

Biofilme in Melkanlagen

Dissertation

zur Erlangung des Grades

Doktorin der Ernährungs- und Lebensmittelwissenschaften (Dr. troph.)

der Landwirtschaftlichen Fakultät

der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

von

Mareike Katharina Weber

aus

Engelskirchen

Bonn 2019

Referent: Prof. Dr. André Lipski

Korreferent: Prof. Dr. Andreas Schieber

Tag der mündlichen Prüfung: 16. August 2019

Angefertigt mit Genehmigung der Landwirtschaftlichen Fakultät der Universität Bonn

Inhalt

Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis.....	VI
Abkürzungsverzeichnis	VIII
1 Einleitung	1
1.1 Biofilme	2
1.1.1 Biofilmbildung	2
1.1.2 Einflussfaktoren auf die Biofilmbildung.....	3
1.1.3 Interaktion zwischen Biofilm-Habitanten	5
1.2 Biofilme in der Lebensmittelindustrie	7
1.2.1 Bedeutung von Biofilmen in der Lebensmittelindustrie	7
1.2.2 Biofilme in der Milchindustrie.....	7
1.2.3 Maßnahmen zur Kontrolle der Biofilmbildung.....	8
1.3 Antibiotikaresistenzen und Horizontaler Gentransfer.....	10
1.3.1 Arten von Antibiotikaresistenzen.....	10
1.3.2 Horizontaler Gentransfer.....	11
1.3.3 Antibiotikaresistenzen und horizontaler Gentransfer in Biofilmen	13
1.4 Untersuchung von Biofilmen	13
1.4.1 Kulturelle Untersuchungsverfahren	13
1.4.2 Molekularbiologische Untersuchungsverfahren	14
1.5 Next-Generation-Sequencing (NGS)-Techniken	15
1.5.1 RNA-Seq/Differentielle Genexpressionsanalyse	15
1.5.2 Biofilmassoziierte Gene	18
1.6 Zielsetzung	22
2 Material und Methoden	24
2.1 Untersucher Milchviehbetrieb.....	24
2.2 Versuchsaufbau	24
2.3 Kultivierungsgestützter Ansatz zur Diversitätsanalyse.....	27
2.3.1 Kulturelle Keimzahlbestimmung und Vereinzeln von Isolaten	27
2.3.2 Makroskopische und mikroskopische Differenzierung der Isolate.....	28
2.3.3 Fettsäureanalyse	28
2.3.4 DNA-Extraktion und 16S rRNA-Gensequenzierung.....	29
2.4 Sequenzbasierte Diversitätsanalyse.....	31
2.4.1 PMA-Behandlung	31

2.4.2	DNA-Extraktion aus PMA-behandelten Proben.....	31
2.4.3	Erstellung von Klonbibliotheken	32
2.5	Statistische Analyse und Erstellung von phylogenetischen Stammbäumen.....	33
2.5.1	Berechnung des Deckungsgrades.....	33
2.5.2	Berechnung von Diversitäts-Kennwerten	33
2.5.3	Erstellung phylogenetischer Stammbäume	34
2.6	Nachweis von Antibiotikaresistenzgenen	34
2.6.1	DNA-Extraktion aus Tupferabschwemmlösungen	34
2.6.2	Realtime-qPCR zum Nachweis von Antibiotikaresistenzgenen.....	35
2.6.3	Absolute Quantifizierung der 16S rRNA- und Antibiotikaresistenzgene.....	37
2.6.4	Berechnung von Keimzahläquivalenten aus den RT-qPCR-Ergebnissen	38
2.7	Fähigkeit zur Proteolyse und Lipolyse.....	38
2.7.1	Fähigkeit zur Proteolyse.....	38
2.7.2	Fähigkeit zur Lipolyse	39
2.8	Biofilmbildungsfähigkeit	39
2.8.1	Biofilmbildung in Polystyrol-Mikrotiterplatten.....	39
2.8.2	Reinigungs- und Desinfektionsmittelresistenz der Biofilme	41
2.8.3	Zellviabilität der reinigungs- und desinfektionsmittelresistenten Biofilme...	41
2.8.4	Biofilmbildung in Mischkultur	43
2.8.5	Biofilmbildung auf Edelstahlcoupons.....	43
2.9	Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung	44
2.9.1	Fixierung	44
2.9.2	Vorbereitung der Coupons zur Hybridisierung.....	45
2.9.3	Hybridisierung mit Oligonukleotidsonden.....	45
2.10	Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Biofilmen.....	48
2.11	Differentielle Genexpressionsanalyse.....	48
2.11.1	RNA-Extraktion	49
2.11.2	Differentielle Genexpressionsanalyse.....	50
3	Ergebnisse	52
3.1	Keimzahlen.....	52
3.2	Fettsäureprofile der Isolate.....	55
3.3	Stammbäume der Isolate und Klone	63
3.3.1	Bakterielle Diversität und Dominanz einer Spezies	71
3.4	Antibiotikaresistente Bakterien in Melkanlagen-Biofilmen	73

3.4.1 Gesamtkeimzahlen und Keimzahlen antibiotikaresistenter Bakterien.....	73
3.4.2. Zusammensetzung der antibiotikaresistenten Biofilmgemeinschaft.....	76
3.4.3 Zusammenhang zwischen Zelldichte und Auftreten von Antibiotikaresistenzen	78
3.5 Biofilmbildungsfähigkeit	79
3.5.1 Biofilmbildung von Reinkulturen in Polystyrol-Mikrotiterplatten.....	79
3.4.2 Reinigungs- und Desinfektionsmittelresistenz der Biofilme	84
3.5.3 Biofilmbildung in Mischkultur	89
3.5.4 Biofilmbildung auf Edelstahlcoupons.....	91
3.6 Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung von Biofilmen	92
3.7 Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Biofilmen.....	95
3.8 Differentielle Genexpression von Biofilm-Isolaten in Glucose und Lactose	97
4 Diskussion.....	122
4.1 Besiedlungsdichte von verschiedenen Stellen der Melkanlage.....	122
4.2 Antibiotikaresistenzen in Melkanlagen-Biofilmen	128
4.2.1 Korrelation der Besiedlungsdichte und Übertragung von Antibiotikaresistenzen.....	131
4.3 Charakterisierung der Isolate	132
4.4 Zusammensetzung und Diversität der bakteriellen Gemeinschaft.....	151
4.5 Einflussfaktoren auf die Biofilmbildung.....	157
4.5 Reinigungs- und Desinfektionsmittelresistenz der Biofilme	165
4.6 Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung	173
4.7 Differentielle Genexpression in Biofilmen	174
4.7.1 Differentielle Genexpression von <i>Acinetobacter guillouiae</i> M9	178
4.7.2 Differentielle Genexpression von <i>Kocuria salsicia</i> M239	186
4.7.3 Vergleich der differentiellen Expressionsdaten	191
5 Zusammenfassung.....	194
6 Literatur.....	196
7 Anhang	215
Kurzfassung.....	266
Abstract	267
Danksagung.....	269

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Die fünf Phasen der Biofilmbildung.....	3
Abbildung 2: Angriffsziele von Antibiotika und Resistenzmechanismen	11
Abbildung 3: Mechanismen des horizontalen Gentransfers	12
Abbildung 4: Fließschema zur Durchführung von differentiellen Genexpressionsanalysen mittels RNA-Sequenzierung.	17
Abbildung 5: Schematischer Versuchsaufbau der vorliegenden Arbeit.....	25
Abbildung 6: Mittelwerte der Keimzahlen aus den Tupferprobenahmen	52
Abbildung 7: Stammbaum des Phylums <i>Actinobacteria</i>	64
Abbildung 8: Stammbaum des Phylums <i>Bacteroidetes</i>	65
Abbildung 9: Stammbaum des Phylums <i>Firmicutes</i>	68
Abbildung 10: Stammbaum des Phylums <i>Proteobacteria</i>	69
Abbildung 11: Keimzahlen antibiotikaresistenter Mikroorganismen.....	73
Abbildung 12: Kulturell und molekularbiologisch ermittelte Keimzahlen	75
Abbildung 13: Stammbaum der antibiotikaresistenten Isolate	77
Abbildung 14: Zusammenhang zwischen Zelldichte und Häufigkeit des Auftretens von Antibiotikaresistenzen am Beispiel der Tetracyclin-Resistenz.....	78
Abbildung 15: Stammspezifische Unterschiede im Biofilmbildungspotential der Spezies <i>Acinetobacter guillouiae</i> und <i>Kocuria salsicia</i>	81
Abbildung 16: Einfluss der Inkubationstemperatur auf die Biofilmbildung	82
Abbildung 17: Einfluss des Austauschs von Glucose gegen Lactose im Nährmedium auf die Biofilmbildung	83
Abbildung 18: Biofilmintensität von Isolaten mit Resistenzen gegenüber beiden Reinigungs- und Desinfektionsmitteln.....	84
Abbildung 19: Biofilmintensität von Isolaten mit ausgeprägterer Resistenz gegenüber dem sauren Reinigungsmittel.....	85
Abbildung 20: Biofilmintensität von Isolaten mit ausgeprägterer Resistenz gegenüber dem alkalischen Reinigungs- und Desinfektionsmittel.....	86
Abbildung 21: Prozentuale Zellviabilität der Biofilme nach Behandlung mit Reinigungs- und Desinfektionsmitteln	88
Abbildung 22: Biofilmbildung von ausgewählten Isolaten in Rein- und Mischkultur ..	89
Abbildung 23: Biofilmbildung auf Edelstahlcoupons	91
Abbildung 24: Verschiedene Phasen der Biofilmbildung auf Edelstahlcoupons mittels Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung	93
Abbildung 25: Elektronenmikroskopische Aufnahmen des Isolats <i>Kocuria salsicia</i> M239 auf einem Edelstahlcoupon.....	95

Abbildung 26: Elektronenmikroskopische Aufnahmen des Isolats <i>Acinetobacter guillouiae</i> M9 auf einem Stück Kunststoffschlauch	96
Abbildung 27 (Anhang): Übersicht über die Probenahmeorte in der Melkanlage mit im Weiteren verwendeten Abkürzungen.	215
Abbildung 28 (Anhang): Farbschema zur Bewertung des Ausmaßes der Biofilmbildung der Isolate in den nachfolgenden Tabellen.....	230
Abbildung 29 (Anhang): Zellviabilität als Absorption der unbehandelten Biofilme .	236
Abbildung 30 (Anhang): Probleme bei der Auswertung von Aufnahmen nach Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung von Edelstahlcoupons	241
Abbildung 31 (Anhang): Agarosegel mit RNA-Extrakten der Isolate <i>A. guillouiae</i> M9 und <i>K. salsicia</i> M239	242
Abbildung 32 (Anhang): PCA der differentiellen Transkriptomanalyse der Isolate <i>A. guillouiae</i> M9 und <i>K. salsicia</i> M239	242
Abbildung 33 (Anhang): Wachstumskurven der Isolate <i>Acinetobacter guillouiae</i> M9 und <i>Kocuria salsicia</i> M239 in Glucose- und Lactose-haltiger TSB	242

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Einflussfaktoren auf die Biofilmbildung.....	4
Tabelle 2: Ausgewählte in die Biofilmbildung involvierte Gene	21
Tabelle 3: Bei den Tupferprobenahmen untersuchte Teile der Melkanlage	26
Tabelle 4: Verwendete Nährmedien.....	28
Tabelle 5: Zusammensetzung des Mastermixes zur Amplifikation von 16S rRNA- und Antibiotikaresistenzgenen.....	30
Tabelle 6: PCR-Programm zur Amplifikation der 16S rRNA-Gene	30
Tabelle 7: Charakterisierung der in den RT-qPCR-Reaktionen eingesetzten Primer und Referenzorganismen.....	36
Tabelle 8: Zusammensetzung der Reaktionsansätze der RT-qPCR.....	36
Tabelle 9: PCR-Programme zur RT-qPCR-Detektion der 16S rRNA- und Antibiotikaresistenzgene	36
Tabelle 10: Zusammensetzung des Tributyrin-Agars	39
Tabelle 11: Zusammensetzung von TSB und Lactose-TSB.	40
Tabelle 12: Charakterisierung der zur Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung eingesetzten Oligonukleotidsonden	47
Tabelle 13: Zusammensetzung des Hybridisierungs- und Waschpuffers für FISH.....	47
Tabelle 14: Charakterisierung der eingesetzten Fluorochrome	48
Tabelle 15: Keimzahlen der Coupon-Abklatsche	54
Tabelle 16: Fettsäureprofile der Gruppen 1 und 2	56
Tabelle 17: Fettsäureprofile der Gruppen 3 und 4	57
Tabelle 18: Fettsäureprofile der Gruppe 5	58
Tabelle 19: Fettsäureprofile der Gruppen 6 bis 8.....	59
Tabelle 20: Fettsäureprofile der Gruppen 9 und 10	61
Tabelle 21: Fettsäureprofile der Gruppen 15 und 16	62
Tabelle 22: Shannon Diversitäts-Indices und Equitabilitäten.....	72
Tabelle 23: In den Plasmid-DNA-Extrakten der Isolate nachgewiesene Gene	76
Tabelle 24: Prozentuale Verteilung des Biofilmbildungsvermögens der Isolate.....	80
Tabelle 25: Zusammenfassung der differentiellen Genexpression von <i>Acinetobacter guillouiae</i> M9.....	100
Tabelle 26: Zusammenfassung der differentiellen Genexpression von <i>Kocuria salsicia</i> M239.....	100
Tabelle 27: Ausgewählte differentiell stärker in Glucose exprimierte Gene von <i>Acinetobacter guillouiae</i> M9.	103

Tabelle 28: Ausgewählte differentiell schwächer in Glucose exprimierte Gene von <i>Acinetobacter guillouiae</i> M9.....	109
Tabelle 29: Ausgewählte differentiell stärker in Glucose exprimierte Gene von <i>Kocuria salsicia</i> M239.....	114
Tabelle 30: Ausgewählte differentiell schwächer in Glucose exprimierte Gene von <i>Kocuria salsicia</i> M239.....	118
Tabelle 31 (Anhang): Identifizierungsergebnisse der Isolate und Klonsequenzen.....	215
Tabelle 32 (Anhang): Fettsäureprofile der Untergruppen 1B-D, 2D und 3C	221
Tabelle 33 (Anhang): Fettsäureprofile der Untergruppen 6C, 9C-F und 10C	222
Tabelle 34 (Anhang): Fettsäureprofile der Untergruppen 11D, 11E, 12B und 12C ...	223
Tabelle 35 (Anhang): Fettsäureprofile der Gruppen 13 bis 16	224
Tabelle 36 (Anhang): Fettsäureprofile der Gruppen 17 und 18	225
Tabelle 37 (Anhang): Fettsäureprofile der Gruppen 19 bis 23	226
Tabelle 38 (Anhang): Fettsäureprofile der Gruppen 24 bis 26	227
Tabelle 39 (Anhang): Fettsäureprofile der Gruppe 27	228
Tabelle 40 (Anhang): Fettsäureprofile der Gruppen 28 und 29.....	229
Tabelle 41 (Anhang): Fettsäureprofil der Gruppe 30.....	230
Tabelle 42 (Anhang): Biofilmbildungsfähigkeit der Isolate in Mikrotiterplatten.....	231
Tabelle 43 (Anhang): Einfluss der Behandlung mit Reinigungs- und Desinfektionsmitteln auf die Biofilmintensität	235
Tabelle 44 (Anhang): Prozentuale Zellviabilität der Biofilme nach Behandlung Reinigungs- und Desinfektionsmitteln.....	237
Tabelle 45 (Anhang): Biofilmbildung ausgewählter Isolate der ersten Probenahme in Mischkultur	238
Tabelle 46 (Anhang): Biofilmbildung ausgewählter Isolate der zweiten Probenahme in Mischkultur	239
Tabelle 47 (Anhang): Zusammensetzung der Mischkulturen.	240
Tabelle 48 (Anhang): Ausgewählte differentiell stärker in Glucose exprimierte Gene von <i>Acinetobacter guillouiae</i> M9.....	243
Tabelle 49 (Anhang): Ausgewählte differentiell schwächer in Glucose exprimierte Gene von <i>Acinetobacter guillouiae</i> M9.....	248
Tabelle 50 (Anhang): Ausgewählte differentiell stärker in Glucose exprimierte Gene von <i>Kocuria salsicia</i> M239.....	255
Tabelle 51 (Anhang): Ausgewählte differentiell schwächer in Glucose exprimierte Gene von <i>Kocuria salsicia</i> M239.....	259

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
AB	Antibiotika
AHL	N-Acyl-Homoserin-Lacton
AI	Autoinducer
Amp	Ampicillin
BAP	Biofilmassoziierte Proteine
BP	Baird Parker Agar
C	Cytosin
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CCA	Chromocult Coliform Agar
c-di-GMP	zyklisches Diguanosinmonophosphat
CFC	Cephalothin-Na-Fusidat-Cetrimid-Agar
CIP	Cleaning-in-Place
Clox	Cloxacillin
C_T	cycle threshold, Schwellenwertzyklus
DAPI	Diamidinphenylindol
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMDS	Dimethyldisulfid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
cDNA	copy DNA
eDNA	externe DNA
ESBL	Extended-Spektrum-beta-Laktamase
dNTP	Deoxynukleosidtriphosphat
ECL	equivalent chain length, äquivalente Kettenlänge
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EPS	extrazelluläre polymere Substanzen
FAME	fatty acid methylester, Fettsäuremethylester
FDR	False Discovery Rate
FISH	Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung
G	Guanin
G+	Gram-positiv
G-	Gram-negativ
GC-MS	Gaschromatographie-Massenspektrometrie
GKZ	Gesamtkeimzahl
HGT	Horizontaler Gentransfer
KbE	Koloniebildende Einheiten
KNS	Koagulasenegative Staphylokokken
LAB	lactic acid bacteria, Milchsäurebakterien
MBEC	minimal biofilm eradication concentration, minimal benötigte Konzentration zur Biofilmentfernung
MBK	Minimale bakterizide Konzentration
MGE	Mobiles genetisches Element
MHK	Minimale Hemmkonzentration
MPC	Milk Plate Count Agar

MRS	Agar nach de Man, Rogose & Sharpe
MRSA	Methicillin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
NaOCl	Natriumhypochlorit
NGS	Next Generation Sequencing
NSLAB	nonstarter lactic acid bacteria, Nichtstarter-Milchsäurebakterien
OD	Optische Dichte
ORF	open reading frame, offenes Leseraster
OTU	operative taxonomical unit, operative taxonomische Einheit
PBS	phosphate buffered saline, phosphatgepufferte Salzlösung
PCA	principal component analysis, Hauptkomponentenanalyse
PCR	polymerase chain reaction, Polymerasekettenreaktion
Pen	Penicillin G
PFA	Paraformaldehyd
PIA	Polysaccharide Intercellular Adhesin
PMA	Propidiummonoazid
PNAG	Poly- β -1,6-N-Acetylglucosamin
QS	Quorum-Sensing
QQ	Quorum-Quenching
RNA	Ribonukleinsäure
RNA-Seq	RNA-Sequenzierung
rRNA	ribosomale RNA
RT-qPCR	quantitative Realtime-PCR
SEM	scanning electron microscope, Rasterelektronenmikroskop
T	Thymin
T1SS/T5SS	Typ-1-/Typ-5-Sekretionssystem
TCA-Zyklus	tricarboxylic acid cycle, Tricarbonsäurezyklus, Citratzyklus
TCA	two component system, Zwei-Komponenten-System
Tet	Tetracyclin
tRNA	Transfer-Ribonukleinsäure
TSA	Trypton-Soja-Agar
TSS	transcription start side, Transkriptionsstartpunkt
UTR	untranslated region, nicht translatierter Bereich
VBNC	viable but nonculturable; lebend, aber nicht kultivierbar
VRBD	violet red bile dextrose agar, Kristallviolett-Galle-Glucose-Agar
WST-1	water soluble tetrazolium salt, wasserlösliches Tetrazoliumsalz

1 Einleitung

In nahezu allen Zweigen der Lebensmittelindustrie können Produkte während der Herstellung mit Mikroorganismen kontaminiert werden. Kontaminationen mit Verderbniserregern beeinflussen die Qualität und Haltbarkeit durch unerwünschte Stoffwechselreaktionen. Eine Kontamination mit pathogenen Mikroorganismen kann Lebensmittelinfektionen oder -intoxikationen auslösen und stellt somit eine Verbrauchergefährdung dar [1]. Gelangen kontaminierte Produkte auf den Markt, sind negative Presse und Rückrufaktionen die Folge, welche hohe wirtschaftliche Verluste und ggf. nicht mehr behebbare Imageverluste des Herstellers zur Folge haben können.

Konsummilch und Milchprodukte wie Käse oder Joghurt sind ein wichtiges Grundnahrungsmittel. Laut Bundesministerium für Landwirtschaft und Ernährung (BLE) lag die Milcherzeugung in Deutschland im Jahr 2017 bei 32,7 Millionen Tonnen. 96 % der Rohmilch gingen als Anlieferungsmilch an milchwirtschaftliche Betriebe. Ein großer Anteil davon wird zu Frischmilcherzeugnissen einschließlich Konsummilch verarbeitet, deren Erzeugung im Jahr 2017 bei 4,8 Mio t lag. An zweiter und dritter Stelle sind die Erzeugung von Käse (2,5 Mio t) und Milch- und Molkenmischerzeugnissen/-getränken (3,1 Mio t) zu nennen. Aufgrund ihres hohen Wassergehaltes, neutralen pH-Wertes und der hohen Nährstoffvielfalt ist Milch ein optimales Nährmedium für Mikroorganismen. Rohmilch als Ausgangsprodukt für alle Milchprodukte ist niemals keimfrei, was die milchverarbeitende Industrie dementsprechend vor besondere Herausforderungen stellt.

Durch Mastitiden, bakteriell ausgelöste entzündliche Erkrankungen des Euters, entstehen der Milchwirtschaft hohe finanzielle Verluste [2]. Diese sind auf den Rückgang der Milchleistung sowie auf Produktionsausfälle bei der Milchverarbeitung zurückzuführen. Ein wichtiger Übertragungsweg von Mastitiserregern innerhalb der Herde ist der maschinelle Melkvorgang. Mastitiden werden in den meisten Fällen durch Antibiotikagabe behandelt. Häufig werden aufgrund der erhöhten Anfälligkeit von Milchrindern gegenüber Mastitis beim Trockenstellen Antibiotikapräparate präventiv eingesetzt [3, 4]. In der Veterinärmedizin müssen seit 2011 die verkauften Antibiotikamengen entsprechend der DIMDI-Arzneimittelverordnung (DIMDI-AV) an das Tierarzneimittelregister (TAR) weitergegeben werden. In den Jahren 2011 bis 2015 hat sich die Abgabemenge an Antibiotika von 1700 auf 800 t mehr als halbiert. Bei den in

der Tiermedizin am häufigsten eingesetzten Antibiotikaklassen handelt es sich laut BVL um Penicilline (ca. 300 t/Jahr) und Tetracycline (ca. 220 t/Jahr).

Eine wichtige Rolle bei der Produktion von Lebensmitteln spielen bakterielle Ansammlungen auf Gerätschaften und Maschinen, sogenannte Biofilme, die sich durch konventionelle Reinigungs- und Desinfektionsverfahren nicht oder nur sehr schwer entfernen lassen und somit eine konstante Kontaminationsquelle darstellen [5, 6]. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit Biofilmen in Melkanlagen als Kontaminationsquelle für Rohmilch sowie als Reservoir für Antibiotikaresistenzgene.

1.1 Biofilme

Biofilme sind mikrobielle Gemeinschaften, die von einer selbst produzierten Matrix umgeben sind und an festen oder beweglichen Oberflächen verschiedenster Materialien adhären [7]. Laut aktuellem Forschungsstand liegen Bakterien in ihren natürlichen Habitaten als Biofilme vor. Dabei handelt es sich zumeist um Multispezies-Biofilme [8]. Die erhöhte Resistenz von sessilen, in Biofilmen organisierten Bakterien gegenüber Reinigungs- und Desinfektionsmitteln, Antibiotika und wechselnden Umweltbedingungen im Vergleich zu freien, planktonischen, Mikroorganismen hat Biofilme in den Schwerpunkt der mikrobiellen Forschung gerückt [9, 10].

1.1.1 Biofilmbildung

Der Zyklus der Biofilmbildung lässt sich in fünf Phasen einteilen (Abb. 1) [11, 12]. In der ersten Phase kommt es zur reversiblen Anheftung von Bakterien an eine Oberfläche. Dies geschieht durch Bindung an die Oberfläche beschichtende Polysaccharide oder Proteine über schwache elektrostatische Wechselwirkungen, hydrophobe Wechselwirkungen oder van der Waals-Kräfte [13, 14]. Der konditionierende Film auf der zu besiedelnden Oberfläche wird durch die Zusammensetzung des umgebenden Mediums bestimmt [10].

Die Produktion von extrazellulären polymeren Substanzen (EPS), einer Matrix aus Polysacchariden, Proteinen und extrazellulärer DNA (eDNA), verstärkt die Bindung zur Oberfläche sowie der Zellen untereinander, sodass die Anheftung in Phase 2 irreversibel wird. Die irreversible Anheftung geht einher mit einer drastischen Änderung des Genexpressionsmusters und damit des Phänotyps im Vergleich zum planktonischen Zustand („phenotypic switch“) [15, 16].

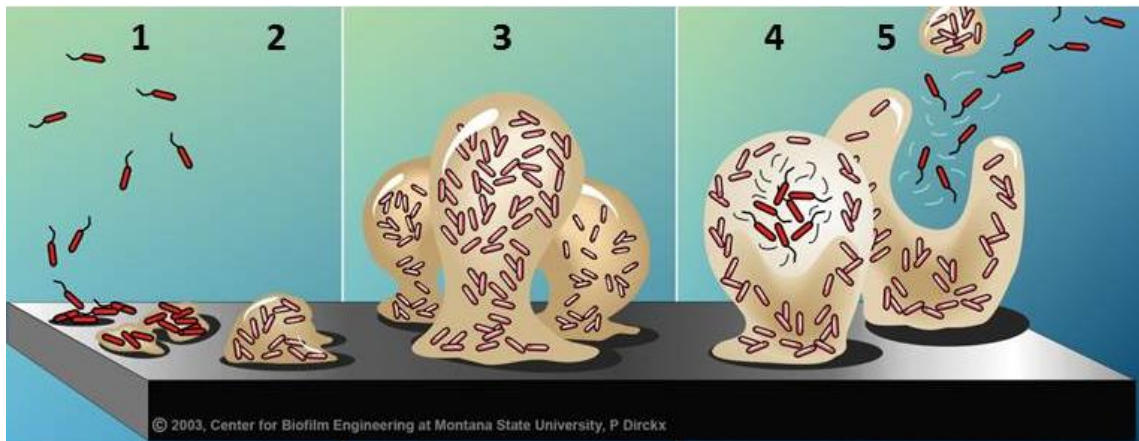


Abbildung 1: Die fünf Phasen der Biofilmbildung. 1: Anheftung einzelner Zellen; 2: EPS-Produktion, verstärkte Adhäsion (Mikrokolonien); 3: Entstehung der Biofilmarchitektur; 4: Weitere Reifung des Biofilms, Quorum-Sensing; 5: Ablösung und Ausbreitung einzelner Zellen (Dispersion) (Verändert nach: Dirckx, P. & Davies, D., 2003, Center for Biofilm Engineering, Montana State University).

Aus den Mikrokolonien entstehen in Phase 3 der Biofilmbildung dreidimensionale Strukturen. Während in Phase 4 eine weitere Reifung des Biofilms stattfindet, wird in Phase 5 über Zell-Zell-Kommunikation (Quorum-Sensing, QS), neben weiteren physiologischen und umweltbedingten Faktoren, die Ablösung (Dispersion) einzelner Zellen aus dem Biofilm initiiert. Die abgelösten Zellen können an anderen Stellen erneut adhären und Biofilme bilden [10, 17].

Reife Biofilme bestehen zu ca. 15 % aus Zellen und zu etwa 85 % aus EPS [10, 14,15]. Die Art und Zusammensetzung der in der EPS enthaltenen Bestandteile ist dabei von der Spezieszusammensetzung des Biofilms sowie von externen Faktoren (z. B. Temperatur, Nährstoffverfügbarkeit) abhängig [18]. Die dreidimensionale Struktur von reifen Biofilmen trägt zur Entstehung von lokalen Nährstoff-, pH- und Sauerstoff-Gradienten bei, sodass Biofilme Nischen für eine große Diversität von Mikroorganismen mit unterschiedlichen Ansprüchen darstellen [19, 20].

1.1.2 Einflussfaktoren auf die Biofilmbildung

Für die initiale Anheftung sowie die darauffolgende Bildung eines reifen Biofilms und die Biofilmarchitektur sind verschiedene Faktoren von Bedeutung, die in Tab. 1 zusammengestellt sind.

Tabelle 1: Einflussfaktoren auf die Biofilmbildung, -architektur und -zusammensetzung. Die aufgezählten Bereiche können sich wiederum gegenseitig beeinflussen.

Zu besiedelnde Oberfläche	Umgebendes Medium	Zelle	Umweltfaktoren	Stressoren
Material	Strömungsgeschwindigkeit	Hydrophobizität	Temperatur	Antimikrobielle Stoffe (Antibiotika, Desinfektionsmittel)
Struktur/Rauigkeit	pH-Wert	Extrazelluläre Strukturen (z. B. Pili)	Sauerstoffverfügbarkeit	Spezieszusammensetzung (Konkurrenz)
Ladung	Osmolarität	Beweglichkeit (Flagellen)	Wasserverfügbarkeit	
Hydrophobizität	Nährstoffverfügbarkeit	Extrazelluläre polymere Substanzen		
Konditionierender Film	Nährstoffzusammensetzung	Signalmoleküle/Quorum Sensing		

Für die erste Anheftung von Bakterien an Oberflächen ist vor allem die physikochemische Beschaffenheit sowohl der zu besiedelnden Oberfläche als auch des Bakteriums entscheidend [21]. So kann der konditionierende Film die Oberflächenladung und -spannung beeinflussen [10]. Weiterhin spielen die Zusammensetzung des Mediums (NaCl-Gehalt, Nährstoffgehalt), der pH-Wert, die Sauerstoffverfügbarkeit sowie die Temperatur eine entscheidende Rolle [14, 21, 22]. Die Architektur und Dichte eines Biofilms wird wiederum von der Spezieszusammensetzung, der Umgebungstemperatur sowie der Strömungsgeschwindigkeit beeinflusst.

