gemessen. *P. lactis* L1-93 und *P. proteolytica* L1-103 wiesen mit Extinktionswerten von  $0,0057 \pm 0,0075$  und  $0,0204 \pm 0,0166$  Biofilmbildung auf Edelstahl- jedoch nicht auf Gummi-Oberfläche auf.

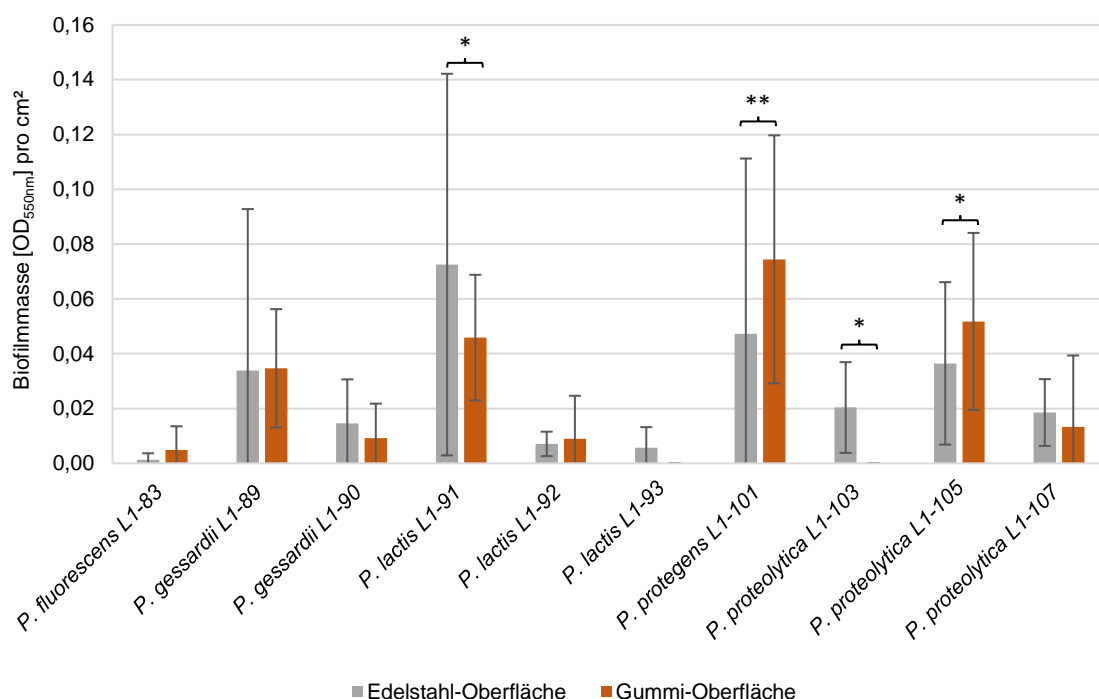


Abbildung 16: Vergleich der quantifizierten Biofilmmasse von 10 Pseudomonas-Isolaten auf Edelstahl- und Gummi-Oberfläche nach 6 Tagen bei 6 °C in 100 %igem Milchmedium mit einer Inokulationsdosis von  $4 \pm 0,5 \log \text{KbE/ml}$ . Signifikante Unterschiede sind mit Sternen markiert: \*,  $p \leq 0,05$ ; \*\*,  $p \leq 0,01$  (Tukey HSD Test).

Bei *P. lactis* L1-91 und *P. proteolytica* L1-103 war das Vermögen zur Biofilmbildung auf Edelstahl signifikant höher als auf Gummi-Oberfläche, wohingegen bei *P. protegens* L1-101 und *P. proteolytica* L1-105 signifikant mehr Biofilmmasse auf Gummi- im Vergleich auf Edelstahl-Oberfläche gebildet wurde.

## 2.2 Rasterelektronenmikroskopie (REM) von Biofilmen

### 2.2.1 Rohmilch-assoziierte Multi-Spezies-Biofilme auf Edelstahl- und Gummi-Oberfläche

#### 2.2.1.1 REM-Analyse von Rohmilch-assoziierten Multi-Spezies-Biofilmen

Die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen der Rohmilch-Biofilme in Abbildung 17 und Abbildung 18 auf Edelstahl- und Gummi-Oberfläche bei 6 und 20 °C zeigen die Anordnung einzelner Zellen in kleineren Komplexen bis hin zu flächendeckenden Gemeinschaften. Dabei wurde temperaturabhängiges Vermögen zur Biofilmbildung der Rohmilch-assoziierten Mikroorganismen auf Edelstahl- und Gummi-Oberfläche festgestellt. So zeigen REM-Aufnahmen in Abbildung 18 (A-F) eine stärker ausgebildete Multispezies-Biofilm-Matrix auf Edelstahl- und Gummi-Oberfläche bei 20 °C im Vergleich zum Wachstum der Rohmilch-Biofilme bei 6 °C. In Abbildung 17 sind vereinzelt Bakterienketten und „Biofilminseln“ (A, B, E, F) zu erkennen, wohingegen die Aufnahmen in Abbildung 18 dicht gewachsene „Biofilmrassen“ auf Edelstahl- und Gummi-Oberfläche zeigen. Casein-Micellen besitzen im Durchschnitt einen Durchmesser von 0,15 µm (Fox und Brodkorb 2008) und waren bei beiden Inkubationstemperaturen im Zellverband des Biofilms eingeschlossen (Abbildung 17, D und H; Abbildung 18, D und H). Es scheint als wären mehr Bakterienzellen bei 20 °C auf Edelstahl- im Vergleich auf Gummi-Oberfläche gewachsenen Biofilme eingeschlossen, wohingegen die Ausbildung der Biofilm-Matrix auf Gummi-Oberfläche stärker ausgeprägt wirkte. Gesamtkeimzahlen aus dem Ergebnis-Abschnitt 2.2.1.2 sowie Aufnahmen in Abbildung 18 (D und H) belegen diese Vermutung. Netzartige, fadenförmige Ausbildungen auf und zwischen den Bakterienzellen können Adhäsine, wie Fimbrien und Pili, darstellen (Abed et al. 2012; Westall et al. 2000) und sind in Abbildung 17 (G und H) sowie in Abbildung 18 (D und H) durch rote Pfeile markiert. Die Bildung von extrazellulären polymeren Substanzen (EPS) kann anhand des schleimartigen Erscheinungsbildes (Chin et al. 2015) in Abbildung 18 (H) vermutet werden. Zudem schien der Zellkomplex in der gleichen Aufnahme (Abbildung 18, H) anhand einer rauen Oberfläche mit einer dünnen Partikel-Schicht im Vergleich zu anderen Zell-Aggregationen (Abbildung 18, D) überzogen gewesen zu sein.

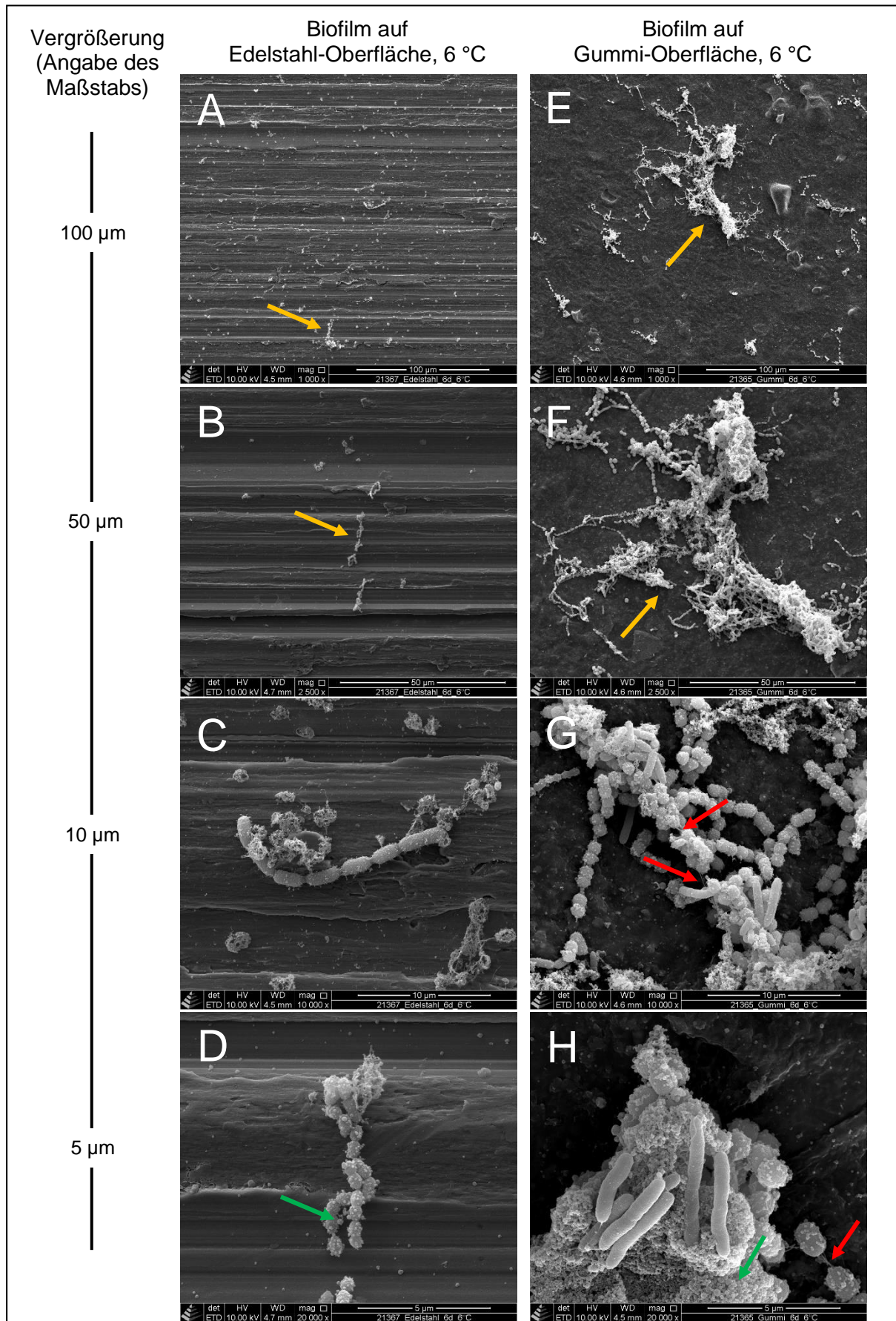


Abbildung 17: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von Rohmilch-Biofilmen auf Edelstahl- (A-D) und Gummi-Oberfläche (E-H) für 6 Tage bei 6 °C inkubiert. Gelbe Pfeile (A, B, E, F) zeigen „Biofilmiseln“, grüne Pfeile (D, H) in Biofilm-Matrix eingeschlossene Casein-Micellen und rote Pfeile (G, H) weisen auf netzartige, fadenförmige Adhäsine auf und zwischen Zellen hin.



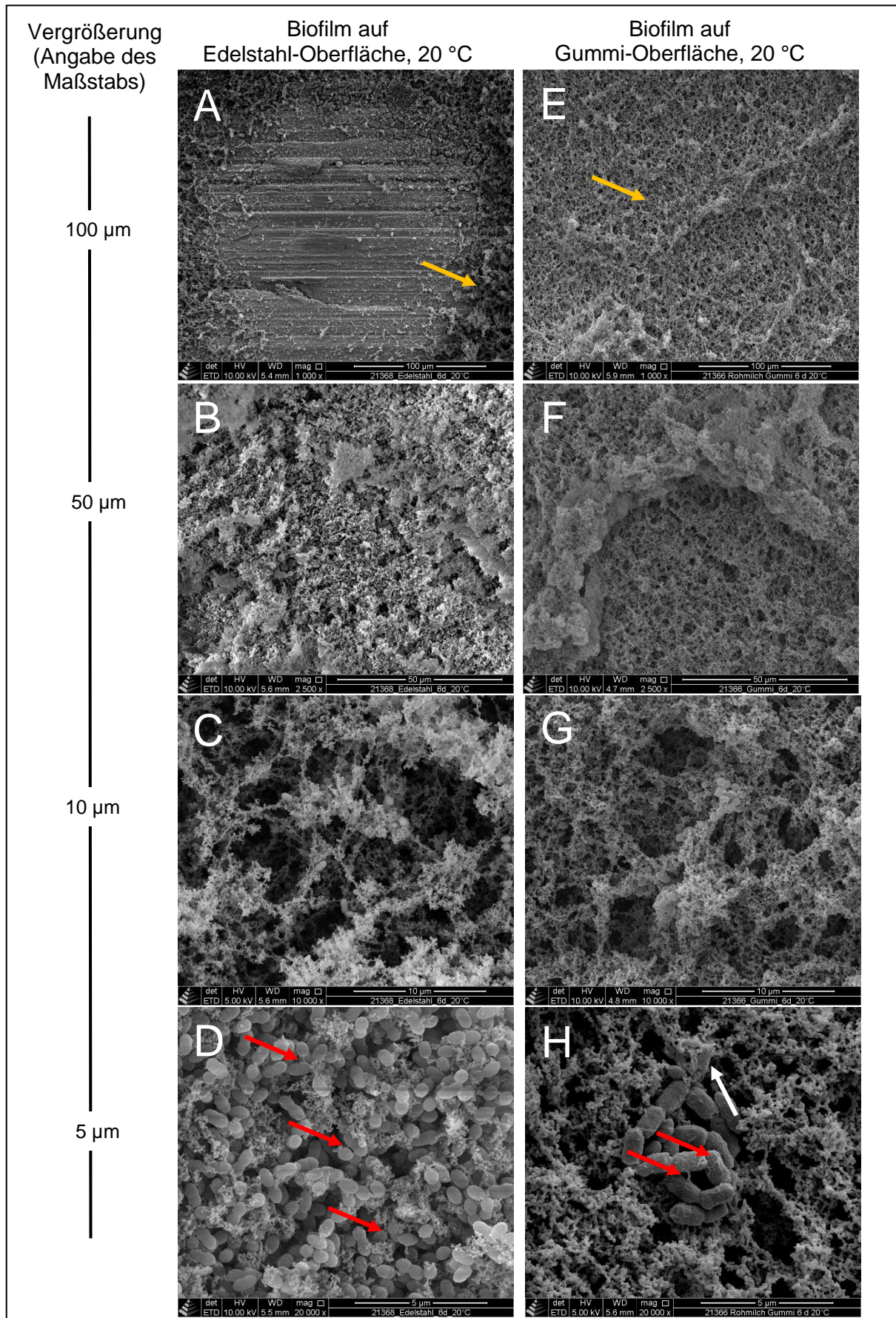


Abbildung 18: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von Rohmilch-Biofilmen auf Edelstahl- und Gummi-Oberfläche für 6 Tage bei 20 °C inkubiert. Gelbe Pfeile (A, E) zeigen „Biofilmrasen“, rote Pfeile (D, H) weisen auf netzartige, fadenförmige Adhäsine auf und zwischen Zellen hin und weißer Pfeil (H) zeigt schleimartige EPS-Bildung.

## 2.2.1.2 Analyse der bakteriellen Biofilm-Zusammensetzung mittels Keimzahlbestimmungen

Die Ergebnisse der Keimzahlbestimmung auf Plate-Count-Agar für den Gesamtkeimgehalt und auf verschiedenen Selektivnährböden für verschiedene Keimgruppen zur Ermittlung der Zusammensetzung von Rohmilch-Biofilmen auf Edelstahl- und Gummi-Oberfläche sind in Abbildung 19 dargestellt. An Tag 0 betrug die Gesamtkeimzahl der Rohmilch 6,0 log KbE/ml und Keimzahlen zwischen 4,3 und 4,9 log KbE/ml für *Pseudomonas* spp., *Escherichia coli* und *Enterobacteriaceae* wurden ermittelt. Der Keimgehalt für Hefen lag bei 3,5 log KbE/ml, wobei kein Wachstum von Schimmelpilzen festgestellt wurde.

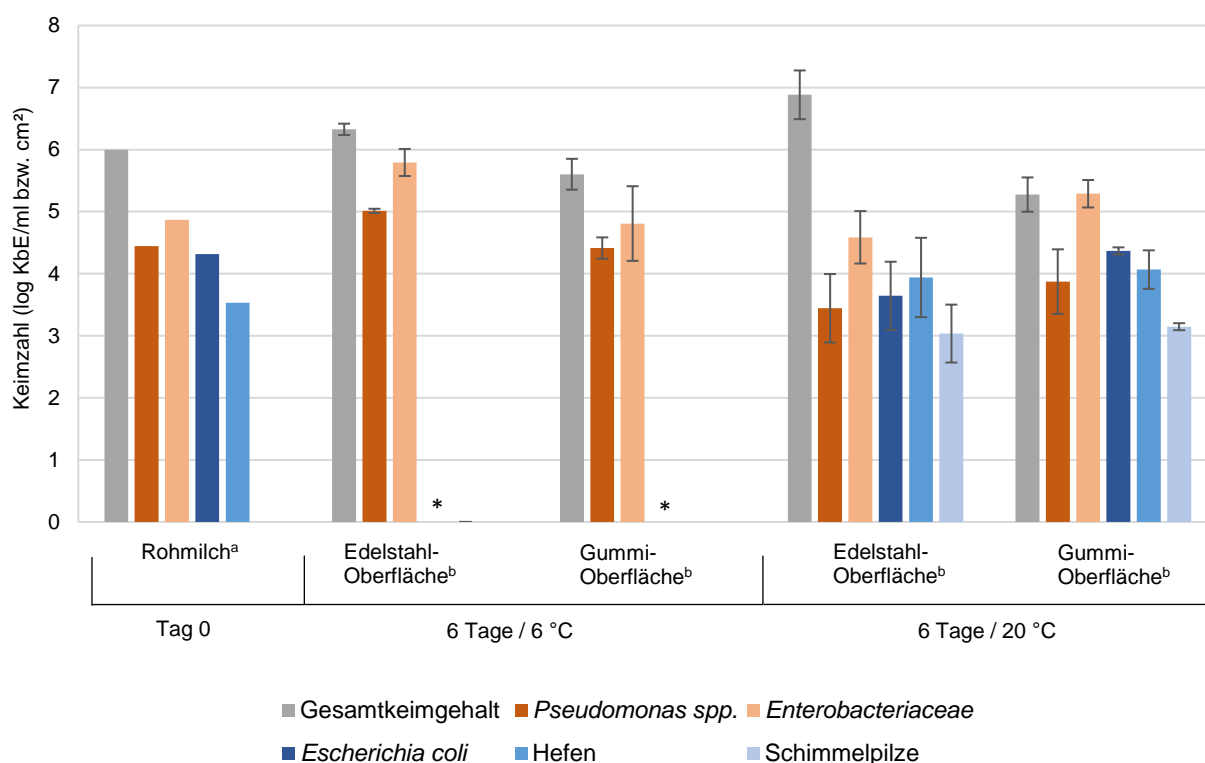


Abbildung 19: Gegenüberstellung der Keimzahlen (log KbE/ml bzw. cm<sup>2</sup>) verschiedener Keimgruppen in Rohmilch-Biofilmen auf Edelstahl- und Gummi-Oberfläche für 6 Tage bei 6 und 20 °C inkubiert. <sup>a</sup> = Keimzahl in log KbE/ml, <sup>b</sup> = Keimzahl in log KbE/cm<sup>2</sup>, \* = Keimzahl < 1 log KbE/cm<sup>2</sup>.

In Rohmilch-assoziierten Multi-Spezies-Biofilmen auf Edelstahl- und Gummi-Oberfläche mit Wachstum bei 6 °C lagen die Gesamtkeimgehalte an Tag 6 zwischen  $5,6 \pm 0,3$  log KbE/cm<sup>2</sup> auf Gummi- und  $6,3 \pm 0,1$  log KbE/cm<sup>2</sup> auf Edelstahl-Oberfläche. Zudem lassen die Keimzahlen der Selektivnährböden auf ein dominantes Wachstum von *Pseudomonas* spp. und Bakterien der Gattung *Enterobacteriaceae* schließen. Die *Pseudomonas*-Keimzahlen im Rohmilch-Biofilm auf Edelstahl-Oberfläche lagen mit  $5,0 \pm 0,1$  log KbE/cm<sup>2</sup> über jenen der Biofilme auf Gummi-Oberfläche mit  $4,4 \pm 0,2$  log KbE/cm<sup>2</sup>. Höhere Keimgehalte wurden für *Enterobacteriaceae* auf Edelstahl-Oberfläche mit  $5,8 \pm 0,2$  log KbE/cm<sup>2</sup> und mit  $4,8 \pm 0,6$  log KbE/cm<sup>2</sup> auf Gummi-Oberfläche detektiert. Die ermittelten Keimzahlen für *Escherichia coli* lagen bei 6 °C gewachsenen Rohmilch-Biofilmen auf Edelstahl- und Gummi-Oberfläche unter 1 log KbE/cm<sup>2</sup>.

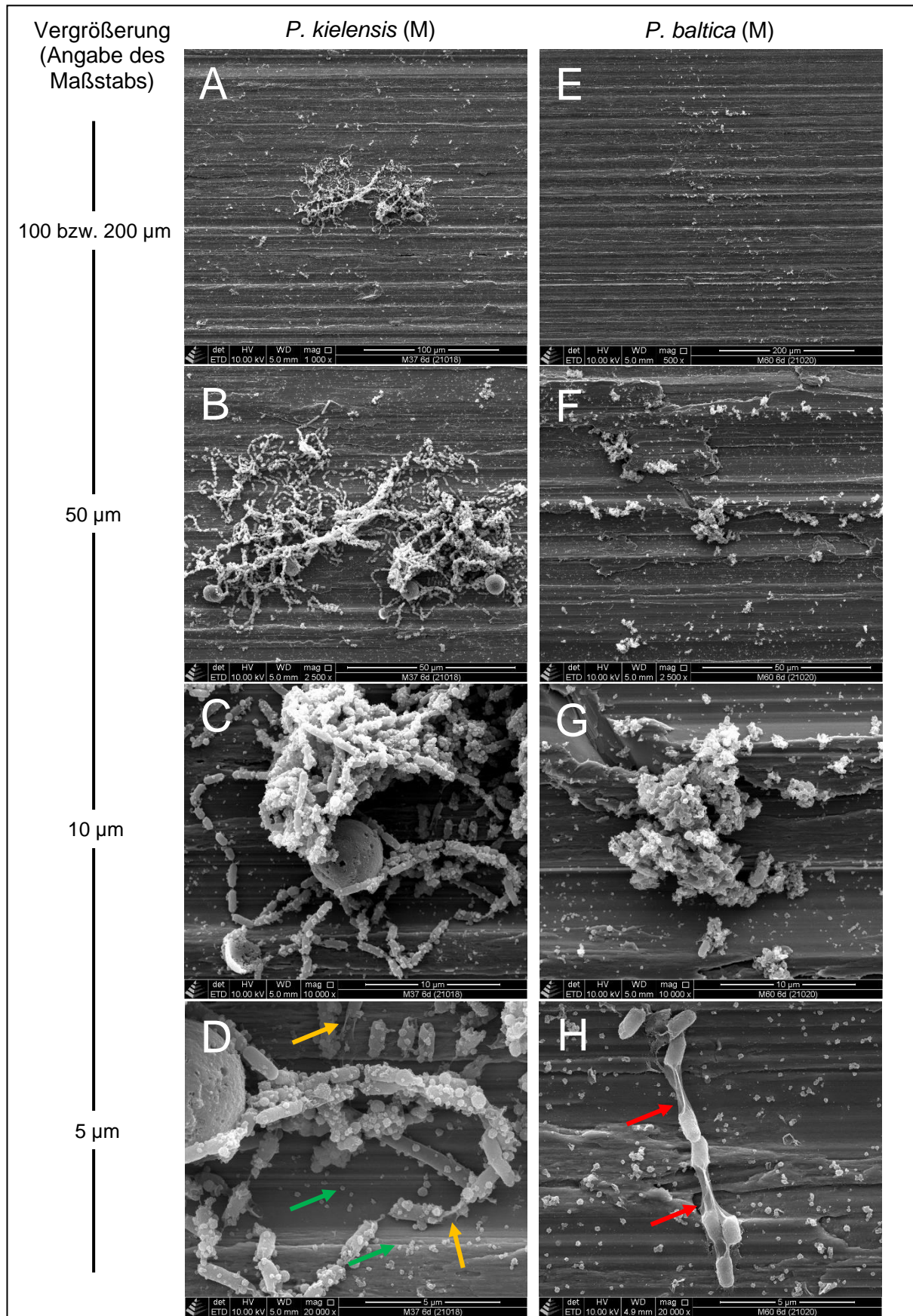
Für Hefen und Schimmelpilze konnten aufgrund fehlenden Wachstums keine Keimzahlen bestimmt werden. Bei 20 °C gewachsene Rohmilch-Biofilme besaßen auf Edelstahl-Oberfläche einen Gesamtkeimgehalt von  $6,9 \pm 0,4 \log \text{KbE/cm}^2$ , wohingegen auf Gummi-Oberfläche mit  $5,3 \pm 0,3 \log \text{KbE/cm}^2$  ein ähnlich hoher Keimgehalt wie bei 6 °C gewachsenen Biofilmen auf gleicher Oberfläche ermittelt wurde. Im Vergleich zur Zusammensetzung der bei 6 °C inkubierten Rohmilch-Biofilme zeigen die Keimzahlen nach der 6-tägigen Inkubation bei 20 °C ein Wachstum von *Escherichia coli*, Hefen und Schimmelpilze auf. Das Wachstum von *Pseudomonas* spp. mit psychrophiler Eigenschaft ist bei 20 °C inkubierten Rohmilch-Biofilmen mit  $3,4 \pm 0,6 \log \text{KbE/cm}^2$  auf Edelstahl-Oberfläche und  $3,9 \pm 0,5 \log \text{KbE/cm}^2$  auf Gummi-Oberfläche niedriger als bei den Rohmilch-Biofilmen bei Kühltemperatur. Die Ergebnisse zeigen somit eine temperaturabhängige bakterielle Zusammensetzung von Rohmilch-Biofilmen. Dabei wird das vorherrschende Wachstum von *Pseudomonas* spp. bei Kühltemperatur (6 °C) deutlich. Weiterhin belegen die Analysen die Fähigkeit von Rohmilch-assoziierten Mikroorganismen Biofilme sowohl auf Edelstahl- als auch auf Gummi-Oberflächen zu bilden. Die Gesamtkeimzahl der bei 20 °C inkubierten Biofilme auf Gummi-Oberfläche lag mit  $5,3 \pm 0,9 \log \text{KbE/cm}^2$  unter jenen auf Edelstahl-Oberfläche mit  $6,9 \pm 0,4 \log \text{KbE/cm}^2$ . Allerdings wurden mit  $3,9 \pm 0,5 \log \text{KbE/cm}^2$  im Biofilm auf Gummi-Oberfläche etwas höhere Keimgehalte an *Pseudomonas* spp. als auf Edelstahl-Oberfläche mit einer *Pseudomonas*-Keimzahl von  $3,4 \pm 0,6 \log \text{KbE/cm}^2$  ermittelt.

### 2.2.2 Mono-Spezies-Biofilme von *Pseudomonas* spp. auf Edelstahl-Oberfläche

Die rasterelektronenmikroskopischen (REM) Aufnahmen der Mono-Spezies-Biofilme von *Pseudomonas* spp. nach 6-tägiger Inkubation bei 6 °C auf Edelstahl-Oberfläche sind in Abbildung 20 und Abbildung 21 dargestellt. Die REM-Aufnahmen von *P. kielensis* (M), *P. baltica* (M) (Abbildung 20) und *P. fluorescens* L1-82 und *P. protegens* L1-102 (Abbildung 21) zeigen speziesabhängige Zellanheftung und Biofilm-Ausbildung. Die Anordnung der Zellen im Biofilm-Verband reichte von schwachen bis stark ausgeprägten Zell-Clustern (Abbildung 20, A und E; Abbildung 21, A und E), allerdings war kein flächendeckender „Biofilmrasen“ zu erkennen. Insbesondere *P. kielensis* (M) lies eine virtuose Zellanordnung als Grundlage für die Biofilm-Ausbildung erkennen (Abbildung 20, A und B). Morphologische Unterschiede hinsichtlich der Produktion extrazellulärer polymerer Substanzen (EPS) waren bei allen *Pseudomonas*-Isolaten zu erkennen. Während Zellen von *P. kielensis* (M) erste schleimartige Strukturen (Abbildung 20, D) aufwiesen, waren Zellen von *P. baltica* (M) bereits von einer Art Schleimhülle eingeschlossen (Abbildung 20, H). Die Aufnahmen von *P. fluorescens* L1-82 zeigen im Vergleich zu *P. kielensis* (M) eine stark ausgeprägte Biofilm-Matrix, welche an der zähen, gelartigen Struktur zu erkennen ist (Abbildung 21, D) (Chin et al. 2015). Dabei war auf eine ähnlich starke EPS-Ausbildung von *P. baltica* (M) anhand Abbildung 20 G zu schließen. Eine weniger stark



ausgeprägte EPS-Struktur zeigte der von *P. protegens* L1-102 gebildete Biofilm anhand einer fadenförmigen, netzartigen Biofilm-Matrix (Abbildung 21, H). Casein-Micellen hafteten an der Zell- und Edelstahl-Oberfläche (Beispiel Abbildung 20, D) und waren möglicherweise im Zellverband des Biofilms fixiert (Beispiel Abbildung 21, H). MilCHFett-Kügelchen, für gewöhnlich mit einem Durchmesser zwischen 1 und 10  $\mu\text{m}$  (Kaláb 2010), befanden sich bei *P. kielensis* (M) in der Nähe des gebildeten Biofilms und waren teilweise darin eingeschlossen (Abbildung 20, B-D).