Insgesamt sind hydrophobe Oberflächen aufgrund verminderter elektrostatischer Abstoßung von Bakterienzellen leichter zu besiedeln [23, 24]. Weiterhin können sowohl laminare als auch turbulente Strömungen die Anheftung begünstigen, da sie die Wahrscheinlichkeit eines Kontaktes zwischen Bakterium und Oberfläche steigern [21]. Dennoch kann eine zu hohe Strömungsgeschwindigkeit zur Ablösung von Zellen aus dem Biofilm aufgrund von Scherkräften führen [25]. Auch die Beweglichkeit von Bakterien mittels Flagellen kann den initialen Kontakt zwischen Bakterienzelle und Oberfläche forcieren [10]. Hydrophobe Oberflächenstrukturen auf Bakterienzellen, wie Pili, Fimbrien, adhäsive Proteine und/oder Lipopolysaccharide können die Anheftung zusätzlich begünstigen. Die Hydrophobizität von Edelstahl muss relativ zu anderen Materialien betrachtet werden. So ist Edelstahl hydrophober als das sehr hydrophile Glas, aber deutlich weniger hydrophob als Polytetrafluorethylen (PTFE, Teflon) [14]. Zudem

wurde gezeigt, dass sich die Hydrophobizität von Edelstahl abhängig von dessen Alter wandeln kann [26]. Bei der Biofilmbildung auf Oberflächen mit Lebensmittelkontakt spielt allerdings die ursprüngliche Beschaffenheit des Materials eine untergeordnete Rolle, sondern diese wird von der Bildung eines konditionierenden Films durch Lebensmittelinhaltsstoffe mehr oder weniger stark verändert [27, 28].

Auch die Oberflächenrauigkeit von Materialien könnte einen Einfluss auf die Besiedlungsfähigkeit von Bakterien haben. Die Annahme, dass raue Oberflächen die Bildung von Biofilmen begünstigen, wird in der Literatur kontrovers diskutiert [21, 25, 29]. Dennoch sind sich die meisten Autoren einig, dass höhere Oberflächenrauigkeiten des Materials die Reinigungs- und Desinfektionseffizienz herabsetzen und somit zu einer gesteigerten Biofilmbildung beitragen können [30-32].

Einige Studien beschreiben eine verstärkte Biofilmbildung unter nährstofflimitierten oder anderen für die Zellen ungünstigen Umwelteinflüssen. Dies wird zumeist mit der Auslösung einer Stressantwort und entsprechend veränderter Genexpression begründet [13, 25, 31, 33].

1.1.3 Interaktion zwischen Biofilm-Habitanten

Multispezies-Biofilme bieten optimale Habitate zum genetischen Austausch, dem Austausch von Metaboliten und zur Zell-Zell-Kommunikation. Dies führt zur Ausbildung von organisierten Strukturen, die entweder als kooperativ, neutral oder kompetitiv beschrieben werden können [34].

In kooperativen Gemeinschaften profitieren alle Mitglieder voneinander. Dabei kann es sich zum Beispiel um das Biofilmbildungspotential von Primärbesiedlern handeln, an deren Oberflächenstrukturen weitere Spezies mit weniger ausgeprägtem Biofilmbildungspotential binden können [1]. Die Sekundärbesiedler können während der Reifung der Biofilme dann Nährstoffe oder Enzyme bereitstellen, die von allen Besiedlern genutzt werden können. Weiterhin können toxische Metabolite abgebaut werden, welche die Proliferation des Biofilms ansonsten einschränken würden. So können zum Beispiel durch den Sauerstoffverbrauch eines Teils der Mikroorganismen Bereiche mit verringertem Sauerstoffpartialdruck sowie anaerobe Bereiche innerhalb des Biofilms entstehen, die von mikroaerophilen oder obligat anaeroben Organismen zur

Vermehrung genutzt werden können [19]. Ähnlich verhält es sich mit der lokalen Absenkung des pH-Wertes [34].

Kompetitive Wechselwirkungen beruhen auf der Konkurrenz von Mikroorganismen um Nährstoffe, Sauerstoff und Besiedelungsfläche. In diesem Falle kann es durch eine Spezies zur Ausschüttung von Stoffwechselprodukten wie Bacteriocinen, organischen Säuren, Biotensiden oder Enzymen kommen, die die Adhäsion und/oder Vermehrung anderer Organismen einschränken oder vollständig inhibieren [34].

Quorum-Sensing (QS), das heißt die von der Bakteriendichte abhängige Kommunikation der Biofilm-Zellen untereinander, wird durch die Produktion löslicher Moleküle, sogenannter Autoinducer (AI), vermittelt. Diese werden von den Biofilm-Habitanten an ihre Umgebung abgegeben [35]. Durch die erhöhte Zelldichte in Biofilmen sowie dem Rückhaltevermögen der AI in der EPS-Schicht reichern sich diese mit zunehmender Populationsdichte so lange an, bis sie eine bestimmte Konzentrationsschwelle überschreiten, bei der Änderungen der Genexpression ausgelöst werden [34]. Dies kann eine gesteigerte Expression von Virulenzfaktoren, extrazellulären Enzymen sowie eine vermehrte EPS-Produktion, Anschalten von HGT-Mechanismen, oder eine Dispersion der Biofilm-Zellen zur Folge haben [14, 34, 36]. Bei den meisten QS-regulierten Produkten handelt es sich um sekretierte Proteine oder Vorgänge, die der gesamten Biofilm-Gemeinschaft zur Verfügung stehen [37]. Die Arten der produzierten AI unterscheiden sich zwischen Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien. Gram-negative Bakterien produzieren unter anderem N-Acyl-Homoserin-Lactone (AHL), während Gram-positive Bakterien Autoinducer-Peptide produzieren [37]. Bei den QS-Systemen handelt es sich meistens um hochspezifische Intra-Spezies-Kommunikationssignale. Es gibt allerdings auch weniger spezifische Inter-Spezies-QS-Systeme. Ein Beispiel für Letztere sind die Autoinducer 2 (AI-2)-Moleküle. Diese werden durch das *luxS*-Gen codiert, das sowohl in Gram-positiven als auch Gram-negativen Bakterien verbreitet ist [35, 38, 39].

1.2 Biofilme in der Lebensmittelindustrie

1.2.1 Bedeutung von Biofilmen in der Lebensmittelindustrie

Biofilme stellen durch den Eintrag von Verderbniserregern und/oder Pathogenen in Lebensmittel nicht nur eine Gefährdung für die Produktqualität und –sicherheit dar [5], sondern können auch die Produktionseffizienz herabsetzen. Letzteres wird z. B. durch eine verminderte Wärmeleitfähigkeit oder Durchflussraten aufgrund von Biofouling auf Wärmetauschern und in Rohrleitungen verursacht. Zusätzlich können Membranen durch Biofilmbildung verstopfen. Ebenso können Biofilme selbst auf rostfreien Materialien wie Edelstahl Korrosionsschäden verursachen [1, 6, 29, 40]. Durch aufwändige Reinigungs- und Desinfektionsmaßnahmen zur Entfernung der Biofilme entstehen weiterhin Kosten aufgrund von Produktionsausfällen oder der Notwendigkeit des Austauschs des Equipments [10, 14, 20].

Von großer Relevanz sind Biofilme auf lebensmittelassoziierten Oberflächen durch die Gefahr der Verursachung von Kreuzkontaminationen bereits verarbeiteter/hitzebehandelter Produkte [1, 5, 10]. Biofilmbildende Bakterien können dabei auf unterschiedlichen Wegen in die Produktionskette eingetragen werden. Dazu zählen Angestellte, Rohwaren, Wasser und Tiere bei Lebensmitteln tierischen Ursprungs. Die Entstehung von schwer zu entfernenden, reifen Biofilmen ist in den meisten Fällen auf unzureichende Reinigungs- und Desinfektionsmaßnahmen oder zu große Zeitintervalle zwischen diesen Maßnahmen zurückzuführen [27]. Besonders häufig von Biofilmbildung betroffen sind die Brauerei-, Fleisch-, Geflügel-, Fisch-/ Meeresfrüchte-, Obst-/Gemüse- und insbesondere die Milchindustrie [20, 41].

Auch wenn primäre Biofilmbildner apathogen sind, können sich pathogene Mikroorganismen mit geringem Biofilmbildungspotential in bereits bestehende Biofilme einlagern und in ihnen persistieren [30, 42]. Entsprechende Biofilme stellen somit eine kontinuierliche Verbrauchergefährdung dar [27, 43].

1.2.2 Biofilme in der Milchindustrie

Bei den bedeutendsten Kontaminationsquellen in der Milchindustrie handelt es sich um unzureichend gereinigtes Equipment in der Primärerzeugung, das heißt der Rohmilchproduktion. Schon hier können auch Pathogene, wie *Listeria monocytogenes*, in die

Sammeltankmilch gelangen. Die Konditionierung von Edelstahl durch Milchproteine kann die Adhäsion verschiedener Bakterien fördern [20]

Die Produktion von Lipasen und Proteasen durch biofilmassoziierte Bakterien ist von großer Bedeutung für die Qualität von Rohmilch sowie pasteurisierter Milch, UHT-Milch und Milchprodukten. Die in Biofilmen häufig im Vergleich zum planktonischen Zustand verstärkt exprimierten Enzyme gelangen während des Melkvorgangs oder der Lagerung im Milchsammeltank in die Rohmilch. Sie sind häufig hitzeresistent und werden daher nicht durch die Wärmebehandlung zur Haltbarmachung von Konsummilch inaktiviert [25, 27, 44, 45]. Der Abbau von Milchproteinen und -lipiden kann zu Fehlparomen wie Bittergeschmack oder zur Ranzigkeit der Milch führen [25, 45, 46]. Biofilmassoziierte Gattungen, die häufig für die Produktion von Proteasen und/oder Lipasen verantwortlich sind, sind *Pseudomonas spp.*, *Bacillus spp.* und *Serratia spp.* Aufgrund ihrer psychrotrophen Eigenschaften können sich viele Spezies dieser Gattungen auch in gekühlter Rohmilch vermehren und Enzyme produzieren [25]. Das Vorhandensein der Enzyme in Konsummilch verringert ihre Haltbarkeit [46, 47].

Diverse Studien konnten zeigen, dass nicht nur Sporen-produzierende Gattungen wie *Bacillus spp.* und *Paenibacillus spp.* die Pasteurisierung überstehen [48], sondern dass sich in Post-Pasteurisierungs-Rohrleitungen auch Gram-negative Bakterien detektieren lassen [1, 50], die eigentlich nicht in der Lage sein sollten, den Erhitzungsprozess zu überleben [51]. Die höhere Überlebensrate von eigentlich hitzeempfindlichen Organismen wird unter anderem auf die Bildung von Multispezies-Biofilmen und den durch die Biofilmmatrix verliehenen Schutz zurückgeführt. Demnach stellen viele aus der Rohmilch stammende Mikroorganismen auch eine Gefahr für die milchverarbeitende Industrie dar, insbesondere, wenn sie über Biofilme in fertige Produkte eingetragen werden [1, 47].

1.2.3 Maßnahmen zur Kontrolle der Biofilmbildung

Als Gegenmaßnahme zur Besiedelung von Flächen mit direktem Produktkontakt werden Materialien verwendet, die eine Biofilmbildung verhindern oder minimieren sollen und gleichzeitig leicht zu reinigen und desinfizieren sind. Weiterhin sollte das gesamte Maschinendesign hygienisch sein [33]. In den meisten Lebensmittelunternehmen sind Cleaning-in-Place (CIP)-Verfahren im Anschluss an die Produktion implementiert, die eine Reinigung und Desinfektion der Maschinen erlauben, ohne Teile zu demontieren

[27]. Ein ideales System zur Entfernung von Biofilmen sollte sowohl die EPS-Matrix als auch die enthaltenen Bakterienzellen eliminieren [20, 27].

Zur Reinigung und Desinfektion von Oberflächen bieten sich physikalische, chemische oder biologische Methoden an. Physikalische Methoden involvieren das mechanische Abbürsten von Oberflächen, oder die Reinigung mit Hochdruck, was für in sich geschlossene Lebensmittel produzierende Maschinen nicht möglich ist. Chemische Methoden werden am häufigsten eingesetzt. Dabei handelt es sich um die oben genannten CIP-Verfahren unter Anwendung verschiedener meist saurer oder alkalischer Wirkstoffe bei erhöhten Wassertemperaturen, denen jeweils ein Spülschritt mit Leitungswasser vorausgeht bzw. folgt [27]. Bei den am häufigsten zur Reinigung und Desinfektion von Edelstahloberflächen eingesetzten Wirkstoffen handelt es sich um Hypochlorit, Peressigsäure und quartäre Ammoniumionen enthaltende Komponenten [14, 33]. Die Effizienz der chemischen Verfahren hängt nicht nur vom eingesetzten Wirkstoff, dessen Konzentration sowie der Wasserhärte, -temperatur, und -Strömungsgeschwindigkeit, sondern auch von der Spezieszusammensetzung und dem Alter des zu entfernenden Biofilms und der Intervalle zwischen den durchgeführten Reinigungs- und Desinfektionsprozessen ab [14, 21, 27, 33, 52].

Unter die biologischen Methoden zur Entfernung von Biofilmen fällt die Anwendung von Enzymen und von Bacteriophagen. Dafür bieten sich besonders Enzyme bzw. an, die die Komponenten der EPS-Schicht zersetzen und die Zellen für einen darauffolgenden Abtötungsschritt freilegen. In Frage kommen dafür DNAsen, Polysaccharidasen und Proteinasen [46, 53]. Bacteriophagen infizieren bakterielle Wirtsorganismen und bringen sie zur Lyse [20]. Den Enzymen und Bacteriophagen ist ihre hohe Spezifität gemeinsam. Für den Einsatz zur Behandlung natürlicher Biofilme mit unbekannter und vermutlich hochdiverser Spezieszusammensetzung stellt dies einen großen Nachteil dar [14, 20].

Ein weiterer Ansatz zur Vermeidung der Biofilmbildung ist die Entwicklung anti-adhäsiver Oberflächen. Dazu zählen superhydrophobe Oberflächen oder Oberflächen mit antibakterieller Beschichtung [23, 32, 40]. Weiterhin zeigten verschiedene Studien die Verhinderung der Adhäsion von Pathogenen durch bestimmte apathogene Biofilmbildner, die Biotenside sekretieren, oder weitere antiadhäsive Eigenschaften besitzen [27]. Zu den innovativen Strategien in der Biofilm-Kontrolle sind weiterhin Quorum-Sensing-Inhibitoren (Quorum Quenching, QQ) zu zählen.

1.3 Antibiotikaresistenzen und Horizontaler Gentransfer

Antibiotika sind Stoffe natürlichen, halbsynthetischen oder synthetischen Ursprungs, die eine bakteriostatische (wachstumshemmende) oder bakterizide (abtötende) Wirkung haben [54, 55]. Durch den erhöhten Antibiotikaeinsatz in der Human- und Veterinärmedizin seit der Entdeckung von Antibiotika kam es in den letzten Jahren zu einer gesteigerten Selektion und damit erhöhtem Vorkommen von (multi-) resistenten Mikroorganismen, nicht nur im klinischen Bereich und in der Tierhaltung, sondern auch in der allgemeinen Umwelt [56-59].

1.3.1 Arten von Antibiotikaresistenzen

In Abb. 2 sind die hauptsächlichen Angriffsziele für Antibiotika in der Bakterienzelle (links) sowie die entsprechenden Resistenzmechanismen (rechts) mit beispielhaft genannten Antibiotikaklassen gegenübergestellt. Potenzielle Angriffsziele von Antibiotika sind essentielle Stoffwechselwege von Bakterien, DNA-, RNA- und Proteinsynthese sowie die Zellwand und Zellmembran [55].

Gegen die Wirkung von Antibiotika gibt es fünf verschiedene Resistenzstrategien. Dabei handelt es sich um die Aktivierung alternativer Stoffwechselwege anstelle der gehemmten (1), das Verhindern des Eindringens von Antibiotika in die Bakterienzelle (2), das aktive Ausschleusen von Antibiotika aus der Zelle durch Effluxpumpen (3), die Synthese von Antibiotika-hydrolysierenden oder -modifizierenden Enzymen (4), und um Modifikationen der Bindungsstellen für Antibiotika auf den Zielstrukturen (5) [55, 58, 60, 61].

Wie in Abb. 2 zu erkennen, können β -Laktam-Antibiotika die bakterielle Zellwand angreifen, indem sie die Peptidoglycansynthese hemmen. Dies führt zu einer verringerten Zellwandintegrität, sodass die Bakterienzelle dem osmotischen Druck nicht standhalten kann und lysiert [62]. Ein weit verbreiteter Resistenzmechanismus gegen β -Laktam-Antibiotika sind β -Laktamasen, Enzyme, die den β -Laktam-Ring hydrolysieren und das Antibiotikum unwirksam machen [63]. Verschiedene β -Laktamasen unterscheiden sich in ihrer Fähigkeit und Effizienz unterschiedliche β -Laktam-Antibiotika zu hydrolysieren [58]. Sie sind häufig auf mobilen genetischen Elementen (;GE) wie Resistenzplasmiden oder Transposons codiert [64, 65].

Tetracycline hemmen die Proteinbiosynthese, indem sie sich an die Ribosomen anlagern und dort die Bindung der Aminosäure-beladenen tRNA-Moleküle verhindern [62]. Neben der aktiven Ausschleusung von Tetracyclinen aus der Bakterienzelle durch Effluxpumpen (codiert z. B. durch *tetA*, *tetK*), gibt es Resistenzgene, die für ribosomale Schutzproteine codieren (*tetM*, *tetO*, *tetW*), welche die Bindung von Tetracyclinen an ihren Wirkungsort verhindern [65]. Beide Resistenzmechanismen sind häufig auf MGE wie konjugativen Plasmiden oder Transposons codiert, und damit horizontal übertragbar [65-67].

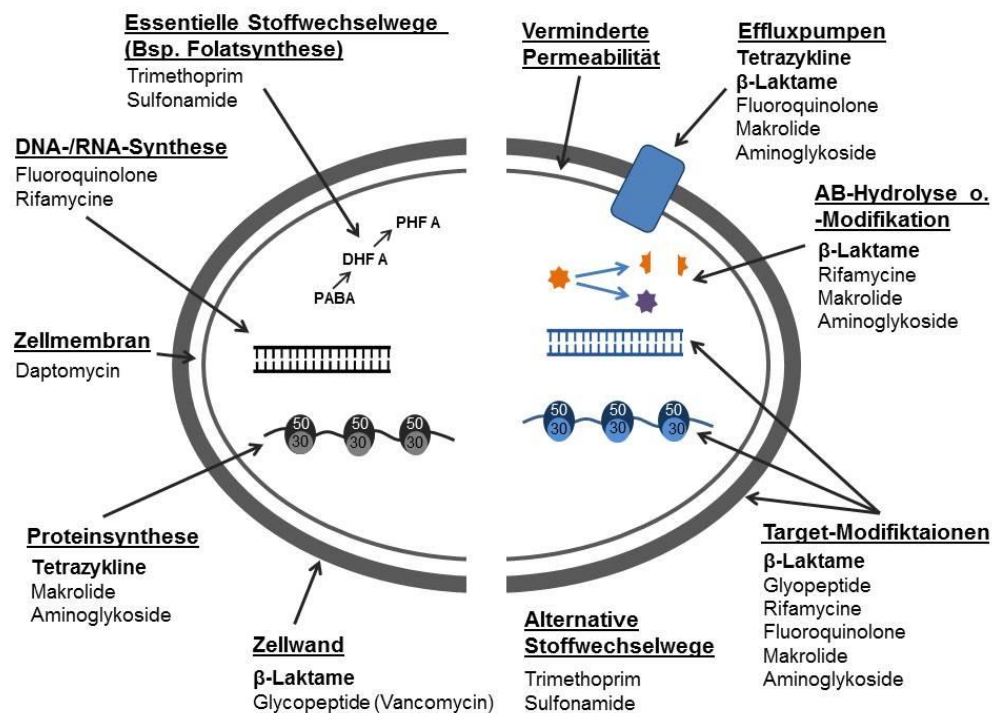


Abbildung 2: Schematische Darstellung der hauptsächlich Angriffspunkte von Antibiotika (AB) in der Bakterienzelle (links) und Resistenzmechanismen (rechts). Zusätzlich sind die entsprechenden Antibiotikaklassen aufgelistet. Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Antibiotikaklassen sind fett markiert.

1.3.2 Horizontaler Gentransfer

Werden genetische Informationen bei der Zellteilung von Mutter- auf Tochterzellen übertragen, spricht man von vertikalem Gentransfer. Im Gegensatz dazu können genetische Informationen auch zwischen verschiedenen Bakterienspezies oder -gattungen übertragen werden. In diesem Falle spricht man von horizontalem Gentransfer (HGT) [55]. Für den horizontalen Gentransfer sind drei Mechanismen bekannt: die Transformation, die Transduktion und die Konjugation (Abb. 3) [61]. Bei den übertragenen MGE handelt es sich zumeist um Plasmide und Transposons, aber auch

Bakteriophagen, Insertionssequenzen und genomische Inseln, sowie Kombinationen aus den genannten MGE sind via HGT übertragbar [61, 68].

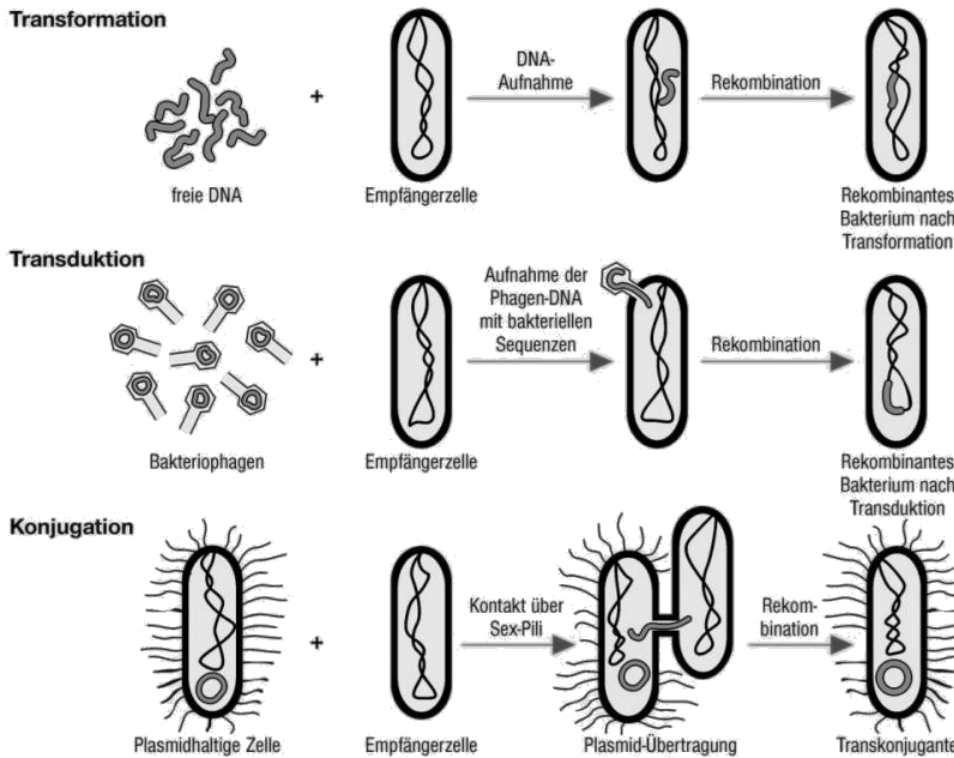


Abbildung 3: Mechanismen des horizontalen Gentransfers (HGT). Verändert nach: <http://www.wissen.de/lexikon/gentransfer> (11/2017).

Bei der Transformation erfolgt die Aufnahme frei vorliegender DNA durch kompetente Bakterienzellen. Voraussetzung für die stabile Integration in die Zelle ist die Rezipitation, falls es sich um ein Plasmid handelt, oder die Integration in das Bakteriengenom durch homologe Rekombination [69]. Für Letztere muss der aufgenommene DNA-Abschnitt ausreichend Homologien zu bereits auf dem Bakterienchromosom vorhandenen Sequenzen besitzen [61]. Die wenigsten Bakterien sind dauerhaft kompetent zur Aufnahme von DNA, sondern die Kompetenzentwicklung wird durch den Einfluss verschiedener Umweltfaktoren, z. B. durch QS-Signale, erst ausgelöst. Bei der Transduktion erfolgt die DNA-Übertragung über Bakteriophagen von einer Wirtszelle auf die andere. Die Konjugation ist ein hochspezifischer Vorgang, bei dem MGE, zumeist Plasmide oder Transposons, über direkten Zell-Zell-Kontakt von einer Spender- auf eine Empfängerzelle übertragen werden. Während der Kontakt bei Gram-negativen Bakterien durch Sex-Pili hergestellt wird, spielen bei Gram-positiven Bakterien andere, bisher noch weitestgehend unbekannte Mechanismen eine Rolle.

1.3.3 Antibiotikaresistenzen und horizontaler Gentransfer in Biofilmen

Die in Biofilmen organisierten Bakterien sind bis zu 1.000 x resistenter gegenüber schädlichen Umwelteinflüssen als planktonische Zellen derselben Spezies [2, 70]. Erhöhte Resistenzen gegenüber Antibiotika und Desinfektionsmitteln sind dabei auf verlangsamte Stoffwechselraten der Biofilm-Zellen sowie die EPS-Schicht als physikalische Diffusionsbarriere zurückzuführen [19]. Aufgrund der hohen Zelldichte und somit der räumlichen Nähe der Zellen im Biofilm, der hochdiversen Spezieszusammensetzung sowie der vereinfachten Zell-Zell-Kommunikation via QS bieten Biofilme optimale Voraussetzungen für einen Austausch von Resistenzgenen via HGT [19, 33]. Zusätzlich tragen Biofilme zur Plasmidstabilität bei [68, 69, 71-73].

Da eDNA ein wichtiger struktureller Bestandteil der EPS-Schicht ist, ist in Biofilmen die Transformationsrate vermutlich deutlich erhöht [25, 62, 69]. Dafür spricht außerdem, dass das Vorliegen von eDNA sowie die Zell-Zell-Kommunikation über QS in Biofilmen die Kompetenzentwicklung zur DNA-Aufnahme regulieren können [74]. Stressoren wie Nährstoff- oder Sauerstofflimitierung sowie das Vorhandensein von Antibiotika können ebenfalls zur Kompetenzentwicklung beitragen [59].

In der Literatur gibt es bisher keine konkreten Hinweise, dass der HGT mittels Transduktion in Biofilmen gesteigert ist [61]. Allerdings weisen neuere Erkenntnisse aus Metagenomanalysen darauf hin, dass in der Umwelt eine viel größere Vielfalt an Bakteriophagen vorliegt, als bisher vermutet. Zudem weisen bestimmte Bakteriophagen ein breites Wirtsspektrum auf und können Antibiotikaresistenzgene sogar zwischen verschiedenen Taxa übertragen [59]. Weiterhin weisen einige Transkriptionsanalysen auf eine vermehrte Expression von Bakteriophagen-Genen in Biofilmen hin [75, 76].

1.4 Untersuchung von Biofilmen

In der Mikrobiologie unterscheidet man zwischen kultivierungsgestützten und molekularbiologischen Nachweismethoden, die jeweils Vor- und Nachteile besitzen. Diese gilt es anhand der zu beantwortenden Fragestellung gegeneinander abzuwägen.

1.4.1 Kulturelle Untersuchungsverfahren

Die grundlegende Voraussetzung für die Detektion von Biofilmbesiedlern mit Hilfe von kultivierungsgestützten Verfahren ist deren Wachstumsfähigkeit auf den verwendeten Nährmedien unter den gewählten Inkubationsbedingungen. In Biofilmen existieren

Nährstoff-, pH, Sauerstoff- und ggf. Hemmstoff-/Antibiotikagradien [8, 62, 74], welche verschiedensten Organismen das Wachstum in den entsprechenden Nischen ermöglichen. Im Labor können diese niemals gleichzeitig abgebildet werden. Zudem sind die Stoffwechselraten der Mikroorganismen besonders in den unteren Schichten des Biofilms sehr gering, was zur Unterschätzung der tatsächlichen Keimzahl und Speziessvielfalt durch die mangelnde Erfassung lebender, aber nicht kultivierbarer (viable but nonculturable, VBNC) Organismen führen kann [74, 77]. Für die Erfassung von antibiotikaresistenten Bakterien besteht das Problem der Festlegung von Grenzwerten der Antibiotikakonzentration zur Unterscheidung zwischen sensitiven und resistenten Bakterien [78]. Ein Vorteil von kulturellen Verfahren besteht in der Möglichkeit, Isolate zu vereinzeln und hinsichtlich ihres Verderbnispotentials, Temperaturbereich des Wachstums und Biofilmbildungsvermögens unter verschiedenen Bedingungen zu charakterisieren.

1.4.2 Molekularbiologische Untersuchungsverfahren

Ein Vorteil von molekularbiologischen Verfahren ist die Unabhängigkeit von Kultivierungsschritten. Bei der direkten DNA-Extraktion aus der Probe besteht theoretisch keine Möglichkeit zur Diskriminierung einzelner Bakteriengruppen durch die gewählten Inkubationsbedingungen, und VBNC-Zellen können ebenfalls detektiert werden. Allerdings ist ein kritischer Punkt der Zellaufschluss, der in den meisten Fällen für Gram-negative Bakterien effizienter abläuft, als für Gram-positive Bakterien mit robusteren Zellwänden, sodass es in molekularbiologischen Verfahren zu einer Überrepräsentation Gram-negativer Organismen kommen kann [79].

Eine weitere Schwierigkeit bei den direkten Verfahren besteht in der mangelnden Unterscheidungsmöglichkeit zwischen DNA aus vermehrungsfähigen Zellen und der DNA lysierter Zellen sowie frei in der Biofilmmatrix vorliegender eDNA. Dem kann mit einer Lebend-Tot-Diskriminierung durch Behandlung der Probe mit Propidium-monoazid (PMA) vor dem Zellaufschluss entgegengewirkt werden. Der Farbstoff kann selektiv nur geschädigte Zellmembranen passieren und im Zellinneren die DNA modifizieren. Die PMA-modifizierten DNA-Moleküle werden während der DNA-Extraktion durch eine herabgesetzte Wasserlöslichkeit diskriminiert, oder sie lassen sich nicht mehr mittels PCR amplifizieren.

Sollte nach der DNA-Extraktion eine PCR-Amplifizierung der zu untersuchenden Gensequenzen notwendig sein, stellt deren Erfolg einen weiteren kritischen Punkt dar. Besonders in DNA-Extrakten aus Mischkulturen von Spezies mit unterschiedlichen Gehalten der Basen Guanin (G) und Cytosin (C) (GC-Gehalt) könnten aufgrund der höheren Schmelztemperatur GC-reicher Sequenzen bevorzugt DNA-Abschnitte mit niedrigem GC-Gehalt amplifiziert werden.

Zu den molekularbiologischen Verfahren zählt auch die mikroskopische Betrachtung von Biofilmen nach deren Fixierung und anschließender Hybridisierung ihrer 16S rRNA mit fluoreszenzmarkierten Oligonukleotid-Sonden. Diese Methode wird als Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) bezeichnet. Der Vorteil der mikroskopischen Verfahren liegt darin, dass die Zusammensetzung und räumliche Verteilung einzelner Mikroorganismen-Gruppen in ihrem natürlichen Habitat analysiert werden kann [80, 81].

1.5 Next-Generation-Sequencing (NGS)-Techniken

1.5.1 RNA-Seq/Differentielle Genexpressionsanalyse

Transkriptomanalysen sind ein wertvolles Tool, um die globale Genexpression von Bakterien unter bestimmten Umweltbedingungen oder in verschiedenen Wachstumsphasen zu analysieren. Bei der differentiellen Genexpressionsanalyse werden die Genexpressionsmuster eines Organismus unter zwei verschiedenen Konditionen miteinander verglichen, um vermehrt oder vermindert exprimierte Gene zu detektieren. Das Ziel solcher Untersuchungen ist es, Stoffwechselwege zu identifizieren, die unter den zu analysierenden Konditionen eingeschlagen werden.

Vor der Möglichkeit zur Durchführung von RNA-Sequenzierungen (RNA-Seq) durch Next-Generation-Sequencing (NGS)-Plattformen wurden Genexpressionsanalysen mit der copy-DNA (cDNA)-Microarray-Technologie durchgeführt. Nachteile der Methode sind das aufwändige und damit kostenintensive Design von spezifischen Mikrochips für die jeweils zu untersuchende Bakterienspezies sowie die fehlende Möglichkeit bisher unbekannte Gene zu identifizieren [82-84].

Die Vorteile von RNA-Seq-Analysen sind ihre hohe Sensitivität und Auflösung, da die Transkripte auf Ebene ihrer Nukleotidsequenz analysiert werden können. Somit können auch bisher unbekannte Gene identifiziert werden. Es besteht die Möglichkeit, Transkriptionsstartpunkte (transcription start sites, TSS) und 5' und 3' nicht codierende

Regionen (untranslated regions, UTR) zu identifizieren. Somit können neue offene Leserahmen (open reading frames, ORF) im Genom identifiziert und Annotationen verbessert werden. Zudem können co-regulierte Gene identifiziert werden, welche in Operons organisiert sind. Zusätzlich können die Transkriptionslevel hochpräzise quantifiziert werden [82, 83].

Das Vorgehen bei der RNA-Sequenzierung mit anschließender differentieller Genexpressionsanalyse sind schematisch in Abb. 4 dargestellt. Ein kritischer Punkt ist die Entwicklung eines geeigneten Versuchsdesigns (1), da nur ein solches sinnvolle Daten zur differentiellen Genexpression unter den zu testenden Bedingungen liefert. Dazu zählt auch die Verwendung von biologischen Replikaten, um Zufallsbefunde auszuschließen [84]. Für zuverlässige Aussagen sollten mindestens drei Replikate pro zu testender Kondition durchgeführt werden.

Die RNA-Extraktion (2) kann unter Verwendung von kommerziell erhältlichen Kits erfolgen. In jedem Fall muss eine DNase-Behandlung stattfinden und die vollständige Entfernung von DNA sowie die RNA-Konzentration und -Qualität verifiziert werden. Um die mRNA anzureichern, und damit den Informationsgehalt der Sequenzierung zu erhöhen, werden zumeist Housekeeping-RNA-Moleküle (tRNA, rRNA) entfernt, welche zusammen mehr als 95 % des Roh-RNA-Extraktes ausmachen (3). Die Entfernung erfolgt durch Magnetic Beads mit rRNA-spezifischen Sequenzen oder bei der reversen Transkription unter Verwendung von „nicht so zufälligen“ („not-so-random“) Primern [85].

Zur Erstellung von cDNA-Bibliotheken wird die RNA fragmentiert (4). Die Fragmente werden durch reverse Transkription mit zufälligen (random) Hexamer-Primern in stabilere doppelsträngige cDNA umgeschrieben (5). Als Startpunkte für die PCR-Amplifikation zur Erhöhung der Template-Menge vor der Sequenzierung (7) werden Adapter an beide Enden der cDNA-Fragmente ligiert. Die Adapter enthalten zudem spezifische Sequenzen, die in den Durchflusszellen des Sequenzierers gebunden werden und dienen gleichzeitig als Startpunkte der Sequenzierungsreaktion (6). Weiterhin können sie Barcode-Sequenzen zur Unterscheidung verschiedener Transkripte bei der Multiplex-Sequenzierung unterschiedlicher Proben in derselben Reaktion enthalten [85]. Vor der Sequenzierung (8) wird eine Qualitätskontrolle der erstellten cDNA-Bibliothek hinsichtlich der Fragmentlänge und -konzentration durchgeführt. Die benötigte

Sequenziertiefe (Reads/Sequenzen pro Probe) sowie die Durchführung der Sequenzierung von einem Ende (single end) oder beiden Enden (paired end) der Fragmente ist abhängig vom Ziel der Studie und des vorhandenen Budgets. So kann die Sequenziertiefe für differentielle Genexpressionsanalysen geringer sein als für die Detektion von neuen Genen [83]. Paired end-Sequenzierungen erhöhen die Genauigkeit des Mappings und sorgen für eine bessere Detektion von Transkripten mit geringer Konzentration.

Die erhaltenen kurzen Sequenz-Reads von ca. 150 bp Länge werden bioinformatisch entsprechend ihrer Qualität gefiltert, Adaptersequenzen werden herausgeschnitten und die verbliebenden Reads auf ein Referenz-Genom gemapped (9) [84]. Die Quantifizierung erfolgt anhand der Anzahl an Reads, die auf ein Gen gemapped wurden unter Berücksichtigung der Länge des Gens. Nach einer Normalisierung (10) der Daten aus verschiedenen Experimenten zur Berücksichtigung unterschiedlicher Größen der sequenzierten cDNA-Bibliotheken [85], erfolgt die differentielle Genexpressionsanalyse (11). Die Programme zur differentiellen Genexpressionsanalyse unterscheiden sich unter anderem in den zugrundeliegenden statistischen Modellen [82, 85, 86].

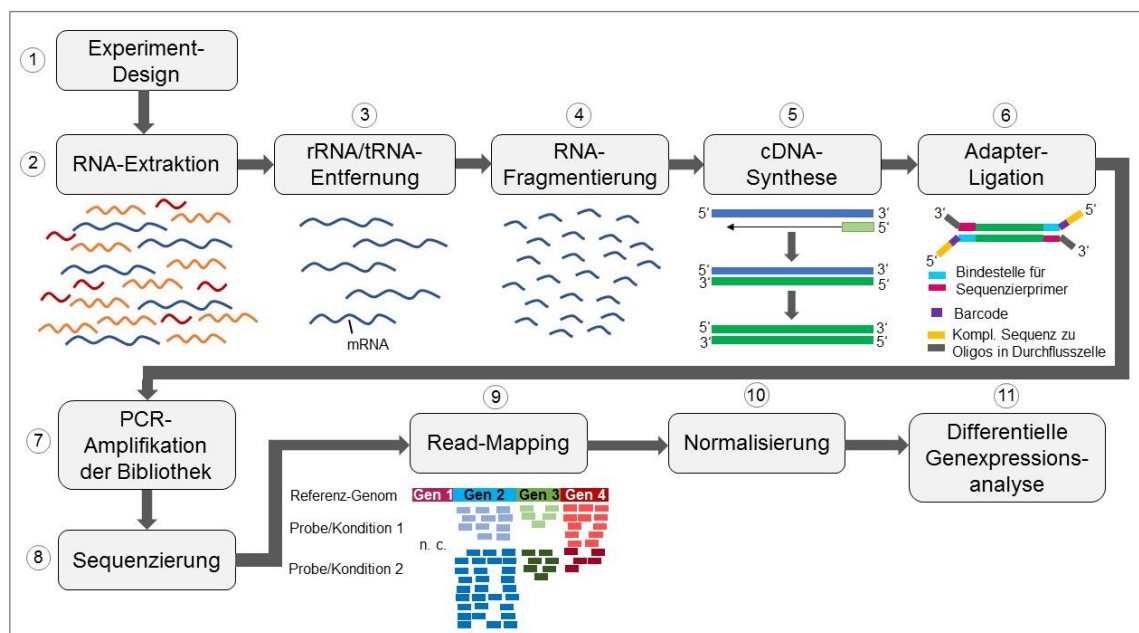


Abbildung 4: Fließschema zur Durchführung von differentiellen Genexpressionsanalysen mittels RNA-Sequenzierung. Die Zahlen verweisen auf Erwähnungen im Fließtext. n. c., nicht codiert. Gelb, rRNA; rot, tRNA; blau, mRNA; grün, cDNA.

Um Ausreißer zu identifizieren, können Hauptkomponentenanalysen (principal component Analysen, PCA) durchgeführt werden. Damit kann zudem festgestellt werden, ob Unterschiede im Genexpressionsmuster der Replikate unterschiedlicher Konditionen zu erwarten sind, da in diesem Falle die Replikate einer Kondition jeweils zusammen clustern. Die erhaltenen differentiellen Expressionen der Gene werden als x-fache Veränderung oder deren Logarithmus (fold-change bzw. log-fold-change) zwischen den zu testenden Konditionen angegeben. Um Zufallsbefunde zu minimieren, werden Kennzahlen zur Beurteilung der statistischen Signifikanz der Befunde angegeben. Hierzu zählen der p-Wert sowie Korrekturen des p-Wertes zur Berücksichtigung multipler Tests, wie die False Discovery Rate (FDR) und der Bonferroni-Wert. Zu den an den häufigsten verwendeten NGS-Plattformen zählen Illumina (Solexa), Life Technologies (SOLiD) und Roche (454).

1.5.2 Biofilmassoziierte Gene

Zur Identifizierung von zur Biofilmbildung benötigten Genen wurden Transkriptomanalysen und/oder differentielle Genexpressionsanalysen von verschiedenen Bakterien durchgeführt. Die meisten Studien untersuchten dabei die Genexpressionsmuster von Biofilmbildnern, die im klinischen Bereich oder in der Lebensmittelindustrie relevant sind. Dazu zählen *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Acinetobacter baumannii*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* und *Bacillus subtilis*.

Bisherige Studien führten zu dem Ergebnis, dass es kein universelles Biofilm-Genexpressionsmuster gibt. Stattdessen ist dieses hochvariabel und von der Phase der Biofilmbildung, der zu besiedelnden Oberfläche, dem umgebenden Medium und weiteren Umweltfaktoren sowie von der jeweiligen Bakterienspezies abhängig [28]. Zudem kann es aufgrund der Bildung von Nischen innerhalb eines Biofilms zu lokalen Unterschieden im Genexpressionsmuster kommen. Vermutlich ist dementsprechend jeder Biofilm einzigartig [87]. Das Genexpressionsmuster in Biofilmen ist demjenigen von planktonischen Zellen derselben Spezies in der stationären Wachstumsphase sehr ähnlich [75, 87, 88]. Dennoch gibt es Trends, die auf ein gewisses Muster von biofilmassoziierten Genen hindeuten. So sind Gene, die für Flagellen und damit für die Beweglichkeit von Bakterien codieren (z. B. *flh*-Operon), wahrscheinlich für den ersten Kontakt zwischen der Bakterienzelle und der zu besiedelnden Oberfläche von Bedeutung [89]. Kurz nach der Anheftung wird die Expression dieser Gene unterdrückt, was als typischer Marker für

den Übergang in den sessilen Wachstumsmodus gewertet wird [87]. Jedoch scheint die Rolle der Flagellen-vermittelten Beweglichkeit bei der Biofilmbildung von den Strömungsverhältnissen abzuhängen. So konnte für diverse Bakterien festgestellt werden, dass Flagellen nur unter statischen Bedingungen für die Biofilmbildung von Bedeutung sind und ihre Wichtigkeit bei „continuous flow“-Konditionen abnimmt [90].

Für eine Adhäsion der Zellen untereinander sowie an die zu besiedelnde Oberfläche sind in vielen Bakterien Typ I- (*fimA*) oder Typ IV-Pili (*pilA*, *pilF*) oder Curli verantwortlich [75, 91]. Die Expression von entsprechenden Genen wird als Übergang von der reversiblen zur irreversiblen Adhäsion gewertet [89]. Weitere auf der Zelloberfläche lokalisierte Adhäsine (z. B. Ag43) werden vor allem über Typ 1- oder Typ 5-Sekretionssysteme (T1SS, T5SS) sowie Autotransporter an die äußere Membran von Gram-negativen Bakterien abgegeben [91, 92].

Für die Bildung von reifen Biofilmen ist die Fähigkeit zur Exopolysaccharid-Synthese von Bedeutung. Besonders bekannt ist der *icaABCD*-Locus von Staphylokokken, der für das „Polysaccharide Intercellular Adhesin“ (PIA) bzw. poly- β -1,6-N-Acetylglucosamin (PNAG) codiert [53]. *A. baumannii* produziert ebenfalls PNAG, codiert durch das *pgaABCD*-Operon [93, 94]. Die Exopolysaccharide verleihen den Biofilmen ihre Struktur und Stabilität. Zusätzlich enthält die EPS-Schicht diverse Proteine sowie eDNA. Das Vorkommen von eDNA in Biofilmen wird auf die Auslösung des programmierten Zelltods von Subpopulationen zurückgeführt. Die genauen Mechanismen sind dabei noch nicht abschließend geklärt [90, 95]. Zu den wichtigsten Proteinen in der Biofilm-Matrix zählen die „Biofilmassoziierten Proteine“ (BAP), die ursprünglich in *S. aureus* identifiziert wurden. Mittlerweile wurden Homologe zu den *bap*-Genen in vielen verschiedenen Gram-positiven und Gram-negativen Organismen detektiert [90, 96, 97].

Entgegen der Annahme, dass Biofilme einen Schutz gegen Stressoren aus der Umwelt darstellen, zeigen immer mehr Studien, dass vor allem in reifen Biofilmen Stress-induzierte Stoffwechselwege aktiviert sind [75]. Dazu zählen die vermehrte Induktion von temperenten Phagen, DNA-Reparatur-Systemen (*recA*, *xthA*), Chaperonen (*dnaJ*, *dnaK*, *hfq*), Hitzeschock-Proteinen (*htp*), Sigma-Faktoren (z. B. *rpoS*) sowie Proteinen der SOS-Antwort (*sbm*, *sula*), oxidativem und Zellwand-Stress (*cpx*, *pspABCDE*, *rpoE*) [75, 87, 91].

Einem Großteil der in globalen Expressionsanalysen von Biofilmen detektierten Gene konnte keine bisher bekannte Funktion zugeordnet werden. Somit ist weiterer Forschungsbedarf notwendig, um die Funktion dieser Gene zu identifizieren und damit weitere Erkenntnisse über biofilmassoziierte Gene zu gewinnen [75, 87]. Um die Beteiligung der detektierten Gene an der Biofilmbildung zu verifizieren, werden Mutationen eingeführt und anschließend das Biofilmbildungsvermögen von Wildtyp und Mutante verglichen. Dabei zeigen sich bei konservierten Genen verschiedener Spezies teils kontroverse Ergebnisse, insbesondere bei QS-regulierten Genen.

Neben der Detektion von biofilmassoziierten Genen, ist die Analyse von regulatorischen Wegen von Bedeutung, um Erkenntnisse über die Aktivierung und Repression der Biofilmbildung zu gewinnen und diese darüber ggf. an unerwünschten Stellen zu verhindern. Die Induktion der Biofilmbildung unterliegt komplexen Regulationsmechanismen und beruht auf der Fähigkeit von Bakterien, ihre Umgebung wahrzunehmen und z. B. auf das Vorliegen von QS-Signalmolekülen bei erhöhten Zelldichten sowie Nährstoff- und Sauerstofflimitierung oder osmotischen Stress mit verstärkter Biofilmbildung zu reagieren [53, 98]. So unterliegen u. a. Typ IV-Pili, weitere oberflächenassoziierte Proteine, Proteine der Stressantwort, Eisen-Aquirierungssysteme (z. B. Siderophore) und Virulenzfaktoren der Regulation durch QS-Signale [36, 92]. Biofilmassoziierte Gene werden zudem häufig durch Zwei-Komponenten-Systeme (two component systems, TCS), bestehend aus Sensor-Kinase und Response-Regulator, reguliert [89, 99], oder sie können durch second messenger Moleküle wie c-di-GMP oder cAMP aktiviert werden. Während c-di-GMP in den meisten Bakterien die Biofilmbildung aktiviert [89, 91], konnte überwiegend eine verminderte Biofilmbildung durch hohe intrazelluläre cAMP-Konzentrationen nachgewiesen werden [15, 100].

In Tab. 2 ist eine Übersicht über ausgewählte biofilmassoziierte Gene der Phyla *Firmicutes* und *Proteobacteria* dargestellt. Diese erhebt weder einen Anspruch auf Vollständigkeit noch auf die Übertragbarkeit auf andere Spezies. Zudem existieren in verschiedenen Spezies mit großer Wahrscheinlichkeit Homologe der aufgeführten Gene, die entweder dieselbe Funktion oder sogar entgegengesetzte Funktionen aufweisen können. Bei vielen der dargestellten Genprodukte handelt es sich um regulatorische Proteine, die wiederum die Expression weiterer Biofilm-spezifischer Gene, z. B. Pili, EPS-Produktion usw. aktivieren oder unterdrücken.

Tabelle 2: Ausgewählte in die Biofilmbildung involvierte Gene. Verändert nach [87]; mit * markierte Gene sind dieser Quelle entnommen. KNS, Koagulase-negative Staphylokokken; PNAG: Poly-1,6-N-Acetyl-D-Glucosamin.

Gen	Bakterienspezies	Funktion	Referenz
Phylum Firmicutes			
<i>spo0H</i> ¹⁾	<i>B. subtilis</i>	Benötigt für vollständige Biofilm-Reifung	* [88]
<i>luxS</i>	<i>B. subtilis</i>	Quorum-Sensing, gesteigerte Biofilmbildung	[90], [101], [102]
	<i>L. monocytogenes</i>	Quorum-Sensing, unterdrückt Biofilmbildung	[90], [103]
<i>clp</i>	<i>L. monocytogenes</i>	Protease, Stressantwort	*
<i>recO</i>	<i>L. monocytogenes</i>	DNA-Reparatur, Stressantwort	*
<i>agrABCD</i> ¹⁾	<i>L. monocytogenes</i>	Quorum-Sensing, Positive Regulation von Adhäsion und Biofilmbildung	[90], [104]
	<i>S. aureus</i>	Quorum-Sensing, Biofilm-Ablösung	[90], [105], [106]
<i>sarA</i> ¹⁾	<i>S. aureus</i>	Aktiviert Biofilmbildung via PIA/PNAG-Produktion	*
<i>rpoB</i> ¹⁾	<i>S. epidermidis</i>	Aktiviert Biofilmbildung	*
<i>icaABCD</i>	<i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i>	Synthese von EPS-Komponenten (PIA/PNAG)	[53]
<i>bap</i>	KNS	Biofilmassoziiertes Protein, begünstigt Adhäsion	[53]
Phylum Proteobacteria			
<i>pga</i>	<i>A. baumannii</i>	Synthese von PNAG, EPS-Bestandteil	[93], [94]
<i>csu</i>	<i>A. baumannii</i>	Synthese von Typ I Pili (Adhäsion)	[94]
<i>bfmRS</i> ²⁾	<i>A. baumannii</i>	Positive Regulation des <i>csu</i> -Operons, Twitching-Motility	[93], [94]
<i>abaI/abaR</i>	<i>A. baumannii</i>	QS-System via AHL, homolog zu <i>lux</i>	[94]
<i>adeRS</i> ²⁾	<i>A. baumannii</i>	Regulierung von biofilmassoziierten Genen (z. B. RND-Effluxpumpen)	[107]
<i>csrA</i> ¹⁾	<i>E. coli</i>	Unterdrückt Biofilmbildung, aktiviert Ablösung	*
<i>cpxAR</i> ²⁾	<i>E. coli</i>	Positive Regulation der Biofilmbildung	[75], [88]
<i>ompR/ envZ</i> ²⁾	<i>E. coli</i>	Verstärkt Anheftung über Fimbrien- und Cellulose-Gen-Aktivierung	* [89]
<i>csgD</i> ¹⁾	<i>E. coli</i>	Reguliert Curli-Operons	[89]
<i>rcsB-yojN-rcsC</i> ²⁾	<i>E. coli</i>	Aktiviert Biofilmbildung; Colansäure-Synthese ↑, Flagellen- und Curli ↓	* [89]
<i>recA</i>	<i>E. coli</i>	SOS-Antwort	*
<i>soxS</i> ¹⁾	<i>E. coli</i>	Oxidativer Stress	*
<i>rpoS</i> ¹⁾	<i>E. coli</i>	Globaler Stressregulator	*
	<i>P. aeruginosa</i>	Globaler Stressregulator	*
<i>tatABC</i>	<i>E. coli</i> <i>P. aeruginosa</i>	Proteinsekretion, benötigt für Biofilmbildung	[75]
<i>crc</i> ¹⁾	<i>P. aeruginosa</i>	Aktivierung der Typ IV-Beweglichkeit, benötigt für Biofilmbildung	*

¹⁾ Transkriptionsfaktor, ²⁾ 2-Komponenten-System (TCS)

1.6 Zielsetzung

Biofilme in der Milchindustrie können eine persistente Kontaminationsquelle für Milch und Milchprodukte mit Pathogenen und/oder Verderbniserregern und deren hitzeresistenten Enzymen darstellen. Somit können sie eine Verbrauchergefährdung verursachen, oder die Haltbarkeit von Milchprodukten reduzieren.

Bisherige Studien zur Charakterisierung der bakteriellen Gemeinschaft konzentrierten sich vor allem auf Biofilme in der milchverarbeitenden Industrie, wie in Anlagen zur Herstellung von pasteurisierter Konsummilch, Milchpulver oder Käse. Dennoch kann die Zusammensetzung der bakteriellen Gemeinschaft in diesen Industriezweigen durch die Mikrobiota der Rohmilch als Ausgangsprodukt sämtlicher Milchprodukte beeinflusst werden. Diese ist wiederum abhängig von der Mikrobiota in Biofilmen auf verschiedenen Oberflächen der Melkanlage. Aus den Biofilmen können Bakterien während des Melkvorgangs in die Rohmilch abgeschwemmt und mit ihr in die Molkereien weitergetragen werden, wo sie sich erneut in Biofilmen etablieren und Sekundärkontaminationen verursachen können.

Die vorliegende Arbeit ist die erste, die eine umfangreiche Charakterisierung der bakteriellen Gemeinschaft von Melkanlagen-Biofilmen vornimmt. Um die tatsächlich vorhandene Vielfalt so vollständig wie möglich zu erfassen, wurde eine Kombination aus kultivierungsgestützten und molekularbiologischen Verfahren verwendet. Mit Hilfe von Tupferabstrichen von verschiedenen Stellen der Melkanlage sollten Schwachstellen im maschinellen Melkvorgang identifiziert werden, bei denen eine erhöhte Besiedelungsdichte auftritt. Weiterhin wurden Edelstahlcoupons für mehrere Tage in die Melkanlage verbracht, um die Initiation der Biofilmbildung unter möglichst realitätsnahen Bedingungen zu analysieren. Zusätzlich wurde die Prävalenz von antibiotikaresistenten Bakterien erfasst, da Biofilme potentielle Hotspots für die Neuausstattung von tier- und humanpathogenen Erregern mit Antibiotikaresistenzen darstellen. Dies ist besonders in Tierhaltungsbetrieben relevant, da dort Antibiotika in großen Mengen präventiv und therapeutisch zum Einsatz kommen. Mit den Ergebnissen sollte die Hypothese überprüft werden, dass die Übertragung von Antibiotikaresistenzen via HGT mit der Besiedelungsdichte in Biofilmen korreliert.

Die aus den kulturellen Verfahren gewonnenen Isolate wurden hinsichtlich ihres produktschädigenden Potentials (Wachstum bei Kühltemperaturen, Fähigkeit zur Proteolyse und Lipolyse) sowie ihres Biofilmbildungspotentials unter verschiedenen für die Milchindustrie relevanten Bedingungen untersucht. Dazu zählte die Anzucht bei Kühltemperaturen, der Austausch von Glucose im Nährmedium durch Lactose als Hauptkohlenhydrat der Milch, sowie die Untersuchung der Biofilmbildung in Mischkultur mit anderen Melkanlagen-Isolaten. Weiterhin wurden die zur Reinigung und Desinfektion der beprobten Melkanlage verwendeten Mittel hinsichtlich ihrer Effizienz zur Entfernung der gebildeten Biofilme und zur Abtötung der Bakterien evaluiert. Anhand von differentiellen Genexpressionsanalysen sollten die genetischen Determinanten der Biofilmbildung in Glucose- bzw. Lactose-haltigem TSB-Medium von Stämmen der Spezies *Acinetobacter guillouiae* und *Kocuria salsicia* beurteilt werden.

Aus den in der vorliegenden Arbeit generierten Daten könnten Empfehlungen hinsichtlich einer Optimierung des Maschinendesigns und der CIP-Verfahren zur Reinigung und Desinfektion der beprobten Melkanlage getroffen werden. Weiterhin können die detektierten Bakteriengruppen hinsichtlich ihrer Relevanz für die Milchindustrie beurteilt werden. Dazu zählt ihr Potential zur Verbrauchergefährdung sowie der mögliche negative Einfluss auf die Haltbarkeit von Milch. Zudem könnten relevante Primärbesiedler identifiziert und Strategien zur Verhinderung ihrer Anheftung entwickelt werden. Durch die Untersuchungen kann der Prozess der Biofilmbildung auf Edelstahloberflächen detailliert nachvollzogen werden.

2 Material und Methoden

2.1 Untersuchter Milchviehbetrieb

Bei dem untersuchten Milchviehbetrieb handelt es sich um die Lehr- und Forschungsstation Frankenforst der Universität Bonn in Königswinter-Vinzel (L: 7° 12' 22" E, B: 50° 42' 49" N). Hier werden ca. 60 Milchkühe der Rasse Deutsche Holstein zweimal täglich maschinell gemolken. Nach jedem Melkvorgang wird die Melkanlage (GEA Farm Technologies, Bönen) durch ein Cleaning-in-Place (CIP)-System gereinigt und desinfiziert. Hierzu wird morgens das Mittel Circo Super AFM (alkalisch) und abends das Mittel Circo Super SFM (sauer) (GEA Farm Technologies, Bönen) eingesetzt. Diese werden entsprechend der Herstellerangaben automatisch auf eine Endkonzentration von 0,4 % dosiert und die Anlage bei einer Temperatur von 60 °C gereinigt.

Die aktiven Komponenten des alkalischen Reinigungs- und Desinfektionsmittels Circo Super AFM sind Natriumhypochlorit und Natriumhydroxid, während es sich bei den aktiven Komponenten des sauren Mittels Circo Super SFM um Phosphor- und Salpetersäure handelt. Die Rohmilch wird bis zur Abholung durch die Molkerei für drei Tage bei 4 °C in einem Sammel-tank (Kryos 6BII, WestfaliaSurge Japy SAS, Saint Apollinaire, Frankreich) gelagert. Nach der Abholung wird auch der Milchsammel-tank durch ein CIP-Verfahren gereinigt und desinfiziert.

Zum Trockenstellen der Milchkühe wird präventiv das Cloxacillin-haltige Präparat Orbenin Extra verabreicht. Penicillin-, Ampicillin- und Tetracyclin-haltige Präparate werden weniger häufig und lediglich therapeutisch zur Behandlung von akuten Infektionen eingesetzt.

2.2 Versuchsaufbau

Der schematische Versuchsaufbau ist in Abb. 5 gezeigt. Um zu erfassen, an welchen Stellen innerhalb der Melkanlage eine Biofilmbildung auftritt, welche Bakteriengruppen vertreten sind, und ob zeitliche Veränderungen in der Zelldichte und Zusammensetzung der Biofilme auftreten, wurden zu drei verschiedenen Zeitpunkten (März und August 2014 und Juni 2015) Tupferabstriche von verschiedenen Stellen der Melkanlage genommen. Die Bereiche der Tupferprobenahme sowie die jeweils beprobte Fläche sind in Tab. 3 aufgeführt und in Abb. 27 im Anhang visualisiert.