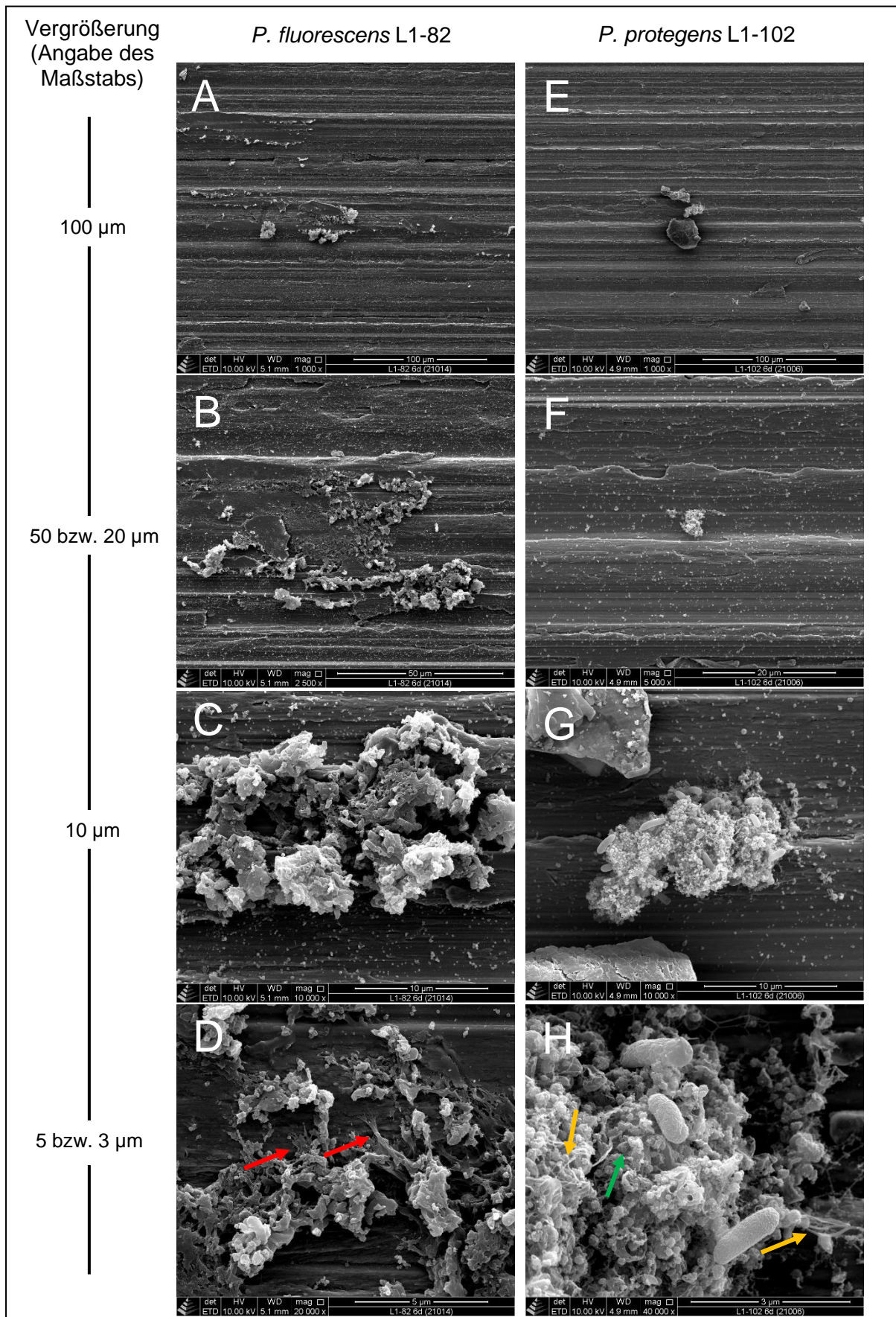


Abbildung 21: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von Mono-Spezies-Biofilmen von *P. fluorescens* L1-82 und *P. protegens* L1-102 nach 6-tägiger Inkubation bei 6 °C auf Edelstahl-Oberfläche mit einer Inokulationsdosis von  $4 \pm 0,5 \log \text{KbE/ml}$ . Gelbe Pfeile (H) zeigen fadenförmige, netzartige Biofilm-Matrix auf, während rote Pfeile (D) auf stark ausgeprägte EPS hinweisen. Grüner Pfeil (H) zeigt in Biofilm-Matrix eingeschlossene Casein-Micelle.

## 2.3 Charakterisierung von *Pseudomonas* spp. hinsichtlich der Peptidaseaktivität in Biofilmen

### 2.3.1 Bestimmung der Peptidaseaktivität von *Pseudomonas* spp. auf Magermilch-Agar

#### 2.3.1.1 Kategorisierung der Peptidaseaktivität

Die Kategorisierung der Peptidaseaktivität auf Magermilch-Agar der 38 untersuchten *Pseudomonas*-Isolate nach Maier et al. (2020) sind in Abbildung 22 dargestellt. Ein Anteil von 53 % (20/38) der untersuchten *Pseudomonas*-Isolate, darunter 18 verschiedene *Pseudomonas*-Spezies, zeigten eine starke Peptidaseaktivität. Bei 10 % (4/38) aller Isolate wurde eine sehr starke Peptidaseaktivität nachgewiesen. Mit 29 % (11/38) waren knapp ein Drittel der untersuchten Pseudomonaden keine Peptidasebildner, lediglich 8 % (3/38) wurden als moderat peptidaseaktiv eingestuft und keines der Isolate wies eine schwache Peptidaseaktivität auf.

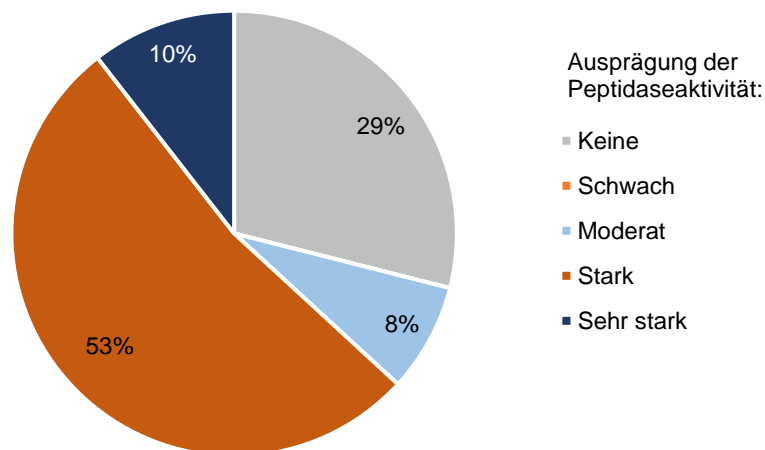


Abbildung 22: Analyse der Peptidaseaktivität durch Screening auf Magermilch-Agar von 38 *Pseudomonas*-Isolaten mithilfe der Auswertung nach Maier et al. (2020). *L. innocua* L1-63 wies als Negativ-Kontrolle keine Peptidaseaktivität auf und wurde in dargestellter Auswertung nicht berücksichtigt.

#### 2.3.1.2 Proteolytischer Index

Die Ergebnisse der Peptidaseaktivität nach Berechnung des proteolytischen Index nach Hamdani et al. (2019) sind in Abbildung 23 dargestellt. Die gemessene Aktivität war von der *Pseudomonas*-Spezies und des eingesetzten Isolats abhängig. *P. proteolytica* L1-105 wies mit einem Indexwert von  $2,05 \pm 0,06$  die höchste Aktivität auf Magermilch-Agar auf, gefolgt von zwei weiteren *P. proteolytica*-Isolaten (L1-103 und -104) mit Werten von  $1,87 \pm 0,05$  und  $1,82 \pm 0,07$ . Insgesamt zeigten alle 5 Vertreter von *P. proteolytica* eine mittlere bis sehr hohe Peptidaseaktivität. Isolate ohne nachweisbarer Peptidaseaktivität waren *P. baltica* (M), *P. fluorescens* L1-81, *P. fragi* (L1-84, -86, -87), *P. kielensis* (M), *P. lundensis* (L1-94, -97), *P. protegens* L1-100, *P. saxonica* L1-205 und *P. weihenstephanensis* L1-195. Dabei sind auch Unterschiede in der Ausprägung der Peptidaseaktivität innerhalb einer Spezies zu beobachten. So wurden für 3 verschiedene Isolate

von *P. fluorescens* (L1-83, -82, -81) unterschiedliche Indexwerte ermittelt:  $1,76 \pm 0,18$  für eine hohe Aktivität;  $1,26 \pm 0,19$  für eine moderate bis hohe Aktivität und auch keine messbare Aktivität.

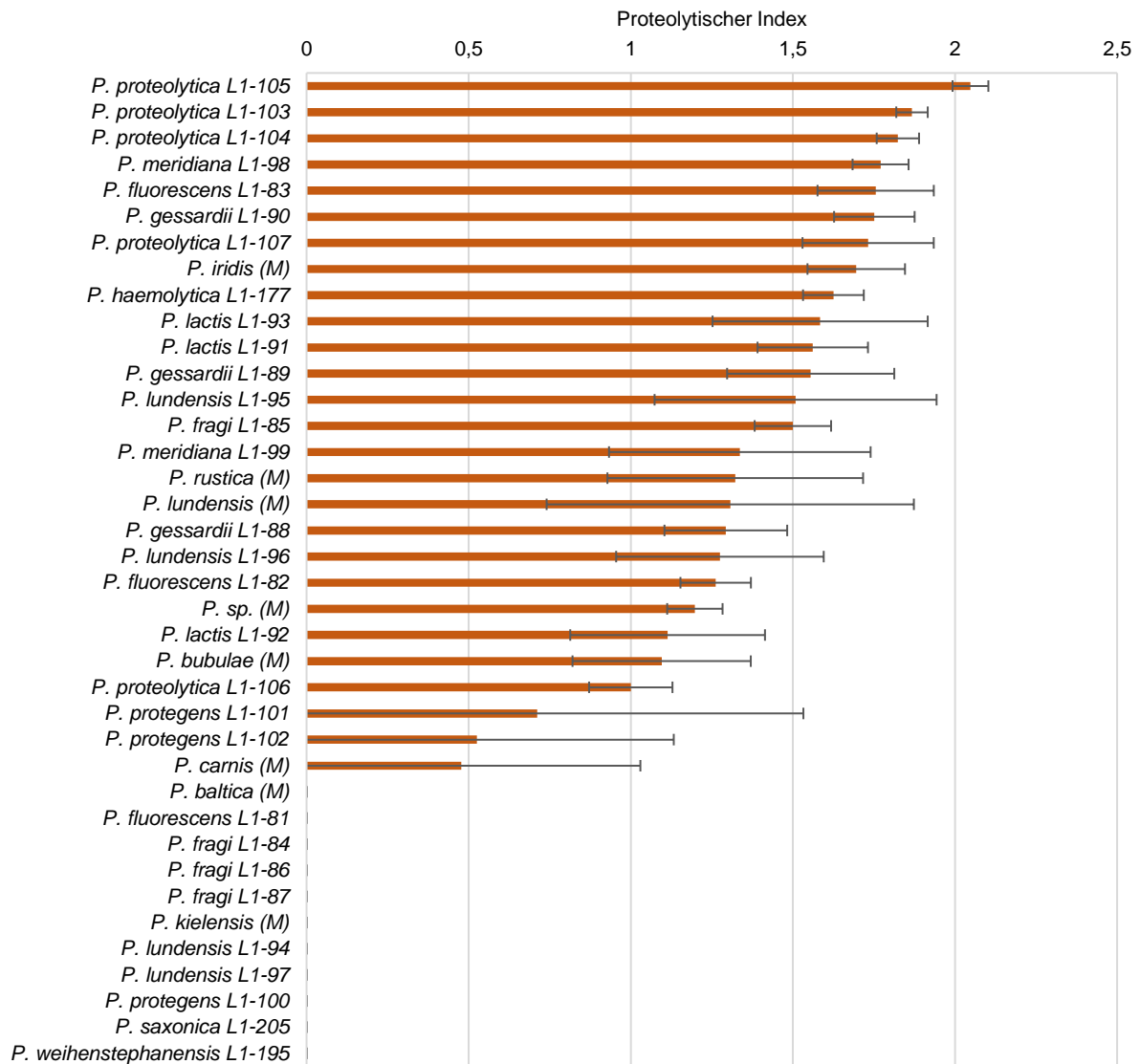


Abbildung 23: Peptidaseaktivität von Pseudomonas-Isolaten anhand des proteolytischen Index nach Hamdani et al. (2019) dargestellt. (M) = Mittels MALDI Biotyper® identifizierte Rohmilch-Isolate.

## 2.3.2 Quantifizierung der Peptidaseaktivität mittels Fluorescamin-Assay

### 2.3.2.1 Peptidaseaktivität Biofilm-assoziierten Zellen auf Edelstahl-Oberfläche und planktonischer Zellen im Vergleich

Die Ergebnisse zur Quantifizierung der Peptidaseaktivität mittels Fluorescamin-Assay von 6-tägigen Biofilm-assoziierten und planktonischen Zellen nach einer Inkubationszeit zur Casein-Spaltung von  $24 \pm 1$  Stunden bei  $20 \text{ }^\circ\text{C}$  sind in Abbildung 24 in Femtokatal pro koloniebildende Einheiten (fkat pro KbE) gegenübergestellt.

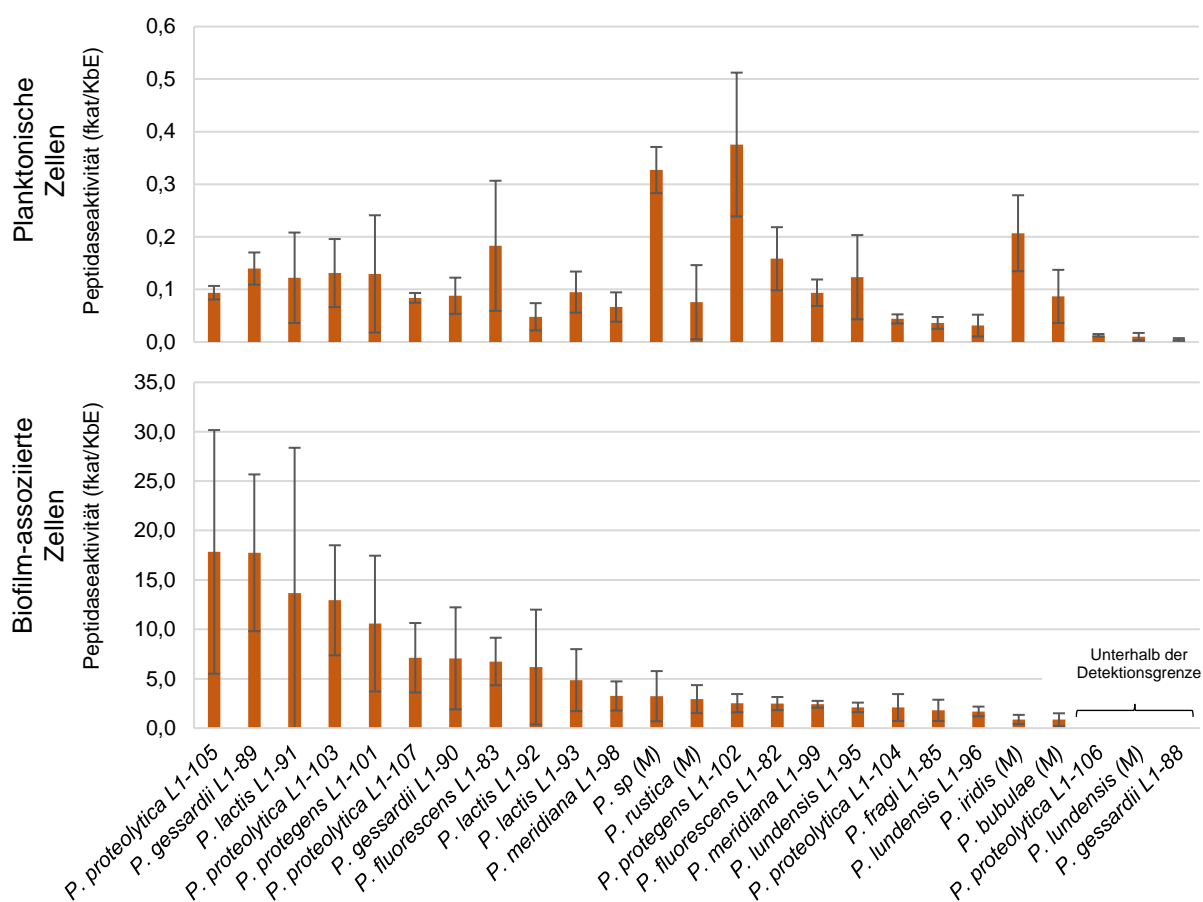


Abbildung 24: Ergebnisse der Quantifizierung der Peptidaseaktivität von Biofilm-assoziierten und planktonischen Zellen mittels Fluorescamin-Assay mit einer Casein-Spaltung für  $24 \pm 1$  Stunden bei  $20 \text{ }^\circ\text{C}$ . Die gemessene Peptidaseaktivität ist in Femtokatal pro koloniebildende Einheit (fkat/KbE) angegeben. Oberes Säulendiagramm zeigt die Peptidaseaktivität der planktonischen Zellen auf, während das untere Diagramm die Quantifizierungsergebnisse der Peptidaseaktivität von Biofilm-assoziierten Zellen darstellt. Dabei sind die unterschiedlichen Skalierungen der y-Achsen zu beachten. *L. innocua* L1-63 lag als Negativ-Kontrolle unterhalb der Detektionsgrenze des Assays. (M) = Mittels MALDI Biotyper® identifizierte Rohmilch-Isolate.

Die höchste Peptidaseaktivität wiesen Biofilm-assoziierte Zellen von *P. proteolytica* L1-105 mit  $17,84 \pm 12,33$  fkat/KbE auf, gefolgt von *P. gessardii* L1-89 mit  $17,75 \pm 7,93$  fkat/KbE und *P. lactis* L1-91 mit  $13,68 \pm 14,70$  fkat/KbE. Bei den planktonischen Zellen wies *P. protegens* L1-102 mit  $0,38 \pm 0,14$  fkat/KbE die höchste Peptidaseaktivität auf, gefolgt von *P. sp. (M)* mit



0,33 ± 0,04 fkat/KbE und *P. iridis* (M) mit 0,21 ± 0,07 fkat/KbE. Die Peptidaseaktivität der Biofilm-assoziierten Zellen von *P. proteolytica* L1-106, *P. lundensis* (M) und *P. gessardii* L1-88 lag unterhalb der Detektionsgrenze des Assays. Anhand der Ergebnisse kann eine stamm- und isolatspezifische Peptidaseaktivität der Biofilm-assoziierten als auch der planktonischen Zellen abgeleitet werden. Als Beispiel für die Isolatspezifität wiesen die *P. proteolytica*-Isolate L1-104, -105, -106 und -107 mit Werten zwischen 17,84 ± 12,33 fkat/KbE und Werte unterhalb der Detektionsgrenze ein breites Aktivitätsspektrum auf.

Wie in Abbildung 25 dargestellt lag die mittlere Peptidaseaktivität der Biofilm-assoziierten Zellen bei 5,44 ± 7,02 fkat/KbE und somit signifikant höher als jene der planktonischen Zellen mit einer durchschnittlichen Aktivität von 0,11 ± 0,14 fkat/KbE.

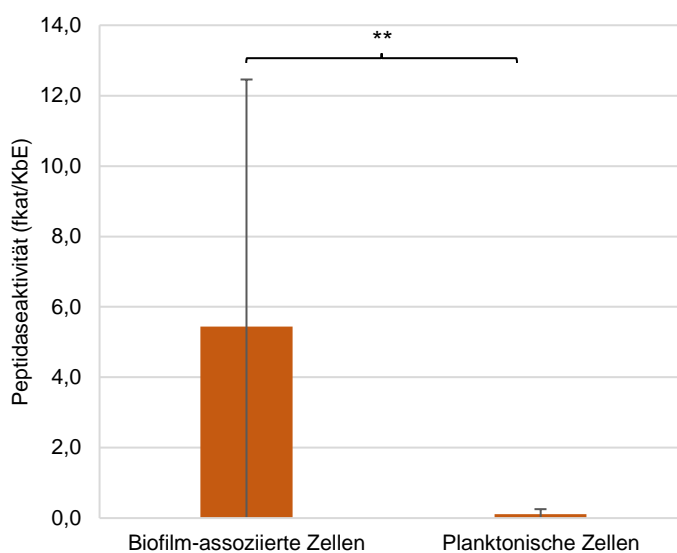


Abbildung 25: Mittelwerte der Peptidaseaktivität Biofilm-assoziiierter und planktonischer Zellen quantifiziert mittels Fluorescamin-Assay mit einer Casein-Spaltung für 24 ± 1 Stunden bei 20 °C aus Abbildung 24. Signifikante Unterschiede sind mit Sternen markiert: \*,  $p \leq 0,05$ ; \*\*,  $p \leq 0,01$  (Tukey HSDTest).

In Abbildung 26 ist der Quotient der Peptidaseaktivität Biofilm-assoziiierter und planktonischer Zellen je *Pseudomonas*-Isolat gegenübergestellt. Die Berechnung basierte auf die in Abbildung 24 dargestellten Ergebnisse zur Quantifizierung der Peptidaseaktivität Biofilm-assoziiierter und planktonischer Zellen mittels Fluorescamin-Assay, wobei die Mittelwerte der beiden Ansätze beider Durchgänge verwendet wurden.

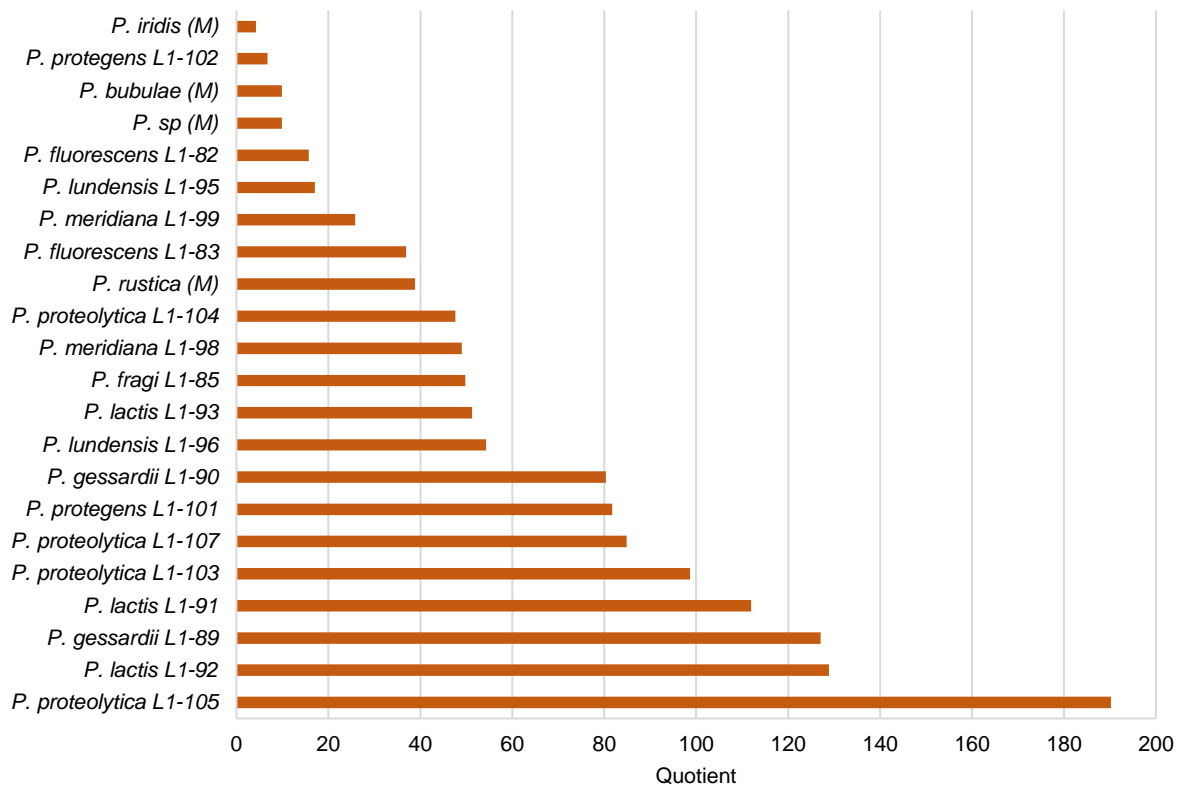


Abbildung 26: Quotienten der Peptidaseaktivität Biofilm-assoziiierter und planktonischer Zellen aus den in Abbildung 24 dargestellten Quantifizierungs-Ergebnissen mittels Fluorescamin-Assay zur Einschätzung des Aktivitätsvermögens Biofilm-assoziiierter Zellen. (M) = Mittels MALDI Biotyper<sup>®</sup> identifizierte Rohmilch-Isolate.

Die ermittelten Quotienten zeigen eine spezies- und isolatspezifisch höhere Peptidaseaktivität der Biofilm-assoziierten Zellen auf. Anhand des höchsten Quotienten von *P. proteolytica* L1-105 kann auf eine 190-fach höhere Aktivität der Biofilm-assoziierten Zellen im Vergleich zur planktonischen Wuchsform geschlossen werden, gefolgt von *P. lactis* L1-92 und *P. gessardii* L1-89 mit 129- bzw. 127-fach höherer Aktivität der Biofilm-assoziierten Zellen. Weitere Isolate von *P. proteolytica* (L1-102, -103, -104, -107) zeigten eine zwischen 7- und 99-fach höhere Aktivität auf. Mit einer 4-fach höheren Aktivität wurden bei *P. iridis* (M) der geringste Unterschied der Peptidaseaktivität Biofilm-assoziiierter und planktonischer Zellen ermittelt. Die Biofilm-assoziierten Zellen von *P. lundensis* L1-96 zeigten vergleichsweise geringe Peptidaseaktivität auf (Abbildung 24), wobei durch Betrachtung des Quotienten dennoch eine 54-fach höhere Aktivität im Vergleich zur planktonischen Wuchsform vorlag (Abbildung 26). Für *P. proteolytica* L1-106, *P. lundensis* (M) und *P. gessardii* L1-88 konnte aufgrund nicht-detektierbarer Peptidaseaktivität der Biofilm-assoziierten Zellen (Abbildung 24) kein Quotient ermittelt werden.



### 2.3.2.2 Peptidaseaktivität Biofilm-assoziiierter Zellen auf Edelstahl- und Gummi-Oberfläche im Vergleich

Die Quantifizierungs-Ergebnisse der Peptidaseaktivität Biofilm-assoziiierter und planktonischer Zellen auf Edelstahl- und Gummi-Plättchen mittels Fluorescamin-Assay sind in Abbildung 27 in Femtokatal pro koloniebildende Einheit (fkat pro KbE) dargestellt.

Die Peptidaseaktivität der Biofilm-assoziierten Zellen auf Gummi-Oberfläche lag bei beiden untersuchten *Pseudomonas*-Isolaten, *P. protegens* L1-101 und *P. proteolytica* L1-105, über der gemessenen Aktivität der Biofilm-assoziierten Zellen auf Edelstahl-Oberfläche. Allerdings wurde kein signifikanter Zusammenhang hinsichtlich der Oberflächenart ermittelt. Die höchste Peptidaseaktivität Biofilm-assoziiierter Zellen wurden bei *P. proteolytica* L1-105 auf Gummi-Oberfläche mit  $8,14 \pm 11,5$  fkat/KbE gemessen, wohingegen die Aktivität auf Edelstahl-Plättchen  $4,20 \pm 4,19$  fkat/KbE betrug. Bei *P. protegens* L1-101 wurde eine Peptidaseaktivität der Biofilm-assoziierten Zellen auf Gummi-Oberfläche von  $7,31 \pm 6,56$  fkat/KbE ermittelt und eine Aktivität Biofilm-assoziiierter Zellen auf Edelstahl-Plättchen von  $6,82 \pm 8,18$  fkat/KbE.

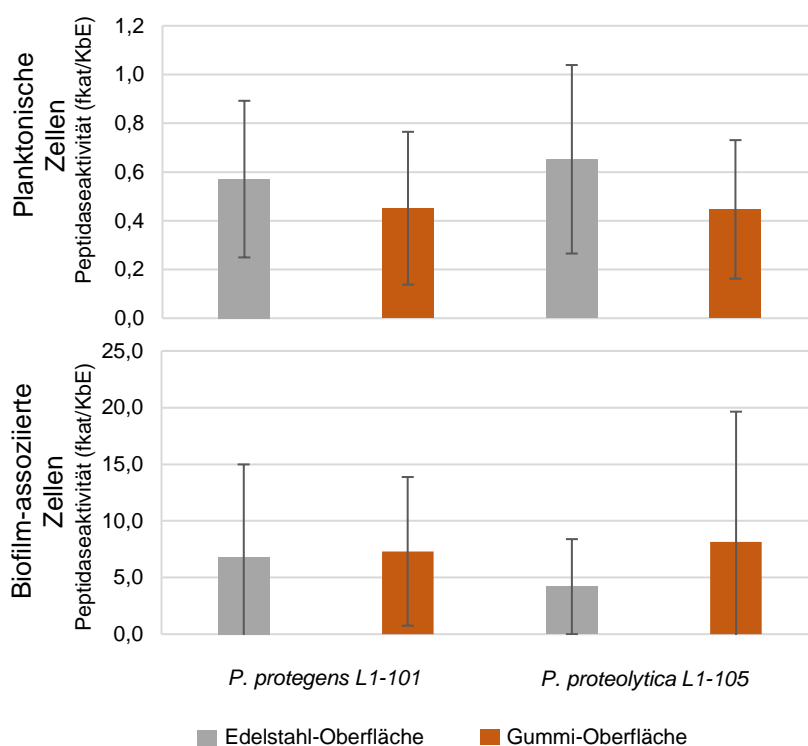


Abbildung 27: Ergebnisse der Quantifizierung der Peptidaseaktivität Biofilm-assoziiierter Zellen auf Edelstahl- und Gummi-Plättchen mittels Fluorescamin-Assay mit einer Casein-Spaltung für  $24 \pm 1$  Stunden bei  $20^\circ\text{C}$ . Die gemessene Peptidaseaktivität ist in Femtokatal pro koloniebildende Einheit (fkat/KbE) angegeben. Oberes Säulendiagramm zeigt die Peptidaseaktivität der planktonischen Zellen auf, während das untere Diagramm die Quantifizierungsergebnisse der Peptidaseaktivität von Biofilm-assoziierten Zellen darstellt. Dabei sind die unterschiedlichen Skalierungen der y-Achsen zu beachten.