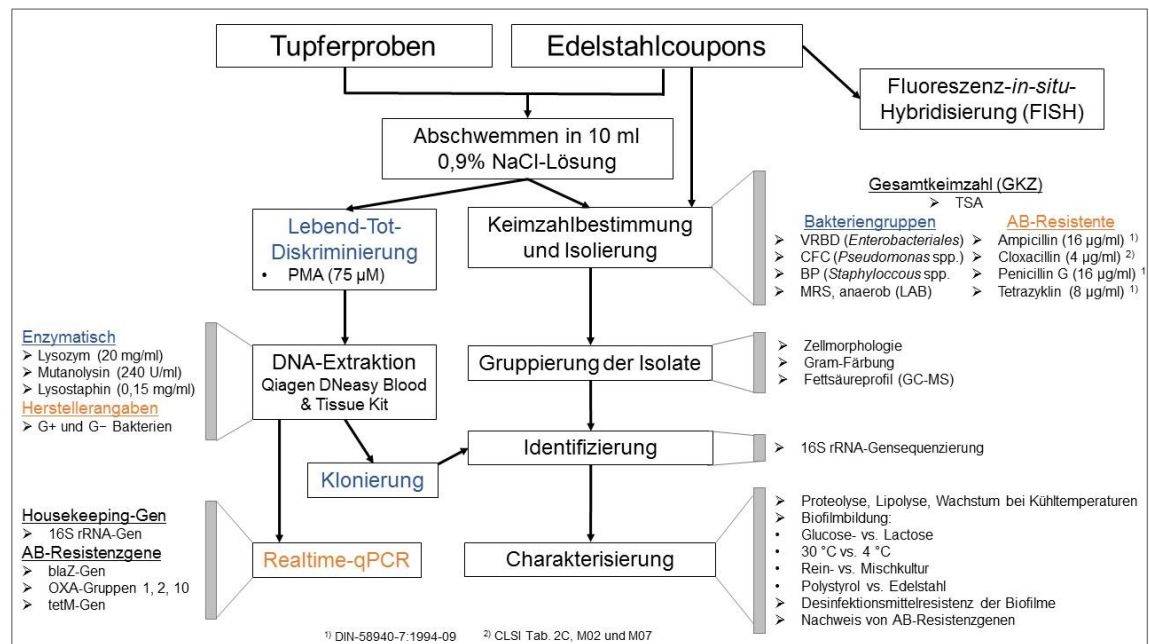


Abbildung 5: Schematischer Versuchsaufbau der vorliegenden Arbeit zur Untersuchung von Melkanlagen-Biofilmen. Der kultivierungsunabhängige Teil ist auf der linken Seite, der kulturelle Teil auf der rechten Seite der Abbildung dargestellt. Farblich markiert sind jeweils Untersuchungen, die nur im Hauptversuchsteil zur Charakterisierung der Gesamtmikrobiota (blau), oder zur Detektion antibiotikaresistenter Bakterien (orange) durchgeführt wurden.

Die Tupferköpfe wurden in steriler Ringerlösung abgeschwemmt und die Zellsuspension anschließend kulturell durch Ausstreichen von Verdünnungsreihen auf verschiedenen Voll- und Selektivnährmedien untersucht. Zusätzlich wurde nach vorangehender Lebend-Tot-Diskriminierung mittels PMA aus der Tupferabschwemmlösung der Probenahme im Juni 2015 die DNA extrahiert, um die bakterielle Diversität molekularbiologisch mittels Klonierung zu erfassen. Um eine möglichst vollständige DNA-Extraktion zu gewährleisten, wurden die drei Enzyme Lysozym, Lysostaphin und Mutanolysin eingesetzt.

Des Weiteren wurden Edelstahlcoupons aus demselben Material wie der überwiegende Anteil der Edelstahlteile der Melkanlage gefertigt (Grad 304, V2A, 1.4301, X5CrNi18-10, kaltgewalzt). Diese wurden sterilisiert und anschließend in der Spirale des Filterrohrs befestigt in die Melkanlage eingebracht, oder in den Milchabscheider eingehängt, wo sie 48 h oder 72 h verblieben, bevor sie entfernt und ebenfalls parallel kulturell und molekularbiologisch untersucht wurden. Zudem wurden die objektträgergroßen Edelstahlcoupons für eine mikroskopische Untersuchung mittels Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) fixiert. Das Ausbringen der Coupons geschah zu drei verschiedenen Zeitpunkten mit 48 h Verbleib in der Melkanlage (November 2015,

Oktober 2016 und Februar 2017) sowie einmal mit 72 h Verbleib in der Melkanlage (Dezember 2015).

Neben den Tupferproben zur Erfassung der mikrobiellen Diversität wurden im Verlauf von drei Masterarbeiten [78, 108, 109] weitere Tupferproben derselben Melkanlage genommen, um diese auf antibiotikaresistente Bakterien zu untersuchen. Die Probenahmen erfolgten im Mai, Juni und Dezember 2015 sowie im Mai 2016. Die Anteile antibiotikaresistenter Mikroorganismen wurden durch Ausplattieren auf mit verschiedenen β -Laktam-Antibiotika und Tetracyclin versetztem TSA bestimmt. Außerdem wurden DNA-Extrakte mittels Herstellerprotokoll des Qiagen DNeasy Blood & Tissue Kits (Qiagen, Hilden) für Gram-positive und Gram-negative Bakterien gewonnen. Sowohl mit den Tupfer-DNA-Extrakten als auch mit DNA-Extrakten ausgewählter antibiotikaresistenter Isolate wurden verschiedene Antibiotikaresistenzgene mittels Realtime-quantitativer PCR (RT-qPCR) nachgewiesen. Zur relativen Quantifizierung der Resistenzgene wurden außerdem die 16S rRNA-Gene in den Tupfer-DNA-Extrakten amplifiziert.

Tabelle 3: Bei den Tupferprobenahmen untersuchte Teile der Melkanlage im Melkstand und in der Milchküche mit im Weiteren verwendeten Abkürzungen und Größe der beprobten Fläche. n. m., nicht messbar.

Probenahmeort	Abkürzung	Beprobte Fläche (cm ²)
Melkstand		
Melkbecherinnenraum	MB	n. m.
Melkbecherablagen	MBA	15,0
Innenraum des Milchabscheiders/Sammelbehälters	SB	n. g.
Filterrohr inkl. Stofffilter	FR	19,0 ¹⁾ bzw. 25,1 ²⁾
Edelstahlrohr am Anfang der Druckleitung	AD-E	19,0 ¹⁾ bzw. 35,2 ²⁾
„Milchküche“		
Edelstahlrohr am Ende der Druckleitung	ED-E	19,0 ¹⁾ bzw. 35,2 ²⁾
Kunststoffrohr am Ende der Druckleitung	ED-K	19,0 ¹⁾ bzw. 35,2 ²⁾
Auslassstutzen des Milchsammeltanks	ST	38,0 ¹⁾ bzw. 75,4 ²⁾
Innenraum des Milchsammeltanks	T	n. g.

¹⁾ Beprobte Flächen bei Probenahmen zur Untersuchung der Gesamtmikrobiota

²⁾ Beprobte Flächen bei Probenahmen zur Detektion antibiotikaresistenter Bakterien

Die aus den kulturellen Verfahren gewonnenen Isolate wurden entsprechend ihrer Fettsäureprofile in Gruppen eingeteilt, aus denen repräsentative Vertreter zur Identifizierung mittels 16S rRNA-Gensequenzierung ausgewählt wurden. Die Isolate wurden hinsichtlich ihres Wachstums bei Kühltemperaturen, ihrer Lipolyse- und Proteolysefähigkeit sowie ihrem Biofilmbildungspotential untersucht. Vertreter mit

Biofilmbildungspotential in Polystyrol-Mikrotiterplatten wurden weiterhin auf ihre Resistenz gegenüber den zur Reinigung- und Desinfektion der Melkanlage eingesetzten Mitteln untersucht. Außerdem wurden ausgewählte Isolate auf ihre Fähigkeit zur Biofilmbildung auf Edelstahlcoupons getestet. Um die Kooperation der aus derselben Melkanlage stammenden Isolate bei der Biofilmbildung zu überprüfen, wurden Mikrotiterplattentests mit Mischkulturen aus je zwei Spezies durchgeführt. Von zwei ausgewählten biofilmbildenden Isolaten wurden differentielle Genexpressionsanalysen zum Einfluss des Austauschs von Glucose oder Lactose im Nährmedium auf die im Biofilm exprimierten Gene durchgeführt.

2.3 Kultivierungsgestützter Ansatz zur Diversitätsanalyse

Sofern nicht anders vermerkt, stammten alle Nährmedien und Chemikalien von den Firmen Merck KGaA (Darmstadt), Carl Roth GmbH und Co. KG (Karlsruhe) und Oxoid Ltd. (Hampshire, UK).

2.3.1 Kulturelle Keimzahlbestimmung und Vereinzelung von Isolaten

Für die kulturelle Keimzahlbestimmung aus den Tupferproben wurden die Tupferköpfe durch 30-sekündiges Vortexen in 10 ml gepufferter physiologischer Kochsalzlösung (Ringerlösung) abgeschwemmt. Anschließend wurden dekadische Verdünnungsreihen aus den Abschwemmlösungen erstellt und im Oberflächenverfahren auf verschiedenen Voll- und Selektivnährmedien zum Nachweis bestimmter Bakteriengruppen (Tab. 4) ausplattiert. Für die kulturelle Keimzahlbestimmung der Coupons wurden diese auf den in Tab. 4 aufgeführten Voll- und Selektivmedien für einige Sekunden aufgedrückt. Alle Medien wurden bei 30 °C inkubiert. Die Inkubation erfolgte aerob, mit Ausnahme des MRS-Agars, welcher anaerob im Anaerobtopf mit Hilfe des Anaerokult® A-Systems (Merck KGaA, Darmstadt) inkubiert wurde.

Zusätzlich wurden die Keimzahlen der resistenten Mikroorganismen auf mit Antibiotika versetztem TSA bestimmt. Dabei handelte es sich um die β -Lactam-Antibiotika Ampicillin, Penicillin G (jeweils 16 $\mu\text{g/ml}$) und Cloxacillin (4 $\mu\text{g/ml}$) sowie um Tetracyclin (8 $\mu\text{g/ml}$). Als Grenzwerte der Antibiotikakonzentrationen für die Differenzierung zwischen sensiblen und –resistenten Mikroorganismen wurden die Angaben des CLSI (2016) sowie aus der DIN 58940-7 herangezogen.

Unter Berücksichtigung der jeweils abgetupften bzw. abgeklatschten Flächen wurden die Keimzahlen als KbE/cm² berechnet. Während die Auszählung der Kolonien nach 48 h Inkubation erfolgte, wurden die Isolate nach 72 h Inkubationszeit vereinzelt, da erst nach dieser Zeit deutliche Unterschiede in der Koloniemorphologie erkennbar waren.

Tabelle 4: Für die Bestimmung der Gesamtkeimzahl und die selektive Erfassung verschiedener Bakteriengruppen verwendete Nährmedien mit Abkürzungen und Inkubationsbedingungen.

Nährmedium	Abkürzung	Bakteriengruppe
Trypton-Soja-Agar	TSA	Aerobe Gesamtkeimzahl (GKZ)
Milk plate count agar	MPC	Aerobe milchassoziierte Gesamtkeimzahl
Agar nach de Man, Rogosa & Sharpe	MRS	Milchsäurebakterien (lactic acid bacteria, LAB)
Baird Parker Agar	BP	<i>Staphylococcus</i> spp.
Chromocult® Coliform Agar	CCA	<i>E. coli</i> , Coliforme, <i>Enterobacterales</i>
Kristallviolett-Galle-Dextrose-Agar	VRBD	<i>Enterobacterales</i>
Cephalothin-Na-Fusidat-Cetrimid-Agar	CFC	<i>Pseudomonas</i> spp.

2.3.2 Makroskopische und mikroskopische Differenzierung der Isolate

Die Koloniemorphologie der Reinkulturen wurde durch die mit dem bloßen Auge bestimmbaren Charakteristika Farbe, Oberfläche und Umriss makroskopisch beschrieben. Zusätzlich wurde die Zellmorphologie mikroskopisch bestimmt (Carl Zeiss Axio Scope.A1, Jena). Eine weitere Differenzierung der Isolate erfolgte durch die Bestimmung des Gramfärbeverhaltens nach Gerhardt *et al.* (1981) [110] und/oder der Durchführung des KOH-Tests als Alternativmethode.

2.3.3 Fettsäureanalyse

Die Erstellung von Fettsäureprofilen diente der Gruppierung der Isolate vor der Identifizierung. Die Fettsäureanalyse erfolgte aus für 48 h bei 30 °C auf TSA inkubierten Reinkulturen. Zunächst wurden mit der Methode nach Sasser (1990) [111] Fettsäuremethylester (FAME) präpariert, anschließend extrahiert und 1 µl des Extraktes mittels Gaschromatographie und gekoppeltem Massenspektrometer (GC-MS) (7890A und 5975C, Agilent Technologies, Böblingen) unter Verwendung einer 5 % Phenylmethylsilikon-Kapillarsäule aufgetrennt und analysiert. Als Trägergas diente Helium 5.0. Die Injektortemperatur betrug 250 °C, die Temperatur im Säulenofen wurde in Schritten von 5 °C/min von 120 °C auf 240 °C erhöht und die Temperatur auf der Transferlinie vom GC zum MS betrug 280 °C. Falls nötig, wurden die FAMEs im Stickstoffstrom aufkonzentriert und erneut analysiert.

Die äquivalenten Kettenlängen (equivalent chain length, ECL) wurden aus den Verhältnissen der Retentionszeiten der unbekannt Peaks zu den Retentionszeiten eines FAME-Standards (MIDI System Calibration Standard, Agilent Technologies, Böblingen) berechnet. Durch den Abgleich der ECL-Werte der unbekannt Peaks mit einer 126 Standardwerte enthaltenden internen Datenbank wurden anschließend die in Frage kommenden Fettsäuren identifiziert. Zur Verifizierung von Fettsäuren wurden die Massenspektren der entsprechenden Peaks mit der Software „ChemStation GC-MS Data-Analysis“ Version E.02.00.493 (Agilent Technologies, Böblingen) analysiert.

Die Prozentanteile der Fettsäuren wurden als Verhältnis der Peakflächen der als Fettsäuren identifizierten Signale zur Gesamtpeakfläche angegeben. Die genauen Positionen der Doppelbindungen einfach ungesättigter Fettsäuren wurden mit Hilfe einer Dimethyldisulfid (DMDS)-Derivatisierung der FAME-Extrakte ausgewählter Vertreter einer Fettsäuregruppe nach Nichols *et al.* (1986) [112] ermittelt. Die Position der Doppelbindung ergab sich nach der GC-MS-Analyse aus den Massen der durch DMDS-Addition an die Doppelbindungen entstandenen α - und ω -Fragmente.

Alle Isolate wurden anhand ihres Fettsäureprofils, zusammen mit der Zellmorphologie und dem Gramfärbeverhalten, in Gruppen eingeteilt, aus denen repräsentative Vertreter zur Identifizierung ausgewählt wurden.

2.3.4 DNA-Extraktion und 16S rRNA-Gensequenzierung

Die Isolate wurden durch die Sequenzierung von Teilen des 16S rRNA-Gens identifiziert. Die DNA-Extraktion erfolgte aus bei 30 °C inkubierten TSB-Übernachtskulturen. Je nach ermitteltem Gramfärbeverhalten wurde nach dem Protokoll des Herstellers des „Qiagen DNeasy Blood & Tissue Kits“ (Qiagen, Hilden) für Gram-positive oder -negative Bakterien vorgegangen. Zur Amplifizierung eines etwa 1500 bp langen Bereichs der 16S rRNA-Gene im Thermocycler (ep Gradient S, Eppendorf, Hamburg) wurde das Primerpaar GM3F (5'-AGAGTTTGATCMTGGC-3') und GM4R (5'-TACCTTGTTACGACTT-3') [113] verwendet. In Tab. 5 ist die Zusammensetzung der PCR-Reaktionsansätze dargestellt. Das verwendete PCR-Programm ist in Tab. 6 aufgeführt. Der Erfolg der Amplifizierung wurde über die Kontrolle der Bandenlänge durch Auftragen auf ein Agarosegel (1 % Agarose, VWR, Darmstadt; Längen-Marker: HyperLadder™ 1 kb, Bioline, Luckenwalde) verifiziert. Anschließend wurde das Amplifikat mit dem „QIAquick PCR Purification Kit“ (Qiagen, Hilden) aufgereinigt.

Tabelle 5: Zusammensetzung des Mastermixes zur Amplifikation von 16S rRNA- und Antibiotikaresistenzgenen mittels Endpoint-PCR.

Komponente	Endkonzentration	Volumen (μ l)	Hersteller
VWR®, 10X Hauptpuffer	1 x	5	VWR, Darmstadt
dNTP-Mix, 10 mM each	0,2 mM/Nukleotid	1	GeneOn, Ludwigshafen a. R.
Forward-Primer (8 pmol/ μ l)	0,16 μ M	1	VBC Biotech, Wien, AUT
Reverse-Primer (8 pmol/ μ l)	0,16 μ M	1	
VWR® Taq DNA-Polymerase	1 U	0,5	VWR, Darmstadt
Template-DNA		2	/
A. bidest., sterilfiltriert		ad 50	/

Tabelle 6: PCR-Programm zur Amplifikation der 16S rRNA-Gene mit den Primerpaaren GM3/GM4 und M13F/R.

	Temperatur ($^{\circ}$ C)	Dauer (min)	Zyklenzahl
Erster Denaturierungsschritt	95	2	
Denaturierung	95	1	
Annealing	49	1	10
Elongation	72	1,5	
Denaturierung	95	1	
Annealing	44	1	20
Elongation	72	1,5	
Letzter Syntheseschritt	72	5	

Zum Sequenzieren eines ca. 700 bp langen vorderen Bereichs des 16S rRNA Gens durch den externen Dienstleister SeqLab (Göttingen) wurde das aufgereinigte PCR-Produkt mit dem Primer GM8Rneu (5'-GGACTACCAGGGTATCTAAT-3') (G. Muyzer, unveröffentlicht) vermischt. Zur genaueren Identifizierung wurde bei Bedarf zusätzlich eine weitere Sequenzierung des hinteren Genabschnitts mit dem Primer GM1F (5'-CCAGCAGCCGCGGTAAT-3') [114] vorgenommen.

Die Sequenzen wurden mit dem Programm Chromas Lite 2.6.2 (Technelysium, South Brisbane, AUS) ausgewertet und geschnitten. Die mit den Primern GM8Rneu und GM1F erhaltenen Teilsequenzen wurden mit dem Programm BioEdit 7.2.5 [115] zur Vollsequenz zusammengefügt. Die Identifizierung der Isolate auf Speziesebene erfolgte über den Abgleich der Sequenzen mit den in den Online-Datenbanken „EzBioCloud“ [116] und „Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)“ [117] hinterlegten 16S rRNA-Gensequenzen von Typstämmen.

2.4 Sequenzbasierte Diversitätsanalyse

Zur DNA-Extraktion von den Edelstahlcoupons wurden beide Seiten eines Coupons kräftig mit einem in Ringerlösung angefeuchteten Wattetupfer abgerieben und dieser in ein Reagenzglas mit 10 ml steriler Ringerlösung überführt. Die enthaltenen Zellen wurden durch Vortexen abgeschwemmt. Die Tupferabstriche von den verschiedenen Teilen der Melkanlage lagen bereits in 10 ml Ringerlösung vor.

2.4.1 PMA-Behandlung

Für eine Lebend-Tot-Diskriminierung zur besseren Vergleichbarkeit mit dem kulturellen Verfahren wurden die Abschwemmlösungen der Tupfer vor der DNA-Extraktion mit dem Farbstoff Propidiummonoazid (PMA) behandelt. Die eingesetzte Konzentration von 75 μM PMA orientierte sich dabei an der erfolgreichen Anwendung von 100 μM PMA zur Diskriminierung toter Zellen in Rohmilch [79] mit der Überlegung, dass in Ringerlösung keine Milchbestandteile die effektive PMA-Konzentration durch Bindung des Farbstoffes herabsetzen könnten, sodass die Konzentration verringert werden könnte. Die Konzentration wurde mit einer Mischkultur aus Gram-positiven und -negativen Isolaten verifiziert. Zur Lebend-Tot-Diskriminierung der Tupferabschwemmlösungen wurden 2 ml der Abschwemmlösung mit einer Endkonzentration von 75 μM PMA [Stocklösung: 20 mM PMA (Biotium Inc., Hayward, USA) in 20 % Dimethylsulfoxid (AppliChem GmbH, Darmstadt)] behandelt. Das weitere Vorgehen erfolgte wie bereits beschrieben [79]. Das heißt, die PMA-behandelten Ansätze wurden zunächst für 5 min unter regelmäßigem Mischen im Dunkeln inkubiert, um eine Penetration des Farbstoffes in Zellen mit gestörter Membranintegrität zu gewährleisten. Anschließend erfolgte die Belichtung zur PMA-Photoinduktion mit einer 400 W Halogenlampe (R7s, 9000 Lumen, Osram, Augsburg) für 5 min aus 20 cm Entfernung zu den waagrecht auf Eis gelagerten Proben. Zur besseren Durchmischung der Proben während der Belichtung wurden sie bei 150 rpm auf einem Plattformschüttler (Heidolph, Schwabach) geschüttelt.

2.4.2 DNA-Extraktion aus PMA-behandelten Proben

Aus allen PMA-behandelten Proben wurde die DNA-Extraktion mit Hilfe einer enzymatischen Zellyse vorgenommen. Die Tupferabschwemmlösungen wurden bei 13.000 x g für 10 min zentrifugiert, der Überstand entfernt und das Zellpellet in 180 μl Lysepuffer [20 mM Tris HCl (pH 8,2), 2 mM EDTA, 1,2 % Triton-X-100] resuspendiert, in dem 20 mg/ml Lysozym und 0,15 mg/ml Lysostaphin [Stocklösung: 6 mg/ml in

Lysepuffer] enthalten waren. 9 µl Mutanolysin-Lösung wurden hinzugefügt (Stocklösung: ≥ 4.000 U in 200 µl 0,1 M Kaliumphosphat-Puffer, pH 6,2) und die Mischung für 30 min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurden 25 µl Proteinase K und 200 µl Puffer AL (beide von Qiagen, Hilden) hinzugefügt und für weitere 30 min bei 70 °C im Heizblock inkubiert. Nach Hinzufügen von 200 µl Ethanol wurde die weitere DNA-Extraktion entsprechend der Herstellerangaben des „Qiagen DNeasy Blood & Tissue Kits“ (Qiagen, Hilden) durchgeführt.

2.4.3 Erstellung von Klonbibliotheken

Die 16S rRNA-Gene wurden mit dem Primerpaar GM3/GM4 amplifiziert, die korrekte Bandenlänge auf einem Agarosegel überprüft und die PCR-Produkte aufgereinigt, wie in Abschnitt 2.3.4 beschrieben. Falls keine PCR-Produktbanden auf dem Agarosegel sichtbar waren, wurden die DNA-Extrakte in der Vacufuge (Concentrator 530, Eppendorf, Hamburg) aufkonzentriert und erneut in die PCR eingesetzt. Falls nötig, wurde auch ein größeres Volumen des DNA-Extraktes als Template eingesetzt.

Mit den aufgereinigten PCR-Produkten wurden Klonbibliotheken mit dem pGEM-T-Vektorsystem (Promega, Madison, USA) erstellt. Die Vektoren wurden nach Herstellerangaben in kompetente *Escherichia coli* JM109 Zellen (Promega, Madison, USA) transformiert. Insert-tragende Klone wurden anhand einer vektorvermittelten Ampicillin-Resistenz und mit einem Blau-Weiß-Screening auf X-Gal- und Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG)-haltigen LB-Agarplatten selektiert [118]. Inserts von zufällig ausgewählten Klonen wurden mit dem Primerpaar M13F (5'-GTTTTCCCAGTCACGAC-3') und M13R (5'-CAGGAAACAGCTATGA-3') [119] unter den in den Tab. 5 und 6 beschriebenen Bedingungen amplifiziert. Die korrekte Bandenlänge von 1.700 bp wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese bestätigt. Die Aufreinigung, Sequenzierung und Identifizierung der 16S rRNA-Gene erfolgten wie in Abschnitt 2.3.4 beschrieben. Vor der Identifizierung wurden Vektorsequenzen mit dem Programm Chromas Lite 2.6.2 (Technelysium, South Brisbane, AUS) entfernt. Zudem wurden Chimären mithilfe des Pintail Programms [120] detektiert und ausgeschlossen.

2.5 Statistische Analyse und Erstellung von phylogenetischen Stammbäumen

2.5.1 Berechnung des Deckungsgrades

Um abzuschätzen, in wie weit die in der Klonbibliothek erfassten stichprobenartig sequenzierten 16S rRNA-Gene die tatsächlich vorhandene bakterielle Diversität in den Tupferproben und auf den Coupons widerspiegeln, wurde der Deckungsgrad nach Good (1953) [121] berechnet. Dieser orientiert sich an der Anzahl an Einzelklonen bzw. Spezies mit nur einem Individuum als Indikator für die Abdeckung der Speziesvielfalt der Grundgesamtheit. Um diese zu identifizieren, wurden zunächst operative taxonomische Einheiten (operational taxonomic units, OTUs) definiert. Dabei handelt es sich um Isolate oder Klone mit $\geq 99\%$ Übereinstimmung ihrer 16S rRNA-Gensequenz [122]. Damit ergibt sich für die Berechnung des Deckungsgrades folgende Formel:

$$C = \left(1 - \frac{N_x}{n}\right) * 100 \quad (\text{Formel 1})$$

C = „Coverage“ (Deckungsgrad)

N_x = Anzahl der OTUs, die von nur einem Klon/Individuum repräsentiert werden

n = Gesamtanzahl der Klone bzw. Individuen

2.5.2 Berechnung von Diversitäts-Kennwerten

Zur statistischen Beurteilung der auf den verschiedenen Melkanlagen-Oberflächen und Coupons vorhandenen bakteriellen Vielfalt wurden der Shannon-Diversitäts-Index (H) und die Equitabilität (E_H) sowohl für das kulturelle Verfahren als auch für die molekularbiologische Methode berechnet. Der Shannon-Diversitäts-Index berechnet sich dabei mit folgender Formel:

$$H = - \sum_{i=1}^S p_i * \ln p_i \quad \text{mit } p_i = \frac{n_i}{N} \quad (\text{Formel 2})$$

H = Shannon-Diversitäts-Index

S = Anzahl verschiedener Spezies

n_i = Anzahl der Individuen der Spezies i

N = Gesamtanzahl Isolate/Klone

Der Shannon-Index ist ein Maß für die Diversität. Je höher der Wert für einen Probenahmeort ist, desto höher ist die dort detektierte Speziesvielfalt. Der niedrigste Wert ist 0 (Detektion von nur einer Spezies), während keine obere Grenze existiert.

Der Equitabilitäts-Wert (E_H), auch als Shannon-Evenness bezeichnet, gibt die Gleichverteilung von Spezies innerhalb einer Population wieder. Dabei bedeutet der maximal erreichbare Wert von 1,0 eine maximale Gleichverteilung ohne Dominanz einer Spezies. Wenn sich der Wert 0 nähert, spricht dies für die zunehmende Dominanz einer Spezies innerhalb der Population. Die Equitabilität wird mit folgender Formel berechnet:

$$E_H = \frac{H}{H_{max}} = \frac{H}{\ln S} \quad (\text{Formel 3})$$

2.5.3 Erstellung phylogenetischer Stammbäume

Zur Darstellung der evolutionären Distanz zwischen den identifizierten Bakterienisolaten, Klonsequenzen und ihren nächstähnlichen Typstämmen wurden phylogenetische Stammbäume aus den 16S rRNA-Gensequenzen erstellt. Zunächst wurde mit dem Programm MEGA 7 [123] ein ClustalW-Alignment [124] der Sequenzen erstellt. Anschließend wurde daraus ein phylogenetischer Stammbaum mit dem Maximum-Likelihood-Algorithmus berechnet. Die Korrektheit der Stammbaumtopologie wurde mit Hilfe eines Bootstrap-Verfahrens [125] mit 1.000 Wiederholungen überprüft.

2.6 Nachweis von Antibiotikaresistenzgenen

2.6.1 DNA-Extraktion aus Tupferabschwemmlösungen

Für die Extraktion der Gesamt-DNA zum Nachweis von Antibiotikaresistenzgenen wurden 2 x jeweils 2 ml Tupferabschwemmlösung abzentrifugiert (13.000 rpm, 10 min). Die DNA wurde aus dem Zellpellet anschließend jeweils nach dem Herstellerprotokoll für Gram-positive und Gram-negative Bakterien mit dem „Qiagen DNeasy Blood & Tissue Kit“ (Qiagen, Hilden) extrahiert. Die DNA-Extrakte wurden in der Vacufuge (Concentrator 530, Eppendorf, Hamburg) auf etwa die Hälfte des ursprünglichen Volumens aufkonzentriert.

2.6.2 Realtime-qPCR zum Nachweis von Antibiotikaresistenzgenen

Zur Quantifizierung der 16S rRNA- und Antibiotikaresistenzgene und zur Erstellung von Standardkurven aus Referenzorganismen wurde der „QuantiTect SYBR Green PCR Mastermix“ (Qiagen, Hilden) verwendet. Alle RT-qPCR-Reaktionen wurden mit dem Mastercycler epRealplex (Eppendorf, Hamburg) durchgeführt. Die 16S rRNA-Gene dienten als „Housekeeping-Gene“ zur relativen Quantifizierung der Antibiotikaresistenzgene. Zur Verifizierung der korrekten Amplifikate wurden nach jedem RT-qPCR-Lauf Schmelzkurven erstellt und bei Bedarf die entstandenen PCR-Produkte zur Überprüfung der Bandenlänge zusätzlich auf ein 1 %-Agarosegel aufgetragen.

Die verwendeten Primer für die Amplifikation der 16S rRNA- und Antibiotikaresistenzgene sind mit den jeweiligen Referenzstämmen in Tab. 7 charakterisiert. In Tab. 8 ist die Zusammensetzung der PCR-Reaktionsansätze dargestellt und Tab. 9 enthält die entsprechenden PCR-Programme.

Zum Nachweis verschiedener β -Lactamasen wurden spezifische Primer für das *blaZ*-Gen sowie für die OXA-Gengruppen 1, 2 und 10 verwendet. Als Referenzorganismen dienten *Staphylococcus epidermidis* RP62A, *Escherichia coli* E2, *E. coli* W3110 und *Providencia stuartii* P125 (zur Verfügung gestellt von Dr. Beate Henrichfreise, Pharmazeutische Mikrobiologie, Universität Bonn). Als Referenzorganismus für das Tetracyclinresistenzverleihende *tetM*-Gen wurde *Staphylococcus aureus* 1450194 (zur Verfügung gestellt von Dr. Ute Müller, Institut für Tierwissenschaften, Universität Bonn) verwendet. Zur Erstellung von Standardkurven wurden DNA-Extrakte aus Reinkulturen der in Tab. 7 genannten Referenzorganismen verwendet und mindestens drei Verdünnungsstufen einer dekadischen Verdünnungsreihe in der RT-qPCR eingesetzt.

Um die Amplifikation bereits im Mastermix enthaltener unspezifischer Hintergrund-DNA mit 16S rRNA-Gen-spezifischen Primern zu unterdrücken, wurden alle Mastermixe vor Zugabe der Template-DNA mit PMA (0,8 μ M Endkonzentration) nach Hein *et al.* (2007) [130] behandelt. Die behandelten Ansätze wurden 20 min bei 4 °C im Dunkeln inkubiert, das weitere Vorgehen zur Photoaktivierung erfolgte wie in Absatz 2.4.1 beschrieben.

Mit den in den Tab. 7-9 beschriebenen Primern und PCR-Programmen wurden zusätzlich Resistenzgene in Plasmid-DNA-Extrakten ausgewählter antibiotikaresistenter Isolate

nachgewiesen und sequenziert. Die Plasmid-DNA wurde mit Hilfe der kommerziell erhältlichen Kits „NucleoSpin® Plasmid-Kit“ (Machery-Nagel GmbH & Co. KG, Düren) oder „Qiaprep Spin Miniprep Kit“ (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben extrahiert. Die Aufreinigung der PCR-Produkte und die Sequenzierung erfolgten wie in Abschnitt 2.3.4 beschrieben. Als Sequenzierprimer wurden die jeweiligen Forward-Primer aus Tab. 7 eingesetzt. Die erhaltenen Sequenzen wurden mittels „BLAST“ [117] mit bereits hinterlegten Sequenzen verglichen.

Tabelle 7: Charakterisierung der in den RT-qPCR-Reaktionen eingesetzten Primer und Referenzorganismen.

Gen (-gruppe)	Bez.	Sequenz (5' → 3')	Ampl.-länge (bp)	Quelle	Referenzorganismus
16S rRNA	F1048	5'-GTGSTGCAYGGYTGTCGTCA-3'	146	[126]	<i>E. coli</i> E2
	R1194	5'-ACGTCRTCCMCACCTCCTC-3'			
OXA-1	B1-F	5'-TTTTCTGTTGTTTGGGTTTT-3'	427		<i>E. coli</i> E2
	B1-R	5'-TTTCTTGGCTTTTATGCTTG-3'			
OXA-2	B2-F	5'-AAGAAACGCTACTCGCCTGC-3'	478	[127]	<i>E. coli</i> W3110
	B2-R	5'-CCACTCAACCCATCCTACCC-3'			
OXA-10	B10-F	5'-TCAACAAATCGCCAGAGAAG-3'	276		<i>P. stuartii</i> P125
	B10-R	5'-TCCCACACCAGAAAAACCAG-3'			
<i>blaZ</i>	BG-Fneu	5'-GAGATTTGCCTATGCTTCTACT-3'	233	[128]	<i>S. epidermidis</i> RP62A
	BG-R	5'-CCACCGATYTCKTTTATAATTT-3'			
<i>tetM</i>	tetM-F	5'-ACAGAAAGCTTATTATATAAC-3'	171	[129]	<i>S. aureus</i> 1450194
	tetM-R	5'-TGGCGTGTCTATGATGTTTAC-3'			

Tabelle 8: Zusammensetzung der Reaktionsansätze der RT-qPCR.

Komponente	Endkonzentration	Volumen (µl)	Hersteller
QuantiTect SYBR Green PCR Mastermix 2x	1 x	10	Qiagen, Hilden
Forward-Primer (10 µM)	0,3 µM	0,6	VBC Biotech,
Reverse-Primer (10 µM)	0,3 µM	0,6	Wien, AUT
Template-DNA		2	
<i>A. bidest.</i>		ad 20	

Tabelle 9: PCR-Programme zur RT-qPCR-Detektion der 16S rRNA- und Antibiotikaresistenzgene OXA-1, -2, -10, *blaZ* und *tetM*.

	Temperatur (°C)	Dauer	Zyklenzahl
Erster Denaturierungsschritt	95	15 min	1
Denaturierung	94	15 s	
Annealing	16S rRNA Gen	57,0	35 (16S rRNA-Gene)
	OXA-1, -2, -10	52,1	
	<i>blaZ</i>	50,0	
	<i>tetM</i>	47,0	
Elongation	72	30 s	
Schmelzkurve	Annealingtemp. bis 95	20 min	

2.6.3 Absolute Quantifizierung der 16S rRNA- und Antibiotikaresistenzgene

Als Referenz für eine absolute Quantifizierung der 16S rRNA-Gene in den Gesamt-DNA-Extrakten der Tupferproben wurde zunächst mit dem Primerpaar GM3F/GM4R [113] ein ca. 1500 bp langes Amplifikat des 16S rRNA-Gens aus dem DNA-Extrakt des Referenzorganismus *E. coli* E2 gewonnen (s. Abschnitt 2.3.4). Anschließend wurde das Amplifikat mit dem „QIAquick PCR Purification Kit“ (Qiagen, Hilden) aufgereinigt und die Konzentration im Plattenphotometer (Epoch Reader, BioTek, USA) gemessen. Da damit sowohl die Amplifikatlänge als auch die Konzentration des PCR-Produktes bekannt waren, konnte über Formel 4 nach Whelan *et al.* (2003) [131] die Genkopienanzahl pro PCR-Reaktionsansatz berechnet werden.

$$\text{Kopien}/\mu\text{l Template} = \frac{\text{DNA – Konzentration} \left(\frac{\text{g}}{\mu\text{l}} \right) * 6,02 * 10^{23} \left(\frac{\text{mol} * \text{Da}}{\text{g}} \right)}{\text{Amplifikatlänge (bp)} * 660 \left(\frac{\text{Da}}{\text{bp} * \text{mol}} \right)}$$

(Formel 4)

Aus dem aufgereinigten PCR-Produkt wurde eine dekadische Verdünnungsreihe erstellt und mit dem Primerpaar F1048/ R1194 (Tab. 7) in der RT-qPCR eingesetzt. Durch Anlegen einer linearen Regression der logarithmierten Kopienzahlen pro Ansatz und den C_T -Werten der jeweiligen Verdünnungsstufen wurde eine Kalibriergerade zur Berechnung der Kopienanzahl pro Reaktionsansatz erstellt.

Für eine absolute Quantifizierung der Antibiotikaresistenzgene in den Gesamt-DNA-Extrakten der Tupferproben wurden Klonierungen mit dem „pGEM[®]-T Vector System“ (Promega, Madison, USA) mit aufgereinigten Amplifikaten aus den Referenzorganismen (Tab. 7), wie in Abschnitt 2.4.3 beschrieben, durchgeführt. Die DNA-Extrakte aus vektorhaltigen *E. coli* JM109-Zellen wurden als Template in PCR-Reaktionen zur Amplifikation der Antibiotikaresistenzgene mit Teilen des Vektors eingesetzt (Tab. 5, 6). Nach gelelektrophoretischer Überprüfung der korrekten Amplifikatlänge wurde die Konzentration der aufgereinigten PCR-Produkte plattenphotometrisch gemessen und nach Formel 4 die Genkopienanzahl pro Ansatz berechnet. Durch Einsatz verschiedener Verdünnungsstufen der Amplifikate in der RT-qPCR konnten Standardkurven erstellt werden. Dies erlaubte, analog zur Quantifizierung der 16S rRNA-Gene, eine Berechnung der Kopienzahl/Ansatz über den C_T -Wert der Reaktion.

2.6.4 Berechnung von Keimzahläquivalenten aus den RT-qPCR-Ergebnissen

Um einen Vergleich zwischen den kulturell und der via RT-qPCR ermittelten Keimzahlen zu ermöglichen, wurden aus den Kopienanzahlen des molekularbiologischen Ansatzes Keimzahläquivalente berechnet. Hierfür musste die 20-fache Aufkonzentrierung der DNA aus den Tupferabschwemmlösungen vor Einsatz als Template in die RT-qPCR berücksichtigt werden. Für die Darstellung der Keimzahläquivalente/cm² wurde zudem durch die jeweils abgetupfte Fläche dividiert. Bei der Berechnung der Gesamtkeimzahl (GKZ)-Äquivalente aus den detektierten 16S rRNA-Genen, musste berücksichtigt werden, dass eine Bakterienzelle mehrere Kopien des 16S rRNA Genes enthalten kann und dass sich die Anzahl der Genkopien pro Zelle zwischen verschiedenen Gattungen oder Spezies unterscheiden kann. Daher wurde mit einem durchschnittlichen Wert von 4,2 Genkopien pro Bakterienzelle [132] gerechnet. Bei der Berechnung der Keimzahläquivalente der Antibiotikaresistenten wurde angenommen, dass jede Bakterienzelle nur ein Resistenzgen enthält.

2.7 Fähigkeit zur Proteolyse und Lipolyse

Die meisten aus den Tupferproben und von den Edelstahlcoupons isolierten Stämme wurden hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Proteolyse und Lipolyse getestet. Damit konnte ihr Potential als Verderbniserreger in Milch und Milchprodukten bewertet werden.

2.7.1 Fähigkeit zur Proteolyse

Die Fähigkeit zur Proteolyse, das heißt zum Abbau von Proteinen, wurde auf 5 % Magermilch enthaltendem TSA getestet. Für dessen Herstellung wurde 2-fach konzentrierter TSA autoklaviert und anschließend 1:1 mit 10 %-iger rekonstituierter Magermilch aus Magermilchpulver (AppliChem, Darmstadt) vermischt. Letztere konnte lediglich für 5 Minuten bei 100 °C erhitzt werden, da es sonst zur Denaturierung bzw. zum Verklumpen der enthaltenen Proteine kam. Die Isolate wurden auf jeweils einem Viertel des Proteolyse-Agars ausgestrichen und für 48 h bis 72 h bei 30 °C bzw. für 7 bis 10 Tage bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden sowohl das Wachstum als auch die Fähigkeit zum Abbau der Magermilchproteine (Proteolyse) beurteilt, welche sich durch klare Höfe um die Kolonien im ansonsten trüben Agar zeigte.

2.7.2 Fähigkeit zur Lipolyse

Die Fähigkeit zur Lipolyse, das heißt zum Abbau von Lipiden, wurde durch Ausstreichen der Isolate auf Tributyrin-Agar getestet, dessen Zusammensetzung in Tab. 10 aufgeführt ist. Die Isolate wurden auf jeweils einem Viertel des Lipolyse-Agars ausgestrichen und für 48 h bis 72 h bei 30 °C bzw. für 7 bis 10 Tage bei 4 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurde das Ausmaß des Wachstums und die Fähigkeit zur Lipolyse beurteilt, die sich ebenfalls durch klare Höfe um die Kolonien im ansonsten trüben Agar zeigte.

Tabelle 10: Zusammensetzung des Tributyrin-Agars zum Test auf Lipolysefähigkeit.

Komponente	Menge (g/ml)	Hersteller
Special Pepton	2,5	Oxoid/ Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Pepton aus Casein	2,5	Honeywell Fluka™/Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Hefeextrakt	3	VWR, Darmstadt
Agar Bacteriological	15	VWR, Darmstadt
Tributyrin	10	Alfa Aesar, Haverhill, Massachusetts, USA
Tween 80	1	Merck, Darmstadt
A. dest.	11	

2.8 Biofilmbildungsfähigkeit

Die Fähigkeit zur Biofilmbildung in Polystyrol-Mikrotiterplatten wurde für alle identifizierten Isolate von den Tupferprobenahmen zur generellen Diversitätsanalyse sowie von den Edelstahlcoupons bestimmt. Dazu zählten Tests auf Biofilmbildung bei verschiedenen Temperaturen (30 °C vs. 4 °C) sowie in Glucose- oder Lactose-haltiger Trypton-Soja-Bouillon (TSB). In TSB bei 30 °C als Biofilmbildner eingestufte Isolate wurden weiterhin auf die Reinigungs- und Desinfektionsmittelresistenz der gebildeten Biofilme getestet. Zudem wurden Isolate, die schwache bis moderate Biofilme in Reinkultur bildeten, auf synergistische oder antagonistische Effekte bei der Biofilmbildung in Mischkultur getestet. Von ausgewählten Isolaten wurde zusätzlich ihre Fähigkeit zur Biofilmbildung auf Edelstahlcoupons untersucht.

2.8.1 Biofilmbildung in Polystyrol-Mikrotiterplatten

Der Standardtest zur Biofilmbildung in Polystyrol-Mikrotiterplatten erfolgte nach der modifizierten Methode von Kolari *et al.* (2001) [133]. Dafür wurden TSB-Übernachtskulturen der Isolate durch Verdünnen mit frischer TSB auf eine dem 0,5 McFarland-Standard entsprechende Zelldichte von $1,5 \times 10^8$ KBE/ml eingestellt. Dies erfolgte durch Messung der optischen Dichte bei 625 nm (OD_{625nm}) im

Küvettenphotometer. In sterile 96-well Polystyrol-Mikrotiterplatten mit Rundboden (Greiner Bio-One, Frickenhausen) wurden jeweils 200 µl frisches Medium pro Well vorgelegt und anschließend vier Kavitäten einer Spalte mit 2 µl der eingestellten Vorkultur beimpft. Die restlichen vier Kavitäten derselben Spalte blieben unbeimpft und dienten als Negativkontrolle (Blank). Um Kontaminationen zu vermeiden, wurden die Kavitäten alternierend beimpft, sodass jede beimpfte Kavität von unbeimpften Kavitäten (Blanks) umgeben war. Als Medien wurden sowohl fertige, als Granulat einzuwiegende TSB (Merck, Darmstadt), als auch selbst zusammengestellte TSB mit gleicher Zusammensetzung, bei der jedoch Glucose durch Lactose ersetzt wurde, verwendet. Dies diente der Untersuchung, ob die aus der Melkanlage stammenden Isolate stärkeres Biofilmbildungsvermögen mit Lactose als Hauptkohlenhydrat der Milch aufweisen. Die Zusammensetzungen der verwendeten Bouillons sind in Tab. 11 aufgeführt. Bei allen Versuchen wurden parallel vier Mikrotiterplatten mit derselben Vorkultur beimpft. Jeweils zwei Ansätze enthielten TSB bzw. Lactose-TSB, davon wurde jeweils eine Platte für 24 h bei 30 °C und die andere für 7 d bei 4 °C inkubiert.

Tabelle 11: Gegenüberstellung der Zusammensetzungen fertig vom Hersteller bezogener Trypton-Soja-Bouillon (TSB) und selbst zusammengestellter Lactose-TSB.

Trypton-Soja-/CASO-Bouillon (TSB) (Merck, Darmstadt)		Lactose-TSB (selbst hergestellt)		
Komponente	Gehalt (g/l)	Komponente	Gehalt (g/l)	Hersteller
Pepton aus Casein	17	Pepton aus Casein	17	Honeywell Fluka™/ Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Pepton aus Sojamehl	3	Pepton aus Sojamehl	3	
NaCl	5	NaCl	5	Merck, Darmstadt
K ₂ HPO ₄	2,5	K ₂ HPO ₄	2,5	
D(+)-Glucose-Monohydrat	2,5	Lactose-Monohydrat	2,5	VWR, Darmstadt

Nach der Inkubation wurde das Ausmaß des Wachstums durch Messung der OD_{625 nm} im Plattenphotometer (Epoch Reader, BioTek, USA) erfasst. Anschließend wurden die Platten ausgeleert und mit 250 µl Kristallviolettlösung (4 g/l in 20 % Methanol) zur Anfärbung des Biofilms befüllt. Nach 5 min Inkubation wurde die Kristallviolettlösung abgesaugt (Nunc-Immuno™ Washer, 8 Channel, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) und die Kavitäten 3 x mit sterilem A. dest. gewaschen. Nach einer kurzen Lufttrocknung wurde das im Biofilm verbliebene Kristallviolett durch Zugabe von 300 µl Ethanol ausgewaschen und nach einer Einwirkzeit von 60 min die Absorption bei 550 nm

im Plattenphotometer (Epoch Reader, BioTek, USA) gemessen. Die Auswertung erfolgte durch Abzug des Mittelwertes der Blanks von den Absorptionswerten eines Isolates. Aus den erhaltenen Werten ($n = 4$) wurden anschließend Mittelwert und Standardabweichung berechnet. Die Intensität der Biofilmbildung ist proportional zur Höhe der Absorption bei 550 nm. Anhand der Absorptionsintensitäten wurden die Isolate in sehr starke (Abs. 550 nm $\geq 2,0$), starke ($1,0 \leq$ Abs. 550 nm $< 2,0$), moderate ($0,5 \leq$ Abs. 550 nm $< 1,0$) und schwache ($0,1 \leq$ Abs. 550 nm $< 0,5$) Biofilmbildner sowie in Isolate ohne Biofilmbildungsfähigkeit (Abs. 550 nm $< 0,1$) eingeteilt.

2.8.2 Reinigungs- und Desinfektionsmittelresistenz der Biofilme

Isolate, die in TSB bei 30 °C Biofilmbildungsvermögen aufwiesen, wurden auf Resistenzen gegenüber den zur Reinigung und Desinfektion der Melkanlage eingesetzten Mitteln untersucht. Dafür wurden Mikrotiterplatten, wie in Abschnitt 2.8.1 beschrieben, mit den Isolaten in TSB beimpft, nach Inkubation bei 30 °C die OD_{625 nm} gemessen und die Platten ausgeleert. Anschließend wurden die Kavitäten jeweils einer Mikrotiterplatte mit 250 µl der frisch hergestellten 0,4 %-igen Lösungen des sauren (Circo Super SFM) und alkalischen (Circo Super AFM) Reinigungs- und Desinfektionsmittels (beide GEA Farm Technologies, Bönen) befüllt und für 15 min inkubiert. Die verwendete Konzentration entsprach dabei der Empfehlung des Herstellers zur Anwendung in der Melkanlage. Anschließend wurde das Reinigungs- und Desinfektionsmittel abgesaugt und die Kavitäten 2x mit sterilem 1x PBS-Puffer (pH 7,4; 20x-Stocklösung von VWR, Darmstadt) gewaschen. Die verbliebenen Biofilme wurden, wie in Abschnitt 2.8.1 beschrieben, mit Kristallviolett angefärbt und die Absorption bei 550 nm photometrisch bestimmt.

Als Kontrolle wurden Platten ohne weitere Behandlung vor der Kristallviolettfärbung mitgeführt. Außerdem wurden zwei Platten mitgeführt, die mit sterilem destilliertem Wasser statt Reinigungs- und Desinfektionsmittel für 15 min inkubiert wurden. Um den Einfluss des Spülens mit 1x PBS-Puffer zu bewerten, wurde von diesen Platten nur eine gespült, die andere wurde sofort nach Absaugen des A. dest. mit Kristallviolett angefärbt.

2.8.3 Zellviabilität der reinigungs- und desinfektionsmittelresistenten Biofilme

Bei Isolaten, deren Biofilme durch die Reinigungs- und Desinfektionsmittelbehandlung nicht entfernt wurden, wurde überprüft, ob diese nach der Behandlung noch lebende Zellen enthalten. Dafür wurden Zellviabilitätsassays mit wasserlöslichem

Tetrazoliumsalz (water soluble tetrazolium salt, WST-1) (4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-Benzol-Disulfonat, Sigma Aldrich/Merck, Darmstadt) durchgeführt. Dabei handelt es sich um einen Redoxindikator, der die Atmungsaktivität von Bakterienzellen anzeigt. In reduzierter Form erscheint der Farbstoff gelblich-rot, sodass die gemessene Absorption bei (430 – 600 nm) proportional zur Atmungsaktivität der Zellen ist.

Für die Zellviabilitätsmessungen wurde eine 3,5 %-ige WST-1-Arbeitslösung in 1x PBS-Puffer aus einer 10 mM (6,5 mg/ml) WST-1-Stocklösung in A. dest. frisch angesetzt. Je Kavität wurden davon 250 µl nach der Reinigungs- und Desinfektionsmittelbehandlung anstelle des Kristallvioletts in Abschnitt 2.8.2 hinzugegeben und nach 4 h Inkubation bei 30 °C die Absorptionen bei 400 und 600 nm gemessen.

Im Gegensatz zu dem in den Abschnitten 2.8.1 und 2.8.2 beschriebenen Vorgehen wurden die Mikrotiterplatten nach der Reinigungs- und Desinfektionsmittelbehandlung nicht manuell, sondern mit Hilfe eines automatischen Mikrotiterplatten-Spülsystems (WellWash™ Microplate Washer, Thermo Scientific, Waltham, USA) mit 1 x PBS-Puffer gespült.

Als Positivkontrollen wurden Mikrotiterplatten nach Ausleeren des Mediums direkt mit WST-1 Lösung versetzt. Zusätzlich wurden zwei weitere Platten mitgeführt, die statt mit den Reinigungs- und Desinfektionsmitteln 15 min mit sterilem Wasser inkubiert wurden. Im Gegensatz zu den in Abschnitt 2.8.2 beschriebenen Versuchen wurde hier steriles Leitungswasser anstelle von A. dest. verwendet, um osmotische Effekte bei der Ablösung der Biofilme auszuschließen. Wie in allen Versuchen wurden jeweils unbeimpfte Kavitäten als Blanks mitgeführt. Die Auswertung erfolgte durch Abzug der Absorptionswerte bei 600 nm von denen bei 430 nm für jede Kavität. Anschließend wurden die Mittelwerte der Blanks von den Absorptionswerten der Isolate abgezogen und deren Mittelwerte und Standardabweichung berechnet.

Da die Absorptionsintensitäten bei (430 – 600 nm) sich innerhalb der Isolate bei den unbehandelten Proben (Positivkontrollen) stark unterschieden, wurde der für jedes Isolat ermittelte Wert als 100 % gesetzt und die Zellviabilitäten nach Leitungswasser- bzw. Reinigungs- und Desinfektionsmittelbehandlung als prozentuale Anteile dieses Wertes angegeben.

2.8.4 Biofilmbildung in Mischkultur

Für die Biofilmbildung in Mischkultur wurden Isolate verwendet, die eine schwache bis moderate Biofilmbildung in Reinkultur aufwiesen, um eine Veränderung der Absorptionsintensität nach der Kristallviolett färbung noch detektieren zu können. Zudem wurden nur Isolate miteinander inkubiert, die aus derselben Probenahme stammten, da sie demnach in den beprobten Biofilmen bereits gleichzeitig zu finden gewesen waren.

Die Biofilmbildungstests wurden, wie in Abschnitt 2.8.1 für die Reinkulturen beschrieben, in TSB bei 30 °C durchgeführt. Die Platten wurden dafür mit jeweils 1 µl der auf eine OD_{625 nm} zwischen 0,08 und 0,125 eingestellten Vorkulturen angeimpft, sodass pro Ansatz Mischkulturen aus zwei Isolaten auf eine verminderte oder verstärkte Biofilmbildung im Vergleich zu den Reinkulturen getestet wurden. Das weitere Vorgehen zur Bestimmung der Biofilmbildungsintensität durch Anfärben mit Kristallviolett erfolgte wie in Abschnitt 2.8.1 beschrieben. Gleichzeitig wurde die Biofilmbildung der jeweiligen Reinkulturen erneut ermittelt.

2.8.5 Biofilmbildung auf Edelstahlcoupons

Von ausgewählten Isolaten, die sich als starke bis sehr starke Biofilmbildner in Mikrotiterplatten erwiesen, wurde die Biofilmbildungsintensität auf Edelstahl mittels Kristallviolett färbung durchgeführt. Alle Versuche fanden in Glucose- und Lactose-TSB (Tab. 11) bei 24-stündiger Inkubation bei 30 °C statt.

Die für die Tests verwendeten Edelstahlcoupons wurden vor dem ersten Gebrauch für mind. 3 Stunden in Aceton gewaschen, dann unter Rühren in 5 l A. dest. gespült, im Trockenschrank bei ca. 50 °C getrocknet und anschließend autoklaviert. Nach der Durchführung der Tests wurden die Coupons über Nacht in Ethanol gelagert und anschließend getrocknet. Danach wurden die Coupons nacheinander jeweils für 15 min in 60 °C warmen 0,8 %-igen Lösungen des sauren (Circo Super SFM) und alkalischen (Circo Super AFM) (beide GEA Farm Technologies, Bönen) Reinigungs- und Desinfektionsmittels gelagert. Zwischen und nach den Behandlungen wurden sie unter Rühren in 5 l A. dest. gespült. Anschließend erfolgte die weitere Behandlung wie oben für die erste Verwendung beschrieben. Dieses Verfahren diente zur Entfernung von Fingerabdrücken und anderen Rückständen von den Coupons. Die entsprechend behandelten Coupons wurden nur mit Handschuhen oder Pinzetten angefasst.

Vorkulturen der zu testenden Isolate wurden auf eine einheitliche Zelldichte entsprechend des 0,5 McFarland-Standards gebracht. Unter sterilen Bedingungen wurden 2 x 2 cm Edelstahlcoupons (Grad 304, V2A, 1.4301, X5CrNi18-10) in Zellkulturplatten mit 6 Kavitäten je Platte verbracht, sodass jede Kavität einen Coupon enthielt. Anschließend wurden je 3 Kavitäten mit 5 ml TSB bzw. Lactose-TSB befüllt. Je zwei Kavitäten pro Medium wurden mit 50 µl der Vorkultur eines Isolates beimpft. Eine Kavität pro Medium blieb unbeimpft und diente als Blank.

Nach der Inkubation bei leichtem Rotieren eines Plattformschüttlers (Unimax 1010, Heidolph, Schwabach) wurden die Edelstahlcoupons unter sterilen Bedingungen entnommen, mit steriler Ringerlösung abgespült, um planktonische Zellen zu entfernen, und in neue Zellkulturplatten überführt. Anschließend erfolgte die 5-minütige Anfärbung nach Zugabe von 5 ml Kristallviolettlösung, wie in Abschnitt 2.8.1 beschrieben. Die Coupons wurden erneut mit Ringerlösung abgespült, um nicht an den Biofilm gebundene Farbstoffreste zu entfernen, und in frische Zellkulturplatten überführt. Dort wurde der Farbstoff durch 60-minütige Inkubation in 5 ml Ethanol ausgewaschen und anschließend die Absorption bei 550 nm im Küvettenphotometer gemessen. Ebenso wurde die $OD_{625\text{ nm}}$ des Überstandes nach der Inkubation für jede Kavität bestimmt. Die Auswertung erfolgte analog zu Abschnitt 2.8.1, jedoch mit zwei anstelle von vier Parallelen pro Isolat.

2.9 Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung

2.9.1 Fixierung

Für die Herstellung der PFA-Fixierlösung wurden 4 g Paraformaldehyd in 60 ml A. bidest. bei 60 °C im Wasserbad durch Zugabe von wenigen Tropfen 2 N NaOH gelöst. Dann wurden 33 ml 3x PBS-Puffer (20 x-Stocklösung, pH 7,2, VWR, Darmstadt) hinzugegeben und mit HCl auf einen pH-Wert von 7,2 eingestellt. Die Lösung wurde mit A. bidest. auf 100 ml aufgefüllt und vor dem Einsatz sterilfiltriert.

Jeweils die Hälfte der in die Melkanlage verbrachten Coupons einer Probenahme wurden mit am selben Tag hergestellter 4 % PFA-Lösung bzw. Ethanol fixiert. Die Ethanol-Fixierung diente der Fixierung von Gram-positiven Bakterien, während die PFA-Lösung zur Fixierung Gram-negativer Bakterien eingesetzt wurde. Dafür wurden 45 ml 4 % PFA-Lösung bzw. Ethanol zu dem in einem 50 ml Reaktionsgefäß platzierten Coupon gegeben und bei 4 °C über Nacht im Überkopfschüttler (Intelli-Mixer RM-25, LTF-Labortechnik,

Wasserburg) fixiert. Anschließend wurden die PFA-fixierten Coupons aus den Fixierlösungen entfernt und zum Waschen in 45 ml 1 x PBS-Puffer in einem neuen 50 ml-Reaktionsgefäß überführt. Der Waschschrift erfolgte für 30 min im Überkopfschüttler (Intelli-Mixer RM-25, LTF-Labortechnik, Wasserburg) bei Raumtemperatur und wurde ein weiteres Mal mit frischem 1 x PBS-Puffer wiederholt. Alle Coupons wurden bis zur weiteren Verarbeitung in 45 ml 1 x PBS/Ethanol (1:1, v/v) bei -20 °C gelagert.