Der Quotient der Peptidaseaktivität Biofilm-assoziiierter Zellen auf Edelstahl- und Gummi-Oberfläche und derer planktonischer Zellen der beiden *Pseudomonas*-Isolate sind in Abbildung

28 dargestellt. Die Ergebnisse zeigen eine isolatspezifische und oberflächenabhängige höhere Peptidaseaktivität Biofilm-assoziiierter Zellen auf Gummi- im Vergleich zum Wachstum der Zellen auf Edelstahl-Oberfläche auf.

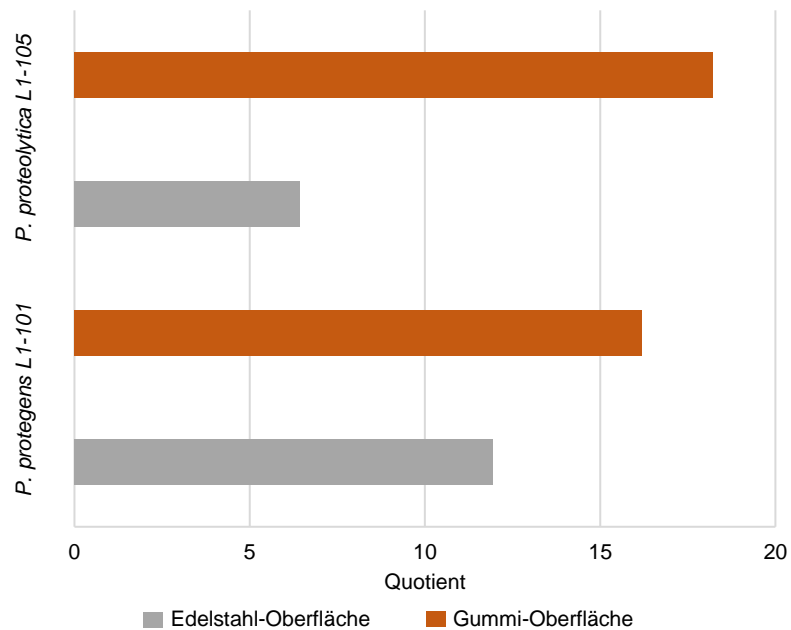


Abbildung 28: Quotienten der Peptidaseaktivität Biofilm-assoziiierter und planktonischer Zellen im Vergleich auf Edelstahl- und Gummi-Oberfläche aus den in Abbildung 27 dargestellten Quantifizierungs-Ergebnissen mittels Fluorescamin-Assay zur Einschätzung des Aktivitätsvermögens auf unterschiedlichen Oberflächen.

Die Peptidaseaktivität Biofilm-assoziiierter Zellen auf Gummi von *P. proteolytica* L1-105 und *P. protegens* L1-101 war hinsichtlich des Quotienten 18- bzw. 16-fach höher im Vergleich zur planktonischen Wuchsform. Zudem verdeutlichen die Quotienten bei beiden Isolate eine geringere Peptidaseaktivität der Biofilm-assoziierten Zellen auf Edelstahl- im Vergleich zur Gummi-Oberfläche auf, was bereits aus Abbildung 27 hervorging.

## Diskussion

### 1 Bestimmung der Eintragsrouten von *Pseudomonas* spp. in Rohmilch

#### 1.1 Zusammenhang zwischen *Pseudomonas*-Keimzahlen und hofseitigen Einflussfaktoren

Im Rahmen der Aufarbeitung von 521 Rohmilchproben der 38 Erzeugerhöfe wurden *Pseudomonas*-Keimzahlen zwischen 1,4 und über 6,7 log KbE/ml in Rohmilch ermittelt, wobei die durchschnittliche Keimzahl (arithmetisches Mittel) bei  $3,4 \pm 1,3$  log KbE/ml lag. Leriche und Fayolle (2012) ermittelten während der monatlichen Beprobung von 37 Erzeugerhöfen über 13 Monate ähnliche Werte mit mittleren *Pseudomonas*-Keimzahlen in Rohmilch von 3,6 log KbE/ml. Die in dieser Arbeit ermittelten Gesamtkeimzahlen ( $n = 519$ ) lagen zwischen 3,3 und 7,1 log KbE/ml, mit einem arithmetisches Mittel von  $4,7 \pm 0,6$  log KbE/ml. Gemäß RohmilchGütV (2021) sollte bei der Güteuntersuchung von Rohmilch eine Gesamtkeimzahl nicht höher als 5 log KbE/ml nachgewiesen werden. Insgesamt lagen somit 26,6 % (138/519) der in dieser Arbeit untersuchten Rohmilchproben über diesem Keimwert. Vithanage et al. (2016) ermittelten bei den Keimzahlbestimmungen in Rohmilch von 3 australischen Erzeugerhöfen Gesamtkeimgehalte zwischen 4,1 und 5,1 log KbE/ml, wobei die Keimzahlen psychrotropher Bakterien zwischen 2,8 und 3,8 log KbE/ml lagen und circa 5 % des Gesamtkeimgehalts ausmachten. Bereits Adams et al. (1967) gaben an, dass der Keimgehalt an psychrotrophen Bakterien von 4 log KbE/ml für die Abnahme von  $\kappa$ -Casein in Rohmilch ausreichen und somit Einfluss auf die Stabilisierung der Casein-Micelle nehmen würde. Allerdings sehen Champagne et al. (1994) erst einen Keimgehalt von über 6 log KbE/ml an Psychrotrophen in Rohmilch für die weitere thermische Behandlung als kritisch an. Die höchste Enzymproduktion mit einhergehender Proteolyse stellten Vithanage et al. (2017) ab einer Keimzahl an psychrotrophen proteolytisch aktiven Bakterien von  $\geq 4,5$  log KbE/ml bei Temperaturen  $\geq 4$  °C fest. Bislang wurde kein offizieller Schwellenwert an proteolytisch aktiven psychrotrophen Bakterien, wie *Pseudomonas* spp., in Rohmilch zur Kategorisierung der Milchqualität eingeführt und ist gemäß RohmilchGütV (2021) somit nicht Bestandteil der Güteuntersuchung. Darüber hinaus haben interne Untersuchungen zur durchflusszytometrischen Zählung des Gesamtkeimgehalts mittels Bactocount IBCm ergeben, dass mit diesem Routineverfahren gemäß ASU L 01.01-7 eine Unterrepräsentation des *Pseudomonas*-Gehalts in Rohmilch erfolgen kann.

Die Analyse der verschiedenen Spülsysteme zur Reinigung des Melkstands in dieser Arbeit ergab signifikant höhere *Pseudomonas*-Keimzahlen bei Höfen unter Verwendung der Säure/Lauge-Zirkulation im Vergleich zu anderen Arten an Spülsystemen (Heißwasser, Kaltwasser, Heißwasser kombiniert mit Säure/Lauge-Zirkulation). Dabei ist zu berücksichtigen, dass lediglich

ein Erzeugerhof „Kaltwasser (ca. 40 °C per Hand)“ als Reinigungsart des Melkstands angab. Denkbar ist eine Behandlung mittels Hochdruckreinigers in Kombination mit effektiven Mikroorganismen, die nur bis 40 °C wirksam sind (EMIKO Handelsgesellschaft mbH 2019). Dieser ökologisch betriebene Erzeugerhof besitzt allerdings eine Rohrmelkanlage, sodass höchstens von einer Reinigung der äußeren Oberflächen oder Vorreinigung abnehmbarer Teile mit „Kaltwasser“ auszugehen ist. Bei der Verwendung dieser Art des Melksystems ist jedoch eine Reinigung im geschlossenen System unter Verwendung von Reinigungsmitteln anzunehmen (DeLaval GmbH 2022). Darüber hinaus ist zu erwähnen, dass lediglich ein Erzeuger „Heißwasser“ in Kombination mit „Säure/Lauge-Zirkulation“ als Reinigungsart des Melkstands angab. In der Praxis wird für gewöhnlich nur eines der beiden Spülsysteme angewandt. Die Zirkulationsreinigung beginnt mit einer Vorspülung der Melkanlage mit lauwarmem Wasser (30 °C), worauf die Reinigungslösung (sauer oder alkalisch) bei Temperaturen zwischen 40 und 60 °C mehrmals die Anlage durchströmt und abschließend mit Wasser mit Trinkwasserqualität nachgespült wird (Binder 2022; Krömker 2007). Im Gegensatz dazu erfolgt mittels Kochendwasserreinigung eine Hitzedesinfektion, bei der das auf 96 °C erhitzte und mit organischen Säuren versetzte Wasser durch das Melksystem geleitet wird. Alle Teile mit Milchkontakt werden dabei für mindestens 2 Minuten auf eine Temperatur > 77 °C erhitzt (Krömker 2007; Ordloff 1993; Parry und Egdell 1969). Bei beiden Erzeugerhöfen ist daher unklar, ob die Antwortmöglichkeiten im Rahmen der Abfrage zu den Spülsystemen zur Melkstand-Reinigung fehlinterpretiert wurden. Allerdings ergab die Auswertung hinsichtlich der Spülsysteme ebenfalls signifikant höhere *Pseudomonas*-Keimzahlen bei Höfen mit „Säure-Lauge-Zirkulation“ im Vergleich zu Betrieben mit „Heißwasser“ als Spülsystem der Wahl. Dabei bestand kein signifikanter Unterschied zwischen den Gesamtkeimgehalten, so dass dieser Zusammenhang ausschließlich die *Pseudomonas*-Keimzahl zu beeinflussen schien.

Zudem ergaben die Analysen dieser Arbeit signifikant niedrigere *Pseudomonas*- und Gesamtkeimzahlen bei Höfen mit einer kombinierten Laufstall- und Weidehaltung im Vergleich zu Höfen mit reiner Laufstallhaltung oder kombinierter Anbindestall- und Weidehaltung. Ähnlich zu diesem Resultat stellten Vacheyrou et al. (2011) anhand der Gesamtmenge an Mikroorganismen signifikant stärker kontaminierte Rohmilch bei Erzeugern mit Anbindestallhaltung im Vergleich zu Betrieben mit Laufstallhaltung fest, was durch die räumliche Trennung zwischen Lebensraum des Milchviehs und des Melkbereichs sowie durch angepasste Reinigungsstrategien von Höfen mit Laufställen erklärt wurde. Diese Erkenntnis spiegelt sich jedoch nur bedingt in den Ergebnissen dieser Arbeit zu verschiedenen Melksystemen wider, wo je nach Art des Melksystems von einer mehr oder weniger großen räumlichen Trennung zwischen Lebensraum des Milchviehs und des Melkbereichs ausgegangen werden kann. Vermutlich ist die Art der Tierhaltung mit der Produktionsart (konventionell oder ökologisch) der Erzeugerhöfe eng verknüpft. Den Metadaten dieser Arbeit zufolge nutzten ökologische Betriebe ausschließlich eine

kombinierte Weide- und Laufstallhaltung, wodurch sich signifikant niedrigere *Pseudomonas*-Keimzahlen hinsichtlich Weide- und Laufstallhaltung gegenüber reiner Laufstallhaltung und der kombinierten Haltung im Anbindestall und auf Weide durch die Produktionsart erklären lassen. Die Analysen ergaben hinsichtlich der Produktionsart signifikant niedrigere *Pseudomonas*- und Gesamtkeimzahlen in ökologisch produzierter Rohmilch gegenüber konventionell produzierter Milch. In einer Studie von Smigic et al. (2017) wurden ebenfalls signifikant niedrigere Gesamtkeimzahlen in ökologisch produzierter ( $4,13 \pm 0,33 \log \text{KbE/ml}$ ) gegenüber konventioneller ( $5,00 \pm 0,21 \log \text{KbE/ml}$ ) Rohmilch ermittelt. Bei der Rohmilch-Analyse hinsichtlich des Hygienestatus von 126 finnischen Betrieben detektierten Luukkonen et al. (2005) ebenfalls niedrigere Gesamtkeimzahlen in Rohmilch von ökologischen im Vergleich zu konventionellen Milcherzeugern. Zudem wurde ein geringerer Eiweiß- und Fettgehalt in ökologisch produzierter Milch als in konventioneller Rohmilch untersucht, wobei Smigic et al. (2017) dies nicht bestätigen konnten.

Weiterhin ergaben die Analysen signifikant höhere *Pseudomonas*- und Gesamtkeimzahlen bei Erzeugern mit kommunaler Wasserversorgung im Vergleich zur Wasserversorgung durch einen eigenen Brunnen und einer Kombination beider Arten. Von einer Verunreinigung des Wassers aus der Kommune ist jedoch abzusehen, wohingegen Kuehn et al. (2013) eine Kontamination des Wassers zur Reinigung der Euter als Ursache für u. a. hohe *Pseudomonas*-Gehalte an Eutern hypothetisierten.

Keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich *Pseudomonas*- und Gesamtkeimzahlen wurde zwischen den verschiedenen Arten an Melksystemen ermittelt. Dabei stellten Sun et al. (2022) signifikant höhere Gesamtkeimgehalte und eine höhere Speziesvielfalt in Rohmilch bei Betrieben mit Melkroboter und der damit verbundenen Laufstallhaltung gegenüber jenen Höfen mit Melkvorhaben im Anbindestall fest. Dabei assoziierten sie hohe Gesamtkeimzahlen in Rohmilch mit einer unzureichenden Zitzenhygiene und stellten eine Melkroboterhersteller bedingte Artenvielfalt in Rohmilch fest. Mittels Hauptkomponenten-Analyse ermittelten sie die Art des Melksystems als maßgeblichen Einflussfaktor auf die Milchmikrobiota (Sun et al. 2022). Desweiteren ergab die Analyse dieser Arbeit signifikant niedrigere *Pseudomonas*-Keimzahlen der Höfe mit kombinierter Durchlauf- und Tankkühlung im Vergleich zu Betrieben mit alleiniger Durchlauf- oder Tankkühlung. Bei der Tankkühlung, eine Art der Direktverdampfung, wird die Milch unter ständigem Rühren mittels Kühlaggregats im Tank herunter gekühlt. Damit wird ein Anfriern der Milch an der Wandung des Tanks verhindert. Bei der Durchlaufkühlung wird die Rohmilch indirekt mittels Platten- oder Rohrkühler herunter gekühlt (Paul Mueller Company 2022; Krömker 2007). Sowohl die Tank- als auch die Durchlaufkühlung bergen bei unzureichender Reinigung Risiken durch Anlagerung von Bakterien bis hin zur Biofilmbildung. Durch die hintereinander geschaltete indirekte und direkte Kühlung ist die Wahrscheinlichkeit der

Minimierung des bakteriellen Wachstums am höchsten, weshalb dadurch signifikant niedrigere *Pseudomonas*-Keimzahlen zu erklären sind.

Die Auswertungen zur Milchstapelung ergaben signifikant höhere *Pseudomonas*-Keimzahlen bei Höfen mit Tank gegenüber jenen, die Rohmilch mittels Wanne und einer Kombination aus Wanne und Tank stapelten. Dabei handelte es sich um je einen ökologischen Erzeugerhof, der nicht bzw. nicht ausschließlich mittels Tank Milch stapelte, sodass die signifikanten Ergebnisse bzgl. der Milchstapelung zu vernachlässigen sind.

Hinsichtlich der Abholungsintervalle wurde kein signifikanter Einfluss auf die *Pseudomonas*- und Gesamtkeimzahl in Rohmilch ermittelt. Reguillo et al. (2018) stellten ebenfalls keine signifikante Reduktion psychrotropher Bakterien bei täglicher Milchabholung im Vergleich zur Zweitägigen fest. Dennoch ergaben ihre Analysen bei Betrachtung der Mittelwerte eine Reduktion der Keimzahl mesophiler aerober Bakterien um 32 % und psychrotropher Bakterien um 18 % bei täglicher Milchabholung im Vergleich zur zweitägigen Abholung von Rohmilch. So kann von einer kürzeren Lagerzeit bei täglicher Milchabholung bis zum Weitertransport zur Molkerei auf eine Reduktion des Keimgehalts in Rohmilch abgeleitet werden. Darüber hinaus sind Schwankungen der kühl gelagerten Milch bei täglicher Abholung wahrscheinlich geringer im Vergleich zur zwei- oder dreitägigen Milchabholung, bei der durch Zugabe von frischer Milch (ca. 38 °C) eine Temperaturerhöhung von bis zu 3 °C einhergehen kann (Reguillo et al. 2018).

In Bezug auf die verschiedenen Arten der Euterhygiene (Trocken, Einweg- oder waschbare Tücher, automatisch mittels Bürste des Melkroboters) ergaben die in dieser Arbeit erfolgten Untersuchungen keine signifikant höheren *Pseudomonas*-Keimzahlen. Verdier-Metz et al. (2009) erstellten auf einer *Single-Strand-Conformation-Polymorphism* (SSCP) basierten Analyse Profile von 67 Milcherzeugern. Die Untersuchungen ergaben, dass Milchbetriebe mit einem allgemeinen hohen Hygieneniveau, darunter fallen Reinigung bzw. Desinfektion der Zitze vor bzw. nach dem Melkvorgang sowie die korrekte Einstellung der Melkmaschine, eine gute Belüftung und gereinigte Tränke, eine niedrigere Diversität der Milchmikrobiota im Vergleich zu Milcherzeugern mit niedrigem Hygieneniveau aufwiesen (Verdier-Metz et al. 2009). Betriebe mit geringer Euterhygiene, mangelnder Sauberkeit der Melkanlage und des Melkbereichs wiesen hingegen signifikant höhere Gesamtkeimzahlen und die höchste Diversität der mikrobiellen Zusammensetzung in Rohmilch auf (Verdier-Metz et al. 2009).

Weiterhin ergab die Analyse in dieser Arbeit keine signifikanten Unterschiede der *Pseudomonas*- und Gesamtkeimzahlen in Abhängigkeit zur Jahreszeit, dem einzigen hofunabhängigen Parameter. Mit einem Mittelwert von  $3,6 \pm 1,4$  und  $\pm 1,3$  log KbE/ml waren die *Pseudomonas*-Keimzahlen in den Frühlings- und Wintermonaten in Rohmilch im Vergleich zu Sommer ( $3,3 \pm 1,3$  log KbE/ml) und Herbst ( $3,2 \pm 1,2$  log KbE/ml) leicht höher. Vithanage et al. (2016) stellten den höchsten Keimgehalt an psychrotrophen Bakterien ebenfalls im Winter und die geringsten Keimzahlen im Frühling fest. Es ist möglich, dass das Reinigungsregime der

Milcherzeuger u. a. in Bezug auf die Melkanlage und im Allgemeinen in den Sommermonaten aufgrund höherer Temperaturen strenger eingehalten und ausgeweitet wurde. Infolgedessen waren keine signifikant höheren *Pseudomonas*- und Gesamtkeimzahlen in den Analysen der vorliegenden Arbeit im Sommer festzustellen. Andererseits sind die im Winter vorliegenden Temperaturen für das Wachstum psychrotropher Bakterien, wie *Pseudomonas* spp., geeignet. Zusammen mit einem weniger strengen Reinigungsregime, könnten somit höhere *Pseudomonas*-Keimzahlen in den Wintermonaten erklärt werden. Yap et al. (2021) belegten in ihrer Studie durch metagenomische Shotgun-Analysen die durch Jahreszeiten bedingte signifikante Veränderung der Milchmikrobiota. Auch andere Autoren zeigten Jahreszeit-bedingte Veränderungen der Milch-Mikrobiota (Kable et al. 2019; Doyle et al. 2017a), wohingegen Leriche und Fayolle (2012) sowie Vidal et al. (2017) im jahreszeitlichen Verlauf keine signifikanten Unterschiede der *Pseudomonas*-Keimzahlen in Rohmilch feststellten.

Weitere Faktoren, die auf die Mikrobiota in Rohmilch und damit auf den Anteil an *Pseudomonas* spp. Einfluss nehmen können, sind: die Fütterung der Tiere (Porcellato et al. 2021; Hagi et al. 2010), die Höhenlage der Weidehaltung (Bonizzi et al. 2009), das Laktationsstadium (Doyle et al. 2017a; McInnis et al. 2015), die Zitzenbehandlung vor dem Melkvorgang (Doyle et al. 2017b), die Lagerbedingungen der Milch, wie Dauer und Temperatur (O'Connell et al. 2016), und die Wetterbedingungen (Porcellato et al. 2021).

## 1.2 Identifikation der Eintragsrouten von *Pseudomonas* spp. in Rohmilch

Aus den *Pseudomonas*- und Gesamtkeimzahlen zur Analyse der Eintragsrouten durch die Begehung von 8 Höfen waren individuelle, hofspezifische Eintragsrouten abzuleiten. Dabei unterstreichen die Ergebnisse die Ubiquität von *Pseudomonas* spp. in Milchbetrieben. So wurde bei Hof H5, H6 und H7 häufiger *Pseudomonas*-Keimzahlen von über 4 log KbE/ml am Zapfhahn, an der Dichtung des Zapfhahns und des Tankdeckels sowie am Entlüftungsdeckel detektiert. Bei Hof H3 und H4 der *Pseudomonas*-auffälligen Höfen wurde an der Halterung der Zitzenbecher *Pseudomonas*-Keimzahlen von über 4 log KbE/ml ermittelt. Bei den Erzeugerhöfen H5, H6 und H7 handelte es sich um ökologische Milchbetriebe, die eine andere Molkerei belieferten als die beprobten konventionell betriebenen Höfe H1 bis H4, H8A und B. Der Zeitpunkt der Hofbegehungen war allen Landwirten bekannt, sodass nicht ausgeschlossen werden kann, dass eine grobe Reinigung vorab bei einigen Milchproduzenten durchgeführt wurde. Es ist daher unklar, weshalb speziell ökologische Milchbetriebe durch die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Beprobungen deutlich höhere *Pseudomonas*-Kontaminationen und Gesamtkeimgehalte im Bereich des Rohmilchtanks aufwiesen. Es ist daher für zukünftige Beprobungen zu überlegen, Erzeugerhöfe einer Produktionsart (konventionell oder ökologisch)

oder einer zugehörigen Molkerei auszuwählen, um die Ergebnisse der Keimzahlbestimmungen gegenüberstellen zu können. Vacheyrou et al. (2011) untersuchten mögliche bakterielle Eintragswege mit Einfluss auf die Rohmilch-spezifische Mikrobiota von 16 Höfen während der Wintermonate. Mittels Selektivnährböden wurden von Luft-, Staub-, Heu- und Rohmilchproben sowie Proben der Zitzenoberfläche kulturelle Keimzahlbestimmungen durchgeführt und Rohmilch-Isolate mittels phänotypischer sowie DNA-basierter Methoden identifiziert. Die Analysen zum Eintrag von Bakterien über die Luft in Rohmilch ergaben eine ähnliche bakterielle Zusammensetzung der Stallluft und der Luft im Melkbereich. Zudem wurde bei 22 % der Proben ( $n = 9$ ) *Pseudomonas* spp. in der Luft des Melkbereichs detektiert (Vacheyrou et al. 2011). Mit Hof 8A und einer *Pseudomonas*-Keimzahl von  $0,17 \log \text{KbE}/10 \text{ l}$  waren es im Rahmen dieser Arbeit 11,1 % der Proben mit einem *Pseudomonas*-Nachweis in der Luft des Melkbereichs, wodurch der Eintrag von *Pseudomonas* spp. über diese Eintragsroute in Rohmilch als unwahrscheinlich eingestuft werden kann. Auch auf der Zitzenoberfläche und in Heu- und Staub wiesen Vacheyrou et al. (2011) *Pseudomonas* spp. nach, wobei die bakterielle Besiedlung der Zitzen durch bspw. Einstreu (Zdanowicz et al. 2004), auf dem das Milchvieh zuvor lag, und der Intensität der Euter-/ Zitzenhygiene (Verdier-Metz et al. 2009) beeinflusst werden kann.

Ähnlich zu Porcellato et al. (2021) wiesen Capodifoglio et al. (2016) eine wetterabhängige Prävalenz von *Pseudomonas* spp. an verschiedenen Probenahmestellen von 10 brasilianischen Milchbetrieben nach. Dabei wurden im Vergleich zur Trockenzeit während der Regensaison im Mittel höhere *Pseudomonas*-Keimzahlen ermittelt, wobei die identifizierten *Pseudomonas*-Isolate auch ein höheres proteolytisches Potential zeigten. Dass *Pseudomonas* spp. seinen Ursprung in der Umwelt hat und in feuchter Umgebung wächst, ist bereits bekannt (Da Costa et al. 1996).

Die in dieser Arbeit im Milchfilter ermittelten *Pseudomonas*-Keimzahlen zwischen  $3,79$  und  $7,93 \log \text{KbE}/\text{ml}$  und Gesamtkeimzahlen zwischen  $5,08$  und  $8,38 \log \text{KbE}/\text{ml}$  zeigten eine hohe bakterielle Kontamination auf. Leriche und Fayolle (2012) gingen bei ermittelten *Pseudomonas*-Keimzahlen im Filter der Melkanlage von 7 französischen Erzeugerhöfen zwischen  $1,7$  und  $4,5 \log \text{KbE}/\text{cm}^2$  von einer Eintragsquelle von *Pseudomonas* spp. in Rohmilch aus. Allerdings dient dieser Filter dazu in Milch vorhandene Partikel, wie Heu, Kot und andere Verschmutzungen, zurückzuhalten. Unter diesem Gesichtspunkt ist die erhöhte Prävalenz an Pseudomonaden, welche an den organischen Materialien gebunden sind, nachzuvollziehen.

Weiterhin ermittelten Leriche und Fayolle (2012) *Pseudomonas*-Gehalte von  $6,9 \log \text{KbE}/\text{cm}^2$  auf Gummi-Halterungen der Zitzenbecher (*washing rubber cups*) während des Melkvorgangs. Die Analysen zu potentiellen Eintragsrouten in dieser Arbeit ergaben *Pseudomonas*-Keimzahlen von über  $4 \log \text{KbE}/\text{cm}^2$  an Probenahmestellen aus Gummi, wie die Dichtung des Zapfhahns und des Tankdeckels sowie die Dichtung des Sammelstücks des Melkzeugs. Möglich ist, dass Oberflächen aus Gummi die Bildung von Biofilmen begünstigen, weshalb diese These im Verlauf dieser Arbeit noch beleuchtet wurde. Solche Stellen werden vermutlich durch die automatische



Reinigung der Melkanlage aufgrund der schweren Zugänglichkeit nicht erfasst, sodass die vorhandenen Bakterien nicht (vollständig) beseitigt werden können. Bei Bava et al. (2011) korrelierten Gesamtkeimzahlen in Rohmilch signifikant positiv mit jenen der Zitzenbecher aus Gummi, was die zuvor genannte These der durch Gummi-Oberfläche geförderten Ausbildung von Biofilmen unterstreicht. Auch Flach et al. (2014) schließen von hohen *Pseudomonas*-Keimzahlen schwer zu reinigender Stellen, wie die von ihnen u. a. beprobten Milchablassventile, auf ein höheres Risiko zur Biofilmbildung. Derartige Verschmutzungen waren im Rahmen der Hofbegehungen bereits visuell durch vorhandene weiß-gelbliche Reste an Dichtungen verschiedenster Probenahmestellen (s. o.) zu erkennen. Zudem sind die zuvor genannten Stellen mit *Pseudomonas*-Keimzahlen von über 4 log KbE/cm<sup>2</sup> mit einem geringen Aufwand zu erreichen, sodass seitens der Landwirte eine manuelle Nachreinigung oder ein Austauschen einzelner Dichtungen prinzipiell möglich wäre. In einer telefonischen Nachbesprechung mit den Landwirten wurde diese Empfehlung bereits ausgesprochen.

Das zur Reinigung der Melkanlage, des Kühltanks und des Equipments eingesetzte Wasser kann ebenfalls eine bakterielle Eintragsquelle darstellen (Perkins et al. 2009). Allerdings scheint der Eintrag von *Pseudomonas* spp. in Rohmilch über das Wasser anhand der in dieser Arbeit ermittelten *Pseudomonas*-Keimzahlen der untersuchten Wasserproben (Kalt-/ Warmwasser zur Tank-, Melksystemreinigung und Nachspülung des Melksystems) vernachlässigbar zu sein. Ausnahmen bildeten *Pseudomonas*-Keimzahlen von 2,57 und 2,43 log KbE/ml im Nachspülwasser des Melksystems bei Hof H4 und H7 sowie ein auffällig hoher *Pseudomonas*-Wert von 4,46 log KbE/ml bei Hof H2. Da alle anderen Wasser-Proben der genannten Höfe *Pseudomonas*-unauffällig waren, könnten in Bezug auf Hof H2, H4, und H7 eine zu niedrige Wassertemperatur und/oder eine falsch eingestellte Konzentration des Reinigungsmittels ursächlich für die ermittelten *Pseudomonas*-Werte sein. Die Konzentration des Reinigungsmittels ist mitunter von der Wasserhärte und der eingesetzten Wassermenge abhängig (Luttner 2016; Bremer et al. 2009). Die Auswirkung der Wassertemperatur ( $\geq 35$  °C) zur Reinigung des Melkgeschirrs zeigten Bava et al. (2011) durch signifikant niedrigere Keimzahlen an psychrotrophen Mikroorganismen in der Tankmilch sowie im Nachspülwasser der von ihnen untersuchten Anlage. Die drei genannten Erzeugerhöfe H2, H4 und H7 mit positivem *Pseudomonas*-Nachweis im Nachspülwasser des Melksystems gaben an mit zirkulierender Säure/Lauge zu reinigen. Bei dieser Reinigungsart werden saure und alkalische Detergenzien alternierend angewandt, wobei alkalische Reinigungsmittel häufiger eingesetzt werden. Alkalische Reiniger besitzen die Eigenschaft Fette zu verseifen und Proteine aufzuspalten, während Säuren mineralische Ablagerungen lösen (Binder 2022; Kakurinov 2014). Es ist möglich, dass die alternierende Anwendung der Reinigungsmittel vernachlässigt wurde und somit Ablagerungen entstanden sind, die als Nährboden für Bakterien wie *Pseudomonas* spp., dienen.