2.9.2 Vorbereitung der Coupons zur Hybridisierung

Die Edelstahlcoupons wurden vor der Hybridisierung durch eine jeweils 3-minütige Inkubation in ansteigenden Ethanolkonzentrationen (50 %, 80 % und 100 %) dehydriert. Ein Coupon konnte bei identischer Zusammensetzung von Hybridisierungs- und Waschpuffer mit verschiedenen Sonden hybridisiert werden. Um eine Vermischung der Sonden zu vermeiden, wurde in diesem Fall mit Wachsmalstiften eine hydrophobe Trennlinie zwischen den hybridisierten Bereichen gezogen. In jedem Fall wurde die hybridisierte Seite der Coupons mit einem Wachsmalstift markiert. Vor der Hybridisierung wurden 150 µl einer Lysozym-Lösung (28 mg/ml Lysozym in 100 mM Tris/HCl, 50 mM EDTA, pH 7,2) auf die Coupons gegeben und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion wurde durch gründliches Abspülen mit A. bidest gestoppt. Eine Lysozym-Behandlung wurde immer dann angewendet, wenn für die Hybridisierung Sonden zur Fluoreszenzmarkierung Gram-positiver Bakterien oder die Sonde Eub338 zur Markierung aller Bakterien verwendet wurden.

2.9.3 Hybridisierung mit Oligonukleotidsonden

Für die Hybridisierung wurden 80 µl Hybridisierungspuffer vorgelegt und mit 10 µl Cy3- oder Cy5-markierter Oligonukleotidsonde bzw. -sondengemisch (50 ng/µl) durch Pipettieren auf dem Coupon vermischt. Die verwendeten Sonden sind in Tab. 12 charakterisiert. Neben den fluoreszenzmarkierten Sonden wurden in zwei Reaktionen Kompetitor-Oligonukleotide ohne Fluoreszenzmarkierung in 10-fach höherer Konzentration (500 ng/µl) zur Maskierung von unspezifischen Signalen durch starke Sequenzähnlichkeiten der nachzuweisenden Bakteriengruppen (*Beta-* und *Gamma-proteobacteria*) eingesetzt.

Der Coupon wurde waagrecht auf ein Papiertuch in ein 50 ml-Reaktionsgefäß eingebracht und für 90 min bei 46 °C im Hybridisierungssofen (OV1, Biometra, Göttingen) inkubiert. Durch Zugabe des restlichen Hybridisierungspuffers auf das Papiertuch wurde das Innere des Reaktionsgefäßes feucht gehalten. Nach der Hybridisierung wurden überschüssige und unspezifisch hybridisierte Sonden mit auf 48 °C vorgewärmten Waschpuffer zunächst abgespült und der Coupon anschließend für 15 min im selben Waschpuffer bei 48 °C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurde der Coupon lufttrocknen gelassen.

Die Zusammensetzungen von Hybridisierungs- und Waschpuffer sind in Tab. 13 dargestellt. Die verwendete Formamid-Konzentration im Hybridisierungs- und Waschpuffer bestimmt die Stringenz der Sondenbindung an die Zielsequenz und ist abhängig von der verwendeten Sonde und damit indirekt vom GC-Gehalt der DNA der zu hybridisierenden Mikroorganismen. Die jeweils eingesetzten Formamid-Konzentrationen können Tab. 12 zur Charakterisierung der Sonden/-Gemische entnommen werden. Nach der Hybridisierung mit den spezifischen Sonden wurden alle Proben mit 100 µl einer 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)-Lösung (1 µg/ml) (Sigma Aldrich/Merck, Darmstadt) für 10 min bei 4 °C im Dunkeln gegengefärbt. Der restliche Farbstoff wurde mit A. bidest abgespült und die Objektträger im Dunkeln lufttrocknen lassen.

Vor dem Mikroskopieren wurde Fluoroshield™ (Sigma Aldrich/Merck, Darmstadt) auf die Proben gegeben. Alle Proben wurden mit dem Fluoreszenzmikroskop Axio Scope (Carl Zeiss, Jena) mit insgesamt 400- und 1.000-facher Vergrößerung untersucht. Die verwendeten Filter sind zusammen mit den Anregungs- und Emissionswellenlängen der eingesetzten Farbstoffe in Tab. 14 aufgeführt. Die Dokumentation erfolgte mittels Kamera. Die Bilder wurden mit der Software Zen Lite (Carl Zeiss, Jena) bearbeitet, das heißt Maßstabsbalken wurden eingefügt und Cy3-/Cy5-Kanal mit dem DAPI-Kanal zusammengeführt.

Tabelle 12: Zur Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung mit Edelstahlcoupons eingesetzte Oligonukleotidsonden. Angegeben sind die Sondenbezeichnung, die Art der Fluoreszenzmarkierung, die Basensequenz der Sonde, der zu markierende Zielorganismus, die eingesetzte Formamid-Konzentration im Hybridisierungspuffer und die Literaturquelle. In zwei Reaktionen wurden Kompetitor-Oligonukleotide (K) ohne Fluoreszenzmarkierung in 10-fach höherer Konzentration eingesetzt. Zum Nachweis von Mitgliedern des Phylums *Firmicutes* wurde ein Gemisch aus den drei angegebenen Sonden eingesetzt. Alle Oligonukleotide wurden von VBC-Biotech, Wien, Österreich, hergestellt.

Sonde ¹⁾ / Kompetitor (K) ²⁾	Markier.	Sequenz (5' → 3')	Zielorganismus	% Formamid	Quelle
Eub338	Cy3	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	<i>Bacteria</i>	20	[134]
Euk516	Cy3	ACCAGACTTGCCCTCC	<i>Eukarya</i>	20	
Bet42a	Cy5	GCCTTCCCACATCGTTT	<i>Betaproteobacteria</i>	35	[135]
Gam42a (K)	/	GCCTTCCCCTTCGTTT	<i>Gammaproteo- bacteria</i>		
Gam42a	Cy3	GCCTTCCCCTTCGTTT	<i>Gammaproteo- bacteria</i>	35	[135]
Bet42a (K)	/	GCCTTCCCACATCGTTT	<i>Betaproteobacteria</i>		
LGC354A	Cy3	TGGAAGATTCCCTACTGC	<i>Firmicutes</i>	35	[136]
LGC354B	Cy3	CGGAAGATTCCCTACTGC			
LGC354C	Cy3	CCGAAGATTCCCTACTGC			
HGC69a	Cy3	TATAGTTACGGCCGCGT	<i>Actinobacteria</i>	20	[137]

¹⁾ Konzentration je Sonde: 50 ng/μl

²⁾ Konzentration von nicht markierten Kompetitor-Oligonukleotiden: 500 ng/μl

Tabelle 13: Zusammensetzungen des Hybridisierungs- und Waschpuffers für die Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung mit Oligonukleotidsonden. Die verwendete Formamid-Konzentration im Hybridisierungspuffer bestimmt die Stringenz der Sondenbindung an die Zielsequenz und ist sondenabhängig. Diese hat wiederum Einfluss auf die Zusammensetzung des Waschpuffers.

	Komponente	Volumen (μl)	
		20 % Formamid	35 % Formamid
Hybridisierungspuffer	5 M NaCl		360
	1 M Tris-HCl, pH 8,0		40
	Deion. Formamid	400	700
	10 % SDS		2
	A. bidest		ad 2.000
Waschpuffer	1 M Tris-HCl, pH 8,0		1.000
	5 M NaCl ¹⁾	225	80
	0,5 M EDTA, pH 8,0 ¹⁾		500
	10 % SDS		50
	A. bidest		ad 50.000

¹⁾ Volumen abhängig von der Formamid-Konzentration des Hybridisierungspuffers

Tabelle 14: Anregungs-/Absorptions- und Emissionswellenlängen sowie Extinktionskoeffizienten der eingesetzten Fluorochrome. Im unteren Teil der Tabelle sind die zugehörigen verwendeten Filtersätze für das eingesetzte Zeiss Axio Scope (Carl Zeiss, Jena) Fluoreszenzmikroskop aufgelistet.

Fluorochrom	DAPI	Cy3	Cy5
Absorptionswellenlänge (nm)	345	512/552	625-650
Emissionswellenlänge (nm)	455	565/615	670
Extinktionskoeffizient ($\text{mol}^{-1} \text{l}^{-1}$)	120	150	250
Filterset	49	43	50
Anregungsfilter	G 365	BP 545/25	BP 640/30
Strahlenteiler	FT 395	FT 570	FT 660
Sperrfilter	BP 445/50	BP 605/70	BP 690/50

2.10 Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Biofilmen

Von Biofilmen der Isolate *Acinetobacter guillouiae* M9 und *Kocuria salsicia* M239 wurden elektronenmikroskopische Aufnahmen auf Edelstahlcoupons und einem fabrikneuen Kunststoffschlauch wie demjenigen am Ende der Druckleitung der untersuchten Melkanlage angefertigt. Dafür wurden die 2 x 2 cm Edelstahlcoupons (Grad 304, V2A, 1.4301, X5CrNi18-10) sowie ca. 1 x 1 cm Zuschnitte des Kunststoffschlauchs in Zellkulturplatten mit 6 Kavitäten verbracht. Diese wurden, wie in Abschnitt 2.8.5 für die Edelstahlcoupons beschrieben, mit 5 ml Medium und 50 μl einer auf eine Zelldichte von ca. 10^8 KbE/ml eingestellten Kultur des jeweiligen Isolates für 24 h bei 30 °C inkubiert. Während *A. guillouiae* M9 in TSB inkubiert wurde, wurde *K. salsicia* M239 in Lactose-TSB angezogen. Nach der Inkubation wurden die Coupons bzw. Schlauchzuschnitte gründlich von allen Seiten mit steriler Ringerlösung abgespritzt, um planktonische Zellen zu entfernen, und bei 4 °C bis zur weiteren Untersuchung gelagert. Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen (SEM-Aufnahmen) wurden von Matthias Mail, INRES, Institut für Gartenbauwissenschaft, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, am Karlsruher Institut für Technologie angefertigt.

2.11 Differentielle Genexpressionsanalyse

Da einige Biofilm-Isolate deutliche Unterschiede im Ausmaß ihrer Biofilmbildung zeigten, wenn sie in Glucose- oder Lactose-haltiger TSB inkubiert wurden, wurden Transkriptomanalysen durchgeführt, um die bei der Kristallviolett-färbung beobachteten Unterschiede anhand von differentiell unterschiedlich exprimierten Genen zu bewerten. Ausgewählt wurden die Isolate *Kocuria salsicia* M239, welches eine deutlich verstärkte Biofilmbildung in Lactose-TSB aufwies, und zum Vergleich *Acinetobacter guillouiae*

M9, das keine derart starken Unterschiede bei der Biofilmbildung in beiden Medien zeigte. Dennoch bestand bei letzterem Isolat die Tendenz zur leicht verstärkten Biofilmbildung in Glucose-TSB.

2.11.1 RNA-Extraktion

Zur Entfernung von RNAsen wurden alle Gefäße, die im Verlauf der RNA-Extraktion verwendet wurden, zunächst über Nacht bei 37 °C mit 0,1 % Diethylpyrocarbonat (DEPC) (PanReac AppliChem, Darmstadt) in A. dest. inkubiert, anschließend geleert und zur Entfernung von DEPC-Resten autoklaviert. Ebenso wurde mit den Puffern verfahren, die zur RNA-Extraktion eingesetzt wurden. In diesem Falle wurde A. bidest. mit 0,1 % DEPC versetzt und nach der Inkubation autoklaviert. Oberflächen, auf denen während der RNA-Extraktion gearbeitet wurde, wurden zur Dekontamination zuvor mit RNase-ExitusPlusTM-Spray (AppliChem, Darmstadt) abgewischt.

Pro Isolat und Medium (Glucose- vs. Lactose-TSB) wurden drei biologische Parallelen angesetzt. Eine Parallele bestand dabei aus einem 7,5 x 2,5 cm Edelstahlcoupon (Grad 304, V2A, 1.4301, X5CrNi18-10, kaltgewalzt) in einer mit 30 ml Medium gefüllten sterilen Petrischale. Diese wurde mit 300 µl einer auf den 0,5 McFarland-Standard eingestellten TSB-Vorkultur des jeweiligen Isolats beimpft und bei 30 °C unter leichtem Schwenken (50 rpm) auf einer Rotationsplatte inkubiert. Die RNA-Extraktion sollte aus einer Mischung des auf dem Edelstahlcoupon gewachsenen Biofilms und des auf eine jeweils einheitliche OD_{625 nm} eingestellten Überstandes vorgenommen werden. Dies erfüllte den Zweck, genügend RNA zur weiteren Untersuchung zur Verfügung zu stellen. Die RNA-Extraktion aus jeweils einheitlichen Zelldichten des Überstandes sollte dabei Gene maskieren, die in planktonischen Zellen in beiden Medien exprimiert werden, sodass der Fokus dennoch auf den im Biofilm unterschiedlich stark exprimierten Genen lag. Trotzdem konnten somit gleichzeitig Gene erfasst werden, die auch im Überstand beider Medien differentiell exprimiert wurden, und gegebenenfalls indirekt auf die Biofilmbildung Einfluss nahmen.

Da sich herausstellte, dass die Menge der extrahierten RNA bei Inkubationszeiten über 16 h drastisch abnahm, wurden die Kulturen zur Anzucht des Biofilms 12 bis max. 15 h bis zur Durchführung der RNA-Extraktion inkubiert. Zunächst wurden die jeweiligen Überstände durch Verdünnen mit steriler TSB bzw. Lactose-TSB auf eine einheitliche

OD_{625 nm} von 0,5 gebracht. Davon wurden 10 ml in ein 30 ml-Zentrifugenröhrchen überführt und bis zur weiteren Verarbeitung bei 4 °C gelagert.

Die Edelstahlcoupons wurden aus der Petrischale entnommen, von beiden Seiten 3x mit Ringerlösung abgespritzt und in eine leere Petrischale überführt. Nach Zugabe von 20 ml Ringerlösung wurden die Petrischalen dicht mit Parafilm (IDL, Nidderau) verschlossen und der Biofilm durch eine 10-minütige Behandlung im Ultraschallbad von den Coupons abgelöst. Anschließend wurde die Ringerlösung in dasselbe sterile Zentrifugenröhrchen überführt, in welchem sich bereits der zugehörige Überstand befand. Das Zellpellet wurde durch einen 15-minütigen Zentrifugationsschritt bei 20 °C und 11.000 rpm gewonnen, in 500 µl steriler Ringerlösung resuspendiert und mit 1 ml RNA-stabilisierender „RNAprotect-Bacteria“-Reagenz (Qiagen, Hilden) vermischt. Nach 5 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde das Gemisch durch Zentrifugieren (10 min, 5.000 x g) pelletiert und das Pellet in 20 µl Proteinase K (Qiagen, Hilden) und 200 µl TE-Puffer mit 20 mg/ml frisch eingewogenem Lysozym resuspendiert. Im Anschluss wurde die RNA mit dem „RNeasy Protect Bacteria Mini Kit“ (Qiagen, Hilden) entsprechend der Herstellerangaben extrahiert. Die RNA wurde in zwei Schritten mit jeweils 30 µl des vom Hersteller mitgelieferten RNase-freien Wassers von der Säule eluiert, sodass das Gesamtvolumen 60 µl betrug. Davon wurden je 2 µl zur Kontrolle des Extraktionserfolges auf ein 1 %-Agarosegel aufgetragen und der restliche Extrakt bis zur weiteren Verwendung bei –80 °C gelagert. Durch das Agarosegel wurde die Unversehrtheit der RNA überprüft, ihre Konzentration abgeschätzt und mögliche DNA-Rückstände detektiert. Falls in den RNA-Extrakten eine Bande auf Höhe der genomischen DNA (gDNA) vorhanden war, wurde ein erneuter DNase-Verdau durchgeführt und die RNA-Extrakte anschließend über eine RNeasy-Minisäule (Qiagen, Hilden) aufgereinigt und im ursprünglichen Volumen eluiert. Der Erfolg der Aufreinigung wurde durch erneutes Auftragen auf ein 1 % Agarosegel verifiziert. Die Konzentration der RNA-Extrakte wurde im Plattenphotometer (Epoch Reader, BioTek, USA) mittels Take 3 Mikro-Volumen Platte gemessen.

2.11.2 Differentielle Genexpressionsanalyse

Die differentielle Genexpressionsanalyse wurde extern vom Max Planck Genome Center (MPGC) in Köln durchgeführt. Dazu wurde eine Gesamtmenge von mind. 1 µg der wie unter Abschnitt 2.11.1 beschrieben gewonnenen RNA an das MPGC geschickt. Jeder

Ansatz bestand pro Isolat und Medium aus drei biologischen Replikaten. Zusätzlich wurden DNA-Extrakte der Isolate *A. guillouiae* M9 und *K. salsaicia* M239 zur Erstellung von Referenzgenomen ebenfalls an das MGC geschickt. Diese dienten zum Mapping der Reads aus den Transkriptom-Sequenzierungen. Die DNA-Extrakte wurden wie unter Abschnitt 2.3.4 beschrieben gewonnen, jedoch fand nach der enzymatischen Zelllyse ein RNase-Verdau durch Zugabe von 20 µl RNase A (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) und 15 min Inkubation bei Raumtemperatur statt. Anschließend wurden 25 µl Proteinase K (Qiagen, Hilden) und 200 µl Puffer AL hinzugefügt und weiter nach dem Herstellerprotokoll des „DNeasy Blood & Tissue Kits“ (Qiagen, Hilden) verfahren.

Für die Erstellung der Referenzgenome wurden Illumina-Bibliotheken mit dem „NEB Next Ultra II DNA Library Prep Kit for Illumina“ (New England Biolabs, Frankfurt am Main) erstellt und mit einem Illumina HiSeq3000-Sequenzierer (Illumina, San Diego, USA) mit einer Read-Länge von 150 bp von beiden Seiten (paired end) sequenziert. Die Qualitätskontrolle der Reads und das Entfernen der Adaptersequenzen wurde mit FLEXBAR [138] durchgeführt. Die Genome wurden mit SPAdes 3.6.2 [139] assembliert und die Qualität der Assemblies mit Quast [140] überprüft. Die Coverage der Contigs wurde mit dem BMap-Tool (<https://jgi.doe.gov/data-and-tools/bbtools/>) berechnet und die Überschneidung und Ähnlichkeit von Contigs mit > 500 bp wurde mit Gepard überprüft [141].

Die Genvorhersagen/Annotationen wurden durch Eingabe der Genom-Assemblies über den RAST-Server (<http://rast.nmpdr.org/>) [142] erstellt. Die Liste der Genpositionen wurde dann als Referenz in das Tool „RNASeq analysis“ der CLC Genomics Workbench (Qiagen Bioinformatics, Hilden) eingegeben. Anschließend wurden mit dem Programm die mRNA-Sequenzierungs-Reads anhand der eingegebenen Gene gemapped. Die Expressionswerte für jedes Gen wurden mit dem Tool „Differential expression for RNA-Seq“ mit den Standardparametern des Programmes berechnet. Über die Coverage der Gene wurden anschließend die statistischen Kenngrößen p-Wert, False Discovery Rate (FDR) und Bonferroni-Wert berechnet, um die statistische Signifikanz der differentiell exprimierten Gene zu bewerten.

3 Ergebnisse

3.1 Keimzahlen

Von den Tupferproben wurden neben der Gesamtkeimzahl (GKZ) auf TSA die Keimzahlen der in der Milchindustrie relevanten präsumtiven *Enterobacteriales*, Pseudomonaden, Staphylokokken und Milchsäurebakterien ermittelt. Die Mittelwerte der Keimzahlen sind in Abb. 6 für die verschiedenen Probenahmeorte dargestellt.

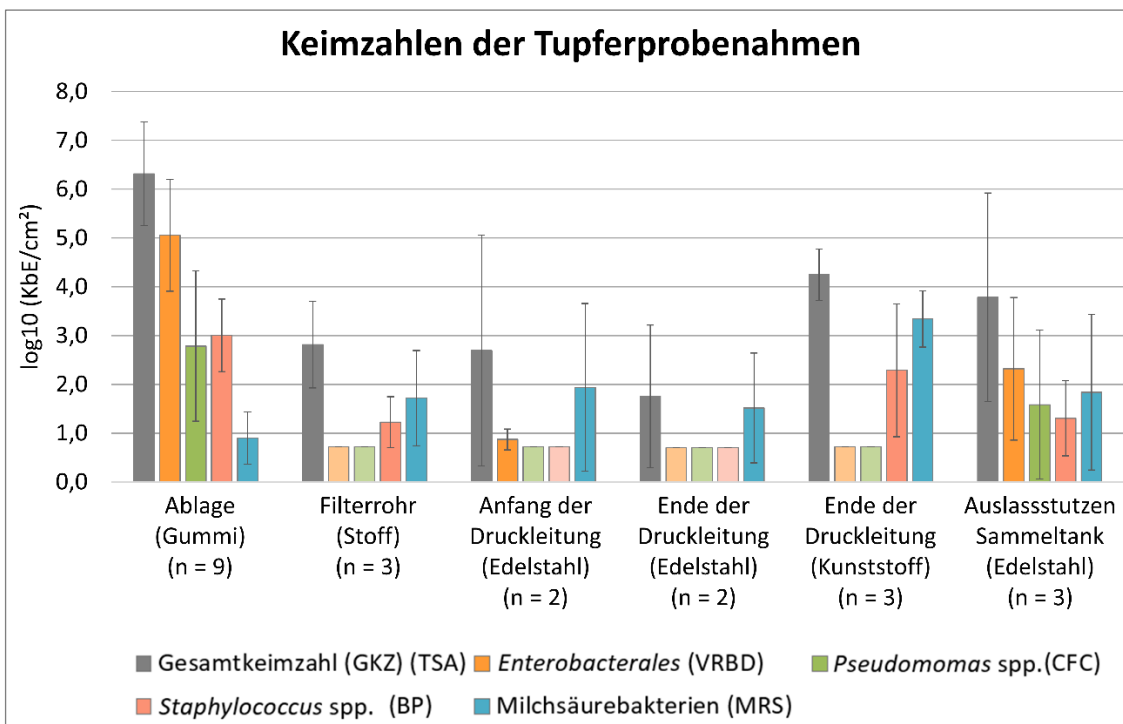


Abbildung 6: Mittelwerte der Keimzahlen aus den Tupferprobenahmen, aufgeteilt nach dem Probenahmeort. Dargestellt sind die Gesamtkeimzahlen (GKZ) sowie die auf Selektivmedien ermittelten Keimzahlen der *Enterobacteriales*, *Pseudomonas* spp., *Staphylococcus* spp. und Milchsäurebakterien. Angegeben ist das beprobte Material sowie die Gesamtzahl der zur Mittelwertbildung herangezogenen Proben (n).

Die Ablagen des Melkgeschirrs wiesen mit einer durchschnittlichen GKZ von $6,3 \log_{10} \text{KbE}/\text{cm}^2$ die höchste Besiedelungsdichte auf. Die zweithöchste durchschnittliche Besiedelungsdichte lag mit ca. $4,2 \log_{10} \text{KbE}/\text{cm}^2$ im Kunststoffrohr am Ende der Druckleitung vor. Die dort ermittelte GKZ lag bei allen drei Probenahmen in einem ähnlich hohen Bereich, sodass hier die geringste Standardabweichung von allen Probenahmeorten vorlag. Die Besiedlungsdichten am Auslassstutzen des Milchsammeltanks und den Rohrleitungen aus Edelstahl wiesen, abhängig vom Zeitpunkt der Probenahme, dagegen deutliche Schwankungen auf. So lag die GKZ am

Auslassstutzen des Milchsammeltanks bei zwei Probenahmen um $2,5 \log_{10}$ KbE/cm², während bei der Probenahme im August 2014 ein Wert von $6,3 \log_{10}$ KbE/cm² ermittelt wurde. Während das Filterrohr ebenfalls relativ konstante Besiedelungsdichten um $2,8 (\pm 0,9) \log_{10}$ KbE/cm² aufwies, schwankten die GKZ in den Edelstahl-Rohrleitungen stark zwischen nicht nachweisbar ($< 0,7 \log_{10}$ KbE/cm²) und 3 bis $4 \log_{10}$ KbE/cm².

Die präsumtiven *Enterobacterales* wiesen die höchste Besiedelungsdichte auf den Melkbecherablagen auf. Ihre durchschnittliche Keimzahl lag dabei nur etwa eine log-Stufe unterhalb der GKZ. Untereinander vergleichbare Werte von ca. $3 \log_{10}$ KbE/cm² wiesen dort die Pseudomonaden und Staphylokokken auf, während die durchschnittliche Keimzahl der Milchsäurebakterien nur knapp oberhalb der Nachweisgrenze von $0,6 \log_{10}$ KbE/cm² lag.

Innerhalb der Rohrleitungen der Melkanlage lagen die Keimzahlen für die Gram-negativen *Enterobacterales* und Pseudomonaden nahe an, bzw. unterhalb der Nachweisgrenze. Im Gegensatz dazu wurden hohe Keimdichten der Milchsäurebakterien detektiert. Deren durchschnittliche Keimzahlen lagen am Filterrohr, am Edelstahlrohr am Anfang der Druckleitung sowie am Kunststoffrohr am Ende der Druckleitung maximal eine log-Stufe unterhalb der GKZ bzw. etwa auf gleicher Höhe. Auch die ebenfalls Gram-positiven Staphylokokken wurden im Filterrohr und im Kunststoffrohr am Ende der Druckleitung nachgewiesen, jedoch nicht in den Edelstahl-Rohrleitungen.

Am Auslassstutzen des Milchsammeltanks wurden nur im Verlauf der Probenahme mit hoher GKZ von $6,3 \log_{10}$ KbE/cm² Keimzahlen für *Enterobacterales* und Pseudomonaden jeweils im Bereich von etwa $3,5 \log_{10}$ KbE/cm² ermittelt. Bei den Probenahmen mit geringeren GKZ lagen die Keimzahlen der Pseudomonaden nahe der Nachweisgrenze. *Enterobacterales* waren dagegen zu jedem Probenahmezeitpunkt am Auslassstutzen des Milchsammeltanks nachweisbar.

In Tab. 15 sind die Keimzahlen auf den zu vier verschiedenen Zeitpunkten in die Melkanlage eingebrachten Edelstahlcoupons dargestellt. Während auf den beiden für zwei Tage in die Filterrohr-Spirale eingehängten Coupons Keimzahlen von 3 bzw. 5 KbE/cm² ermittelt wurden, lag die Keimzahl auf dem für dieselbe Zeitspanne im Sammelbehälter platzierten Coupon unterhalb der Nachweisgrenze. Der Verbleib der Coupons für einen weiteren Tag in der Melkanlage führte zu einer Verdoppelung der

Keimzahl auf ca. 12 KbE/cm². Bis auf eine Ausnahme mit geringem Wachstum auf MRS-Agar konnte nach Abklatschen der Coupons auf keinem der verwendeten Selektivmedien Wachstum festgestellt werden.

Tabelle 15: Keimzahlen der Coupon-Abklatsche zu verschiedenen Probenahmen. Angegeben sind neben den Keimzahlen pro cm² der Zeitpunkt der Probenahme, der Ausbringungsort und der Zeitraum, in dem die Coupons in der Melkanlage verblieben. MI: Melkintervalle; n. n.: nicht nachweisbar.

Zeitpunkt der Probenahme	Ort innerhalb der Melkanlage	Zeitraum des Verbleibens in der Anlage	Gesamtkeimzahl (GKZ) auf TSA	Keimzahl auf Selektivmedien
November 2015	Filterrohr-Spirale	48 h / 4 MI	5,0 KbE/cm ²	n. n.
Dezember 2015	Sammelbehälter	72 h / 6 MI	11,9 KbE/cm ²	0,4 KbE/cm ² (MRS)
Oktober 2016	Sammelbehälter	48 h / 4 MI	< 1 KbE/18,8 cm ²	n. n.
Februar 2017	Filterrohr-Spirale	48 h / 4 MI	3,1 KbE/cm ²	n. n.

Aus den Tupferprobenahmen und eingebrachten Coupons wurden 332 Isolate gewonnen. Dabei handelte es sich bei der Mehrzahl von 298 Isolaten um Bakterien. Weitere 34 Isolate wurden anhand ihrer Koloniemorphologie bzw. der mikroskopischen Untersuchung als Schimmelpilze oder Hefen identifiziert. Sie wurden von weiteren Untersuchungen ausgeschlossen. Insgesamt 291 bakterielle Isolate wurden hinsichtlich ihres Gramfärbeverhalten untersucht. Dabei wiesen 65 % ein positives und 35 % ein negatives Gramfärbeverhalten auf. Betrachtete man die 222 Tupfer- und 69 Coupon-Isolate getrennt voneinander, war ein deutlicher Unterschied festzustellen. Von den Tupfer-Isolaten waren 60 % Gram-positiv und 40 % Gram-negativ, während mit 84 % der überwiegende Anteil der Coupon-Isolate ein positives Gramfärbeverhalten aufwies und nur 16 % Gram-negativ waren.

3.2 Fettsäureprofile der Isolate

Die Bakterienisolate wurden basierend auf der Zusammensetzung ihrer Hauptfettsäuren in 30 Gruppen eingeteilt. Ergaben sich weiterhin Unterschiede in der prozentualen Zusammensetzung der Fettsäuren, wurden Untergruppen gebildet. In den Tab. 16 bis 21 sind die Fettsäureprofile der aufgrund ihrer Eigenschaften für die Milchindustrie relevantesten Isolate dargestellt. Neben den prozentualen Anteilen der Membranfettsäuren sind die Anzahl der zugehörigen Isolate sowie deren Zellmorphologie, Gramfärbeverhalten und Proteolyse- und Lipolyse-Fähigkeit aufgeführt. Zusätzlich sind Isolierungsort und –medium angegeben. Da die Gruppierung der Isolate zur Auswahl zu identifizierender Vertreter herangezogen wurde, sind die Identifizierungsergebnisse ebenfalls angegeben. Weitere Details zur Identifizierung anhand der 16S rRNA-Gensequenzierung werden in Kapitel 3.3 dargestellt. Die in den Fettsäuretabellen angegebenen Speziesbezeichnungen basieren auf diesen Daten. Die restlichen Fettsäureprofile sind in den Tab. 32-41 im Anhang aufgeführt.

Tab. 16 zeigt beispielhaft die Fettsäurezusammensetzung der mit 18 Isolaten vertreterstärksten Untergruppe 1A der insgesamt 30 Isolate umfassenden drittgrößten Fettsäuregruppe 1, welche insgesamt in vier Untergruppen aufgeteilt wurde. Bei allen Isolaten war C15:0 anteiso mit Anteilen von über 85 % die Hauptfettsäure. Die als zwei verschiedene Spezies der Gattung *Kocuria* identifizierten Isolate aus Untergruppe 1A stammten von verschiedenen Stellen innerhalb der Melkanlage, auch von den Coupons. Die Fähigkeit zur Proteo- und Lipolyse war bei den Isolaten stammspezifisch unterschiedlich ausgeprägt, sodass keine allgemein gültige Aussage zum Verhalten der Gruppenmitglieder möglich ist.

Die insgesamt 35 Gram-positiven, stäbchenförmigen Isolate aus der zweitgrößten Fettsäuregruppe 2 verteilten sich ebenfalls auf vier Untergruppen. Drei davon sind in Tab. 16 dargestellt. Allen gemeinsam ist die Hauptfettsäure C15:0 anteiso mit durchschnittlichen Anteilen zwischen 50 und 60 %, sowie als weitere Hauptfettsäuren C16:0 iso und C17:0 anteiso. Mit 16 von 20 identifizierten Isolaten wurde der überwiegende Anteil vier verschiedenen Spezies der Gattung *Microbacterium* zugeordnet. Die Isolate stammten ebenfalls von verschiedenen Stellen innerhalb der Melkanlage und von den Coupons. Die Mehrzahl wies ausschließlich Proteolyse-Fähigkeit auf, allerdings gab es auch hier stammspezifische Unterschiede.

Tabelle 16: Fettsäureprofile der Gruppen 1 und 2. Angegeben ist die Anzahl der zugehörigen Isolate, deren Zellmorphologie und Gramfärbverhalten, Fähigkeit zur Proteo- und Lipolyse sowie der Isolierungsort und das Nährmedium. Die prozentualen Anteile der Fettsäuren sind als Mittelwert mit Standardabweichung in Klammern angegeben. Zusätzlich ist das Identifizierungsergebnis mit der Anzahl der identifizierten Vertreter in Klammern angegeben.

Gruppe	2			
Untergruppe	1A	2A	2B	2C
Anzahl Isolate	18	9	16	7
Zellmorphologie	Kokken	Stäbchen	Stäbchen	Stäbchen
Gramfärbung	+	+	+	+
Proteolyse	- / + ¹⁾	- / + ¹⁾	- / + ¹⁾	+ ²⁾
Lipolyse	- / + ¹⁾	- / + ¹⁾	- / + ¹⁾	-
Herkunft	MBA, MA, FR, DEE, DEK, T, C	MBA, FR	MBA, FR, DAE, DEK, C	C
Medium	TSA, MPC, BP	TSA, MPC, BP	TSA, MPC	TSA
Fettsäuren in %				
14:0 iso	0,5 (0,3)			
14:0	0,3 (0,3)			
15:0 iso	0,4 (0,4)	9,9 (5,3)	2,2 (2,3)	0,4 (0,4)
15:0 anteiso	85,4 (4,4)	57,9 (7,5)	55,9 (5,8)	49,6 (3,0)
15:0	0,2 (0,3)			
16:0 iso	7,5 (2,4)	12,8 (2,8)	14,4 (5,6)	11,5 (7,7)
16:0	1,2 (0,9)	0,3 (0,3)	0,3 (0,5)	0,2 (0,1)
17:0 iso		1,6 (1,2)	0,5 (0,6)	0,2 (0,2)
17:0 anteiso	4,6 (2,7)	17,4 (3,7)	26,5 (4,0)	38,2 (6,9)
Identifizierung (n)	<i>Kocuria salsicia</i> (7), <i>Kocuria kristinae</i> (4)	<i>Microbacterium maritypicum/ oxydans</i> (3), <i>Microbacterium foliorum/ phyllosphaerae</i>	<i>Microbacterium maritypicum/ oxydans</i> (4), <i>Microbacterium flavum/lacticum</i> (2), <i>Microbacterium testaceum</i> , <i>Kocuria salsicia</i>	<i>Microbacterium flavum/lacticum</i> (4), <i>Pseudoclavibacter chungangensis</i> (2), <i>Microbacterium testaceum</i>

¹⁾ Die Gruppe enthält sowohl jeweils einseitig positive, als auch komplett Proteolyse- und Lipolyse-positive und negative Isolate.

²⁾ Zwei von sieben Isolaten sind Proteolyse-negativ.

In Tab. 17 sind die Fettsäuregruppen 3 und 4 dargestellt. Allen gemeinsam ist ihre Stäbchenform, ihr positives Gramfärbverhalten sowie hohe Anteile der Fettsäure C15:0 iso. Während es sich bei der zweiten Hauptfettsäure von Gruppe 3 um C15:0 anteiso handelte, wurden in Gruppe 4 zusätzlich hohe Anteile von C16:0 iso, C16:0 und C17:0 iso nachgewiesen. Die Identifizierung ausgewählter Vertreter beider Gruppen zeigte eine Zugehörigkeit der meisten Isolate zu fünf verschiedenen Spezies der Gattung *Bacillus*. Alle Isolate wurden von verschiedenen Stellen der Melkanlage gewonnen, jedoch stammte der überwiegende Anteil aus den Tupferabstrichen und nicht von den Coupons. Alle als *Bacillus safensis* identifizierten Isolate aus Gruppe 3A besaßen sehr starke Proteolyse- und Lipolyse-Aktivität. Alle sieben Isolate aus Gruppe 3B wiesen eine als sehr stark eingestufte Lipolyse-Aktivität auf.

Tabelle 17: Fettsäureprofile der Gruppen 3 und 4. Angegeben ist die Anzahl der zugehörigen Isolate, deren Zellmorphologie und Gramfärbeverhalten, Fähigkeit zu Proteo- und Lipolyse sowie der Isolierungsort und das Nährmedium. Bei mehr als einem Vertreter pro Gruppe/Untergruppe sind die prozentualen Anteile der Fettsäuren als Mittelwert mit Standardabweichung in Klammern angegeben. Das Identifizierungsergebnis ist mit der Anzahl der identifizierten Vertreter in Klammern angegeben.

Gruppe	3		4	
Untergruppe	3A	3B	4A	4B
Anzahl Isolate	9	7	1	1
Zellmorphologie	Lange Stäbchen	Lange Stäbchen	Stäbchen	Stäbchen
Gramfärbung	+	+	+	+
Proteolyse	+ ¹⁾	-	+	+
Lipolyse	+ ¹⁾	+	+	+
Herkunft	MBA, ST, C	MBA, FR, DAE	MB	ST
Medium	TSA, MPC, BP, PAL	TSA, MPC, PAL	MPC	TSA
Fettsäuren in %				
13:0 iso			5,1	5,8
13:0 anteiso			0,8	
14:0 iso	0,2 (0,6)	0,2 (0,6)	3,1	1,8
14:0			2,7	2,6
15:0 iso	44,9 (5,1)	27,6 (6,2)	36,9	62,7
15:0 anteiso	49,1 (6,3)	58,0 (9,7)	8,7	9,5
15:0	0,2 (0,5)		0,5	
16:0 iso	0,5 (0,4)	0,6 (0,9)	10,1	3,4
16:1 <i>cis</i> 9			4,5	4,4
16:0	0,2 (0,1)	0,1 (0,2)	9,6	2,4
17:1 iso 5			1,1	
17:1 anteiso <i>cis</i> 5			0,8	1,0
17:0 iso	1,2 (0,8)	3,1 (1,7)	11,7	6,3
17:0 anteiso	3,7 (1,4)	10,3 (3,3)	4,5	0,1
Identifizierung (n)	<i>Bacillus safensis</i> (4), <i>Kurthia gibsonii</i>	<i>Bacillus marisflavi</i> , <i>Bacillus paralicheniformis</i> (2)	<i>Bacillus thuringiensis/paranthracis</i>	

¹⁾ Ein Isolat ist Proteolyse- und Lipolyse-negativ.

Gruppe 5 enthält 10 von den Melkbecherablagen und Coupons isolierte Gram-positive Kokken (Tab. 18). Allen gemeinsam war die Hauptfettsäure C15:0 anteiso sowie als weitere Fettsäuren C15:0 iso, C17:0 anteiso und längerkettige Fettsäuren bis C20:0. Alle identifizierten Vertreter wurden fünf verschiedenen Spezies der Gattung *Staphylococcus* zugeordnet. Der Großteil der Isolate wies sowohl Proteolyse- als auch teils starkes Lipolyse-Vermögen auf.

Tabelle 18: Fettsäureprofile der Gruppe 5. Angegeben ist die Anzahl der zugehörigen Isolate, deren Zellmorphologie und Gramfärbeverhalten, Fähigkeit zu Proteo- und Lipolyse sowie der Isolierungsort und das Nährmedium. Bei mehr als einem Vertreter pro Gruppe/Untergruppe sind die prozentualen Anteile der Fettsäuren als Mittelwert mit Standardabweichung in Klammern angegeben. Zusätzlich ist das Identifizierungsergebnis mit der Anzahl der identifizierten Vertreter in Klammern angegeben.

Gruppe	5			
	5A	5B	5C	5D
Untergruppe				
Anzahl Isolate	5	2	2	1
Zellmorphologie	Kokken	Kokken	Kokken	Kokken
Gramfärbung	+	+	+	+
Proteolyse	+ ¹⁾	-	+	+
Lipolyse	+ ²⁾	+ ³⁾	+	+
Herkunft	MBA	MBA, C	MBA, C	C
Medium	BP	TSA, BP	TSA, BP	TSA
Fettsäuren in %				
14:0 iso	0,1 (0,1)	0,8 (0,8)	0,3 (0,4)	0,1
15:0 iso	7,5 (2,6)	1,8 (1,4)	20,8 (1,5)	2,3
15:0 anteiso	81,9 (4,5)	74,8 (0,5)	51,3 (2,9)	62,0
16:0 iso	0,2 (0,2)	0,7 (0,4)	1,5 (0,6)	0,2
16:0	0,2 (0,1)	0,3 (0,1)	0,2 (0,1)	1,0
17:0 iso	0,9 (0,4)	0,8 (0,6)	4,9 (1,0)	3,7
17:0 anteiso	8,7 (1,9)	16,7 (3,9)	18,5 (1,5)	28,0
18:1 iso		0,3 (0,4)		
18:0	0,3 (0,0)	2,3 (2,7)	0,5 (0,3)	1,6
19:0 iso			0,6 (0,2)	0,1
19:0 anteiso		0,7 (0,7)	1,1 (0,1)	0,8
20:0	0,1 (0,1)	1,0 (1,4)	0,4 (0,2)	
Identifizierung (n)	<i>Staphylococcus cohnii</i> subsp. <i>cohnii</i> (3)	<i>Staphylococcus haemolyticus</i> , <i>Staphylococcus arleatae</i>	<i>Staphylococcus chromogenes</i> (2)	<i>Staphylococcus warneri</i>

¹⁾ Zwei von fünf Isolaten sind Proteolyse-negativ.

²⁾ Eins von fünf Isolaten ist Lipolyse-negativ.

³⁾ Ein Isolat ist Lipolyse-negativ.

Tab. 19 zeigt die Fettsäureprofile der Gruppen 6 bis 8. Den Isolaten aus Gruppe 6 war die Hauptfettsäure C15:0 iso sowie die stäbchenförmige Zellmorphologie und das negative Gramfärbeverhalten gemeinsam. Alle Vertreter enthielten Spuren verschiedener gerad- und verzweigt-kettiger Hydroxyfettsäuren. Sie wurden der Gattung *Stenotrophomonas* zugewiesen, wovon zwei der Spezies *Stenotrophomonas maltophilia* angehörten. Aufgrund von phänotypischen und genotypischen Unterschieden zu *S. maltophilia* wurde im Zuge der vorliegenden Arbeit eine Neubeschreibung der Spezies *Stenotrophomonas lactitubi* vorgenommen. Der Typstamm der Spezies, M15^T, stammt aus Gruppe 6A. Alle Isolate zeigten neben einer sehr starken Proteolyse- auch Lipolyse-Fähigkeit.

Tabelle 19: Fettsäureprofile der Gruppen 6 bis 8. Angegeben ist die Anzahl der zugehörigen Isolate, deren Zellmorphologie und Gramfärbverhalten, Fähigkeit zu Proteo- und Lipolyse sowie der Isolierungsort und das Nährmedium. Bei mehr als einem Vertreter pro Gruppe/Untergruppe sind die prozentualen Anteile der Fettsäuren als Mittelwert mit Standardabweichung in Klammern angegeben. Zusätzlich ist das Identifizierungsergebnis mit der Anzahl der identifizierten Vertreter in Klammern angegeben. var, variabel.

Gruppe	6		7		8
Untergruppe	6A	6B	7A	7B	
Anzahl Isolate	7	1	4	5	20
Zellmorphologie	Stäbchen	Stäbchen	Kurze Stäbchen	Kurze Stäbchen	Kurze Stäbchen
Gramfärbung	–	–	var/ –	var/ –	var/ –
Proteolyse	+	+	+	+ ²⁾	–
Lipolyse	+	+	– ¹⁾	–	+
Herkunft	MBA, ST	ST	MBA, ST	MBA, FR, ST	MBA, ST, F, DEK
Medium	MPC, CFC, CCA, VRBD	CFC	TSA, CFC, VRBD	TSA, CCA	TSA, MPC, CCA, VRBD
Fettsäuren in %					
11:0 iso	2,3 (0,3)	1,3			
ECL 10,85			1,8 (1,1)	1,6 (1,3)	
10:0 3OH		0,2	2,9 (1,3)		
12:0		0,5	0,4 (0,1)	2,2 (0,2)	4,4 (1,5)
11:0 iso 3OH	0,3 (0,1)				
12:0 2OH		0,4			0,2 (0,2)
12:0 3-methoxy			0,3 (0,1)		
12:0 3OH	0,5 (0,2)	0,7	0,8 (0,3)		1,5 (1,0)
14:0 iso	1,0 (0,5)	0,4			
14:0	2,0 (0,5)	1,8	4,5 (0,5)	4,6 (0,8)	0,2 (0,1)
13:0 iso 3OH	0,9 (0,4)				
15:0 iso	43,8 (4,7)	30,2			
15:0 anteiso	19,5 (1,5)	12,0			
15:0	0,8 (0,5)	0,5	0,8 (1,9)	0,4 (0,1)	
14:0 2OH			0,5 (0,2)		
14:0 3OH			2,8 (2,6)	1,8 (0,8)	
16:0 iso	1,7 (0,7)	0,7			
16:1 <i>c/t</i> 5 o. <i>cis</i> 7	0,3 (0,5)				
16:1 <i>cis</i> 9	11,1 (1,8)	20,8	5,4 (1,1)	10,6 (3,5)	12,5 (3,3)
16:0	9,6 (3,0)	20,2	47,9 (2,7)	40,9 (3,0)	28,8 (2,4)
17:1 iso <i>cis</i> 9	2,3 (1,4)	2,0			
17:0 iso	2,6 (1,2)	2,2			
17:0 anteiso	0,2 (0,2)				
16:0 iso 2OH	0,1 (0,1)	0,7			
17:0 <i>cyclo</i>			20,8 (2,3)	14,8 (2,4)	0,1 (0,1)
17:0			0,5 (0,3)	0,4 (0,1)	0,1 (0,1)
18:1 <i>cis</i> 9					52,1 (2,8)
18:1 <i>cis</i> 11	0,1 (0,1)	5,0	8,0 (1,9)	21,0 (2,8)	
18:0			0,2 (0,1)	0,1 (0,1)	0,1 (0,1)
19:0 <i>cyclo</i> 11-12				2,3 (0,9)	1,7 (1,1)
Identifizierung (n)	<i>Stenotrophomonas lactitubi</i> (2x), <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	<i>Serratia marcescens</i> (2)	<i>Escherichia marmotae/ coli</i> (3)	<i>Acinetobacter guillouiae</i> (7), <i>Acinetobacter johnsonii</i> (2)

¹⁾ Ein Isolat ist Lipolyse-positiv.

²⁾ Ein Isolat ist Proteolyse-negativ.

Bei allen Isolaten aus den Gruppen 7 und 8 handelte es sich um Gram-negative oder -variable Bakterien mit kurzer Stäbchenform. Den Isolaten aus beiden Untergruppen von Gruppe 7 war C16:0 als Hauptfettsäure, große Anteile von C17:0 *cyclo* und das Vorkommen von C14:0 3OH gemeinsam. Während zwei der vier Isolate aus Gruppe 7A als *Serratia marcescens* identifiziert wurden, handelte es sich bei drei der fünf Vertreter aus Gruppe 7B um *Escherichia marmotae* oder *Escherichia coli*. Alle Isolate aus Gruppe 7A wiesen eine sehr starke Proteolyseaktivität auf. Bis auf eine Ausnahme besaß keines der Isolate die Fähigkeit zur Lipolyse. Die ausschließliche Fähigkeit zur Proteolyse, jedoch nicht zur Lipolyse, zeigte auch die Mehrzahl der Isolate aus Untergruppe 7B.

Mit 20 Isolaten war Gruppe 8 die viertgrößte Fettsäuregruppe. Die Hauptfettsäuren waren C18:1 *cis* 9, C16:0 und C16:1 *cis* 9. Zusätzlich wurde in allen Isolaten C12:0 3OH detektiert. Alle identifizierten Isolate gehörten der Gattung *Acinetobacter* an. Beim überwiegenden Anteil handelte es sich um die Spezies *A. guillouiae*. Allen Isolaten gemeinsam war ihre überwiegend als sehr stark eingestufte Lipolyse-Aktivität und die nicht vorhandene Fähigkeit zur Proteolyse.

Mit 36 Isolaten handelte es sich bei Gruppe 9 um die größte Fettsäuregruppe. Aufgrund von prozentualen Unterschieden in den Hauptfettsäuren C16:0 und C18:1 *cis* 11 wurden sechs Untergruppen gebildet, von denen die beiden größten in Tab. 20 dargestellt sind. Bei allen Isolaten handelte es sich um Gram-positive Bakterien, die überwiegend vom anaerob inkubierten MRS Agar stammten. Hinsichtlich der Zellmorphologie und dem Isolierungsort variierten die Isolate stark. Die Identifizierungsergebnisse zeigten eine große Gattungsvielfalt. Besonders häufig wurden die Spezies *Enterococcus faecalis*, *Pediococcus pentosaceus* und *Lactobacillus casei* identifiziert. Bei den *Enterococcus faecalis*-Isolaten handelte es sich um die einzigen Vertreter dieser Gruppe, die auch zu aerobem Wachstum auf TSA und weiteren Medien in der Lage waren. Die überwiegende Mehrzahl der Isolate wies ein häufig als stark eingestuftes Proteolyse-Vermögen auf. Keines war in der Lage Lipolyse zu betreiben.

Bei allen Isolaten der Gruppe 10 handelte es sich um Gram-negative Stäbchen, die überwiegend von den Melkbecherablagen isoliert wurden. Die erste Hauptfettsäure aller Untergruppen war C16:0 mit durchschnittlichen Anteilen von 45-50 %. Die Identifizierung der Isolate aus den Untergruppen 10A und 10B, die repräsentativ in Tab. 20 dargestellt sind, spiegelte eine hohe Vielfalt von vier Spezies der Gattung

Pseudomonas wieder. Die Mehrzahl der Isolate wies die Fähigkeit zur Lipolyse, jedoch nicht zur Proteolyse auf. Lediglich das als *Pseudomonas koreensis* identifizierte Isolat aus Gruppe 10B sowie ein weiteres nicht identifiziertes Isolat aus Gruppe 10A waren zu beiden Reaktionen fähig. Die Isolate M36 und *Pseudomonas poae/trivialis* M43 zeigten bei 30 °C keine Fähigkeit zur Proteolyse, betrieben diese jedoch bei 4 °C.

Tabelle 20: Fettsäureprofile der Gruppen 9 und 10. Angegeben ist die Anzahl der zugehörigen Isolate, deren Zellmorphologie und Gramfärbverhalten, Fähigkeit zu Proteo- und Lipolyse sowie der Isolierungsort und das Nährmedium. Bei mehr als einem Vertreter pro Gruppe/Untergruppe sind die prozentualen Anteile der Fettsäuren als Mittelwert mit Standardabweichung in Klammern angegeben. Zusätzlich ist das Identifizierungsergebnis mit der Anzahl der identifizierten Vertreter in Klammern angegeben.

Gruppe	9		10	
Untergruppe	9A	9B	10A	10B
Anzahl Isolate	27	5	7	1
Zellmorphologie	Stäbchen und Kokken	Stäbchen und Kokken	Dünne Stäbchen	Kurze Stäbchen
Gramfärbung	+	+	–	–
Proteolyse	+ ¹⁾	+	– ³⁾	+
Lipolyse	– ²⁾	–	+ ⁴⁾	+
Herkunft	MBA, FR, DEE, DEK, ST, C	MBA, FR, DAE, DEK, C	MBA, FR, ST	MBA
Medium	TSA, MPC, MRS, BP, CCA	MRS	TSA, CFC, CCA, VRBD	CFC
Fettsäuren in %				
10:0 3OH			0,2 (0,1)	0,4
12:0			1,9 (1,2)	0,6
12:0 2OH			0,5 (0,5)	0,8
12:0 3OH			0,9 (0,5)	1,1
14:0	3,2 (2,0)	1,2 (0,5)	0,2 (0,2)	0,3
16:1 <i>cis</i> 9	3,0 (2,5)	3,3 (2,1)	36,5 (4,3)	18,0
16:1 <i>trans</i> 9	1,5 (1,4)	6,3 (2,5)		
16:1 <i>cis</i> 11		0,5 (0,7)		
16:0	43,8 (6,8)	18,7 (7,3)	43,5 (3,8)	51,8
16:0 11-methyl		2,4 (2,4)		
17:0 <i>cyclo</i>			1,9 (1,2)	19,3
17:0			0,1 (0,1)	0,4
18:1 <i>cis</i> 11	41,4 (8,7)	63,4 (1,3)	13,5 (3,5)	7,0
18:0	1,0 (0,6)	0,1 (0,2)	0,6 (0,6)	
ECL 18,3	0,6 (2,1)			
19:0 <i>cyclo</i> 11-12	5,8 (7,6)	4,1 (2,6)		
Identifizierung (n)	<i>Enterococcus faecalis</i> (7), <i>Pediococcus pentosaceus</i> (3), <i>Lactobacillus fermentum</i> , <i>Lactobacillus parabuchneri</i>	<i>Lactobacillus casei</i> (2)	<i>Pseudomonas poae/trivialis</i> , <i>Pseudomonas congelans</i> , <i>Pseudomonas gessardii</i> , <i>Microvirgula aerodenitrificans/curvata</i>	<i>Pseudomonas koreensis</i>

¹⁾ Fünf von 27 Isolaten sind Proteolyse-negativ; ein Isolat wuchs nicht auf Proteolyse-Agar;

²⁾ Drei von 27 Isolaten wuchsen nicht auf Lipolyse-Agar; ³⁾ Ein Isolat ist Proteolyse-positiv;

⁴⁾ Drei Isolate sind Lipolyse-negativ.

In Tab. 21 sind die Fettsäureprofile der Gram-positiven, stäbchenförmigen Isolate der Gruppen 11 und 12 dargestellt. Alle Isolate aus Gruppe 11 stammten von den Vollmedien TSA oder MPC und wurden häufig von den in die Melkanlage eingebrachten Coupons isoliert. Die Identifizierung erbrachte vier verschiedene Spezies der Gattung *Gordonia*. Zusätzlich wurden vier Isolate zwei verschiedenen Spezies der Gattung *Rhodococcus* zugeordnet.

Tabelle 21: Fettsäureprofile der Gruppen 15 und 16. Angegeben ist die Anzahl der zugehörigen Isolate, deren Zellmorphologie und Gramfärbverhalten, Fähigkeit zu Proteo- und Lipolyse sowie der Isolierungsort und das Nährmedium. Die prozentualen Anteile der Fettsäuren sind als Mittelwert mit Standardabweichung in Klammern angegeben. Zusätzlich ist das Identifizierungsergebnis mit der Anzahl der identifizierten Vertreter in Klammern angegeben.

Gruppe	11			12
Untergruppe	11A	11B	11C	12A
Anzahl Isolate	5	6	3	3
Zellmorphologie	Stäbchen	Stäbchen	Stäbchen	Stäbchen
Gramfärbung	+	+	+	+
Proteolyse	-	-	-	-
Lipolyse	+	+ ¹⁾	+ ¹⁾	+
Herkunft	DAE, FR, ST, C	FR, C	FR, C	FR
Medium	TSA, MPC	TSA, MPC	TSA	TSA, BP
Fettsäuren in %				
14:0	0,9 (0,5)	1,7 (1,3)	1,3 (0,4)	0,1 (0,1)
15:0	0,1 (0,2)	0,4 (0,3)	0,4 (0,5)	
16:1 <i>cis</i> 9		0,9 (2,1)	0,1 (0,1)	
16:1 <i>trans</i> 9 o. <i>cis</i> 10	6,9 (2,1)	4,3 (3,1)	12,3 (4,8)	
16:0	39,2 (4,0)	54,6 (2,6)	43,4 (4,9)	11,8 (1,3)
ECL 16,7				0,8 (0,2)
ECL 16,9		0,2 (0,6)		1,8 (0,5)
17:0	0,9 (1,4)	0,1 (0,2)	0,2 (0,2)	
17:0 10-methyl			0,3 (0,5)	
18:1 <i>cis</i> 9	36,4 (1,7)	28,9 (3,9)	18,0 (2,8)	67,1 (0,8)
18:0	6,1 (1,3)	1,3 (1,9)	0,9 (1,0)	18,3 (1,0)
18:0 10-methyl	9,2 (2,4)	6,4 (4,4)	19,9 (5,1)	
18:0 11-methyl		0,9 (2,1)		
19:0			0,6 (1,1)	
ECL 19,94			1,8 (3,4)	
Identifizierung (n)	<i>Gordonia polyisoprenivorans</i> (2), <i>Gordonia paraffinivorans</i> , <i>Gordonia bronchialis</i>	<i>Rhodococcus fascians</i> (2), <i>Gordonia polyisoprenivorans</i> , <i>Rhodococcus qingshengii</i> / <i>degradans</i>	<i>Gordonia jacobae</i> / <i>sputi</i> (2), <i>Rhodococcus qingshengii</i> / <i>degradans</i>	<i>Corynebacterium falsenii</i> (3)

¹⁾ Ein Isolat ist Lipolyse-negativ.

Bei allen Isolaten aus Gruppe 12 handelte es sich um Gram-positive, stäbchenförmige Bakterien, die überwiegend von BP-Agar stammten. Das Fettsäureprofil der Untergruppe 12A ist beispielhaft in Tab. 21 dargestellt. Die Isolate aus allen drei Untergruppen wurden als drei verschiedene Spezies der Gattung *Corynebacterium* identifiziert. Alle als *C. falsenii* identifizierten Isolate wiesen Lipolyse-Fähigkeit auf, während die als *C. confusum* und *C. glutamicum* identifizierten Isolate weder Proteolyse- noch Lipolyse-Fähigkeit besaßen.

3.3 Stammbäume der Isolate und Klone

Für die Erstellung phylogenetischer Stammbäume aus den 16S rRNA-Gensequenzen der Isolate, Klone und deren nächstähnlichen Typstämmen wurde beim Vorkommen von mehr als einer Sequenz pro Spezies mit $\geq 99\%$ Übereinstimmung jeweils das Isolat oder der Klon mit der längsten Sequenz als repräsentativer Vertreter ausgewählt. Die prozentualen Übereinstimmungen zwischen den repräsentativen Vertretern und ihren nächstähnlichen Typstämmen sind in Tab. 31 im Anhang dargestellt. Die Stammbäume stellen separat die vier Phyla *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes* und *Proteobacteria* dar. Die Anzahl der Sequenzen insgesamt sowie die Herkunft der Isolate bzw. des DNA-Extraktes, aus dem die Klonsequenzen stammten, sind in den Stammbäumen jeweils farblich und mit Abkürzungen gekennzeichnet. Die in Abb. 7 dargestellte Legende ist für alle nachfolgenden Stammbäume gültig.

In Abb. 7 ist der phylogenetische Stammbaum der Isolate und Klone des Phylums *Actinobacteria* dargestellt. Bei der überwiegenden Anzahl von 74 der dargestellten Sequenzen handelte es sich um Isolate. Lediglich acht Klonsequenzen, die alle vom DNA-Extrakt des im Oktober 2016 in die Melkanlage verbrachten Coupons stammten, wurden der Spezies *Microbacterium foliorum/phylosphaerae* zugeordnet. Besonders hohe Vielfalten von jeweils vier verschiedenen Spezies konnten für die Gattungen *Microbacterium*, *Corynebacterium* und *Gordonia* detektiert werden. Aus der Gattung *Microbacterium* stammte zudem eine hohe Anzahl von insgesamt 18 Isolaten. Ebenfalls viele Vertreter wies die Gattung *Kocuria* mit den zwei Spezies *K. kristinae* und *K. salsicia* auf. Die Isolate des Phylums *Actinobacteria* stammten von unterschiedlichen Probenahmeorten innerhalb der Melkanlage sowie auch häufig von den in die Melkanlage verbrachten Edelstahlcoupons. Viele der dargestellten Spezies wurden zudem wiederkehrend bei verschiedenen Probenahmen isoliert.