Auch bei den durch die Kriterien (s. Material und Methoden 4.2.1) als *Pseudomonas*-unauffällig eingeordneten Höfe H7 und H8A, wurden bei der einmalig durchgeführten Hofbegehung Gesamtkeimgehalte von 5,33 und 5,11 log KbE/ml und eine *Pseudomonas*-Keimzahl von 5,75 log KbE/ml (H7) in Rohmilch ermittelt. Daraus wird ersichtlich, dass es trotz guter Hygienepraktiken in Folge eines und mehrerer Schwachstellen sporadisch zu einem erhöhten Keimeintrag, u. a. mit *Pseudomonas* spp., in Rohmilch kommen kann.

## **2 Charakterisierung von *Pseudomonas* spp. hinsichtlich der Biofilmbildung und der Peptidaseaktivität**

### **2.1 Analyse der Biofilmbildung von *Pseudomonas* spp.**

Biofilme stellen in der Lebensmittelindustrie eine potentielle (Re-) Kontaminationsquelle von Bakterien dar und können so zum Verderb des Produkts beitragen (Shi und Zhu 2009). Verderbserreger in der Lebensmittelkette „Milch“, u. a. *Pseudomonas* spp., sind auf allen Stufen der Milchproduktion zu finden (Vlková et al. 2008; Eneroth et al. 2000; Cleto et al. 2012; Flach et al. 2014). Die Untersuchungen zur Biofilmbildung in Mikrotiterplatten mittels Kristallviolett-Assay nach O'Toole (2011) sollten zeigen inwieweit diese Eigenschaft bei *Pseudomonas*-Isolaten unter Kühltemperaturen in Milchmedium verbreitet ist. Nach 6-tägiger Inkubation bei 6 °C stellte sich die Biofilmbildung in Mikrotiterplatten als stamm- und speziesspezifisch sowie als von der Konzentration des Milchmediums abhängig dar. Frühere Studien (Rossi et al. 2016; Flach et al. 2014; Cleto et al. 2012) belegten die Biofilmbildung von *Pseudomonas*-Isolaten aus milchverarbeitenden Betrieben in Mikrotiterplatten und deren speziesspezifisches Adhäsionsvermögen. Allerdings entspricht das Adhäsionsvermögen auf Kunststoff-Oberflächen (Mikrotiterplatten) nur bedingt den realen Bedingungen (Cleto et al. 2012; Flach et al. 2014), weshalb neben der Quantifizierung der Biofilmmasse auch die Keimzahl im Biofilm (Ban und Kang 2016) in weiteren Untersuchungen auf Edelstahl bestimmt wurde. Die Versuche auf Edelstahl stellten ebenfalls eine speziesspezifische und von der Konzentration des Milchmediums abhängige Biofilmbildung dar und zeigten die Fähigkeit zur Ausbildung eines Biofilms von Pseudomonaden in Milchmedium auf diesem Material. Auch Teh et al. (2012) belegten in ihrer Studie die speziesspezifische Biofilmbildung auf Edelstahl-Oberfläche unter Verwendung rekonstituierter Magermilch. Speziesspezifische Biofilmbildung kann auf Strukturen der Zelloberfläche, wie Flagellen und Fimbrien, sowie auf Hydrophobizität der Zelloberfläche und Mortalität der Zelle zurückzuführen sein (Rossi et al. 2018; Katsikogianni und Missirlis 2004; Donlan 2002). Dixon et al. (2018) stellten in ihrer Studie eine Ca<sup>2+</sup>-Ionen-abhängige Biofilmbildung von Isolaten aus Molkereiabwasser im Mikrotiterplatten-Format fest. Dabei wurde eine höhere Biofilmbildung im Medium mit geringeren Konzentrationen bis zu 20 mM an Ca<sup>2+</sup>-

Ionen gezeigt. Diese Beobachtung passt zu den Ergebnissen dieser Arbeit, da ebenfalls ein signifikant höheres Adhäsionsvermögen auf Kunststoff (Mikrotiterplatten) in 10 und 50 %igen als in 100 %igen Milchmedium nachzuweisen war und im verdünnten Milchmedium (10 und 50 %) von einer geringeren Konzentration an  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen auszugehen ist. Abgeleitet von der Konzentration ionischen Calciums in Rohmilch zwischen 2,78 und 4,24 mM (Lewis 2011) liegen die in H-Milch vorliegenden  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen jedoch unter jenen, welche Dixon et al. (2018) untersuchten. Guvensen et al. (2012) wiesen ebenfalls eine  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Biofilmbildung von *Sphingomonas paucimobilis* nach. Allerdings wurde eine höhere Biofilmbildung in  $\text{Ca}^{2+}$ -haltigem Medium mit Konzentrationen bis 0,25 mM auf Edelstahl-Oberfläche im Vergleich zu Medium, dem kein  $\text{Ca}^{2+}$  zugesetzt wurde, festgestellt. Die Erhöhung der Hydrophobizität der Zelloberfläche könnte ein weiterer Grund für das verbesserte Anheftungsvermögen sein (Guvensen et al. 2012; Song und Leff 2005). Auch die Fähigkeit zur Ausbildung von Biofilmen als Folge einer Stressantwort, u. a. aufgrund eines limitierten Nährstoffangebots, wurde in einigen Studien beobachtet (Lories et al. 2020; Thomason et al. 2012) und könnte ein weiterer Grund für die Biofilmbildung im Medium mit geringerem Milchanteil (10 und 50 %) darstellen. *Pseudomonas*-Isolate, die unabhängig von der Wachstumsoberfläche in keinem der drei Milchmedien Biofilmbildung aufwiesen, besitzen womöglich nur schwach exprimierte oder fehlende Biofilm-relevante Gene (Ozer et al. 2021; O'Toole und Kolter 1998). Molekularbiologische Expressionsstudien könnten diese Hypothese überprüfen. Für die *in vitro* Versuche in dieser Arbeit wurde als Wachstumsmedium H-Milch (3,5 % Fett) verwendet, um möglichst nah an die Nährstoffverfügbarkeit von Rohmilch zu gelangen und eine Reproduzierbarkeit des Mediums zu ermöglichen. Nach Rodriguez-Rodriguez et al. (2001) ist der Calcium-Gehalt in Rohmilch mit  $1653 \pm 207$  mg/l höher als in thermisch behandelte Milch ( $1309 \pm 62$  mg/l), wobei nur 10 % des Calciums als Ionen vorliegen (Lewis 2011). Es gibt Studien, die auf den Einfluss zweiwertiger Kationen, wie  $\text{Ca}^{2+}$ , durch *Divalent Cation Bridging* (DCB) auf die Biofilmentwicklung hinweisen (Somerton et al. 2015). Darunter ist die Bindung zwischen zweiwertiger Kationen und negativ geladenen Abschnitten der EPS zu verstehen, wodurch die Gesamtstabilität des Biofilmgerüsts verbessert werden kann (Teixeira und Oliveira 1999; van Hoogmoed et al. 1997; Dunne und Burd 1992). Es ist unklar, ob es durch die Wahl von H-Milch als Wachstumsmedium zu einer Über- oder Unterschätzung des Potentials zur Biofilmbildung in Rohmilch kam. Hierfür könnte untersucht werden, ob eine positive Korrelation zwischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen und anderer Calcium-Fractionen (bspw. gebunden an Casein-Micellen als Calcium-Phosphat, an Citrat gebundenes  $\text{Ca}^{2+}$  im Serum) vorliegt.

In vergleichenden Versuchen wies die Biofilmbildung von fünf ausgewählten *Pseudomonas*-Isolaten auf Edelstahl-Oberfläche niedrigere Extinktionswerte als die Messungen in 96-Well-Mikrotiterplatten aus Kunststoff auf, was auf eine höhere Biofilmmasse auf Kunststoff- als auf Edelstahl-Oberfläche schließen lässt. Auch die Untersuchungen zur Quantifizierung der

Biofilmmasse auf Edelstahl- und Gummi-Oberfläche ergaben ein isolatspezifisches und oberflächenabhängiges Vermögen zur Biofilmbildung. Eine oberflächenabhängige Biofilmbildung, u. a. von *Pseudomonas* spp., wurde bereits nachgewiesen (Mahto und Das 2021; Lee et al. 2015; Oh et al. 2009; Teixeira et al. 2005; Joseph et al. 2001; Oliveira et al. 1994). Viele Studien zeigten eine höhere Biofilmbildung auf hydrophoben, nicht-polaren Oberflächen, wie Teflon und andere Kunststoffe, als auf weniger hydrophoben Oberflächen, zu denen Materialien wie Glas und Metalle (u. a. Stahl) zählen (Joseph et al. 2001; Sinde und Carballo 2000; Bendinger et al. 1993). Laut Teixeira et al. (2005) zählte Stahl (rostfreies Edelstahl Nr. 316 und Nr. 304) sowie Gummi anhand der negativ gemessenen freien Adhäsionsenergie zwischen Bakterienzelle und Material in wässrigem Medium zu den hoch hydrophoben Materialien. Sie gaben zudem an, dass die Oberflächenbehandlung bei Stahl Einfluss auf dessen hydrophobe Eigenschaft hat (Teixeira et al. 2005). Neben der Art des Materials hat die Inkubationstemperatur ebenfalls einen Einfluss auf die Bildung von Biofilmen (Han et al. 2016; Liu et al. 2015). In dieser Arbeit wurde eine Kühltemperatur von 6 °C zur Durchführung der Biofilm-Analysen von *Pseudomonas* spp. gewählt, da Rohmilch bei täglicher Abholung gemäß Verordnung (EG) Nr. 853/2004 unverzüglich auf  $\leq 8$  °C und bei nicht täglicher Abholung auf  $\leq 6$  °C gekühlt werden muss. Obwohl eine stärkere Biofilmbildung von *Pseudomonas* spp. aufgrund des Wachstumsoptimums bei mesophilen Temperaturen wahrscheinlich ist (Andreani und Fasolato 2017), ergaben Untersuchungen zum Wachstumsverhalten von *Pseudomonas fluorescens* und *Pseudomonas extremaustralis* eine gesteigerte Produktion von extrazellulären polymeren Substanzen (EPS) und stärkere Biofilmbildung bei 4 °C gegenüber 30 °C und bei 10 °C gegenüber 28 °C (Aswathanarayan und Vittal 2014; Tribelli und López 2011). Die Ergebnisse von Aswathanarayan und Vittal (2014) und Tribelli und López (2011) sowie der vorliegenden Arbeit belegen die Fähigkeit zur Ausbildung von Biofilmen von *Pseudomonas* spp. bei Kühltemperaturen.

Die zum Teil großen Standardabweichungen der Extinktionswerte zur Quantifizierung der Biofilmmasse mittels Kristallviolett-Assay lassen auf eine schwierige Reproduzierbarkeit der Ergebnisse bei dieser Methodik schließen. Diese Problematik ist bereits bekannt, weshalb nach relevanten Einflussfaktoren geforscht wird (Lewandowski et al. 2004). Bei der Versuchsdurchführung des Kristallviolett-Assays mit Edelstahl- und Gummi-Plättchen sind jedoch Faktoren aufgefallen, die schwankende Extinktionswerte erklären könnten. Zum Beispiel bleibt nach dem Waschen des mit Kristallviolett-Lösung eingefärbten Edelstahl- oder Gummi-Plättchens Farbe an der hierfür eingesetzten Pinzette zurück, welche auf dem Plättchen anheftet, sobald es zum Trocknen abgelegt wurde. Darüber hinaus kann sich durch Arbeiten mit einer Pinzette beim Greifen des Plättchens stets Biofilmmaterial ablösen, was somit nicht angefärbt und quantifiziert wird. Zur Optimierung der Methodik ist daher eine Pinzette mit extra-schmalen Greifer zu empfehlen.

Die Durchführung weiterer Untersuchungen zur Bildung von Multi-Spezies-Biofilmen im Kontext „Milch“ sollte zukünftig erfolgen, da die in der Lebensmittelindustrie vorkommenden Biofilme aus mehreren Bakteriengattungen und -spezies bestehen (Flach et al. 2014). Oliveira et al. (2019) ermittelten eine hohe Biodiversität in 10-tägigen Rohmilch-assoziierten Multi-Spezies-Biofilmen bei 7 °C auf Edelstahl-Oberfläche. Dabei dominierten Bakterien der Klasse Gammaproteobacteria und Bacilli. Die Fähigkeit zur Biofilmbildung vieler Bakterien der beiden Klassen, wie *Serratia* spp., *Staphylococcus* spp., *Stenotrophomonas* spp., *Enterococcus* spp. und *Pseudomonas* spp., wurde bereits untersucht (Rosado de Castro et al. 2017; Cleto et al. 2012). Im Vergleich zu Mono-Spezies-Biofilmen weisen Dual- und Multi-Spezies-Biofilme unter anderem eine höhere Resistenz gegenüber antimikrobiellen Mitteln auf (Schwering et al. 2013), hemmen das Wachstum oder verbessern das Überleben pathogener Mikroorganismen (Ica et al. 2012; Guillier et al. 2008). Insbesondere bei Multi-Spezies-Biofilmen spielt, neben der Bildung von EPS und Biofilm-relevanter Gene sowie weiterer Faktoren, die Zell-zu-Zell-Kommunikation über *Quorum Sensing* eine zentrale Rolle (Li et al. 2021). Bei dieser Art der Kommunikation erfolgt die Sekretion und Detektion von Signal-Molekülen, wie N-Acylhomoserinlactone (AHLs), Autoinducer-2-Moleküle (AI-2) und autoinduzierte Peptide (AIP) (Skandamis und Nychas 2012; West et al. 2006). Bei der Bildung gemischter Biofilme kann konkurrierendes oder synergistisches Verhalten auf Intra- und Inter-Speziesebene beobachtet werden (Li et al. 2021; Alonso et al. 2020). Dabei ist *Quorum Sensing* bei der Biofilmbildung, -reifung und -ablösung von Bedeutung und reguliert die Zelldichte sowie die metabolische Aktivität reifer Biofilme, um sich u. a. an Nährstoffbedarf und -verfügbarkeit anzupassen (Yuan et al. 2018b).

## 2.2 Rasterelektronenmikroskopie von Biofilmen

Die rasterelektronenmikroskopischen (REM) Aufnahmen der Multi-Spezies-Biofilme in Rohmilch auf Edelstahl- und Gummi-Oberfläche zeigten die Anordnung einzelner Zellen in „Biofilminseln“ und im „Biofilmrasen“. Dabei wiesen die REM-Aufnahmen auf ein temperaturspezifisches Biofilm-Wachstum auf Edelstahl- und Gummi-Oberfläche, mit ausgeprägter Biofilmbildung bei 20 °C, hin. Die ermittelten Keimzahlen (s. Ergebnisse 2.2.1.2) der bei 20 °C inkubierten Rohmilch-Biofilme im Vergleich zur Inkubation bei 6 °C stimmten mit dieser Beobachtung überein. REM-Aufnahmen der Mono-Spezies-Biofilme von *Pseudomonas* spp. in 100 %igem Milchmedium zeigten speziesabhängige morphologische Unterschiede. Daraus ist auf eine speziespezifische Biofilmbildung und Ausprägung der Biofilm-Matrix zu schließen, die bereits durch mehrere Analysen mittels Kristallviolett-Assay beobachtet wurde (Rossi et al. 2018; Flach et al. 2014; Cleto et al. 2012). Außerdem befinden sich in Rohmilch eine Vielzahl an Mikroorganismen, deren Vermögen zur Biofilmbildung unbekannt ist (Oliveira et al. 2019). Zukünftig von Interesse sind

daher rasterelektronenmikroskopische Analysen von Multi-Spezies-Biofilmen bestehend aus Biofilm-produzierenden Stämmen und solchen ohne dieses Charakteristikum, um Unterschiede in der Ausbildung der EPS bzw. der Biofilm-Matrix analysieren zu können.

Extrazelluläre Substanzen, deren Erscheinung als glatt, netzartig-filamentös, gelartig, aber auch als granulatartig beschrieben werden (Dohnalkova et al. 2011; Westall et al. 2000), konnten in den REM-Aufnahmen kaum beobachtet werden. Daraus könnte auf eine schwach ausgeprägte Biofilm-Matrix bei den Rohmilch-assoziierten Multi-Spezies-Biofilmen geschlossen werden. Möglicherweise lagerten sich auch Casein-Micellen an die filamentöse Biofilm-Matrix an, sodass diese in den Aufnahmen nicht sichtbar war. Dabei ist zu berücksichtigen, dass die REM-Analytik von Biofilmen aktuell in Kooperation mit dem Institut für Lebensmittel- und Bioverfahrenstechnik des Max Rubner-Instituts optimiert wird, sodass dies Einfluss auf die Aussagekraft zukünftiger Aufnahmen haben kann. Alternativ zur klassischen REM-Analyse im Hochvakuum, kann die sog. Niederdruck-Elektronenmikroskopie eingesetzt werden. Mittels ESEM-Modus (engl. *environmental scanning electron microscope*) entfällt eine Entwässerung und Kritisch-Punkt-Trocknung der Proben (s. Material und Methoden 5.3.2), wodurch unerwünschte Trocknungs-Artefakte wie strukturelle Veränderungen der Biofilm-Matrix vermieden werden. Im ESEM-Modus wird die Probe im Niedervakuum und bei Kühltemperaturen zwischen 2 und 4 °C in einer Wasserdampf-atmosphäre analysiert, was den natürlichen Umweltbedingungen sehr nahe kommt. Dadurch ist eine hydratisierte Probe gewährleistet und auch die stark hydratisierten EPS-Strukturen lassen sich in den Aufnahmen darstellen (Flemming 2016; Abed et al. 2012; Fedel et al. 2007). Allerdings sind Zellunterscheidungen durch das semi-transparente Erscheinungsbild der EPS nur begrenzt möglich, welche wiederum durch die REM-Analyse möglich sind (Fedel et al. 2007). Zukünftig können kombinierte Biofilm-Analysen mittels REM- und ESEM-Modus durchgeführt werden, um die Vorteile beider Mikroskopiertechniken zu nutzen. Weiterhin stellt die konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM) kombiniert mit Fluoreszenzfärbung ein beliebtes Instrument dar, um strukturelle und funktionelle Informationen über den Aufbau der Biofilm-Matrix zu erhalten. Durch Fluorophor-konjugierte Lektine können EPS-Strukturen lokalisiert und diese u. a. mit Hilfe einer Bildbearbeitungssoftware quantifiziert werden (Reichhardt und Parsek 2019). Der Gesamtkeimgehalt für die Multi-Spezies-Biofilme eingesetzte Rohmilch einer Milchtankstelle in Schleswig-Holstein betrug 6 log KbE/ml und lag somit über dem Richtwert für die Keimzahl in roher Kuhmilch gemäß RohmilchGütV (2021) von  $\leq 5$  log KbE/ml. Nicht klar ist, ob zum Zeitpunkt der Abholung schon tagesfrische Rohmilch oder sich noch Milch vom Vortrag in der Milchtankstelle befand. Bekannt ist, dass der mikrobielle Status der Milchausgabeautomaten nicht immer einwandfrei ist (Böhnlein et al. 2021). Zur Einschätzung der Hygienebedingungen wurde der mikrobielle Status neben der *Pseudomonas*-Keimzahl anhand des Keimgehalts von *Enterobacteriaceae*, *E. coli* sowie Hefen und Schimmel der eingesetzten Rohmilch ermittelt. Dabei lagen die Keimzahlen für *Pseudomonas* spp. (4,5 log KbE/ml), *Enterobacteriaceae* (4,9 log

KbE/ml), Hefen und Schimmelpilze (3,5 log KbE/ml) der untersuchten Rohmilch über den Durchschnittswerten, welche Böhnlein et al. (2021) für die genannten Keimgruppen in 110 Rohmilchproben von Milchtankstellen ermittelten. In genannter Studie wurden Keimzahlen für *Pseudomonas* spp. von  $3,9 \pm 1,3$  log KbE/ml, für *Enterobacteriaceae* von  $2,7 \pm 1,2$  log KbE/ml sowie für Hefen und Schimmelpilze von  $3,1 \pm 0,9$  log KbE/ml und  $1,5 \pm 0,8$  log KbE/ml ermittelt (Böhnlein et al. 2021). Der Gehalt an *E. coli* der in dieser Arbeit verwendeten Rohmilch war mit 4,3 log KbE/ml im Vergleich zu Böhnlein et al. (2021) mit einem Durchschnitts-Keimgehalt von  $1,4 \pm 0,8$  log KbE/ml und im Vergleich zu Pyz-Łukasik et al. (2015) mit Werten zwischen 0,7 und 2,0 log KbE/ml sehr hoch. Coliforme Keime, zu denen *E. coli* zählt, können Folge eines unzureichenden Hygienestatus der Tiere, der Umweltbedingungen oder einer bakteriellen Kontamination von Melkanlage und -ausrüstung sein (Murphy und Boor 2000).

Die Gesamtkeimzahlen der Rohmilch-assoziierten Multi-Spezies-Biofilme auf Edelstahl- und Gummi-Oberfläche bei 6 °C wiesen auf temperaturspezifisches Wachstum hin. Während für *Pseudomonas* spp. und *Enterobacteriaceae* Keimzahlen von  $5,1 \pm 0,1$  und  $5,8 \pm 0,2$  log KbE/cm<sup>2</sup> auf Edelstahl-Oberfläche und Keimzahlen von  $4,4 \pm 0,2$  und  $4,8 \pm 0,6$  log KbE/cm<sup>2</sup> auf Gummi-Oberfläche ermittelt wurden, zeigten *Escherichia coli* sowie Hefen und Schimmelpilze bei 6 °C auf beiden Oberflächen wenig (*Escherichia coli*:  $< 1$  log KbE/cm<sup>2</sup>) bzw. kein Wachstum. Das dominierende Wachstum psychrotropher Bakterien in Rohmilch, zu denen *Pseudomonas* spp. und Stämme der Gattung *Enterobacteriaceae* zählen, bei Kühltemperaturen ist bekannt und stellt durch den enzymatisch bedingten Verderb eine Herausforderung für die Milchindustrie dar (Martins et al. 2018; Machado et al. 2017; Neubeck et al. 2015; Samarzija et al. 2012). Yuan et al. (2018a) untersuchten und belegten das Vermögen zur Biofilmbildung psychrotropher Bakterien (u. a. *Pseudomonas azotoformans* und *Serratia quinivorans*), wohingegen Teh et al. (2014) das Risiko der Biofilme als Quelle für Verderbnis-Enzyme, wie Proteasen und Lipasen, hervorhoben. Abhängig vom mikrobiellen Status der Rohmilch ist eine gesteigerte Biofilmbildung möglich, wodurch der Anteil proteolytischer Bakterien insbesondere bei Kühltemperaturen steigen kann (Oliveira et al. 2019). Das Wachstum von *Escherichia coli* sowie Hefen und Schimmelpilzen in Rohmilch-assoziierten Multi-Spezies-Biofilmen mit 6-tägiger Inkubation bei 20 °C wurde mit Keimzahlen von  $3,6 \pm 0,6$ ;  $3,9 \pm 0,6$  und  $3,1 \pm 0,5$  log KbE/cm<sup>2</sup> auf Edelstahl-Oberfläche und mit Keimzahlen von  $4,4 \pm 0,1$ ;  $4,1 \pm 0,3$  und  $3,2 \pm 0,1$  log KbE/cm<sup>2</sup> auf Gummi-Oberfläche in dieser Arbeit belegt. Die *Pseudomonas*-Keimzahlen nahmen in den untersuchten Rohmilch-assoziierten Multi-Spezies-Biofilmen bei der Inkubation bei 20 °C ab. Dabei könnte die mesophile Temperatur das Wachstum anderer, mesophiler Gattungen, wie *Escherichia coli*, Hefen und Schimmelpilzen, begünstigt haben, wodurch bei Adhäsion an Edelstahl- oder Gummi-Oberfläche ein Konkurrenzdruck entstanden ist. Die Eigenschaft zur Biofilmbildung mesophiler Bakterien, wie *Bacillus licheniformis* und *Geobacillus stearothermophilus*, wurde bereits untersucht (Sadiq et al. 2017). Ein kulturunabhängiges Verfahren zur Ermittlung der

Zusammensetzung von Multi-Spezies-Biofilmen auf unterschiedlichen Oberflächen stellt die Sequenzierung des Biofilm-Mikrobioms dar (Oliveira et al. 2019). Durch 16s rDNA Amplikon-Sequenzierung können Sequenzen in sog. OTUs (*operation taxonomic units*) gruppiert und anhand deren Zusammensetzung oberflächenabhängige Biofilm-Morphologien analysiert werden.

### 2.3 Charakterisierung von *Pseudomonas* spp. hinsichtlich der Peptidaseaktivität in Biofilmen

Für eine erste Charakterisierung der Peptidaseaktivität von *Pseudomonas*-Isolaten aus Rohmilch wurde ein Screening auf 1 %igem Magermilch-Agar durchgeführt. Peptidaseaktive Isolate lysierten während der Inkubation von 6 Tagen bei 6 °C das Casein im Magermilch-Agar. Von den untersuchten 38 Stämmen waren 53 % (20/38) bzw. 10 % (4/38) stark bzw. sehr stark peptidaseaktiv. 29 % (11/38) der Isolate wiesen keine Peptidaseaktivität auf. Viele Studien belegen bereits die Fähigkeit zur Peptidasebildung von Rohmilch-assoziierten *Pseudomonas*-Isolaten bei Kühltemperaturen (Ribeiro et al. 2018; Meng et al. 2017; Baur et al. 2015a; Wang und Jayarao 2001). Meng et al. (2017) untersuchten das proteolytische Verderbspotential von 143 *Pseudomonas*-Isolaten aus Rohmilch tierischen Ursprungs auf 10 %igem Milch-Agar, wovon sich 72,7 % der Isolate bei 7 °C proteolytisch aktiv verhielten. Dies ist vergleichbar mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit, da 71,0 % der untersuchten *Pseudomonas*-Isolate Peptidasebildner waren und somit das Verderbspotential von Pseudomonaden bei Kühltemperaturen in Milch gezeigt wurde. Meng et al. (2017) untersuchten neben der Peptidaseaktivität bei 7 °C auch weitere Kühltemperaturen. Die Anzahl der peptidaseaktiven Isolate (in Klammer) bei 2 °C (28,0 %), 4 °C (51,8 %) und 10 °C (71,3 %) verdeutlichen die Relevanz der Einhaltung von Kühltemperaturen, da sich die Anzahl an peptidaseaktiven *Pseudomonas*-Stämmen mit niedrigen Kühltemperaturen reduzierte. Es ist jedoch darauf hinzuweisen, dass mit einem abnehmenden *Pseudomonas*-Gehalt nicht „per se“ auch die Stärke der Enzymaktivität verringert wird und daher auch ein entsprechendes Verderbsrisiko bei sehr niedrigen Kühltemperaturen bestehen bleibt.

Maier et al. (2020) analysierten die Korrelation zwischen der Organisation des *aprX-lipA2*-Operons, welches die Metallopeptidase AprX codiert, und der Auswirkung auf das proteolytische Verderbspotential mittels Agar-Diffusions-Assay von 129 *Pseudomonas*-Typstämmen. Dabei waren 33,3% dieser *Pseudomonas*-Stämme mit dem Operon-Typ 1 (*aprXIDEFprtABlipA2*) hoch proteolytisch und wiesen im Mittel signifikant höhere Werte gegenüber *Pseudomonas*-Stämmen, die den Operon-Typen 2 (*aprXIDEFlipA2*), 3 (*aprXIDEF//prtAB*) und 4 (*aprXIDEFprtABlipA12*) zuzuordnen waren, auf (Maier et al. 2020). Sollte das sequenzierte Bakteriengenom vorliegen,



eignet sich die Betrachtung der *aprX-lipA2*-Operon-Anordnung zukünftig als weitere Screening-Methode bei der Auswahl Peptidase-produzierender *Pseudomonas*-Stämme.

Die Untersuchungen zur Bestimmung der Peptidaseaktivität mittels Fluorescamin-Assay zeigten im Rahmen dieser Arbeit die Bildung von Peptidasen in *Pseudomonas*-Biofilmen bei Kühltemperatur. Die Analysen ergaben unter den untersuchten Wachstumsbedingungen im Mittel eine signifikant höhere Peptidaseaktivität Biofilm-assoziiierter Zellen gegenüber planktonischen Zellen (s. Abbildung 25). So wurde bspw. eine 190-fach höhere Aktivität der Biofilm-assoziierten Zellen von *P. proteolytica* L1-105 im Vergleich zur planktonischen Wuchsform ermittelt. Eine höhere Enzymaktivität in Biofilmen im Vergleich zur Flüssigkultur konnten auch andere Studien belegen (Liu et al. 2015; Teh et al. 2012; Gamarra et al. 2010; Frølund et al. 1995). So wiesen schon Frølund et al. (1995) und Gamarra et al. (2010) höhere enzymatische Aktivitäten in Biofilmen aus Schlamm bzw. von *Aspergillus niger* als in deren planktonischen Wuchsformen nach. Neben der signifikant höheren Peptidaseaktivität im Biofilm im Vergleich zur Flüssigkultur von *Pseudomonas lundensis* aus Schweinefleisch, wiesen Liu et al. (2015) eine Korrelation zwischen Peptidaseaktivität und der Masse an gebildeten Biofilm nach. Teh et al. (2012) kamen in ihren Untersuchungen zur Peptidaseaktivität zwischen Biofilmen auf Edelstahl und planktonischer Zellen Gram-positiver und -negativer Bakterienstämme in Magermilch zur gleichen Feststellung wie in der vorliegenden Arbeit und wiesen ebenfalls eine stammspezifische Peptidaseaktivität Biofilm-assoziiierter und planktonischer Zellen nach. Teh et al. (2013) zeigten in einer weiteren Studie auch eine höhere lipolytische Aktivität Biofilm-assoziiierter Zellen von *Staphylococcus aureus*. Erst vor kurzem veröffentlichten Elegbeleye und Buys (2022) Forschungsergebnisse zum proteolytischen und lipolytischen Verderbspotential von *Bacillus subtilis* und *Bacillus velezensis* in Biofilmen. Neben des Biofilm-assoziierten stammspezifischen Verderbspotentials, ergaben die Analysen ein höheres proteolytisches und lipolytisches Verderbsrisiko bei *Bacillus*-Isolaten aus Milch mit geringer Biofilm- und Komplexbildung auf Edelstahl-Oberfläche im Vergleich zu starken Biofilmbildnern. Bei schwachen biofilmbildenden *Bacillus*-Isolaten ohne 3-dimensionaler Komplexbildung hypothetisierten Elegbeleye und Buys (2022) fehlende Sauerstoff- und Nährstoffgradienten, die sonst die Bildung metabolisch ruhender Persisterzellen und Sporen ermöglichen. Demnach können in schwach ausgeprägten Biofilmen mit geringer Komplexbildung hauptsächlich aktive Zellen mit Enzym-sekretierender Eigenschaft vorliegen.

Ein Grund für die höhere Enzymaktivität Biofilm-assoziiierter Zellen im Vergleich zur planktonischer Wuchsform in Flüssigkultur kann die unterschiedliche Expression Enzym-codierender Gene sein (Gamarra et al. 2010; Wang und Chen 2009; Oosthuizen et al. 2001). Auch die Folge einer Stressantwort, wobei die Akkumulation der Enzyme innerhalb des Biofilms als eine Art Überlebensmechanismus dient, kann zur höherer Enzymaktivität von Biofilm-assoziierten Zellen führen (Spector und Kenyon 2012; Thomason et al. 2012). Ursache einer

Stressantwort kann unter anderem ein niedriges Nährstoffangebot sein, welche Teh (2013) anhand der erhöhten lipolytischen Aktivität Biofilm-assoziiierter Zellen im Vergleich der Aktivität bei höherem Nährstoffangebot feststellte. Da in den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit zur Charakterisierung der Peptidaseaktivität H-Milch (3,5 % Fett), also 100 %iges Milchmedium, eingesetzt wurde, besteht die Möglichkeit einer höheren Enzymaktivität in verdünntem Milchmedium, wie 10 und 50 %igem. Zudem ist die extrazelluläre Produktion von Peptidasen psychrotropher Mikroorganismen unter anderem von ernährungsphysiologischen und chemischen Parametern wie Stickstoff- und Kohlenstoffquellen, anorganischen Salzen, der Sauerstoffkonzentration und dem Vorhandensein leicht verstoffwechselbarer Zucker abhängig. Darüber hinaus nehmen weitere Faktoren wie pH-Wert, Temperatur, Inkubationszeit und Inokulationsdosis auf die Peptidaseproduktion Einfluss (Ribeiro et al. 2018; Kasana 2010; Secades et al. 2003).

Es ist bereits bekannt, dass *Quorum Sensing* bei den unterschiedlichen Stadien der Biofilmbildung eine Rolle spielt. Es gibt zudem Hinweise, dass das *Quorum Sensing*-System der Bakterien die Enzymaktivität mitreguliert und somit einen Einfluss auf das bakterielle Verderbnispotential nimmt (Yuan et al. 2018b; Liu et al. 2007). So stellten Liu et al. (2007) eine niedrigere Peptidaseaktivität anhand der verringerten Expression des Peptidase-Gens *aprX* von *Pseudomonas fluorescens* in AHL-armer Umgebung fest. Neben *Quorum Sensing* beeinflussen Faktoren wie Jahreszeit, Temperatur, Eisengehalt und *Phase Variation* die Enzymproduktion der Bakterien (Teh et al. 2014; Marchand et al. 2009a; Maunsell et al. 2006; Nicodème et al. 2005; van den Broek et al. 2005; Woods et al. 2001).

Die in vorliegender Arbeit ermittelten Ergebnisse zur Peptidaseaktivität Biofilm-assoziiierter Zellen auf Gummi- im Vergleich zur Edelstahl-Oberfläche zeigten bei den beiden untersuchten *Pseudomonas*-Stämmen höhere Aktivitäten auf Gummi-Oberfläche. Bei *P. proteolytica* L1-105 und *P. protegens* L1-101 wurden zuvor signifikant höhere Biofilmmassen in 100 %igem Milchmedium auf Gummi- im Vergleich zur Edelstahl-Oberfläche ermittelt (Abbildung 16). Dies kann auf einen Zusammenhang zwischen dem Vermögen zur Biofilmbildung und der Produktion von Peptidasen hinweisen. In einem umfangreicheren Studiendesign mit einer höheren Anzahl an Rohmilch-assoziierten *Pseudomonas*-Stämmen sollte diese Hypothese in weiteren Arbeiten analysiert werden.

Zudem ist die Relevanz von Multi-Spezies-Biofilmen zu berücksichtigen, da Biofilme natürlicherweise aus mehreren Bakteriengattungen zusammengesetzt sind (Jahid und Ha 2014; Elias und Banin 2012). Daher können auch Bakterienisolate mit schwach ausgeprägtem oder fehlendem Vermögen zur Biofilmbildung in die Matrix stark biofilmbildender Bakterien eingeschlossen werden (Cleto et al. 2012). So wiesen Teh et al. (2012) keine proteolytische Aktivität von *Pseudomonas fragi* und *Bacillus licheniformis* in separaten Mono-Biofilmen nach, sondern erst als diese gemeinsam im Biofilm wuchsen. Schon Abate et al. (1999) konnten eine

höhere Produktion amylytischer Enzyme in der Co-Kultur von *Bacillus amyloliquefaciens* und *Zymomonas mobilis* gegenüber deren Reinkulturen nachweisen.

Für die Bestimmung der Peptidaseaktivität von *Pseudomonas*-Stämmen wurde in dieser Arbeit ein Screening auf Magermilch-Agar und die Quantifizierung mittels Fluorescamin-Assay herangezogen. Ein Vorteil des Screenings auf Magermilch-Agar zur Bestimmung der Peptidaseaktivität war die visuelle Darstellung der Enzymaktivität als Lysezone und eine simple Durchführung der Methodik. Ein Nachteil dieser Methode ist die Kultivierung der Rohmilch-Isolate auf festem Nährboden. Dies kann zu einem anderen Wachstumsverhalten als die Kultivierung in Flüssigkultur, wie Milch, führen und entspricht somit nicht der Lagerung einer Suspension, wie Rohmilch. Zudem kann u. a. die Säurebildung aus Laktose durch Glykosid-Hydrolasen, welche zur Casein-Hydrolyse im Nährboden führt, zu falsch positiven Ergebnissen auf diesem Agar führen (Morris et al. 2012). Die Bestimmung der Peptidaseaktivität von planktonischen Zellen mittels Fluorescamin-Assays in Flüssigkultur hingegen kam den Realbedingungen näher.

Während einer 4- bis 6-monatigen Lagerung untersuchten Stoeckel et al. (2016) die durch *Pseudomonas* spp. hervorgerufenen Produktdefekte von (mit und ohne mit *Pseudomonas* spp. gespickter) UHT-Milch, um Korrelationen zwischen der Peptidaseaktivität und des Produktverderbs zu analysieren. Ab einer Peptidaseaktivität von  $0,03 \pm 0,00$  pkat/ml (= 30 fkat/ml) konnte als erste Verderberscheinung die Bildung von Bitterstoffen, gefolgt von Partikelbildung, beobachtet werden. Ein Aufrahmen wurde bei einer Peptidaseaktivität von  $\geq 0,07$  pkat/ml (= 70 fkat/ml) nach 2-4 Monaten festgestellt. Anschließend folgte die Bildung von Protein-Sediment und zuletzt die Gelierung der Milch ab einer Peptidaseaktivität von 0,16 pkat/ml (= 160 fkat/ml) und einer Lagerzeit ab 4 Monaten (Stoeckel et al. 2016). Ein Vergleich der Studienergebnisse von Stoeckel et al. (2016) und der Ergebnisse dieser Arbeit zur Peptidaseaktivität von Biofilm-assoziierten und planktonischen Zellen von *Pseudomonas* spp. ist nicht möglich, da die Studiendesigns trotz gleicher Testmethode (Fluorescamin-Assay) zu sehr voneinander abweichen. Es ist daher von Interesse, kombinierte Untersuchungen zur Biofilmbildung von *Pseudomonas* spp. auf Edelstahl- oder Gummi-Oberfläche und darauffolgenden Lagerversuchen mit von Biofilm-assoziierten und planktonischen Zellen sekretierten Peptidasen, ähnlich zu Stoeckel et al. (2016), durchzuführen.

Aufgrund der Ergebnisse der quantifizierten Biofilmmasse und Peptidaseaktivität Biofilm-assoziiierter und planktonischer Zellen von *Pseudomonas* spp. auf Edelstahl- und Gummi-Oberfläche im Medium Milch wurden *P. proteolytica*, *P. protegens*, *P. lactis* und *P. gessardii* als potentielle „Problemkeime“ mit erhöhtem Verderbnispotential für die milchverarbeitende Industrie identifiziert. In weiterführenden Untersuchungen ist daher die Analyse der biofilmbildenden Eigenschaft und das enzymatisch bedingte Verderbnispotential von Multi-Spezies-Biofilmen unter Berücksichtigung der zuvor gelisteten potentiellen „Problemkeimen“ von Interesse.

## Schlussfolgerung und Ausblick

Die Analysen zur Prävalenz von *Pseudomonas* spp. in norddeutscher Rohmilch hinsichtlich hofspezifischer Einflussfaktoren ergaben signifikant unterschiedliche *Pseudomonas*-Keimzahlen unter anderem bei den Faktoren „Produktionsart“, „Spülsystem“, „Rohmilch-Kühlung“ und „Tierhaltung“. Allerdings müssen beim Fragebogen mögliche Verständnisfehler seitens der „Beantworter“ sowie miteinander zusammenhängende Parameter berücksichtigt werden. In weiterführenden Arbeiten sollten daher wechselseitige Einflüsse zwischen einzelner Hofparameter untersucht und in zukünftigen Analysen beachtet werden. Hierbei könnte eine multivariate Statistik, wie die Hauptkomponentenanalyse, Anwendung finden.

Die Untersuchungen der Eintragsrouten von *Pseudomonas* spp. in Rohmilch ergaben keine höher belasteten Bereiche bei *Pseudomonas*-auffälligen Höfen gegenüber *Pseudomonas*-unauffälligen Milcherzeugern. Jedoch wurden kritische Stellen, wie der Zapfhahn, der Entlüftungsdeckel des Rohmilchtanks und die Halterung der Zitzenbecher sowie Dichtungen aus Gummi, hofübergreifend detektiert. Die Beprobungen der Höfe erfolgte in dieser Arbeit lediglich einmalig, sodass Veränderungen der Keimzahlen bei den jeweiligen Probenahmestellen zu einem anderen Zeitpunkt sehr wahrscheinlich sind. Für die Zukunft sind wiederholte, systematische Begehungen der Höfe und Beprobungen kritischer Stellen zu empfehlen, um ein besseres Verständnis für die Dynamik der Kontamination durch *Pseudomonas* spp. auf den Höfen zu erhalten und Maßnahmen zur Reduktion durch z. B. angepasste Reinigungsstrategien ableiten zu können. Außerdem kann bei der zukünftigen Auswahl der zu beprobenden Höfe eine homogene Verteilung hofspezifischer Parameter helfen, um die Keimgehalte möglichst vieler Probenahmestellen vergleichen zu können. So sollten Höfe mit einheitlichem Melksystem die gleichen Probenahmestellen aufweisen, was eine bessere Gegenüberstellung der Ergebnisse ermöglicht.

Grundsätzlich sollten unabhängig von den Jahreszeiten die Pflege und Wartung der Melkanlagen kontinuierlich eingehalten werden (Luttner 2016). Von den Ergebnissen der Hofbegehungen abgeleitet empfiehlt sich die manuelle Reinigung kritischer Stellen, wie Gummi-Dichtungen, und im Rahmen der regelmäßigen Wartung der Austausch von u. a. Dichtungen und Verbindungsstücken. Darüber hinaus sind bei einer effizienten Reinigung des Melkstands im Sinne des „Sinner'schen Kreises“ (s. Einleitung 3.2) die optimal aufeinander abgestimmten Faktoren Reinigungs- und Desinfektionsmittel, Zeit, Temperatur und Mechanik unerlässlich. Teile der Melkanlage aus Gummi, wie Zitzenbecher, sind im ständigen Kontakt mit Milchfett, alkalischen und säurehaltigen Reinigungsmitteln sowie heißem Wasser und können dadurch vorzeitig altern (Paliy et al. 2020; Luttner 2016). Die durch den Verschleiß entstandenen Risse begünstigen wiederum eine bakterielle Besiedlung und fördern die Bildung von Biofilmen (Kiermeier et al. 1967). Neben der Biofilmbildung auf Kunststoff-Oberfläche (Mikrotiterplatte)

zeigten die Analysen die Fähigkeit zur Ausbildung von Biofilmen von *Pseudomonas*-Isolaten auf Edelstahl- und Gummi-Oberfläche in Milchmedium bei einer Kühltemperatur von 6 °C. Da Biofilme ein gängiges Reservoir für Bakterien darstellen, kann ein erhöhtes Risiko der Kontamination mit *Pseudomonas* spp. durch Biofilme in milchproduzierenden und -verarbeitenden Betrieben abgeleitet werden. Daraus ergibt sich die Empfehlung, Maßnahmen einzuleiten, die das Risiko zur Ausbildung von Biofilmen minimieren. Durch die Einhaltung eines korrekten Reinigungsregimes und die manuelle Reinigung kritischer Stellen (s. Ergebnisse 1.2.2) könnte der Eintrag von *Pseudomonas* spp. in die Rohmilch über Biofilme reduziert werden.

Auch wenn die Einhaltung von Kühltemperaturen während Lagerung und Transport von Rohmilch gewährleistet sein sollte und dadurch verlangsamtes bakterielles Wachstum einhergeht, verdeutlichen die Untersuchungsergebnisse das Risiko, welches Peptidase-produzierende Biofilme für Milchbetriebe bergen können. Mit einer signifikant höheren Peptidaseaktivität bringen *Pseudomonas*-Biofilme unter den gegebenen Untersuchungsbedingungen ein erheblich höheres Verderbspotential mit sich als die in Flüssigkultur befindlichen planktonischen *Pseudomonas*-Zellen. Analysen zur Peptidaseaktivität in Multi-Spezies-Biofilmen, bestehend aus *Pseudomonas*-Isolaten mit weiteren Rohmilch-assoziierten Bakterien, sowie zum Vermögen zur Biofilmbildung auf weiteren in Milchbetrieben vorkommenden Materialien, wie Gummi und Silikon, würden weitere Einblicke in das Verderbnispotential von Peptidase-produzierenden Biofilmen ermöglichen. Darüber hinaus ist die Peptidasebildung Biofilm-assoziiierter Zellen auch bei geringem Nährstoffangebot von Interesse, da im Milchbetrieb infolge der Reinigung verdünnte Milchreste, bspw. in Rohren, zurückbleiben und eine Möglichkeit zur bakteriellen Besiedlung darstellen. Dabei kann eine erhöhte Enzymproduktion einhergehen (Teh 2013). Auch Langzeitauswirkungen von in Rohmilch sekretierten Biofilm-assoziierten Peptidasen und anschließender UHT-Behandlung sowie Lagerung der hitzebehandelten Milch sollten untersucht werden. Damit könnten Korrelationen zwischen Keimzahlen im Biofilm, der Peptidaseaktivität Biofilm-assoziiierter Zellen sowie Produktdefekte infolge des proteolytischen Verderbs hergestellt werden. Weiterhin ist die Optimierung eines effizienten Reinigungsregimes in milchproduzierenden -und verarbeitenden Betrieben zu empfehlen, um die Wahrscheinlichkeit zur Bildung eines Reservoirs für Bakterien zu minimieren. Weitere Analysen hinsichtlich der strukturellen Zusammensetzung von Milch-assoziierten Biofilmen bzw. Biofilm-Matrices sind erforderlich, um den Beitrag von Multi-Spezies-Biofilmen beim Verderb von Milch und Milchprodukten einzuschätzen. Darüber hinaus sind die Erkenntnisse über die Zusammensetzung dieser Biofilme für die Entwicklung wirksamer Präventions- und Kontrollstrategien für Biofilme, die mit einem Verderbspotential einhergehen, in der Milchindustrie notwendig.

## Literaturverzeichnis

- Abate, C. M.; Castro, G. R.; Siñeriz, F.; Callieri, D.A.S. (1999): Production of amylolytic enzymes by *Bacillus amyloliquefaciens* in pure culture and in co-culture with *Zymomonas mobilis*. In: *Biotechnol. Lett.* 21 (3), S. 249–252. DOI: 10.1023/A:1005477505683.
- Abed, S. E.; Koraichi, S.; Latrache, H.; Hamadi, F. (2012): Scanning Electron Microscopy (SEM) and Environmental SEM: Suitable Tools for Study of Adhesion Stage and Biofilm Formation. London: IntechOpen.
- Adams, D. M.; Barach, J. T.; Speck, M. L. (1976): Effect of Psychrotrophic Bacteria from Raw Milk on Milk Proteins and Stability of Milk Proteins to Ultrahigh Temperature Treatment. In: *J. Dairy Sci.* 59 (5), S. 823–827.
- Aguirre, J. S.; Pin, C.; Rodríguez, M. R.; García de Fernando, G. D. (2009): Analysis of the variability in the number of viable bacteria after mild heat treatment of food. In: *Appl. Environ. Microbiol.* 75 (22), S. 6992–6997. DOI: 10.1128/AEM.00452-09.
- Alanis, V. M.; Zurakowski, M.; Pawloski, D.; Tomazi, T.; Nydam, D. V.; Ospina, P. A. (2021): Description of the Characteristics of Five Bedding Materials and Association With Bulk Tank Milk Quality on Five New York Dairy Herds. In: *Front. Vet. Sci.* 8. DOI: 10.3389/fvets.2021.636833.
- Alonso, V. P.; Harada, A. M.; Kabuki, D. Y. (2020): Competitive and/or Cooperative Interactions of *Listeria monocytogenes* With *Bacillus cereus* in Dual-Species Biofilm Formation. In: *Front. Microbiol.* 11. DOI: 10.3389/fmicb.2020.00177.
- Andersson, R. E.; Danielsson, G. (1981): Effect of a Heat-Resistant Microbial Lipase on Flavor of Ultra-High-Temperature Sterilized Milk. In: *J. Dairy Sci.* 64 (3), S. 375–379. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(81)82581-7.
- Andersson, R. E.; Hedlund, C. B.; Jonsson, U. (1979): Thermal Inactivation of a Heat-Resistant Lipase Produced by the Psychrotrophic Bacterium *Pseudomonas fluorescens*. In: *J. Dairy Sci.* 62 (3), S. 361–367. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(79)83252-X.
- Andreani, N. A.; Fasolato, L. (2017): *Pseudomonas* and Related Genera. Duxford: Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition, S. 22–59.
- Anzai, Y.; Kim, H.; Park, J. Y.; Wakabayashi, H.; Oyaizu, H. (2000): Phylogenetic affiliation of the pseudomonads based on 16S rRNA sequence. In: *Int J Syst Evol Microbiol* 50 (4), S. 1563–1589. DOI: 10.1099/00207713-50-4-1563.
- ASU L 00.00-88/1: Untersuchung von Lebensmitteln - Horizontales Verfahren zur Zählung von Mikroorganismen. Teil 1: Koloniezählung bei 30 °C mittels Gussplattenverfahren. (Übernahme der gleichnamigen Norm DIN EN ISO 4833-1, Ausgabe Dezember 2013).
- ASU L 01.01-7: Bestimmung der Gesamtkeimzahl in Rohmilch. Durchflusszytometrische Zählung von Mikroorganismen (Routineverfahren).
- Aswathanarayan, J. B.; Vittal, R. R. (2014): Attachment and biofilm formation of *Pseudomonas fluorescens* PSD4 isolated from a dairy processing line. In: *Food. Sci. Biotechnol.* 23 (6), S. 1903–1910. DOI: 10.1007/s10068-014-0260-8.
- Austin, J. W.; Sanders, G.; Kay, W. W.; Collinson, S. K. (1998): Thin aggregative fimbriae enhance *Salmonella enteritidis* biofilm formation. In: *FEMS Microbiol. Lett.* 162 (2), S. 295–301. DOI: 10.1111/j.1574-6968.1998.tb13012.x.
- Bader, R.B.E.A.; Abdulaal, N.I. (2017): Detection of *Pseudomonas aeruginosa* from normal raw milk and Mastitic cow's milk in Baghdad. In: *Int. J. Curr. Res.* 9 (9), S. 57647–57651.
- Bagge, D.; Hjelm, M.; Johansen, C.; Huber, I.; Gram, L. (2001): *Shewanella putrefaciens* adhesion and biofilm formation on food processing surfaces. In: *Appl. Environ. Microbiol.* 67 (5), S. 2319–2325. DOI: 10.1128/AEM.67.5.2319-2325.2001.

- Baglinière, F.; Matéos, A.; Tanguy, G.; Jardin, J.; Briard-Bion, V.; Rousseau, F. et al. (2013): Proteolysis of ultra high temperature-treated casein micelles by AprX enzyme from *Pseudomonas fluorescens* F induces their destabilisation. In: *Int. Dairy J.* 31 (2), S. 55–61. DOI: 10.1016/j.idairyj.2013.02.011.
- Ban, G.-H.; Kang, D.-H. (2016): Effect of sanitizer combined with steam heating on the inactivation of foodborne pathogens in a biofilm on stainless steel. In: *Food Microbiol.* 55, S. 47–54. DOI: 10.1016/j.fm.2015.11.003.
- Banykó, J.; Vyletelová, M. (2009): Determining the source of *Bacillus cereus* and *Bacillus licheniformis* isolated from raw milk, pasteurized milk and yoghurt. In: *Lett. Appl. Microbiol.* 48 (3), S. 318–323. DOI: 10.1111/j.1472-765X.2008.02526.x.
- Bas, S.; Kramer, M.; Stopar, D. (2017): Biofilm Surface Density Determines Biocide Effectiveness. In: *Front. Microbiol.* 8, S. 2443. DOI: 10.3389/fmicb.2017.02443.
- Baur, C.; Krewinkel, M.; Kranz, B.; Neubeck, M. von; Wenning, M.; Scherer, S. Stoeckel, M. et al. (2015a): Quantification of the proteolytic and lipolytic activity of microorganisms isolated from raw milk. In: *Int. Dairy J.* 49, S. 23–29. DOI: 10.1016/j.idairyj.2015.04.005.
- Baur, C.; Krewinkel, M.; Kutzli, I.; Kranz, B.; Neubeck, M. von; Huptas, C. et al. (2015b): Isolation and characterisation of a heat-resistant peptidase from *Pseudomonas panacis* withstanding general UHT processes. In: *Int. Dairy J.* 49, S. 46–55. DOI: 10.1016/j.idairyj.2015.04.009.
- Bava, L.; Zucali, M.; Sandrucci, A.; Brasca, M.; Vanoni, L.; Zanini, L.; Tamburini, A. (2011): Effect of cleaning procedure and hygienic condition of milking equipment on bacterial count of bulk tank milk. In: *J. Dairy Res.* 78 (2), S. 211–219. DOI: 10.1017/S002202991100001X.
- Bellwood, P. S. (2005): *First Farmers: The Origins of Agricultural Societies. The Beginnings of Agriculture in Southwest Asia.* Malden: Blackwell Pub.
- Bendinger, B.; Rijnaarts, H. H.; Altendorf, K.; Zehnder, A. J. (1993): Physicochemical cell surface and adhesive properties of coryneform bacteria related to the presence and chain length of mycolic acids. In: *Appl. Environ. Microbiol.* 59 (11), S. 3973–3977. DOI: 10.1128/aem.59.11.3973-3977.1993.
- Bentley Instruments, Inc. (2014): *BactoCount IBCm User Handbook. Accurate Counting of Bacteria and Somatic Cells in Milk,* zuletzt geprüft am 14.10.2021.
- Bentley Instruments, Inc. (2019): *Bactocount IBC 3.0. Highly accurate, reliable and real-time enumeration of individual bacteria & somatic cells in raw milk.* Online verfügbar unter <https://www.htscentroamerica.com/index.php/bentley-instruments/recuento-bacteriano?task=download&id=80>, zuletzt geprüft am 02.08.2021.
- Bergey, D. H. (1923): *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology.* Baltimore: Williams & Wilkins Company.
- Binder, J. (2022): *Reinigung und Desinfektion in der Milcherzeugung. Bewertung verschiedener Reinigungssysteme und -mittel.* Hg. v. Verband für handwerkliche Milchverarbeitung (VHM). Online verfügbar unter <https://www.milchhandwerk.info/infothek/neuigkeiten/details/973>, zuletzt geprüft am 18.02.2022.
- Biscola, V.; Tulini, F. L.; Choiset, Y.; Rabesona, H.; Ivanova, I.; Chobert, J.-M. et al. (2016): Proteolytic activity of *Enterococcus faecalis* VB63F for reduction of allergenicity of bovine milk proteins. In: *J. Dairy Sci.* 99 (7), S. 5144–5154. DOI: 10.3168/jds.2016-11036.
- Böhnlein, C.; Fiedler, G.; Loop, J.; Franz, C.M.A.P.; Kabisch, J. (2021): Microbiological quality and safety of raw milk from direct sale in northern Germany. In: *Int. Dairy J.* 114, S. 104944. DOI: 10.1016/j.idairyj.2020.104944.

- Bonizzi, I.; Buffoni, J. N.; Feligini, M.; Enne, G. (2009): Investigating the relationship between raw milk bacterial composition, as described by intergenetic transcribed spacer-PCR fingerprinting, and pasture altitude. In: *J. Appl. Microbiol.* 107 (4), S. 1319–1329. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2009.04311.x.
- Bonsaglia, E.C.R.; Gomes, M. S.; Canisso, I. F.; Zhou, Z.; Lima, S. F.; Rall, V.L.M. et al. (2017): Milk microbiome and bacterial load following dry cow therapy without antibiotics in dairy cows with healthy mammary gland. In: *Sci. Rep.* 7 (1), S. 8067. DOI: 10.1038/s41598-017-08790-5.
- Boquien, C.-Y. (2018): Human Milk: An Ideal Food for Nutrition of Preterm Newborn. In: *Front. Pediatr.* 6. DOI: 10.3389/fped.2018.00295.
- Bouman, S.; Lund, D. B.; Driessen, F. M.; Schmidt, D. G. (1982): Growth of Thermoresistant Streptococci and Deposition of Milk Constituents on Plates of Heat Exchangers During Long Operating Times. In: *J. Food Prot.* 45 (9), S. 806–812. DOI: 10.4315/0362-028X-45.9.806.
- Bowler, L. L.; Zhanel, G. G.; Ball, T. B.; Saward, L. L. (2012): Mature *Pseudomonas aeruginosa* biofilms prevail compared to young biofilms in the presence of ceftazidime. In: *Antimicrob. Agents Chemother.* 56 (9), S. 4976–4979. DOI: 10.1128/AAC.00650-12.
- Bremer, P.; Seale, B.; Flint, S.; Palmer, J. (2009): Biofilms in Dairy Processings. Control of Biofilms in Dairy Manufacturing Plants. In: P. M. Fratamico, B. A. Annous und N. W. Gunther (Hg.): *Biofilms in the Food and Beverage Industries*. Boca Raton: CRC Press, S. 396–431.
- Caldera, L.; Franzetti, L.; van Coillie, E.; Vos, P. de; Stragier, P.; Block, J. de; Heyndrickx, M. (2016): Identification, enzymatic spoilage characterization and proteolytic activity quantification of *Pseudomonas* spp. isolated from different foods. In: *Food Microbiol.* 54, S. 142–153. DOI: 10.1016/j.fm.2015.10.004.
- Capodifoglio, E.; Vidal, A.M.C.; Lima, J.A.S.; Bortoletto, F.; D'Abreu, L. F.; Gonçalves, A.C.S. et al. (2016): Lipolytic and proteolytic activity of *Pseudomonas* spp. isolated during milking and storage of refrigerated raw milk. In: *J. Dairy Sci.* 99 (7), S. 5214–5223. DOI: 10.3168/jds.2015-10453.
- Ceri, H.; Olson, M. E.; Stremick, C.; Read, R. R.; Morck, D.; Buret, A. (1999): The Calgary Biofilm Device: New Technology for Rapid Determination of Antibiotic Susceptibilities of Bacterial Biofilms. In: *J. Clin. Microbiol.* 37 (6), S. 1771–1776. DOI: 10.1128/JCM.37.6.1771-1776.1999.
- Champagne, C. P.; Laing, R. R.; Roy, D.; Mafu, A. A.; Griffiths, M. W. (1994): Psychrotrophs in dairy products: Their effects and their control. In: *Crit Rev Food Sci Nutr* 34 (1), S. 1–30. DOI: 10.1080/10408399409527648.
- Charlebois, A.; Jacques, M.; Archambault, M. (2014): Biofilm formation of *Clostridium perfringens* and its exposure to low-dose antimicrobials. In: *Front. Microbiol.* 5, S. 183. DOI: 10.3389/fmicb.2014.00183.
- Charlton, S.; Ramsøe, A.; Collins, M.; Craig, O. E.; Fischer, R.; Alexander, M.; Speller, C. F. (2019): New insights into Neolithic milk consumption through proteomic analysis of dental calculus. In: *Archaeol. Anthropol. Sci.* 11 (11), S. 6183–6196. DOI: 10.1007/s12520-019-00911-7.
- Chavan, R. S.; Chavan, S. R.; Khedkar, C. D.; Jana, A. H. (2011): UHT Milk Processing and Effect of Plasmin Activity on Shelf Life: A Review. In: *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 10 (5), S. 251–268. DOI: 10.1111/j.1541-4337.2011.00157.x.
- Chin, C.-Y.; Hara, Y.; Ghazali, A.-K.; Yap, S.-J.; Kong, C.; Wong, Y.-C. et al. (2015): Global transcriptional analysis of *Burkholderia pseudomallei* high and low biofilm producers reveals insights into biofilm production and virulence. In: *BMC Genom.* 16, S. 471. DOI: 10.1186/s12864-015-1692-0.



- Chrisope, G. L.; Marshall, R. T. (1976): Combined Action of Lipase and Microbial Phospholipase C on a Model Fat Globule Emulsion and Raw Milk. In: *J. Dairy Sci.* 59 (12), S. 2024–2030. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(76)84483-9.
- Cleto, S.; Matos, S.; Kluskens, L.; Vieira, M. J. (2012): Characterization of contaminants from a sanitized milk processing plant. In: *PLoS one* 7 (6). DOI: 10.1371/journal.pone.0040189.
- Costa, O. Y. A.; Raaijmakers, J. M.; Kuramae, E. E. (2018): Microbial Extracellular Polymeric Substances: Ecological Function and Impact on Soil Aggregation. In: *Front. Microbiol.* 9. DOI: 10.3389/fmicb.2018.01636.
- Cousin, M. A. (1982): Presence and Activity of Psychrotrophic Microorganisms in Milk and Dairy Products: A Review. In: *J. Food Prot.* 45 (2), S. 172–207. DOI: 10.4315/0362-028x-45.2.172.
- Cremonesi, P.; Ceccarani, C.; Curone, G.; Severgnini, M.; Pollera, C.; Bronzo, V. et al. (2018): Milk microbiome diversity and bacterial group prevalence in a comparison between healthy Holstein Friesian and Rendena cows. In: *PLoS one* 13 (10). DOI: 10.1371/journal.pone.0205054.
- Currier, R. W.; Widness, J. A. (2018): A Brief History of Milk Hygiene and Its Impact on Infant Mortality from 1875 to 1925 and Implications for Today: A Review. In: *J. Food Prot.* 81 (10), S. 1713–1722. DOI: 10.4315/0362-028X.JFP-18-186.
- Da Costa, E. O.; Ribeiro, A. R.; Garino Junior, F.; Da Silva, J. A.; Pardo, R. (1996): Bovine mastitis due to environmental agents: *Pseudomonas* sp.; *Plesiomonas* sp.; *Prototeca* sp. In: *Semina: Ciênc. Agrár.* 17 (1), S. 22–25. DOI: 10.5433/1679-0359.1996v17n1p22.
- Danese, P. N.; Pratt, L. A.; Dove, S. L.; Kolter, R. (2000): The outer membrane protein, antigen 43, mediates cell-to-cell interactions within *Escherichia coli* biofilms. In: *Mol. Microbiol.* 37 (2), S. 424–432. DOI: 10.1046/j.1365-2958.2000.02008.x.
- Dantas, S. T. A.; Rossi, B. F.; Bonsaglia, E. C. R.; Castilho, I. G.; Hernandez, R. T.; Fernandes, A.; Rall, V. L. M. (2018): Cross-Contamination and Biofilm Formation by *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis on Various Cutting Boards. In: *Foodborne Pathog. Dis.* 15 (2), S. 81–85. DOI: 10.1089/fpd.2017.2341.
- Danylec, N.; Göbl, A.; Stoll, D. A.; Hetzer, B.; Kulling, S. E.; Huch, M. (2018): *Rubneribacter badeniensis* gen. nov., sp. nov. and *Enteroscipio rubneri* gen. nov., sp. nov., new members of the *Eggerthellaceae* isolated from human faeces. In: *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 68 (5), S. 1533–1540. DOI: 10.1099/ijsem.0.002705.
- Debuno Spiteri, D.; Gillis, R.; Roffet-Salque, M.; Castells Navarro, L.; Guilaine, J.; Manen, C. et al. (2016): Regional asynchronicity in dairy production and processing in early farming communities of the northern Mediterranean. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113 (48), S. 13594–13599. DOI: 10.1073/pnas.1607810113.
- DeLaval GmbH (2022): Melken im Anbindestall. DeLaval Rohrmelkanlage. Online verfügbar unter <https://www.delaval.com/globalassets/canada/brochures/de/delaval-rohrmelkanlage.pdf>, zuletzt geprüft am 21.01.2022.
- Derakhshani, H.; Fehr, K. B.; Sepehri, S.; Francoz, D.; Buck, J. de; Barkema, H. W. et al. (2018): Invited review: Microbiota of the bovine udder: Contributing factors and potential implications for udder health and mastitis susceptibility. In: *J. Dairy Sci.* 101 (12), S. 10605–10625. DOI: 10.3168/jds.2018-14860.
- Dimassi, O.; Rizq, M.; Akiki, R.; Hajj, F. El; Rached, M.; Kaddoura, I. (2020): Generation time, D and Z - values of *pseudomonas fluorescens* under different temperature, water activity and pH conditions. In: *IJAEMS* 6 (3), S. 117–123. DOI: 10.22161/ijaems.63.3.
- DIN EN ISO 13720: Fleisch und Fleischerzeugnisse - Zählung von präsumtiven *Pseudomonas* spp. DOI: 10.31030/1564204.

- DIN EN ISO 4833-1:2013-12: Mikrobiologie der Lebensmittelkette - Horizontales Verfahren zur Zählung von Mikroorganismen. Teil 1: Koloniezählung bei 30 °C mittels Gussplattenverfahren. DOI: 10.31030/2006034.
- Dixon, M. J. L.; Flint, S. H.; Palmer, J. S.; Love, R.; Chabas, C.; Beuger, A. L. (2018): The effect of calcium on biofilm formation in dairy wastewater. In: *Water Pract. Technol.* 13 (2), S. 400–409. DOI: 10.2166/wpt.2018.050.
- Dogan, B.; Boor, K. J. (2003): Genetic diversity and spoilage potentials among *Pseudomonas* spp. isolated from fluid milk products and dairy processing plants. In: *Appl. Environ. Microbiol.* 69 (1), S. 130–138. DOI: 10.1128/AEM.69.1.130–138.2003.
- Dohnalkova, A. C.; Marshall, M. J.; Arey, B. W.; Williams, K. H.; Buck, E. C.; Fredrickson, J. K. (2011): Imaging hydrated microbial extracellular polymers: comparative analysis by electron microscopy. In: *Appl. Environ. Microbiol.* 77 (4), S. 1254–1262. DOI: 10.1128/AEM.02001-10.
- Dongari-Bagtzoglou, A. (2008): Pathogenesis of mucosal biofilm infections: challenges and progress. In: *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* 6 (2), S. 201–208. DOI: 10.1586/14787210.6.2.201.
- Donlan, R. M. (2002): Biofilms: Microbial Life on Surfaces. In: *Emerg. Infect. Dis.* 8 (9), S. 881–890. DOI: 10.3201/eid0809.020063.
- Doyle, C. J.; Gleeson, D.; O'Toole, P. W.; Cotter, P. D. (2017a): High-throughput metataxonomic characterization of the raw milk microbiota identifies changes reflecting lactation stage and storage conditions. In: *Int. J. Food Microbiol.* 255, S. 1–6. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2017.05.019.
- Doyle, Conor J.; Gleeson, David; O'Toole, Paul W.; Cotter, Paul D. (2017b): Impacts of Seasonal Housing and Teat Preparation on Raw Milk Microbiota: a High-Throughput Sequencing Study. In: *Appl. Environ. Microbiol.* 83 (2). DOI: 10.1128/AEM.02694-16.
- DSMZ (2021): LPSN- List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature. Genus *Pseudomonas*. Hg. v. Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ). Online verfügbar unter <https://lpsn.dsmz.de/genus/pseudomonas>, zuletzt geprüft am 21.12.2021.
- DTS-PRO-SYS GmbH (2021): Milchrohrdichtungen. Online verfügbar unter <https://www.ekat.com/dichtungstechnik/dichtungen/milchrohrdichtungen.html>, zuletzt geprüft am 19.11.2021.
- Dufour, D.; Nicodème, M.; Perrin, C.; Driou, A.; Brusseau, E.; Humbert, G. et al. (2008): Molecular typing of industrial strains of *Pseudomonas* spp. isolated from milk and genetical and biochemical characterization of an extracellular protease produced by one of them. In: *Int. J. Food Microbiol.* 125 (2), S. 188–196. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2008.04.004.
- Duman, M.; Mulet, M.; Altun, S.; Burcin Satıcıoğlu, I.; Gomila, M.; Lalucat, J.; García-Valdés, E. (2021): *Pseudomonas anatoliensis* sp. nov. and *Pseudomonas iridis* sp. nov. isolated from fish. In: *Syst. Appl. Microbiol.* 44 (3), S. 126198. DOI: 10.1016/j.syapm.2021.126198.
- Dunne, W. M.; Burd, E. M. (1992): The effects of magnesium, calcium, EDTA, and pH on the in vitro adhesion of *Staphylococcus epidermidis* to plastic. In: *Microbiol. Immunol.* 36 (10), S. 1019–1027. DOI: 10.1111/j.1348-0421.1992.tb02106.x.
- Elegbeleye, J. A.; Buys, E. M. (2022): Potential spoilage of extended shelf-life (ESL) milk by *Bacillus subtilis* and *Bacillus velezensis*. In: *LWT* 153. DOI: 10.1016/j.lwt.2021.112487.
- Elias, S.; Banin, E. (2012): Multi-species biofilms: living with friendly neighbors. In: *FEMS Microbiol. Rev.* 36 (5), S. 990–1004. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2012.00325.x.
- EMIKO Handelsgesellschaft mbH (2019): Sauberer Melkstand durch EM-Reinigung. Online verfügbar unter <https://www.emiko.de/sauberer-melkstand-durch-em-reinigung/>, zuletzt geprüft am 21.01.2022.

- Eneroth, Å.; Ahrné, S.; Molin, G. (2000): Contamination routes of Gram-negative spoilage bacteria in the production of pasteurised milk, evaluated by randomly amplified polymorphic DNA (RAPD). In: *Int. Dairy J.* 10 (5-6), S. 325–331. DOI: 10.1016/S0958-6946(00)00055-8.
- Falardeau, J.; Keeney, K.; Trmčić, A.; Kitts, D.; Wang, S. (2019): Farm-to-fork profiling of bacterial communities associated with an artisan cheese production facility. In: *Food Microbiol.* 83, S. 48–58. DOI: 10.1016/j.fm.2019.04.002.
- Fedel, M.; Caciagli, P.; Chistè, V.; Caola, I.; Tessarolo, F. (2007): Microbial Biofilm Imaging ESEM vs. HVSEM. In: *I&M* 9 (2), S. 44–47. DOI: 10.1002/imic.200790149.
- Fiedler, G.; Gieschler, S.; Kabisch, J.; Grimmmler, C.; Brinks, E.; Wagner, N. et al. (2022): *Pseudomonas rustica* sp. nov., isolated from raw milk at a German dairy farm. In: *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* DOI: 10.1099/ijsem.0.005288.
- Flach, J.; Grzybowski, V.; Toniazzo, G.; Corção, G. (2014): Adhesion and production of degrading enzymes by bacteria isolated from biofilms in raw milk cooling tanks. In: *Food Sci. Technol.* 34 (3), S. 571–576. DOI: 10.1590/1678-457x.6374.
- Flemming, H.-C. (2016): EPS-Then and Now. In: *Microorganisms* 4 (4). DOI: 10.3390/microorganisms4040041.
- Flemming, H.-C.; Wingender, J. (2001): Biofilme - die bevorzugte Lebensform der Bakterien: Flocken, Filme und Schlämme. In: *Biologie in unserer Zeit* 31 (3), S. 169–180. DOI: 10.1002/1521-415X(200105)31:3<169::AID-BIUZ169>3.0.CO;2-U.
- Flemming, H.-C.; Wuertz, S. (2019): Bacteria and archaea on Earth and their abundance in biofilms. In: *Nat. Rev. Microbiol.* 17 (4), S. 247–260. DOI: 10.1038/s41579-019-0158-9.
- Flint, S.; Palmer, J.; Bloemen, K.; Brooks, J.; Crawford, R. (2001): The growth of *Bacillus stearothermophilus* on stainless steel. In: *J. Appl. Microbiol.* 90 (2), S. 151–157. DOI: 10.1046/j.1365-2672.2001.01215.x.
- Fontana, A. J. (2007): Appendix D: Minimum Water Activity Limits for Growth of Microorganisms. In: G. V. Barbosa-Cnovas, A. J. Fontana, S. J. Schmidt und T. P. Labuza (Hg.): *Water Activity in Foods. Fundamentals and Applications*. Oxford: Blackwell Publishing Ltd.
- Forson, A. M.; van der Mei, H. C.; Sjollema, J. (2020): Impact of solid surface hydrophobicity and micrococcal nuclease production on *Staphylococcus aureus* Newman biofilms. In: *Sci. Rep.* 10 (1), S. 12093. DOI: 10.1038/s41598-020-69084-x.
- Fox, P. F.; Brodtkorb, A. (2008): The casein micelle: Historical aspects, current concepts and significance. In: *Int. Dairy J.* 18 (7), S. 677–684. DOI: 10.1016/j.idairyj.2008.03.002.
- Frølund, B.; Griebe, T.; Nielsen, P. H. (1995): Enzymatic activity in the activated-sludge floc matrix. In: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 43 (4), S. 755–761. DOI: 10.1007/s002530050481.
- Gabrić, D.; Lelieveld, H. L. M.; Holah, J. T. (2016): Cleaning of Surfaces. In: H. Lelieveld, J. Holah und D. Gabrić (Hg.): *Handbook of Hygiene Control in the Food Industry (Second Edition)*. Sawston: Woodhead Publishing.
- Gamarra, N. N.; Villena, G. K.; Gutiérrez-Correa, M. (2010): Cellulase production by *Aspergillus niger* in biofilm, solid-state, and submerged fermentations. In: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 87 (2), S. 545–551. DOI: 10.1007/s00253-010-2540-4.
- Gerstman, B. B. (2015): *Basic Biostatistics. Statistics for Public Health Practice*. Burlington: Jones & Barlett Learning.
- Gethins, L.; Rea, M. C.; Stanton, C.; Ross, R. Paul; Kilcawley, K.; O'Sullivan, M. et al. (2016): Acquisition of the yeast *Kluyveromyces marxianus* from unpasteurised milk by a kefir grain enhances kefir quality. In: *FEMS Microbiol. Lett.* 363 (16). DOI: 10.1093/femsle/fnw165.

- Gieschler, S.; Fiedler, G.; Böhnlein, C.; Grimmeler, C.; Franz, C. M. A. P.; Kabisch, J. (2021): *Pseudomonas kielensis* sp. nov. and *Pseudomonas baltica* sp. nov., isolated from raw milk in Germany. In: *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* DOI: 10.1099/ijsem.0.004717.
- Glück, C.; Rentschler, E.; Krewinkel, M.; Merz, M.; Neubeck, M. von; Wenning, M. et al. (2016): Thermostability of peptidases secreted by microorganisms associated with raw milk. In: *Int. Dairy J.* 56, S. 186–197. DOI: 10.1016/j.idairyj.2016.01.025.
- Gomila, M.; Peña, A.; Mulet, M.; Lalucat, J.; García-Valdés, E. (2015): Phylogenomics and systematics in *Pseudomonas*. In: *Front. Microbiol.* 6, S. 214. DOI: 10.3389/fmicb.2015.00214.
- Grillo, K. M.; Dunne, J.; Marshall, F.; Prendergast, M. E.; Casanova, E.; Gidna, A. O. et al. (2020): Molecular and isotopic evidence for milk, meat, and plants in prehistoric eastern African herder food systems. In: *PNAS* 117 (18), S. 9793–9799. DOI: 10.1073/pnas.1920309117.
- Guillier, L.; Stahl, V.; Hezard, B.; Notz, E.; Briandet, R. (2008): Modelling the competitive growth between *Listeria monocytogenes* and biofilm microflora of smear cheese wooden shelves. In: *Int. J. Food Microbiol.* 128 (1), S. 51–57. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2008.06.028.
- Guvensen, N. C.; Demir, S.; Ozdemir, G. (2012): Effects of magnesium and calcium cations on biofilm formation by *Sphingomonas paucimobilis* from an industrial environment. In: *Fresenius Environ. Bull.*, S. 3685–3692. Online verfügbar unter [https://www.water-cti.com/pdf/ESPG/BIO4-BiofilmControl-Industrial\\_Ca-Mg.pdf](https://www.water-cti.com/pdf/ESPG/BIO4-BiofilmControl-Industrial_Ca-Mg.pdf), zuletzt geprüft am 06.07.2021.
- Hagi, T.; Kobayashi, M.; Nomura, M. (2010): Molecular-based analysis of changes in indigenous milk microflora during the grazing period. In: *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 74 (3), S. 484–487. DOI: 10.1271/bbb.90470.
- Hamdani, S.; Asstiyani, N.; Astriany, D.; Singgih, M.; Ibrahim, S. (2019): Isolation and identification of proteolytic bacteria from pig sludge and protease activity determination. In: *IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci.* 230, S. 12095. DOI: 10.1088/1755-1315/230/1/012095.
- Han, N.; Mizan, M. F.; Jahid, I. K.; Ha, S.-D. (2016): Biofilm formation by *Vibrio parahaemolyticus* on food and food contact surfaces increases with rise in temperature. In: *Food Control* 70, S. 161–166. DOI: 10.1016/j.foodcont.2016.05.054.
- Hartley, R. M. (1842): An historical, scientific, and practical essay on milk, as an article of human sustenance; with a consideration of the effects consequent upon the present unnatural methods of producing it for the supply of large cities. New York: Leavitt.
- Häse, C. C.; Finkelstein, R. A. (1993): Bacterial extracellular zinc-containing metalloproteases. In: *Microbiol. Rev.* 57 (4), S. 823–837. DOI: 10.1128/mr.57.4.823-837.1993.
- Hassan, A. N.; Frank, J. F. (2011): Microorganisms associated with milk. In: J. W. Fuquay (Hg.): *Encyclopedia of Dairy Sciences*, Bd. 2. Cambridge: Academic Press, S. 447–457.
- Heckman, Joseph R. (2019): Securing fresh food from fertile soil, challenges to the organic and raw milk movements. In: *Renew. Agric. Food Syst.* 34 (5), S. 472–485. DOI: 10.1017/S1742170517000618.
- Heller, H. M.; Tortora, G.; Burger, H. (1990): *Pseudomonas putrefaciens* bacteremia associated with shellfish contact. In: *Am. J. Med.* 88 (1), S. 85–86. DOI: 10.1016/0002-9343(90)90139-5.
- Helmer, D.; Vigne, J. D. (2007): Was milk a “secondary product” in the Old World Neolithisation process? Its role in the domestication of cattle, sheep and goats. In: *Anthropozoologica* 42 (2), S. 9–40.
- Herman, L. M.; Vaerewijck, M. J.; Moermans, R. J.; Waes, G. M. (1997): Identification and detection of *Bacillus sporothermodurans* spores in 1, 10, and 100 milliliters of raw milk by PCR. In: *IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci.* 63 (8), S. 3139–3143. DOI: 10.1128/aem.63.8.3139-3143.1997.

- Hofmann, K.; Huptas, C.; Doll, E. V.; Scherer, S.; Wenning, M. (2020a): *Pseudomonas haemolytica* sp. nov., isolated from raw milk and skimmed milk concentrate. In: *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 70 (4), S. 2339–2347. DOI: 10.1099/ijsem.0.004043.
- Hofmann, K.; Huptas, C.; Doll, E. V.; Scherer, S.; Wenning, M. (2020b): *Pseudomonas saxonica* sp. nov., isolated from raw milk and skimmed milk concentrate. In: *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 70 (2), S. 935–943. DOI: 10.1099/ijsem.0.003851.
- Iain, M.; Iosif, L.; Nadin, R.; Swapan, M.; Patterson, N.; Roodenberg, S. A. et al. (2015): Genome-wide patterns of selection in 230 ancient Eurasians. In: *Nature* 528 (7583), S. 499–503. DOI: 10.1038/nature16152.
- Ica, T.; Caner, V.; Istanbulu, O.; Nguyen, H. D.; Ahmed, B.; Call, D. R.; Beyenal, H. (2012): Characterization of mono- and mixed-culture *Campylobacter jejuni* biofilms. In: *Appl. Environ. Microbiol.* 78 (4), S. 1033–1038. DOI: 10.1128/AEM.07364-11.
- ISO/TS 11059:2009-08: Milch und Milcherzeugnisse - Verfahren zur Zählung von *Pseudomonas* spp.
- ISSF (2010): Stainless Steel in the Dairy Industry. A Sustainable Solution for Human Diet. Brüssel. Online verfügbar unter [https://www.worldstainless.org/Files/issf/non-image-files/PDF/ISSF\\_Stainless\\_Steel\\_in\\_the\\_Dairy\\_Industry.pdf](https://www.worldstainless.org/Files/issf/non-image-files/PDF/ISSF_Stainless_Steel_in_the_Dairy_Industry.pdf), zuletzt geprüft am 17.02.2022.
- Jahid, I. K.; Ha, S.-D. (2014): The Paradox of Mixed-Species Biofilms in the Context of Food Safety. In: *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 13 (5), S. 990–1011. DOI: 10.1111/1541-4337.12087.
- Jan, J.; Valle, F.; Bolivar, F.; Merino, E. (2000): Characterization of the 5' subtilisin (*aprE*) regulatory region from *Bacillus subtilis*. In: *FEMS Microbiol. Lett.* 183 (1), S. 9–14. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2000.tb08926.x.
- Jodral, M.; Liñan, E.; Acosta, I.; Gallego, C.; Rojas, F.; Bentabol, A. (1993): Mycoflora and toxigenic *Aspergillus flavus* in Spanish milks. In: *Int. J. Food Microbiol.* 18 (2), S. 171–174. DOI: 10.1016/0168-1605(93)90222-3.
- Jonghe, V. de; Coorevits, A.; Block, J. de; van Coillie, E.; Grijspeerdt, K.; Herman, L. et al. (2010): Toxinogenic and spoilage potential of aerobic spore-formers isolated from raw milk. In: *Int. J. Food Microbiol.* 136 (3), S. 318–325. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2009.11.007.
- Jonghe, V. de; Coorevits, A.; van Hoorde, K.; Messens, W.; van Landschoot, A.; Vos, P. de; Heyndrickx, M. (2011): Influence of storage conditions on the growth of *Pseudomonas* species in refrigerated raw milk. In: *Appl. Environ. Microbiol.* 77 (2), S. 460–470. DOI: 10.1128/AEM.00521-10.
- Joseph, B.; Otta, S. K.; Karunasagar, I. (2001): Biofilm formation by *Salmonella* spp. on food contact surfaces and their sensitivity to sanitizers. In: *Int. J. Food Microbiol.* 64 (3), S. 367–372. DOI: 10.1016/s0168-1605(00)00466-9.
- Jürgen Loehrke GmbH (2021): Cleaning-In-Place (CIP). Online verfügbar unter <https://www.loehrke.com/cip/>, zuletzt geprüft am 09.02.2022.
- Kable, M. E.; Srisengfa, Y.; Xue, Z.; Coates, L. C.; Marco, M. L. (2019): Viable and Total Bacterial Populations Undergo Equipment- and Time-Dependent Shifts during Milk Processing. In: *Appl. Environ. Microbiol.* 85 (13). DOI: 10.1128/AEM.00270-19.
- Kakurinov, V. (2014): Food Safety Assurance Systems. Cleaning and Disinfection. In: Y. Motarjemi, G. Moy und E. C. D. Todd (Hg.): *Encyclopedia of Food Safety*. Volume 4. Cambridge: Academic Press, S. 211–225.
- Kaláb, M. (2010): The Beauty of Milk at High Magnification. In: *infocus*, S. 4–37. DOI: 10.22443/rms.inf.1.55.

- Kasana, R. C. (2010): Proteases from Psychrotrophs: An Overview. In: *Crit. Rev. Microbiol.* 36 (2), S. 134–145. DOI: 10.3109/10408410903485525.
- Katsikogianni, M.; Missirlis, Y. F. (2004): Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterials and of techniques used in estimating bacteria-material interactions. In: *Eur. Cells Mater.* 8, S. 37–57. DOI: 10.22203/ecm.v008a05.
- Kaufmann, V.; Scherer, S.; Kulozik, U. (2010): Verfahren zur Verlängerung der Haltbarkeit von Konsummilch und ihre stofflichen Veränderungen: ESL-Milch. In: *J. Verbr. Lebensm.* 5 (1), S. 59–64. DOI: 10.1007/s00003-009-0309-4.
- Kiermeier, F.; Renner, E.; Hoffmann, J. (1967): Untersuchungen und Betrachtungen zur Anwendung von Kunststoffen für Lebensmittel. In: *Z. Lebensm. Unters. Forch.* 134 (4), S. 221–230. DOI: 10.1007/BF01787085.
- Kostaki, M.; Chorianopoulos, N.; Braxou, E.; Nychas, G.-J.; Giaouris, E. (2012): Differential biofilm formation and chemical disinfection resistance of sessile cells of *Listeria monocytogenes* strains under monospecies and dual-species (with *Salmonella enterica*) conditions. In: *Appl. Environ. Microbiol.* 78 (8), S. 2586–2595. DOI: 10.1128/AEM.07099-11.
- Krömker, V. (2007): Kurzes Lehrbuch Milchkunde und Milchhygiene. Stuttgart: Parey.
- Kuehn, J. S.; Gorden, P. J.; Munro, D.; Rong, R.; Dong, Q.; Plummer, P. J. et al. (2013): Bacterial community profiling of milk samples as a means to understand culture-negative bovine clinical mastitis. In: *PLoS one* 8 (4). DOI: 10.1371/journal.pone.0061959.
- Kwon, M.; Hussain, M. S.; Oh, D. H. (2017): Biofilm formation of *Bacillus cereus* under food-processing-related conditions. In: *Food Sci. Biotechnol.* 26 (4), S. 1103–1111. DOI: 10.1007/s10068-017-0129-8.
- Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuch (LFGB) 2005.
- Lee, J.-S.; Bae, Y.-M.; Lee, S.-Y. (2015): Biofilm Formation of *Staphylococcus aureus* on Various Surfaces and Their Resistance to Chlorine Sanitizer. In: *J. Food Sci.* 80 (10), M2279-2286. DOI: 10.1111/1750-3841.13017.
- Leonardi, M.; Gerbault, P.; Thomas, M. G.; Burger, J. (2012): The evolution of lactase persistence in Europe. A synthesis of archaeological and genetic evidence. In: *Int. Dairy J.* 22 (2), S. 88–97. DOI: 10.1016/j.idairyj.2011.10.010.
- Leriche, F.; Fayolle, K. (2012): No seasonal effect on culturable pseudomonads in fresh milks from cattle herds. In: *J. Dairy Sci.* 95 (5), S. 2299–2306. DOI: 10.3168/jds.2011-4785.
- Lewandowski, Z.; Beyenal, H.; Stookey, D. (2004): Reproducibility of biofilm processes and the meaning of steady state in biofilm reactors. In: *Water Sci. Technol.* 49 (11-12), S. 359–364. DOI: 10.2166/wst.2004.0880.
- Lewis, K. (2001): Riddle of Biofilm Resistance. In: *Antimicrob. Agents Chemother.* 45 (4), S. 999–1007. DOI: 10.1128/AAC.45.4.999-1007.2001.
- Lewis, M. J. (2011): The measurement and significance of ionic calcium in milk - A review. In: *Int. J. Dairy Technol.* 64 (1), S. 1–13. DOI: 10.1111/j.1471-0307.2010.00639.x.
- Li, Q.; Liu, L.; Guo, A.; Zhang, X.; Liu, W.; Ruan, Y. (2021): Formation of Multispecies Biofilms and Their Resistance to Disinfectants in Food Processing Environments: A Review. In: *J. Food Prot.* 84 (12), S. 2071–2083. DOI: 10.4315/JFP-21-071.
- Li, X.; Yan, Z.; Xu, J. (2003): Quantitative variation of biofilms among strains in natural populations of *Candida albicans*. In: *Microbiol.* 149 (Pt 2), S. 353–362. DOI: 10.1099/mic.0.25932-0.
- Ling, N.; Forsythe, S.; Wu, Q.; Ding, Y.; Zhang, J.; Zeng, H. (2020): Insights into *Cronobacter sakazakii* Biofilm Formation and Control Strategies in the Food Industry. In: *Engineering* 6 (4), S. 393–405. DOI: 10.1016/j.eng.2020.02.007.

- Liu, J.; Madec, J.-Y.; Bousquet-Mélou, A.; Haenni, M.; Ferran, A. A. (2021): Destruction of *Staphylococcus aureus* biofilms by combining an antibiotic with subtilisin A or calcium gluconate. In: *Sci. Rep.* 11 (1), S. 6225. DOI: 10.1038/s41598-021-85722-4.
- Liu, M.; Wang, H.; Griffiths, M. W. (2007): Regulation of alkaline metalloprotease promoter by N-acyl homoserine lactone quorum sensing in *Pseudomonas fluorescens*. In: *J. Appl. Microbiol.* 103 (6), S. 2174–2184. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2007.03488.x.
- Liu, S.; Gunawan, C.; Barraud, N.; Rice, S. A.; Harry, E. J.; Amal, R. (2016): Understanding, Monitoring, and Controlling Biofilm Growth in Drinking Water Distribution Systems. In: *Environ. Sci. Technol.* 50 (17), S. 8954–8976. DOI: 10.1021/acs.est.6b00835.
- Liu, Y.-J.; Xie, J.; Zhao, L.-J.; Qian, Y.-F.; Zhao, Y.; Liu, X. (2015): Biofilm Formation Characteristics of *Pseudomonas lundensis* Isolated from Meat. In: *J. Food Sci.* 80 (12), M2904-10. DOI: 10.1111/1750-3841.13142.
- Lories, B.; Roberfroid, S.; Dieltjens, L.; Coster, D. de; Foster, K. R.; Steenackers, H. P. (2020): Biofilm Bacteria Use Stress Responses to Detect and Respond to Competitors. In: *Curr. Biol.* 30 (7), 1231-1244.e4. DOI: 10.1016/j.cub.2020.01.065.
- Low, H. Z.; Böhnlein, C.; Sprotte, S.; Wagner, N.; Fiedler, G.; Kabisch, J.; Franz, C. M. A. P. (2020): Fast and Easy Phage-Tagging and Live/Dead Analysis for the Rapid Monitoring of Bacteriophage Infection. In: *Front. Microbiol.* 11, S. 602444. DOI: 10.3389/fmicb.2020.602444.
- Luttner, Edith (2016): Agrarmanagement: Für eine gute Milchhygiene. In: *Allgäuer Bauernblatt*, 2016 (20), S. 23–25. Online verfügbar unter [https://www.wgmev.de/attachments/article/66/Workshop\\_Keimzahlberatung\\_Allg%C3%A4uer-BB\\_Mai\\_2016.pdf](https://www.wgmev.de/attachments/article/66/Workshop_Keimzahlberatung_Allg%C3%A4uer-BB_Mai_2016.pdf), zuletzt geprüft am 10.02.2022.
- Luukkonen, J.; Kemppinen, A.; Kärki, M.; Laitinen, H.; Mäki, M.; Sivelä, S. et al. (2005): The effect of a protective culture and exclusion of nitrate on the survival of enterohemorrhagic *E. coli* and *Listeria* in Edam cheese made from Finnish organic milk. In: *Int. Dairy J.* 15 (5), S. 449–457. DOI: 10.1016/j.idairyj.2004.09.005.
- Macé, S.; Cornet, J.; Chevalier, F.; Cardinal, M.; Pilet, M.-F.; Dousset, X.; Joffraud, J.-J. (2012): Characterisation of the spoilage microbiota in raw salmon (*Salmo salar*) steaks stored under vacuum or modified atmosphere packaging combining conventional methods and PCR-TTGE. In: *Food Microbiol.* 30 (1), S. 164–172. DOI: 10.1016/j.fm.2011.10.013.
- Machado, S. G.; Baglinière, F.; Marchand, S.; van Coillie, E.; Vanetti, M. C. D.; Block, J. de; Heyndrickx, M. (2017): The Biodiversity of the Microbiota Producing Heat-Resistant Enzymes Responsible for Spoilage in Processed Bovine Milk and Dairy Products. In: *Front. Microbiol.* 8, S. 302. DOI: 10.3389/fmicb.2017.00302.
- Mah, T.-F. C.; O'Toole, G. A. (2001): Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. In: *Trends Microbiol.* 9 (1), S. 34–39. DOI: 10.1016/S0966-842X(00)01913-2.
- Mahto, K. U.; Das, S. (2021): Microscopic techniques to evaluate the biofilm formation ability of a marine bacterium *Pseudomonas aeruginosa* PFL-P1 on different substrata. In: *Microsc. Res. Tech.* 84 (10), S. 2451–2461. DOI: 10.1002/jemt.23799.
- Maier, C.; Huptas, C.; Neubeck, M. von; Scherer, S.; Wenning, M.; Lücking, G. (2020): Genetic Organization of the aprX-lipA2 Operon Affects the Proteolytic Potential of *Pseudomonas* Species in Milk. In: *Front. Microbiol.* 11, S. 1190. DOI: 10.3389/fmicb.2020.01190.
- Marchand, S.; Heylen, K.; Messens, W.; Coudijzer, K.; Vos, P. de; Dewettinck, K. et al. (2009a): Seasonal influence on heat-resistant proteolytic capacity of *Pseudomonas lundensis* and *Pseudomonas fragi*, predominant milk spoilers isolated from Belgian raw milk samples. In: *Environ. Microbiol.* 11 (2), S. 467–482. DOI: 10.1111/j.1462-2920.2008.01785.x.

- Marchand, S.; Vandriesche, G.; Coorevits, A.; Coudijzer, K.; Jonghe, V. de; Dewettinck, K. et al. (2009b): Heterogeneity of heat-resistant proteases from milk *Pseudomonas* species. In: *Int. J. Food Microbiol.* 133 (1-2), S. 68–77. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2009.04.027.
- Martin, N. H.; Murphy, S. C.; Ralyea, R. D.; Wiedmann, M.; Boor, K. J. (2011): When cheese gets the blues: *Pseudomonas fluorescens* as the causative agent of cheese spoilage. In: *J. Dairy Sci.* 94 (6), S. 3176–3183. DOI: 10.3168/jds.2011-4312.
- Martins, M. L.; Pinto, U. M.; Riedel, K.; Vanetti, M. C. (2018): Quorum Sensing and Spoilage Potential of Psychrotrophic Enterobacteriaceae Isolated from Milk. In: *Biomed Res. Int.* DOI: 10.1155/2018/2723157.
- Maunsell, B.; Adams, C.; O’Gara, F. (2006): Complex regulation of AprA metalloprotease in *Pseudomonas fluorescens* M114: evidence for the involvement of iron, the ECF sigma factor, PbrA and pseudobactin M114 siderophore. In: *Microbiol.* 152 (1), S. 29–42. DOI: 10.1099/mic.0.28379-0.
- Mazaheri, T.; Cervantes-Huamán, B. R. H.; Bermúdez-Capdevila, M.; Ripolles-Avila, C.; Rodríguez-Jerez, J. J. (2021): *Listeria monocytogenes* Biofilms in the Food Industry: Is the Current Hygiene Program Sufficient to Combat the Persistence of the Pathogen? In: *Microorganisms* 9 (1). DOI: 10.3390/microorganisms9010181.
- McInnis, E. A.; Kalanetra, K. M.; Mills, D. A.; Maga, E. A. (2015): Analysis of raw goat milk microbiota: Impact of stage of lactation and lysozyme on microbial diversity. In: *Food Microbiol.* 46, S. 121–131. DOI: 10.1016/j.fm.2014.07.021.
- Mehta, D. S.; Metzger, L. E.; Hassan, A. N.; Nelson, B. K.; Patel, H. A. (2019): The ability of spore formers to degrade milk proteins, fat, phospholipids, common stabilizers, and exopolysaccharides. In: *J. Dairy Sci.* 102 (12), S. 10799–10813. DOI: 10.3168/jds.2019-16623.
- Mena, K. D.; Gerba, C. P. (2009): Risk assessment of *Pseudomonas aeruginosa* in water. In: *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 201, S. 71–115. DOI: 10.1007/978-1-4419-0032-6\_3.
- Meng, L.; Liu, H.; Dong, L.; Zheng, N.; Xing, M.; Zhang, Y. et al. (2018): Identification and proteolytic activity quantification of *Pseudomonas* spp. isolated from different raw milks at storage temperatures. In: *J. Dairy Sci.* 101 (4), S. 2897–2905. DOI: 10.3168/jds.2017-13617.
- Meng, L.; Zhang, Y.; Liu, H.; Zhao, S.; Wang, J.; Zheng, N. (2017): Characterization of *Pseudomonas* spp. and Associated Proteolytic Properties in Raw Milk Stored at Low Temperatures. In: *Front. Microbiol.* 8, S. 2158. DOI: 10.3389/fmicb.2017.02158.
- Migula, W. (1897): System der Bakterien. Handbuch der Morphologie, Entwicklungsgeschichte und Systematik der Bakterien. 1. Band. Jena: Gustav Fischer.
- Migula, W. (1900): System der Bakterien. Handbuch der Morphologie, Entwicklungsgeschichte und Systematik der Bakterien. 2. Bände. Jena: Gustav Fischer.
- Milch-Güteverordnung (1980): Verordnung über die Güteprüfung und Bezahlung der Anlieferungsmilch. MilchGüV.
- Milchindustrie-Verband e.V. (2020): Fakten Milch. Milch und mehr - die deutsche Milchwirtschaft auf einen Blick. Online verfügbar unter <https://milchindustrie.de/wp-content/uploads/2020/09/Fakten-Milch-September-2020.pdf>, zuletzt geprüft am 11.02.2022.
- Milchindustrie-Verband e.V. (2021a): Beilage zum Geschäftsbericht 2020/2021. Zahlen - Daten - Fakten. Online verfügbar unter [https://milchindustrie.de/wp-content/uploads/2021/09/ZahlenDatenFakten\\_2021.pdf](https://milchindustrie.de/wp-content/uploads/2021/09/ZahlenDatenFakten_2021.pdf), zuletzt geprüft am 11.02.2022.
- Milchindustrie-Verband e.V. (2021b): Wohin die Milch fließt - 2020. Online verfügbar unter <https://milchindustrie.de/wp-content/uploads/2020/06/Wohin-die-Milch-fliesst-2020-scaled.jpg>, zuletzt geprüft am 11.02.2022.



- Milho, C.; Silva, M. D.; Alves, D.; Oliveira, H.; Sousa, C.; Pastrana, L. M. et al. (2019): *Escherichia coli* and *Salmonella Enteritidis* dual-species biofilms: interspecies interactions and antibiofilm efficacy of phages. In: *Sci. Rep.* 9 (1), S. 18183. DOI: 10.1038/s41598-019-54847-y.
- Milojević, L.; Velebit, B.; Baltić, T.; Nikolić, A.; Mitrović, R.; Đorđević, V. (2017): Characterization of biofilms produced by *Escherichia coli* O157 isolated from cattle hides. In: *IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci.* 85. DOI: 10.1088/1755-1315/85/1/012076.
- Montanhini, M. T. M.; Colombo, M.; Nero, L. A.; Bersot, L. S. (2013): Short communication: Presence of neutral metallopeptidase (npr) gene and proteolytic activity of *Bacillus cereus* isolated from dairy products. In: *J. Dairy Sci.* 96 (9), S. 5641–5643. DOI: 10.3168/jds.2013-6886.
- Moravkova, Monika; Huvarova, Veronika; Vlkova, Hana; Kostovova, Iveta; Bacova, Romana (2021): Raw bovine milk as a reservoir of yeast with virulence factors and decreased susceptibility to antifungal agents. In: *Medical mycology* 59 (10), S. 1032–1040. DOI: 10.1093/mmy/myab036.
- Moreno, R.; Rojo, F. (2014): Features of pseudomonads growing at low temperatures: another facet of their versatility. In: *Environ. Microbiol. Rep.* 6 (5), S. 417–426. DOI: 10.1111/1758-2229.12150.
- Morris, L. S.; Evans, J.; Marchesi, J. R. (2012): A robust plate assay for detection of extracellular microbial protease activity in metagenomic screens and pure cultures. In: *J. Microbiol. Methods* 91 (1), S. 144–146. DOI: 10.1016/j.mimet.2012.08.006.
- Muhammad, M. H.; Idris, A. L.; Fan, X.; Guo, Y.; Yu, Y.; Jin, X. et al. (2020): Beyond Risk: Bacterial Biofilms and Their Regulating Approaches. In: *Front. Microbiol.* 11, S. 928. DOI: 10.3389/fmicb.2020.00928.
- Murphy, S. C.; Boor, K. J. (2000): Trouble-shooting sources and causes of high bacteria counts in raw milk. In: *Dairy Food Environ. Sanit.* 20 (8), S. 606–611.
- Murphy, S. C.; Martin, N. H.; Barbano, D. M.; Wiedmann, M. (2016): Influence of raw milk quality on processed dairy products: How do raw milk quality test results relate to product quality and yield? In: *J. Dairy Sci.* 99 (12), S. 10128–10149. DOI: 10.3168/jds.2016-11172.
- Ndahetuye, J. B.; Artursson, K.; Båge, R.; Ingabire, A.; Karege, C.; Djangwani, J. et al. (2020): MILK Symposium review: Microbiological quality and safety of milk from farm to milk collection centers in Rwanda. In: *J. Dairy Sci.* 103 (11), S. 9730–9739. DOI: 10.3168/jds.2020-18302.
- Neu, T. R.; Lawrence, J. R. (1997): Development and structure of microbial biofilms in river water studied by confocal laser scanning microscopy. In: *FEMS Microbiol. Ecol.* 24 (1), S. 11–25. DOI: 10.1111/j.1574-6941.1997.tb00419.x.
- Neubeck, M. von; Baur, C.; Krewinkel, M.; Stoeckel, M.; Kranz, B.; Stressler, T. et al. (2015): Biodiversity of refrigerated raw milk microbiota and their enzymatic spoilage potential. In: *Int. J. Food Microbiol.* 211, S. 57–65. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2015.07.001.
- Nguyen, H. D.; Yuk, H.-G. (2013): Changes in resistance of *Salmonella Typhimurium* biofilms formed under various conditions to industrial sanitizers. In: *Food Control* 29 (1), S. 236–240. DOI: 10.1016/j.foodcont.2012.06.006.
- Nicodème, M.; Grill, J.-P.; Humbert, G.; Gaillard, J.-L. (2005): Extracellular protease activity of different *Pseudomonas* strains: dependence of proteolytic activity on culture conditions. In: *J. Appl. Microbiol.* 99 (3), S. 641–648. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2005.02634.x.
- Nörnberg, M. F.B.L.; Friedrich, R. S.C.; Weiss, R. D.N.; Tondo, E.C.; Brandelli, A. (2010): Proteolytic activity among psychrotrophic bacteria isolated from refrigerated raw milk. In: *Int. J. Dairy Technol.* 63 (1), S. 41–46. DOI: 10.1111/j.1471-0307.2009.00542.x.
- O’Callaghan, T. F.; Sugrue, I.; Hill, C.; Ross, R. P.; Stanton, C. (2012): Nutritional Aspects of Raw Milk. A Beneficial or Hazardous Food Choice. In: L.A. Nero und A.F. De Carvalho (Hg.): *Raw Milk: Balance Between Hazards and Benefits*. Cambridge: Academic Press, S. 127–148.

- O'Connell, A.; Ruegg, P. L.; Jordan, K.; O'Brien, B.; Gleeson, D. (2016): The effect of storage temperature and duration on the microbial quality of bulk tank milk. In: *Journal of dairy science* 99 (5), S. 3367–3374. DOI: 10.3168/jds.2015-10495.
- Oh, Y. J.; Lee, N. R.; Jo, W.; Jung, W. K.; Lim, J. S. (2009): Effects of substrates on biofilm formation observed by atomic force microscopy. In: *Ultramicroscopy* 109 (8), S. 874–880. DOI: 10.1016/j.ultramic.2009.03.042.
- Oliveira, G. B. de; Favarin, L.; Luchese, R. H.; McIntosh, D. (2015): Psychrotrophic bacteria in milk: How much do we really know? In: *Braz. J. Microbiol.* 46 (2), S. 313–321. DOI: 10.1590/S1517-838246220130963.
- Oliveira, G. S.; Lopes, D. R. G.; Andre, C.; Silva, C. C.; Baglinière, F.; Vanetti, M. C. D. (2019): Multispecies biofilm formation by the contaminating microbiota in raw milk. In: *Biofouling* 35 (8), S. 819–831. DOI: 10.1080/08927014.2019.1666267.
- Oliveira, R.; Melo, L.; Oliveira, A.; Salgueiro, R. (1994): Polysaccharide production and biofilm formation by *Pseudomonas fluorescens*: effects of pH and surface material. In: *Colloids Surf. B 2* (1-3), S. 41–46. DOI: 10.1016/0927-7765(94)80016-2.
- Olson, M. E.; Ceri, H.; Morck, D. W.; Buret, A. G.; Read, R. R. (2002): Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics. In: *Can. J. Vet. Res.* 66 (2), S. 86–92.
- Oosthuizen, M. C.; Steyn, B.; Lindsay, D.; Brözel, V. S.; Holy, A. von (2001): Novel method for the proteomic investigation of a dairy-associated *Bacillus cereus* biofilm. In: *FEMS Microbiol. Lett.* 197 (1), S. 47–51. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2001.tb09444.x.
- Ordloff, D. (1993): Boiling water - A good alternative to circulation cleaning. In: *Rinderwelt*.
- O'Toole, G. A.; Kolter, R. (1998): Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. In: *Mol. Microbiol.* 30 (2), S. 295–304. DOI: 10.1046/j.1365-2958.1998.01062.x.
- O'Toole, George A. (2011): Microtiter Dish Biofilm Formation Assay. In: *J. Vis. Exp.* (47). DOI: 10.3791/2437.
- Ottom, L. M.; da Silva Campos, M.; Meneghetti, K. L.; Corção, G. (2017): Influence of twitching and swarming motilities on biofilm formation in *Pseudomonas* strains. In: *Arch. Microbiol.* 199 (5), S. 677–682. DOI: 10.1007/s00203-017-1344-7.
- Ozer, E.; Yaniv, K.; Chetrit, E.; Boyarski, A.; Meijler, M. M.; Berkovich, R. et al. (2021): An inside look at a biofilm: *Pseudomonas aeruginosa* flagella biotracking. In: *Sci. Adv.* 7 (24). DOI: 10.1126/sciadv.abg8581.
- Paliy, A.; Naumenko, A.; Zolotaryova, S.; Zolotarev, A.; Tarasenko, L.; Nechyporenko, O. et al. (2020): Identifying changes in the milking rubber of milking machines during testing and under industrial conditions. In: *EEJET* 5 (1 (107)), S. 127–137. DOI: 10.15587/1729-4061.2020.212772.
- Palleroni, N. J. (2010): The *Pseudomonas* Story. In: *Environ. Microbiol.* 12 (6), S. 1377–1383. DOI: 10.1111/j.1462-2920.2009.02041.x.
- Palleroni, N. J. (2015): *Pseudomonas*. In: *BMSAB*. DOI: 10.1002/9781118960608.gbm01210.
- Pang, X.; Chen, L.; Yuk, H.-G. (2020): Stress response and survival of *Salmonella Enteritidis* in single and dual species biofilms with *Pseudomonas fluorescens* following repeated exposure to quaternary ammonium compounds. In: *Int. J. Food Microbiol.* 325. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108643.
- Parente, E.; Ricciardi, A.; Zotta, T. (2020): The microbiota of dairy milk: A review. In: *Int. Dairy J.* 107. DOI: 10.1016/j.idairyj.2020.104714.
- Parry, D. R.; Egdell, J. W. (1969): The efficiency of acidified boiling water cleaning of pipeline milking machines in parlours. In: *J. Soc. Dairy Technol.* 22 (2), S. 84–89. DOI: 10.1111/j.1471-0307.1969.tb01048.x.

- Paul Mueller Company (2022): Plattenkühler. Online verfügbar unter <https://de.paulmueller.com/milchkuehlung-und-lagerung/plattenkuhler>, zuletzt geprüft am 08.03.2022.
- Peng, J.-S.; Tsai, W.-C.; Chou, C.-C. (2002): Inactivation and removal of *Bacillus cereus* by sanitizer and detergent. In: *Int. J. Food Microbiol.* 77 (1-2), S. 11–18. DOI: 10.1016/S0168-1605(02)00060-0.
- Percival, S. L.; Suleman, L.; Vuotto, C.; Donelli, G. (2015): Healthcare-associated infections, medical devices and biofilms: risk, tolerance and control. In: *J. Med. Microbiol.* 64 (Pt 4), S. 323–334. DOI: 10.1099/jmm.0.000032.
- Pereira, M. A.; Alves, M. M.; Azeredo, J.; Mota, M.; Oliveira, R. (2000): Influence of physico-chemical properties of porous microcarriers on the adhesion of an anaerobic consortium. In: *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 24 (3), S. 181–186. DOI: 10.1038/sj.jim.2900799.
- Pereira, R. P. A.; Peplies, J.; Mushi, D.; Brettar, I.; Höfle, M. G. (2018): *Pseudomonas*-Specific NGS Assay Provides Insight Into Abundance and Dynamics of *Pseudomonas* Species Including *P. aeruginosa* in a Cooling Tower. In: *Front. Microbiol.* 9. DOI: 10.3389/fmicb.2018.01958.
- Perkins, N. R.; Kelton, D. F.; Hand, K. J.; MacNaughton, G.; Berke, O.; Leslie, K. E. (2009): An analysis of the relationship between bulk tank milk quality and wash water quality on dairy farms in Ontario, Canada. In: *J. Dairy Sci.* 92 (8), S. 3714–3722. DOI: 10.3168/jds.2009-2030.
- Pinto, L.; Ippolito, A.; Baruzzi, F. (2015): Control of spoiler *Pseudomonas* spp. on fresh cut vegetables by neutral electrolyzed water. In: *Food Microbiol.* 50, S. 102–108. DOI: 10.1016/j.fm.2015.04.003.
- Pipattanachat, S.; Qin, J.; Rokaya, D.; Thanyasrisung, P.; Srimaneepong, V. (2021): Biofilm inhibition and bactericidal activity of NiTi alloy coated with graphene oxide/silver nanoparticles via electrophoretic deposition. In: *Sci. Rep.* 11 (1). DOI: 10.1038/s41598-021-92340-7.
- Porcellato, D.; Smistad, M.; Bombelli, A.; Abdelghani, A.; Jørgensen, H. J.; Skeie, S. B. (2021): Longitudinal Study of the Bulk Tank Milk Microbiota Reveals Major Temporal Shifts in Composition. In: *Front. Microbiol.* 12. DOI: 10.3389/fmicb.2021.616429.
- Pöther, R.; Scheffel, F.; Behr, M.; Krowas, D. (2019): Monitoring the microbial status of raw and pasteurized milk from vending -machines in Brandenburg, Germany. In: *J. Food Saf. Food Qual.* 70, S. 160–168.
- Pyz-Łukasik, R.; Paszkiewicz, W.; Tatara, M. R.; Brodzki, P.; Bełkot, Z. (2015): Microbiological quality of milk sold directly from producers to consumers. In: *J. Dairy Sci.* 98 (7), S. 4294–4301. DOI: 10.3168/jds.2014-9187.
- Quigley, L.; O'Sullivan, O.; Stanton, C.; Beresford, T. P.; Ross, R. P.; Fitzgerald, G. F.; Cotter, P. D. (2013): The complex microbiota of raw milk. In: *FEMS Microbiol. Rev.* 37 (5), S. 664–698. DOI: 10.1111/1574-6976.12030.
- Ranieri, M. L.; Ivy, R. A.; Mitchell, W. R.; Call, E.; Masiello, S. N.; Wiedmann, M.; Boor, K. J. (2012): Real-time PCR detection of *Paenibacillus* spp. in raw milk to predict shelf life performance of pasteurized fluid milk products. In: *Appl. Environ. Microbiol.* 78 (16), S. 5855–5863. DOI: 10.1128/AEM.01361-12.
- Reguillo, L.; Hernández, M.; Barrientos, E.; Perez-Rodriguez, F.; Valero, A. (2018): Evaluation of the Influence of Frequency of Milk Collection and Milking Dayshift on the Microbiological Quality of Raw Milk. In: *J. Food Qual.* 2018 (2), S. 1–7. DOI: 10.1155/2018/1306107.
- Reichhardt, C.; Parsek, M. R. (2019): Confocal Laser Scanning Microscopy for Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Architecture and Matrix Localization. In: *Front. Microbiol.* 10. DOI: 10.3389/fmicb.2019.00677.

- Reinheimer, J. A.; Demkow, M. R.; Calabrese, L. A. (1990): Characteristics of psychrotrophic microflora of bulk-collected raw milk from the Santa Fe area (Argentina). In: *Aust. J. Dairy Technol.* 45, S. 41–46.
- Ribeiro, A. C.; Bruzaroski, S. R.; Pereira, F. De A.B.; Paião, F. G.; Poli-Frederico, R. C.; Santos, J. S.; Santana, E. H. de (2018): Proteolytic behavior of isolated *Pseudomonas* spp. from refrigerated raw milk in different concentrations and storage temperatures. In: *Semin. Cienc. Agrar* 39 (1), S. 419–424. DOI: 10.5433/1679-0359.2018v39n1p419.
- Rittal Systems Ltd. (2021): White Paper: Stainless Steel Enclosures and Industrial Applications. Unter Mitarbeit von Nathan Xavier. Hg. v. Rittal Systems Ltd. Online verfügbar unter [https://www.rittal.com/imf3/none/4\\_7700/](https://www.rittal.com/imf3/none/4_7700/), zuletzt geprüft am 12.02.2022.
- Rodriguez-Rodriguez, E. M.; Sanz Alaejos, M.; Diaz Romero, C. (2001): Mineral Concentrations in Cow's Milk from the Canary Island. In: *J. Food Compos. Anal.* (14), S. 419–430. DOI: 10.006/jfca.2000.0986.
- RohmilchGütV (2021): Verordnung zur Fortentwicklung des Rohmilchgüterrechts (Rohmilchgüterverordnung).
- Rosado de Castro, M.; da Silva Fernandes, M.; Kabuki, D. Y.; Kuaye, A. Y. (2017): Biofilm formation on stainless steel as a function of time and temperature and control through sanitizers. In: *Int. Dairy J.* 68, S. 9–16. DOI: 10.1016/j.idairyj.2016.12.005.
- Rosenstock, E.; ebert, J.; Scheibner, A. (2021): Cultured Milk. Fermented Dairy Foods along the Southwest Asian–European Neolithic Trajectory. In: *Curr. Anthropol.* 62. DOI: 10.1086/714961.
- Rossi, C.; Chaves-López, C.; Serio, A.; Goffredo, E.; Goga, B. T.; Paparella, A. (2016): Influence of Incubation Conditions on Biofilm Formation by *Pseudomonas Fluorescens* Isolated from Dairy Products and Dairy Manufacturing Plants. In: *Ital. J. Food Saf.* 5 (3), S. 5793. DOI: 10.4081/ijfs.2016.5793.
- Rossi, C.; Serio, A.; Chaves-López, C.; Anniballi, F.; Auricchio, B.; Goffredo, E. et al. (2018): Biofilm formation, pigment production and motility in *Pseudomonas* spp. isolated from the dairy industry. In: *Food Control* 86, S. 241–248. DOI: 10.1016/j.foodcont.2017.11.018.
- Sadiq, F. A.; Flint, S.; Yuan, L.; Li, Y.; Liu, T.; He, G. (2017): Propensity for biofilm formation by aerobic mesophilic and thermophilic spore forming bacteria isolated from Chinese milk powders. In: *Int. J. Food Microbiol.* 262, S. 89–98. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2017.09.015.
- Samarzija, D.; Zamberlin, S.; & Pogacic, T. (2012): Psychrotrophic bacteria and milk and dairy products quality. In: *Mljekarstvo / Dairy* 62 (2), S. 77–95.
- Sauer, K. (2003): The genomics and proteomics of biofilm formation. In: *Genome Biol.* 4 (6). DOI: 10.1186/gb-2003-4-6-219.
- Scales, B. S.; Dickson, R. P.; LiPuma, J. J.; Huffnagle, G. B. (2014): Microbiology, genomics, and clinical significance of the *Pseudomonas fluorescens* species complex, an unappreciated colonizer of humans. In: *Clin. Microbiol. Rev.* 27 (4), S. 927–948. DOI: 10.1128/cmr.00044-14.
- Schauer, Bernhard; Wald, Regina; Urbantke, Verena; Loncaric, Igor; Baumgartner, Martina (2021): Tracing Mastitis Pathogens-Epidemiological Investigations of a *Pseudomonas aeruginosa* Mastitis Outbreak in an Austrian Dairy Herd. In: *Animals : an open access journal from MDPI* 11 (2). DOI: 10.3390/ani11020279.
- Scheldeman, P.; Pil, A.; Herman, L.; Vos, P. de; Heyndrickx, M. (2005): Incidence and diversity of potentially highly heat-resistant spores isolated at dairy farms. In: *Appl. Environ. Microbiol.* 71 (3), S. 1480–1494. DOI: 10.1128/AEM.71.3.1480-1494.2005.
- Schlegelová, J.; Babák, V.; Holasová, M.; Konstantinová, L.; Necidová, L.; Šišák, F. et al. (2010): Microbial contamination after sanitation of food contact surfaces in dairy and meat processing plants. In: *Czech J. Food Sci.* 28 (5), S. 450–461. DOI: 10.17221/65/2009-CJFS.

- Schwering, M.; Song, J.; Louie, M.; Turner, R. J.; Ceri, H. (2013): Multi-species biofilms defined from drinking water microorganisms provide increased protection against chlorine disinfection. In: *Biofouling* 29 (8), S. 917–928. DOI: 10.1080/08927014.2013.816298.
- Secades, P.; Alvarez, B.; Guijarro, J.A (2003): Purification and properties of a new psychrophilic metalloprotease (Fpp2) in the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum*. In: *FEMS Microbiol. Lett.* 226 (2), S. 273–279. DOI: 10.1016/S0378-1097(03)00599-8.
- Shi, X.; Zhu, X. (2009): Biofilm formation and food safety in food industries. In: *Trends Food Sci. Technol.* 20 (9), S. 407–413. DOI: 10.1016/j.tifs.2009.01.054.
- Sinde, E.; Carballo, J. (2000): Attachment of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* to stainless steel, rubber and polytetrafluorethylene: the influence of free energy and the effect of commercial sanitizers. In: *Food Microbiol.* 17 (4), S. 439–447. DOI: 10.1006/fmic.2000.0339.
- Sindi, A.; van Chawn, M. B.; Hernandez, M. E.; Green, K.; Islam, M. K.; Locher, C.; Hammer, K. (2019): Anti-biofilm effects and characterisation of the hydrogen peroxide activity of a range of Western Australian honeys compared to Manuka and multifloral honeys. In: *Sci. Rep.* 9 (1). DOI: 10.1038/s41598-019-54217-8.
- Sinner, H. (1960): Über das Waschen mit Haushaltswaschmaschinen. 2. Auflage. Hamburg: Haus+Heim.
- Skandamis, P. N.; Nychas, G.-J. E. (2012): Quorum sensing in the context of food microbiology. In: *Appl. Environ. Microbiol.* 78 (16), S. 5473–5482. DOI: 10.1128/AEM.00468-12.
- Skeie, S. B.; Håland, M.; Thorsen, I. M.; Narvhus, J.; Porcellato, D. (2019): Bulk tank raw milk microbiota differs within and between farms: A moving goalpost challenging quality control. In: *J. Dairy Sci.* 102 (3), S. 1959–1971. DOI: 10.3168/jds.2017-14083.
- Smigic, N.; Djekic, I.; Tomasevic, I.; Stanisic, N.; Nedeljkovic, A.; Lukovic, V.; Miocinovic, J. (2017): Organic and conventional milk – insight on potential differences. In: *BFJ* 119 (2), S. 366–376. DOI: 10.1108/BFJ-06-2016-0237.
- Somerton, B.; Lindsay, D.; Palmer, J.; Brooks, J.; Flint, S. (2015): Changes in Sodium, Calcium, and Magnesium Ion Concentrations That Inhibit *Geobacillus* Biofilms Have No Effect on *Anoxybacillus flavithermus* Biofilms. In: *Appl. Environ. Microbiol.* 81 (15), S. 5115–5122. DOI: 10.1128/AEM.01037-15.
- Song, B.; Leff, L. G. (2005): Identification and characterization of bacterial isolates from the Mir space station. In: *Microbiol. Res.* 160 (2), S. 111–117. DOI: 10.1016/j.micres.2004.10.005.
- Sørensen, J.; Nybroe, O. (2004): *Pseudomonas* in the Soil Environment. In: J. L. Ramos (Hg.): *Pseudomonas*. Genomics, Life Style and Molecular Architecture. Volume 1. Boston: Springer, S. 369–401.
- Sørhaug, T.; Stepaniak, L. (1997): Psychrotrophs and their enzymes in milk and dairy products: Quality aspects. In: *Trends Food Sci. Technol.* 8 (2), S. 35–41. DOI: 10.1016/S0924-2244(97)01006-6.
- Spector, M. P.; Kenyon, W. J. (2012): Resistance and survival strategies of *Salmonella enterica* to environmental stresses. In: *Int. Food Res. J.* 45 (2), S. 455–481. DOI: 10.1016/j.foodres.2011.06.056.
- Stellato, G.; Utter, D. R.; Voorhis, A.; Angelis, M. de; Eren, A. M.; Ercolini, D. (2017): A Few *Pseudomonas* Oligotypes Dominate in the Meat and Dairy Processing Environment. In: *Front. Microbiol.* 8. DOI: 10.3389/fmicb.2017.00264.
- Stepanović, S.; Vuković, D.; Dakić, I.; Savić, B.; Švabić-Vlahović, M. (2000): A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. In: *J. Microbiol. Methods* 40 (2), S. 175–179. DOI: 10.1016/S0167-7012(00)00122-6.

- Stiefel, P.; Schmidt-Emrich, S.; Maniura-Weber, K.; Ren, Q. (2015): Critical aspects of using bacterial cell viability assays with the fluorophores SYTO9 and propidium iodide. In: *BMC Microbiol.* 15, S. 36. DOI: 10.1186/s12866-015-0376-x.
- Stoeckel, M.; Lidolt, M.; Achberger, V.; Glück, C.; Krewinkel, M.; Stressler, T. et al. (2016): Growth of *Pseudomonas weihenstephanensis*, *Pseudomonas proteolytica* and *Pseudomonas* sp. in raw milk: Impact of residual heat-stable enzyme activity on stability of UHT milk during shelf-life. In: *Int. Dairy J.* 59, S. 20–28. DOI: 10.1016/j.idairyj.2016.02.045.
- Stoodley, P.; Sauer, K.; Davies, D. G.; Costerton, J. W. (2002): Biofilms as complex differentiated communities. In: *Annu. Rev. Microbiol.* 56, S. 187–209. DOI: 10.1146/annurev.micro.56.012302.160705.
- Sun, L.; Lundh, Å.; Höjer, A.; Bernes, G.; Nilsson, D.; Johansson, M. et al. (2022): Milking system and premilking routines have a strong effect on the microbial community in bulk tank milk. In: *J. Dairy Sci.* 105 (1), S. 123–139. DOI: 10.3168/jds.2021-20661.
- Teh, K. H. (2013): Enzymes produced by bacteria within biofilms of dairy origin and their effect on dairy products. Dissertation. Massay University, Palmerston North.
- Teh, K. H.; Flint, S.; Palmer, J.; Andrewes, P.; Bremer, P.; Lindsay, D. (2012): Proteolysis produced within biofilms of bacterial isolates from raw milk tankers. In: *Int. J. Food Microbiol.* 157 (1), S. 28–34. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2012.04.008.
- Teh, K. H.; Flint, S.; Palmer, J.; Andrewes, P.; Bremer, P.; Lindsay, D. (2014): Biofilm – An unrecognised source of spoilage enzymes in dairy products? In: *Int. Dairy J.* 34 (1), S. 32–40. DOI: 10.1016/j.idairyj.2013.07.002.
- Teh, K. H.; Flint, S.; Palmer, J.; Lindsay, D.; Andrewes, P.; Bremer, P. (2011): Thermo-resistant enzyme-producing bacteria isolated from the internal surfaces of raw milk tankers. In: *Int. Dairy J.* 21 (10), S. 742–747. DOI: 10.1016/j.idairyj.2011.04.013.
- Teh, K. H.; Lindsay, D.; Palmer, J.; Andrewes, P.; Bremer, P.; Flint, S. (2013): Lipolysis within single culture and co-culture biofilms of dairy origin. In: *Int. J. Food Microbiol.* 163 (2-3), S. 129–135. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2013.02.009.
- Teixeira, P.; Lopes, Z.; Azeredo, J.; Oliveira, R.; Vieira, M. J. (2005): Physico-chemical surface characterization of a bacterial population isolated from a milking machine. In: *Food Microbiol.* 22 (2-3), S. 247–251. DOI: 10.1016/j.fm.2004.03.010.
- Teixeira, P.; Oliveira, R. (1999): Influence of surface characteristics on the adhesion of *Alcaligenes denitrificans* to polymeric substrates. In: *J. Adhes. Sci. Technol.* 13 (11), S. 1287–1294. DOI: 10.1163/156856199X00190.
- Thomason, M. K.; Fontaine, F.; Lay, N. de; Storz, G. (2012): A small RNA that regulates motility and biofilm formation in response to changes in nutrient availability in *Escherichia coli*. In: *Mol. Microbiol.* 84 (1), S. 17–35. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2012.07965.x.
- Tilocca, B.; Costanzo, N.; Morittu, V. M.; Spina, A. A.; Soggiu, A.; Britti, D. et al. (2020): Milk microbiota: Characterization methods and role in cheese production. In: *J. Proteom.* 210, S. 103534. DOI: 10.1016/j.jprot.2019.103534.
- Tran, L.; Wu, X. C.; Wong, S. L. (1991): Cloning and expression of a novel protease gene encoding an extracellular neutral protease from *Bacillus subtilis*. In: *J. Bacteriol.* 173 (20), S. 6364–6372. DOI: 10.1128/jb.173.20.6364-6372.1991.
- Tribelli, P. M.; López, N. I. (2011): Poly(3-hydroxybutyrate) influences biofilm formation and motility in the novel Antarctic species *Pseudomonas extremaustralis* under cold conditions. In: *Extremophiles* 15 (5), S. 541–547. DOI: 10.1007/s00792-011-0384-1.

- Vacheyrou, M.; Normand, A.-C.; Guyot, P.; Cassagne, C.; Piarroux, R.; Bouton, Y. (2011): Cultivable microbial communities in raw cow milk and potential transfers from stables of sixteen French farms. In: *Int. J. Food Microbiol.* 146 (3), S. 253–262. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2011.02.033.
- van den Broek, D.; Bloemberg, G. V.; Lugtenberg, B. (2005): The role of phenotypic variation in rhizosphere *Pseudomonas* bacteria. In: *Environ. Microbiol.* 7 (11), S. 1686–1697. DOI: 10.1111/j.1462-2920.2005.00912.x.
- van Hoogmoed, C. G.; van der Mei, H. C.; Busscher, H. J. (1997): The influence of calcium on the initial adhesion of *S. thermophilus* to stainless steel under flow studied by metallurgical microscopy. In: *Biofouling* 11 (2), S. 167–176. DOI: 10.1080/08927019709378327.
- van Oss, C. J.; Giese, R. F. (1995): The Hydrophilicity and Hydrophobicity of Clay Minerals. In: *Clays and Clay Minerals* 43 (4), S. 474–477. DOI: 10.1346/CCMN.1995.0430411.
- VDLUFA e.V. (2003): VDLUFA-Methodenbuch. Milch und Milchprodukte: Bestimmung von Pseudomonaden - Koloniezählverfahren mit C-F-C-Selektivagar. VI. Darmstadt: VDLUFA-Verlag.
- Verdier-Metz, I.; Michel, V.; Delbès, C.; Montel, M.-C. (2009): Do milking practices influence the bacterial diversity of raw milk? In: *Food Microbiol.* 26 (3), S. 305–310. DOI: 10.1016/j.fm.2008.12.005.
- Verordnung (EG) Nr. 853/2004: des europäischen Parlaments und Rates vom 29. April 2004 mit spezifischen Hygienevorschriften für Lebensmittel tierischen Ursprungs.
- Verran, J.; Airey, P.; Packer, A.; Whitehead, K. A. (2008): Microbial Retention on Open Food Contact Surfaces and Implications for Food Contamination. Chapter 8. In: A. I. Laskin, G. M. Gadd und S. Sariaslani (Hg.): *Advances in applied microbiology*, Bd. 64. Boston: Academic Press, S. 223–246.
- Vidal, A. M.C.; Saran Netto, A.; Vaz, A. C.N.; Capodifoglio, E.; Gonçalves, A. C.S.; Rossi, G. A.M. et al. (2017): *Pseudomonas* spp.: contamination sources in bulk tanks of dairy farms. In: *Pesq. Vet. Bras.* 37 (9), S. 941–948. DOI: 10.1590/s0100-736x2017000900008.
- Vithanage, N. R. (2017): Mapping the thermo-tolerant proteases in ultra high temperature (UHT) treated milk using molecular approaches. Dissertation. Victoria University, Melbourne.
- Vithanage, N. R.; Dissanayake, M.; Bolge, G.; Palombo, E. A.; Yeager, T. R.; Datta, N. (2016): Biodiversity of culturable psychrotrophic microbiota in raw milk attributable to refrigeration conditions, seasonality and their spoilage potential. In: *Int. Dairy J.* 57, S. 80–90. DOI: 10.1016/j.idairyj.2016.02.042.
- Vithanage, N. R.; Dissanayake, M.; Bolge, G.; Palombo, E. A.; Yeager, T. R.; Datta, N. (2017): Microbiological quality of raw milk attributable to prolonged refrigeration conditions. In: *J. Dairy Res.* 84 (1), S. 92–101. DOI: 10.1017/S0022029916000728.
- Vlková, H.; Babák, V.; Seydlová, R.; Pavlík, I.; Schlegelová, J. (2008): Biofilms and hygiene on dairy farms and in the dairy industry: sanitation chemical products and their effectiveness on biofilms – a review. In: *Czech J. Food Sci.* 26 (5), S. 309–323. DOI: 10.17221/1128-CJFS.
- Vrese, M. de (2010): Was ist ESL-Milch? Teil 1: Herstellung und Nährstoffprofil. In: *Ernährungs Umschau* (12). Online verfügbar unter [https://www.ernaehrungs-umschau.de/fileadmin/Ernaehrungs-Umschau/pdfs/pdf\\_2010/12\\_10/EU12\\_2010\\_644\\_650.qxd.pdf](https://www.ernaehrungs-umschau.de/fileadmin/Ernaehrungs-Umschau/pdfs/pdf_2010/12_10/EU12_2010_644_650.qxd.pdf).
- Walton, M. (2008): Principles of Cleaning-in-Place (CIP). In: A. Y. Tamime (Hg.): *Cleaning-in-place. Dairy, food and beverage operations*. Oxford: Blackwell Pub.
- Wang, H.; Wilksch, J. J.; Chen, L.; Tan, J. W. H.; Strugnell, R. A.; Gee, M. L. (2017): Influence of Fimbriae on Bacterial Adhesion and Viscoelasticity and Correlations of the Two Properties with Biofilm Formation. In: *Langmuir* 33 (1), S. 100–106. DOI: 10.1021/acs.langmuir.6b03764.

- Wang, L.; Jayarao, B. M. (2001): Phenotypic and Genotypic Characterization of *Pseudomonas fluorescens* Isolated from Bulk Tank Milk. In: *J. Dairy Sci.* 84 (6), S. 1421–1429. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(01)70174-9.
- Wang, Z.-W.; Chen, S. (2009): Potential of biofilm-based biofuel production. In: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 83 (1), S. 1–18. DOI: 10.1007/s00253-009-1940-9.
- West, S. A.; Griffin, A. S.; Gardner, A.; Diggle, S. P. (2006): Social evolution theory for microorganisms. In: *Nat. Rev. Microbiol.* 4 (8), S. 597–607. DOI: 10.1038/nrmicro1461.
- Westall, F.; Steele, A.; Toporski, J.; Walsh, M.; Allen, C.; Guidry, S. et al. (2000): Polymeric substances and biofilms as biomarkers in terrestrial materials: Implications for extraterrestrial samples. In: *J. Geophys. Res.* 105, S. 24511–24527. DOI: 10.1029/2000JE001250.
- Wijman, J. G. E.; Leeuw, P. P. L. A. de; Moezelaar, R.; Zwietering, M. H.; Abee, T. (2007): Air-liquid interface biofilms of *Bacillus cereus*: formation, sporulation, and dispersion. In: *IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci.* 73 (5), S. 1481–1488. DOI: 10.1128/AEM.01781-06.
- Wildbrett, G. (2006): Reinigung und Desinfektion in der Lebensmittelindustrie. Hamburg: Behr's Verlag.
- Woods, R. G.; Burger, M.; Beven, C.-A.; Beacham, I. R. (2001): The aprX-lipA operon of *Pseudomonas fluorescens* B52: a molecular analysis of metalloprotease and lipase production. In: *Microbiol.* 147 (2), S. 345–354. DOI: 10.1099/00221287-147-2-345.
- Yagoub, S.O.; Bellow, F.A.; El Zubeir, I.E.M. (2008): Effect of Temperature and Storage Period on the Constituents of Milk Inoculated with *Pseudomonas aeruginosa*. In: *Res. J. Microbiol.* 3, S. 30–34. DOI: 10.3923/jm.2008.30.34.
- Yap, M.; Gleeson, D.; O'Toole, P. W.; O'Sullivan, O.; Cotter, P. D. (2021): Seasonality and Geography Have a Greater Influence than the Use of Chlorine-Based Cleaning Agents on the Microbiota of Bulk Tank Raw Milk. In: *Appl. Environ. Microbiol.* 87 (22). DOI: 10.1128/AEM.01081-21.
- Yuan, L.; Burmølle, M.; Sadiq, F. A.; Wang, N.; He, G. (2018a): Interspecies variation in biofilm-forming capacity of psychrotrophic bacterial isolates from Chinese raw milk. In: *Food Control* 91, S. 47–57. DOI: 10.1016/j.foodcont.2018.03.026.
- Yuan, L.; Sadiq, F. A.; Burmølle, M.; Liu, T.; He, G. (2018b): Insights into Bacterial Milk Spoilage with Particular Emphasis on the Roles of Heat-Stable Enzymes, Biofilms, and Quorum Sensing. In: *J. Food Prot.* 81 (10), S. 1651–1660. DOI: 10.4315/0362-028X.JFP-18-094.
- Yuan, L.; Sadiq, F. A.; Burmølle, M.; Wang, N. I.; He, G. (2019): Insights into Psychrotrophic Bacteria in Raw Milk: A Review. In: *J. Food Prot.* 82 (7), S. 1148–1159. DOI: 10.4315/0362-028X.JFP-19-032.
- Zdanowicz, M.; Shelford, J. A.; Tucker, C. B.; Weary, D. M.; Keyserlingk, M.A.G. von (2004): Bacterial Populations on Teat Ends of Dairy Cows Housed in Free Stalls and Bedded with Either Sand or Sawdust. In: *J. Dairy Sci.* 87 (6), S. 1694–1701. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(04)73322-6.
- Zhao, M.; Tyson, C.; Chen, H.-C.; Paudel, S.; Gitaitis, R.; Kvitko, B.; Dutta, B. (2021): *Pseudomonas alliivorans* sp. nov., a plant-pathogenic bacterium isolated from onion foliage in Georgia, USA. In: *Syst. Appl. Microbiol.* 45 (1), S. 126278. DOI: 10.1016/j.syapm.2021.126278.
- Zhong, X.; Wu, Q.; Zhang, J.; Ma, Z.; Wang, J.; Nie, X. et al. (2020): *Campylobacter jejuni* Biofilm Formation Under Aerobic Conditions and Inhibition by ZnO Nanoparticles. In: *Front. Microbiol.* 11, S. 207. DOI: 10.3389/fmicb.2020.00207.
- Zou, M.; Liu, D. (2018): A systematic characterization of the distribution, biofilm-forming potential and the resistance of the biofilms to the CIP processes of the bacteria in a milk powder processing factory. In: *Food Res. Int.* 113, S. 316–326. DOI: 10.1016/j.foodres.2018.07.020.



## Anhang

Tabelle 9: Fragebogen zur Erfassung hofspezifischer Parameter der 38 Erzeugerhöfe zur Analyse möglicher Einflussfaktoren auf die Pseudomonas- und Gesamtkeimzahl mit dazugehörigen Erläuterungen für die Milcherzeuger.

Hofspezifische Parameter	Molkerei A			Molkerei B		
	Hof a	Hof b	Hof ...	Hof...	Hof ...	Hof ...
<b>1. Art des Betriebes:</b> Konventionell (K) Ökologisch (Ö)						
<b>2. Intervall der Milchabholung (Tage)</b>						
<b>3. Melksystem:</b> Manueller Melkstand (MM) Melkroboter (MR) Rohrmelkanlage (R)						
<b>4. Spülsystem Melkstand:</b> Kaltwasser, ca. 40°C per Hand (K) Heißwasser >70°C (H) Zirkulation Säure/Lauge, ca. 60 °C (S/L)						
<b>5. Milchstapelung:</b> Wanne (W) Tank (T)						
<b>6. Kühlung:</b> Durchlauf (D) Im Tank (T)						
<b>7. Euterhygiene:</b> Trocken (z. B. mit Holzwolle) (T) Einwegtücher (feucht) (EW) Waschbare Tücher (feucht) (WT) Bürste Melkroboter (MR)						
<b>8. Tierhaltung:</b> Anbindestall (S) Laufstall (L) Weide (W)						
<b>9. Wasserversorgung:</b> Eigener Brunnen (B) Kommunaler Wasserversorger (kW)						
<b>10. Liefermenge/Jahr</b>						
<b>11. Gesamtkeimzahl Ø 12 Monate (Zellen/ml)</b>						
<b>12. Somatische Zellzahl Ø 12 Monate (Zellen/ml)</b>						

### Erläuterungen:

- Punkt 3: Definition Rohrmelkanlage: Melkgeschirr am Standplatz des Milchviehs, Rohrleitung vom Standplatz zum Tank
- Punkt 4: Zu Kaltwasser: Ohne Zugabe von Säure/Lauge, ohne Wasser mit Temperaturen > 70°C
- Punkt 6: Durchlaufkühlung: Vorkühlung (mit Eis- oder Brunnenwasser)  
Kühlung im Tank: Milch wird erst im Tank gekühlt
- Punkt 7: Einwegtücher: Fertig, gekauft, evtl. mit alkoholischer Lösung  
Waschbare Tücher: Mehrfach verwendet, mit Wasser
- Punkt 8: Tierhaltung: Auch Mehrfach-Angaben, z. B. für Winter und Sommer, möglich

Tabelle 10: Verbrauchs- und sonstige Materialien.

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Becherglas	DWK Life Science, Deutschland
Edelstahl-Plättchen (AISI 316-2B, 40 x 20 x 1 mm)	Metall-Industriewerk Hofmann GmbH, Deutschland
Einkanalpipette Research Plus; 100, 200, 1000	Eppendorf AG, Deutschland
Einmal Impföse; 1 µl, 10 µl	Sarstedt AG & Co. KG, Deutschland
Einmal Laborhandschuhe, NitrilSoft®	Süd-Laborbedarf GmbH, Deutschland
Einmal Petrischalen mit Deckel, light Version	Greiner Bio-One GmbH, Deutschland
Einmal Plattierungsspatel	Sarstedt AG & Co. KG, Deutschland
Filterspitzen; 100, 200 µl, 1000 µl	Nerbe Plus GmbH & Co. KG, Deutschland
Gasperlen, Ø 2 mm	Merck KGaA, Deutschland
Gummi-Plättchen (EPDM, Lebensmittelecht, 40 x 20 x 3 mm)	Nord-Industriegummi GmbH & Co. KG, Deutschland
Kupfer-Klebeband	Plano GmbH, Deutschland
Laborschere, Edelstahl	Bochem Instrumente GmbH, Deutschland
Leitpaste	Plano GmbH, Deutschland
Mehrkanalpipette Research pro; 300, 1200	Eppendorf AG, Deutschland
Mikro-Well-Platte, 96/F-PP, schwarz	Eppendorf AG, Deutschland
Plattierungsspatel	Sarstedt AG & Co. KG, Deutschland
Eppendorf Tubes, 5 ml	Eppendorf AG, Deutschland
Reagiergefäß, 2 ml Safe Seal	Sarstedt AG & Co. KG, Deutschland
Schraubröhre, 50 ml	Sarstedt AG & Co. KG, Deutschland
Spritzenfilter Filtropur S, 0.45 µm	Sarstedt AG & Co. KG, Deutschland
Stahlwanne	Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland
Stiftprobenteller aus Aluminium	Plano GmbH, Deutschland
Szintillations-Fläschchen	Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland
Tempex Zellstoff, ungebleicht	Temca GmbH & Co. KG, Deutschland
Tupfer in Röhrchen	VWR International, USA
Vernichtungsbeutel	Sarstedt AG & Co. KG, Deutschland
Zellkultur-Platte, 96-Well, Flach-Boden	Greiner Bio-One GmbH, Deutschland

Tabelle 11: Geräte

Gerät	Applikation	Hersteller
Durchflusszytometer BactoCount IBCm	Durchflusszytometrische Bestimmung der Bakterienzahl in Rohmilch	Bentley Instruments Inc., USA
Durchflusszytometer FACSCalibur™	Bestimmung der Zellzahl	BD Bioscience, USA
Feldemissions- Rasterelektronenmikroskop Quanta™ 250 FEG	Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von Biofilmen	FEI, Tschechische Republik
Infrarot-Thermometer Traceable®	Temperaturbestimmung von Rohmilch	VWR International, USA
Kritisch-Punkt-Apparatur CPD 030	Trocknungsverfahren für die REM- Analytik	Bal-Tec AG, Liechtenstein
Luftkeimsammler Air IDEAL® 3P®	Bestimmung der Luftkeimgehalts beim Melkstand	BioMerieux, Frankreich
MALDI Biotyper®	Zur Identifikation von Rohmilch- Isolaten basierend auf der MALDI- TOF-Massenspektrometrie	Bruker Daltonics GmbH & Co. KG, Deutschland
Mikroplatten-Reader SPARK®	Messung von Absorption und Fluoreszenz	Tecan Group Ltd., Schweiz

Fortsetzung von Tabelle 11

<b>Gerät</b>	<b>Applikation</b>	<b>Hersteller</b>
Sputter Coater und Kohlebedampfer Q150T ES	Beschichtungsanlage für die Elektronenmikroskopie	Quorum Technologies Ltd, UK
Sterilisator	Sterilisation der Edelstahl-Plättchen	Memmert GmbH & Co. KGDeutschland
Stomacher® 400 Circulator - Laborhomogenisator	Mischen und Homogenisieren von Sonderproben der Hofbegehungen	Seward Ltd, UK
Vortexer-Genie 2™	Durchmischung von Proben	Bender & Hobein AG, Schweiz
Wasseraufbereitungssystem Elga PF2XXXXM1	Herstellung von Reinstwasser	ELGA LabWater, UK
Werkbank FlowSafe B-[MaxPro]²-130	Sicherheitswerkbank für mikrobiologische Arbeiten	Berner International GmbH, Deutschland
Wipptisch WT 17	Lösen von im Biofilm fixiertes Kristallviolett	Biometra GmbH, Deutschland
Zentrifuge 5427 R	Anreicherung oder Abtrennung von Bakterienzellen aus einer Lösung	Eppendorf AG, Deutschland
Zentrifuge MiniSpin® plus	Anreicherung oder Abtrennung von Bakterienzellen aus einer Lösung	Eppendorf AG, Deutschland

## Danksagung

An erster Stelle möchte ich meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Charles M.A.P. Franz danken. Als ich 2016 im Anschluss einer Vorlesung nach einem Platz zur Erstellung meiner Masterarbeit am Max Rubner-Institut angefragt hatte, war dies rückblickend betrachtet wohl der Anfang einer längeren wissenschaftlichen Zusammenarbeit. Ich habe die Betreuung unter einer angenehmen und motivierenden Atmosphäre erlebt und bin für die jederzeit buchstäblich offene Tür dankbar.

Dr. Christina Böhnlein hat meine bisherige Zeit am Institut mit ihrer stets kompetenten und zuverlässigen Projektbetreuung mit Gespür für das Detail mitgeprägt. Danke, Christina, für unseren offenen, ehrlichen Umgang miteinander sowie deine Fürsorge und konstruktive Kritik.

Weiterhin möchte ich Dr. Gregor Fiedler, Dr. Jan Kabisch und Dr. Christina Grimmeler danken, deren wissenschaftlich geballte Fachkompetenz mir bei verschiedenen forschungsbezogenen Hürden weitergeholfen hat. Bei Dr. Birgit Hetzer bedanke ich mich für die gelungenen rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen und bei Petra Wundram für die durchflusszytometrischen Keimzahlbestimmungen am BactoCount IBCm.

Ein großes Dankeschön für die wertvolle und angenehme Unterstützung im Labor geht an Jennifer Grundmann, Jana Koch, Frauke Repenning und Imke Wahl. Neben der Bewältigung so mancher feierabendraubender „Laboraktionen“, bleiben mir unser freundschaftlicher Umgang und die guten Gespräche in Erinnerung. Ihr seid einfach klasse! Allen weiteren Kollegen, Auszubildenden und Studierenden des MBTs möchte ich mich für die angenehme Arbeitsatmosphäre während meiner gesamten Zeit am Institut bedanken.

Meinen Eltern und engsten Freunden danke ich für jegliche Rückendeckung und Motivation bei der Erstellung der Dissertation.

Zuletzt möchte ich meinem Partner und besten Freund Lars danken, der wohl mit seiner herzerfrischenden Art mein wichtigster Anker der letzten Jahre bei dem Projekt „Promotion“ war.

*Danke*

## Liste der Veröffentlichungen und Konferenzbeiträge

### Veröffentlichungen

Koberg, Sabrina; Gieschler, Stefanie; Brinks, Erik; Wenning, Mareike; Neve, Horst; Franz, Charles M.A.P. (2018): Genome sequence of the novel virulent bacteriophage PMBT14 with lytic activity against *Pseudomonas fluorescens* DSM 50090R. In: *Archives of virology* 163 (9), S. 2575-2577. DOI: 10.1007/s00705-018-3882-y

Gieschler, Stefanie; Fiedler, Gregor; Böhnlein, Christina; Grimmmler, Christina; Franz, Charles M.A.P.; Kabisch, Jan (2021): *Pseudomonas kielensis* sp. nov. and *Pseudomonas baltica* sp. nov., isolated from raw milk in Germany. In: *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. DOI: 10.1099/ijsem.0.004717

Fiedler, Gregor; Gieschler, Stefanie; Kabisch, Jan; Grimmmler, Christina; Brinks, Erik; Wagner, Natalia; Hetzer, Birgit; Franz, Charles M.A.P.; Böhnlein, Christina: *Pseudomonas rustica* sp. nov., isolated from raw milk at a German dairy farm (2022). In: *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. DOI: 10.1099/ijsem.0.005288

### Konferenzbeiträge

Böhnlein, Christina; Eickelberg, Virginia; Habermann, Diana; Fiedler, Gregor; Gieschler, Stefanie; Franz, Charles M. A. P.; Kabisch, Jan.

“Sale of raw milk by vending machines in northern Germany: Food safety implications and other aspects.” 26th International ICFMH Conference – FoodMicro, Berlin (03.-06. September 2018).

Habermann, Diana; Gieschler, Stefanie; Pichner, Rohtraud; Low, Hui; Kabisch, Jan; Böhnlein, Christina. „Nicht-kultivierbare *Listeria monocytogenes*: Ein Problem für die Lebensmittelindustrie?“ 18. Fachsymposium Lebensmittelmikrobiologie, Kiel (07.-09. Oktober 2019)

Gieschler, Stefanie; Böhnlein, Christina; Kabisch, Jan; Franz, Charles M. A. P. „Biofilmbildung von *Pseudomonas* spp. aus Rohmilch.“ 18. Fachsymposium Lebensmittelmikrobiologie, Kiel (07.-09. Oktober 2019)

Böhnlein, Christina; Gieschler, Stefanie; Kabisch, Jan; Franz, Charles M. A. P. „Pseudomonaden in Rohmilch: Biofilmbildung und proteolytische Aktivität.“ Oranienburger Milchwissenschaftstag (18. November 2021)