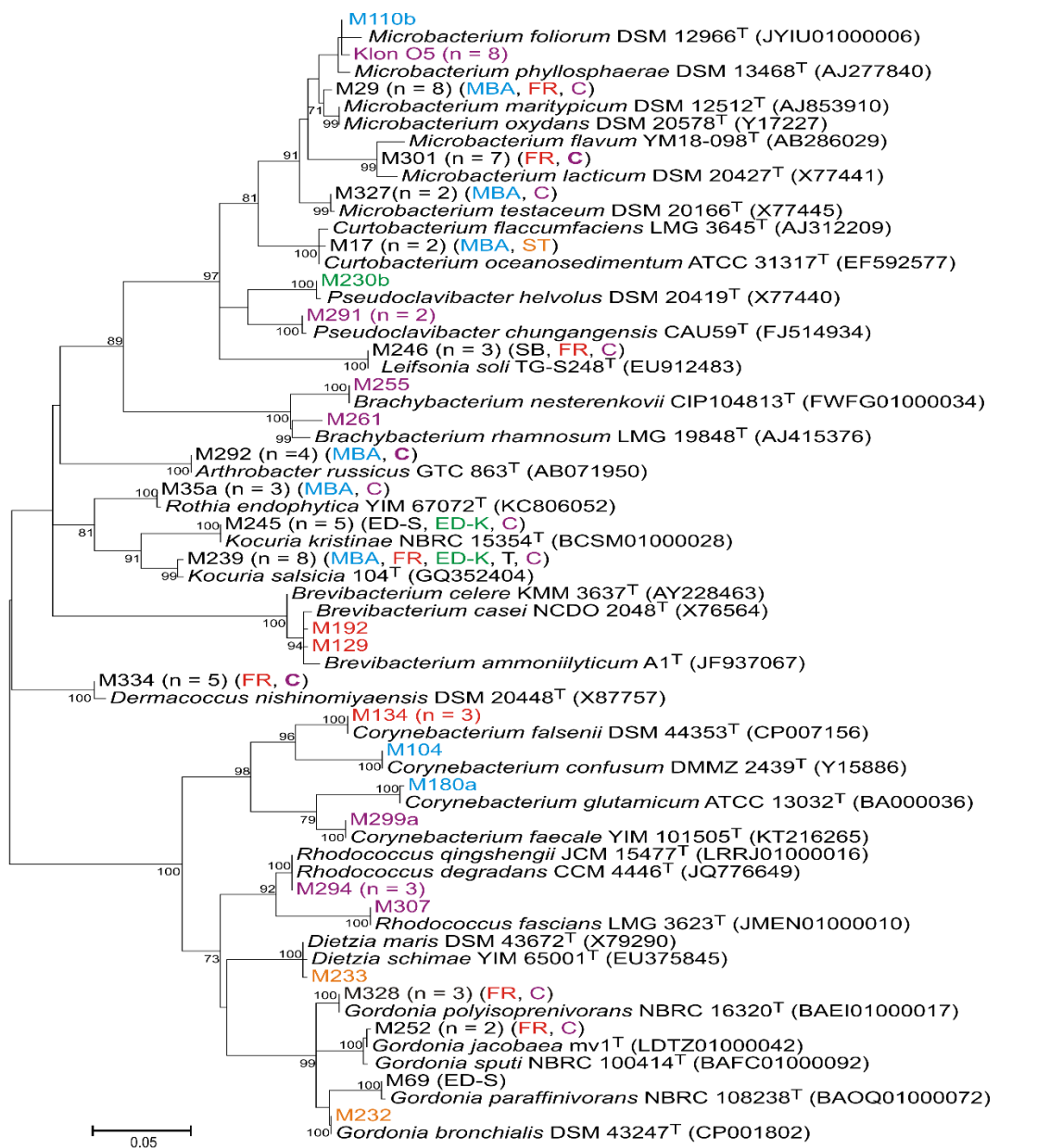


Abbildung 7: Aus den 16S rRNA-Gensequenzen repräsentativer Klone und Isolate des Phylums *Actinobacteria* und ihrer nächstähnlichen Typstämme generierter phylogenetischer Stammbaum. Der Stammbaum wurde mit dem Programm MEGA 7.0 unter Verwendung des „Maximum Likelihood“-Algorithmus erstellt und die Baumtopologie mit Hilfe des Bootstrap-Verfahrens mit 1.000 Wiederholungen überprüft. Es sind nur Bootstrap-Werte $\geq 70\%$ dargestellt. Die dargestellte Skalierung entspricht einer phylogenetischen Distanz von 5%. Die Anzahl der Gesamt-Isolate bzw. -Klone mit $\geq 99\%$ Übereinstimmung zu der dargestellten Sequenz ist in Klammern angegeben. Die Isolationsorte sind farblich bzw. durch Abkürzungen gekennzeichnet. MBA, Melkbecherablage; FR, Filterrohr; ED-K, Ende der Druckleitung (Kunststoffrohr); ST, Auslassstutzen des Milchsammeltanks; C, Edelsstahlcoupon.

Das in Abb. 8 dargestellte Phylum *Bacteroidetes* enthielt die geringste Anzahl verschiedener Vertreter. Die überwiegende Mehrheit der Isolate und Klonsequenzen wurde der Gattung *Chryseobacterium* zugeordnet, welche mit einer hohen Vielfalt von fünf verschiedenen Spezies vertreten war. Besonders häufig war die Spezies *Chryseobacterium carnipullorum* vertreten, die sowohl als Isolat- und Klonsequenz von den Melkbecherablagen stammte, als auch von den Edelstahlcoupons isoliert wurde. Insgesamt stammte der überwiegende Anteil der Isolate und Klone dieses Phylums von den Melkbecherablagen. Neben insgesamt vier von den Coupons isolierten Vertretern, stammte nur das als *Elizabethkingia miricola* identifizierte Isolat M194 vom Filterrohr. Die 20 Klonsequenzen überwogen deutlich gegenüber den 8 Isolatsequenzen.

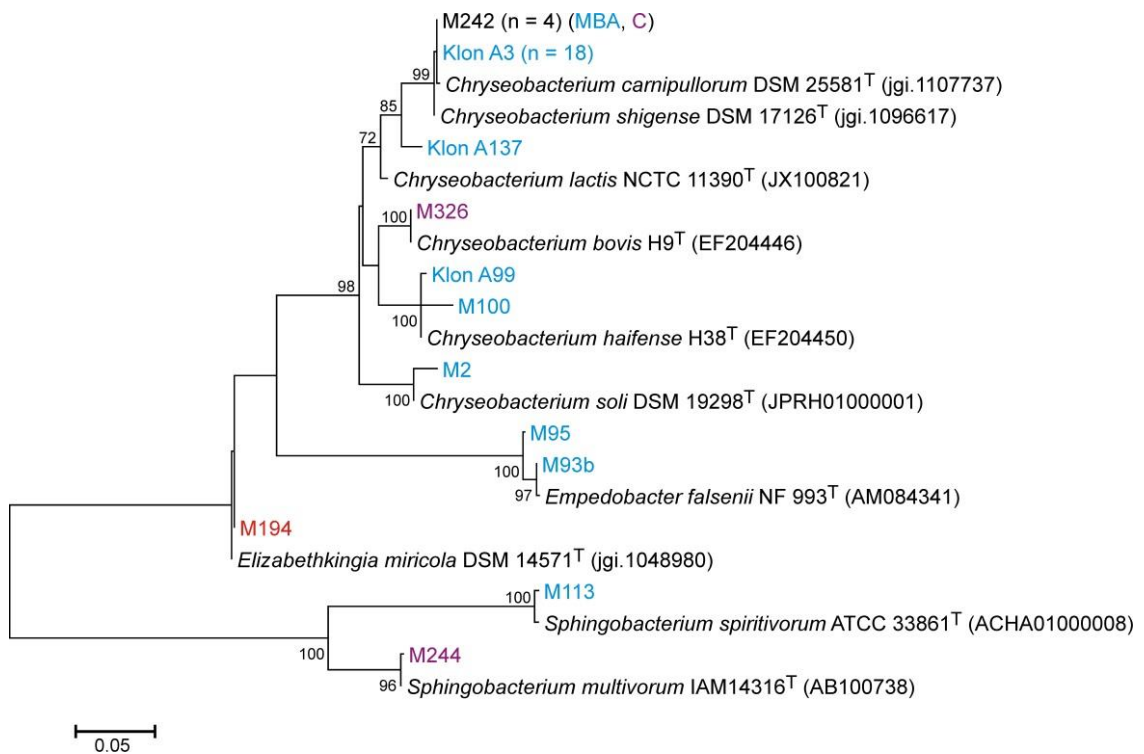


Abbildung 8: Aus den 16S rRNA-Gensequenzen repräsentativer Klone und Isolate des Phylums *Bacteroidetes* und ihrer nächstähnlichen Typstämme generierter phylogenetischer Stammbaum. Der Stammbaum wurde mit dem Programm MEGA 7.0 unter Verwendung des „Maximum Likelihood“-Algorithmus erstellt und die Baumtopologie mit Hilfe des Bootstrap-Verfahrens mit 1.000 Wiederholungen überprüft. Es sind nur Bootstrap-Werte $\geq 70\%$ dargestellt. Die dargestellte Skalierung entspricht einer phylogenetischen Distanz von 5%. Die Anzahl der Gesamt-Isolate bzw. -Klone mit $\geq 99\%$ Übereinstimmung zu der dargestellten Sequenz ist in Klammern angegeben. Die Isolationsorte sind farblich bzw. durch Abkürzungen gekennzeichnet. MBA, Melkbecherablage; C, Edelstahlcoupon (Legende s. Abb. 7).

In Abb. 9 ist der phylogenetische Stammbaum des Phylums *Firmicutes* dargestellt. Insgesamt wurden 10 Klon- und 43 Isolatsequenzen diesem Phylum zugeordnet. Besonders hohe Vielfalten wiesen die Gattungen *Bacillus* und *Staphylococcus* mit jeweils sieben verschiedenen Spezies auf. Während es sich bei der Gattung *Bacillus* ausschließlich um Isolate handelte, wurden drei Klonsequenzen den Spezies *Staphylococcus xylosus* und *S. equorum subsp. equorum* zugeordnet. Eine Vielzahl der Isolat- und Klonsequenzen wurde den Milchsäurebakterien zugeordnet, von denen vor allem die Spezies *Enterococcus faecalis*, *Lactobacillus casei* und *Pediococcus pentosaceus* mehrfach vertreten waren. Die pathogene Spezies *Listeria monocytogenes* wurde nicht als Isolat, jedoch als Klonsequenz aus zwei verschiedenen Coupon-DNA-Extrakten identifiziert, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten in die Melkanlage verbracht wurden. Die Isolate und Klone stammten von einer großen Vielfalt verschiedener Probenahmeorte innerhalb der Melkanlage sowie von den Coupons.

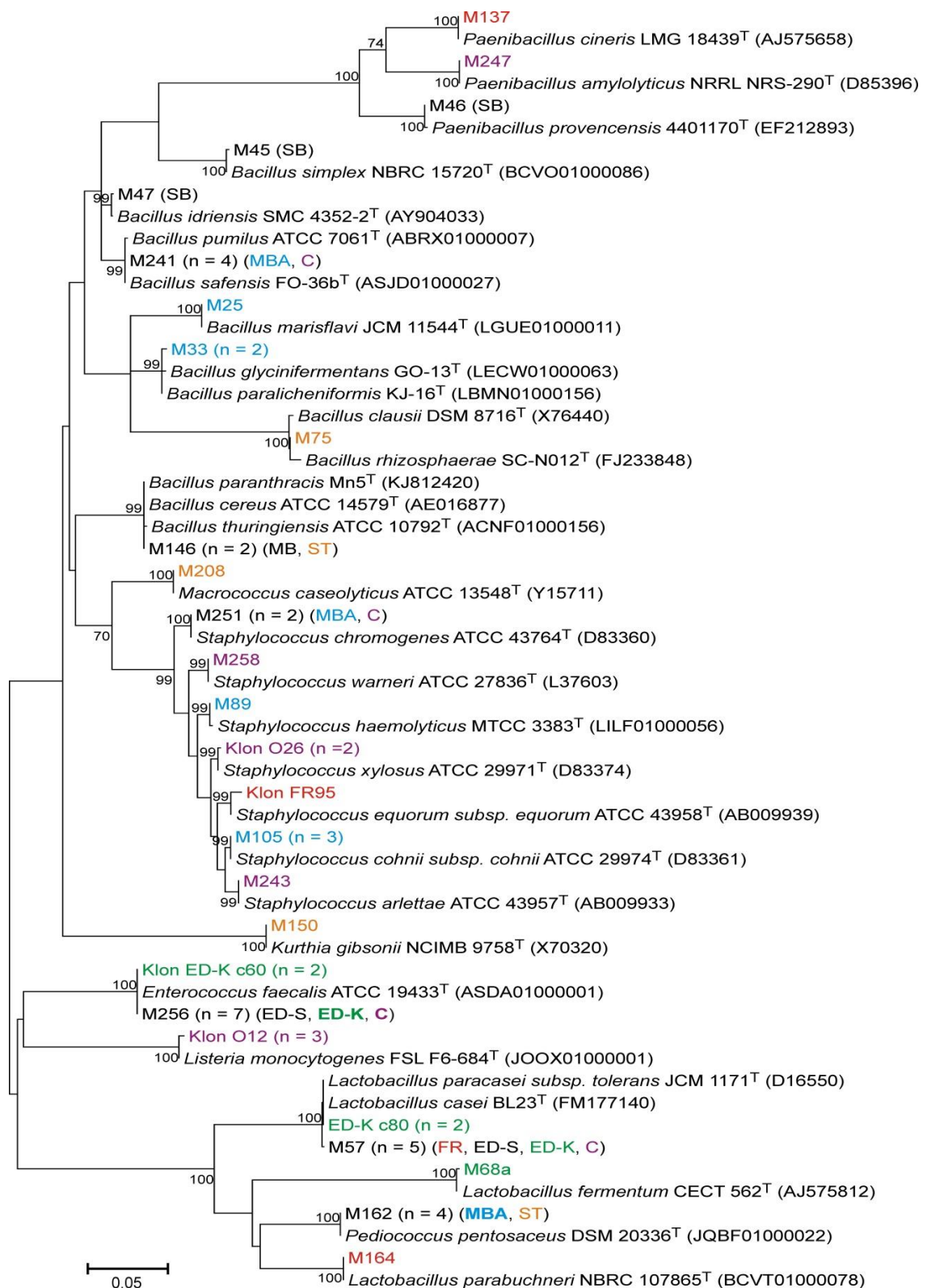


Abbildung 9: Phylogenetischer Stammbaum des Phylums Firmicutes. Beschreibung siehe nächste Seite...

Abbildung 9: Aus den 16S rRNA-Gensequenzen repräsentativer Klone und Isolate des Phylums *Firmicutes* und ihrer nächstähnlichen Typstämme generierter phylogenetischer Stammbaum. Der Stammbaum wurde mit dem Programm MEGA 7.0 unter Verwendung des „Maximum Likelihood“-Algorithmus erstellt und die Baumtopologie mit Hilfe des Bootstrap-Verfahrens mit 1.000 Wiederholungen überprüft. Es sind nur Bootstrap-Werte $\geq 70\%$ dargestellt. Die dargestellte Skalierung entspricht einer phylogenetischen Distanz von 5 %. Die Anzahl der Gesamt-Isolate bzw. -Klone mit $\geq 99\%$ Übereinstimmung zu der dargestellten Sequenz ist in Klammern angegeben. Die Isolationsorte sind farblich bzw. durch Abkürzungen gekennzeichnet. MB, Melkbecher; MBA, Melkbecherablage; SB, Sammelbehälter; FR, Filterrohr; ED-K, Ende der Druckleitung (Kunststoffrohr); ED-S, Ende der Druckleitung (Edelstahlrohr); ST, Auslassstutzen des Milchsammeltanks; C, Edelstahlcoupon (Legende s. Abb. 7).

In Abb. 10 ist der Stammbaum des Phylums *Proteobacteria* dargestellt, dem die größte Anzahl der Sequenzen zugeordnet wurde. Die Isolat- und Klonsequenzen stammten aus den Klassen *Alpha*-, *Beta*- und *Gammaproteobacteria*, wobei Letztere die größte Anzahl an Sequenzen enthielt. Insgesamt ist die Anzahl von Isolaten und Klonen mit 49 bzw. 47 Sequenzen vergleichbar.

Der überwiegende Anteil der Sequenzen der *Alphaproteobacteria* stammte von den Melkbecherablagen. Die größte Vielfalt enthielt dabei die Gattung *Ochrobactrum* mit drei verschiedenen Spezies. Die zwei Klon- und fünf Isolatsequenzen, welche verschiedenen Spezies der Klasse *Betaproteobacteria* zugeordnet wurden, stammten vom Filterrohr, den Melkbecherablagen und einem Coupon.

Große Speziesvielfalten wurden für die Gattungen *Acinetobacter* und *Pseudomonas* detektiert, die den *Gammaproteobacteria* angehören. Während 17 Klonsequenzen als fünf verschiedene *Acinetobacter*-Spezies identifiziert wurden, konnten die identifizierten Isolate insgesamt nur zwei verschiedenen Spezies zugeordnet werden. Dabei handelte es sich bei sieben der neun identifizierten Vertreter um *A. guillouiae*. Zusätzlich wurden verschiedene Spezies der Ordnung *Enterobacterales* nachgewiesen, darunter die Spezies *Serratia marcescens* und *Escherichia coli*.

Der überwiegende Teil der Klonsequenzen aus den DNA-Extrakten des Filterrohrs und des Kunststoffrohrs am Ende der Druckleitung wurde der Spezies *Rhodanobacter glycinis* zugeordnet. Diese wurde auch in mehreren Klonsequenzen vom Auslassstutzen des Milchsammeltanks sowie verschiedener Coupon-DNA-Extrakte nachgewiesen, sodass insgesamt 24 Sequenzen vorlagen. Ein entsprechendes Isolat wurde in keiner Probenahme detektiert.

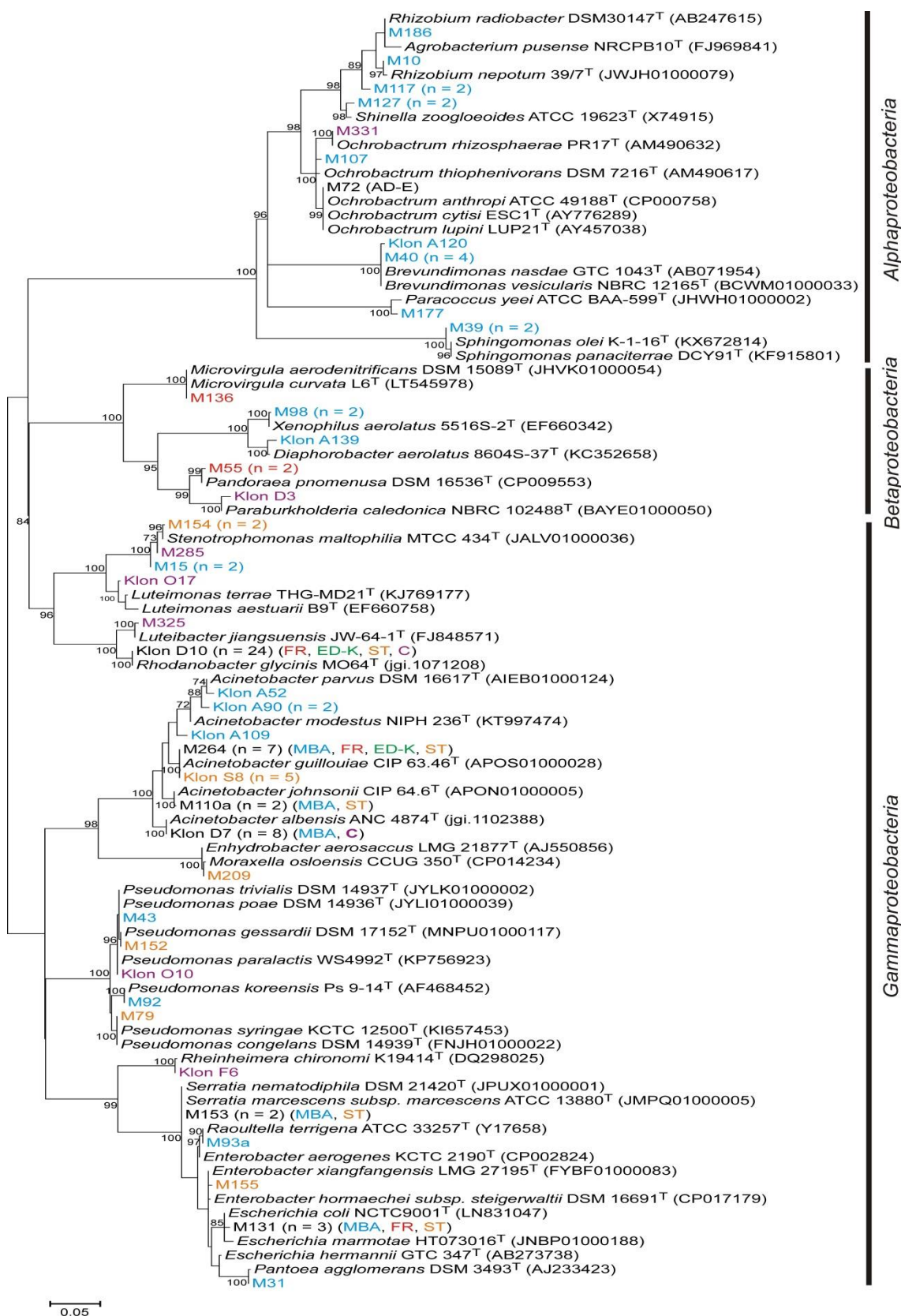


Abbildung 10: Phylogenetischer Stammbaum des Phylums *Proteobacteria*. Beschreibung siehe nächste Seite...

Abbildung 10: Aus den 16S rRNA-Gensequenzen repräsentativer Klone und Isolate des Phylums *Proteobacteria* und ihrer nächstähnlichen Typstämme generierter phylogenetischer Stammbaum. Der Stammbaum wurde mit dem Programm MEGA 7.0 unter Verwendung des „Maximum Likelihood“-Algorithmus erstellt und die Baumtopologie mit Hilfe des Bootstrap-Verfahrens mit 1.000 Wiederholungen überprüft. Es sind nur Bootstrap-Werte $\geq 70\%$ dargestellt. Die dargestellte Skalierung entspricht einer phylogenetischen Distanz von 5 %. Die Anzahl der Gesamt-Isolate bzw. -Klone mit $\geq 99\%$ Übereinstimmung zu der dargestellten Sequenz ist in Klammern angegeben. Die Isolationsorte sind farblich bzw. durch Abkürzungen gekennzeichnet. MBA, Melkbecherablage; FR, Filterrohr; AD-E, Anfang der Druckleitung (Edelstahlrohr); ED-K, Ende der Druckleitung (Kunststoffrohr); ST, Auslassstutzen des Milchsammeltanks; C, Edelstahlcoupon (Legende s. Abb. 7).

Insgesamt stammten die meisten Isolate und Klonsequenzen des Phylums *Proteobacteria* von den Melkbecherablagen und dem Auslassstutzen des Milchsammeltanks. Nur vereinzelt wurden Isolate von den in die Melkanlage verbrachten Edelstahlcoupons dem Phylum *Proteobacteria* zugeordnet. Lediglich zwei Coupon-Isolate gehörten den Gattungen *Ochrobactrum* und *Stenotrophomonas* an.

Die Mehrheit der Tupfer-Isolate (38 %) stammte aus dem Phylum *Proteobacteria*. Bei den Klonsequenzen der Tupfer-DNA-Extrakte war der Anteil mit 58 % noch höher. Jeweils 28 bzw. 27 % der Tupfer-Isolate stammten aus den Phyla *Actinobacteria* und *Firmicutes*, während der Anteil der *Bacteroidetes* unter den Tupfer-Isolaten mit 7 % am geringsten war. Im Gegenteil dazu war letzteres Phylum in den Klonsequenzen mit einem deutlich höheren Anteil von 34 % vertreten, während nur fünf Tupfer-Klonsequenzen (8 %) aus dem Phylum *Firmicutes* stammten und das Phylum *Actinobacteria* in den Klonsequenzen gar nicht vertreten war.

Bei den Isolat- und Klonsequenzen von den in die Melkanlage verbrachten Edelstahlcoupons zeigte sich ein anderes Bild. Hier dominierte das Phylum *Actinobacteria* mit 69 % der Isolatsequenzen deutlich vor den *Firmicutes* mit 20 %, während die Gram-negativen Phyla *Bacteroidetes* und *Proteobacteria* nur 7 % bzw. 4 % der Isolate ausmachten. Im molekularbiologischen Ansatz dominierte stattdessen das Phylum *Proteobacteria* mit 54 % der Klonsequenzen, während ein Anteil von 29 % der Sequenzen dem Phylum *Actinobacteria* zugeordnet wurde. Weitere 18 % der Sequenzen stammten aus dem Phylum *Firmicutes* und keine Coupon-Klonsequenz wurde den *Bacteroidetes* zugewiesen.

3.3.1 Bakterielle Diversität und Dominanz einer Spezies

Die für die Klonbibliotheken kalkulierten Deckungsgrade (Coverages) lagen bei 86,2 % für die Melkbecherablagen, 90,9 % für das Filterrohr, jeweils 100 % für das Kunststoffrohr am Ende der Druckleitung sowie den Auslassstutzen des Milchsammel-tanks, und 85,1 % für die Edelstahlcoupons.

In Tab. 22 sind der Shannon-Diversitäts-Index und die Equitabilitätswerte für das kultivierungsgestützte und molekularbiologische Verfahren, getrennt nach den verschiedenen Probenahmeorten, dargestellt. Weil die Tupferproben in zwei von drei Probenahmen ausschließlich kulturell untersucht wurden, und nur bei einer Probenahme eine parallele Untersuchung mit dem molekularbiologischen Verfahren stattfand, sind in Klammern die Diversitätskennzahlen für das kulturelle Verfahren dieser Probenahme allein dargestellt. Alle eingebrachten Coupons wurden parallel mit beiden Verfahren untersucht, jedoch konnten von den im Oktober 2016 in die Melkanlage eingebrachten Coupons nur Klone und keine Isolate gewonnen werden, während von den im November 2015 in die Anlage verbrachten Coupons ausschließlich Isolate stammten. Aus dem entsprechenden DNA-Extrakt konnte kein PCR-Produkt für die Klonierung generiert werden.

Der Shannon-Index ist ein Maß für die bakterielle Diversität. Je höher der Wert ausfällt, umso größer ist die bakterielle Vielfalt. Die Shannon-Diversitäts-Indices waren für das kultivierungsgestützte Verfahren mit 1,83 bis 3,60 in allen Fällen höher als die korrespondierenden Werte für das molekularbiologische Verfahren (0,3 bis 1,90). Mit Ausnahme des Kunststoffrohrs am Ende der Druckleitung, wo sich die Shannon-Indices beider Verfahren am wenigsten unterschieden, waren die Werte der weiteren Probenahmeorte für das kulturelle Verfahren häufig mehr als doppelt so hoch als für das molekularbiologische Verfahren. Demnach war die mit dem kultivierungsgestützten Verfahren erfasste bakterielle Diversität deutlich höher als die direkt mittels Klonierung dargestellte Diversität an denselben Probenahmeorten.

Anhand der Shannon-Diversitäts-Indices des kulturellen Verfahrens wiesen die Melkbecherablagen mit einem Wert von 3,60 die höchste bakterielle Vielfalt auf, gefolgt von den Coupons mit 3,22. Diese Reihenfolge war für die aus dem molekularbiologischen Verfahren berechneten deutlich geringeren Werte umgekehrt. Während das Filterrohr und der Auslassstutzen des Milchsammel-tanks im kulturellen Verfahren vergleichbar hohe

Shannon-Indices in der Größenordnung von etwa 2,8 aufwiesen, besaß das Kunststoffrohr am Ende der Druckleitung die geringste Diversität. Im Gegensatz dazu besaß dieser Probenahmeort anhand des molekularbiologischen Verfahrens die dritthöchste festgestellte Diversität, während für das Filterrohr mit einem Shannon-Index von 0,3 die geringste Diversität festgestellt wurde.

Tabelle 22: Für das kultivierungsgestützte und molekularbiologische Verfahren (Klonierung) berechnete Shannon Diversitäts-Indices und Equitabilitäten verschiedener Tupferprobenahmeorte und Coupons. Die Werte außerhalb der Klammern gelten jeweils zusammenfassend für alle Isolate und Klone. In Klammern ist der Wert für diejenige Tupferprobenahme dargestellt, bei der das kultivierungsgestützte Verfahren und die Klonierung parallel durchgeführt wurden.

		Kultivierung	Klonierung
Shannon Diversitäts-Index	Tupferproben		
	Melkbecherablagen	3,60 (2,35)	1,36
	Filterrohr	2,76 (1,39)	0,30
	Kunststoffrohr am Ende der Druckleitung	1,83 (1,33)	0,95
	Auslassstutzen des Milchsammeltanks	2,87 (1,56)	0,69
	Coupons	3,22	1,90
Equitabilität	Tupferproben		
	Melkbecherablagen	0,97 (0,98)	0,66
	Filterrohr	0,97 (1,0)	0,44
	Kunststoffrohr am Ende der Druckleitung	0,94 (0,83)	0,86
	Auslassstutzen des Milchsammeltanks	0,99 (0,87)	0,99
	Coupons	0,94	0,86

Die für das kultivierungsgestützte Verfahren berechneten Equitabilitätswerte lagen zwischen 0,83 und 0,99 und damit nahe am maximal möglichen Wert von 1,0. Somit zeigte sich keine ausgeprägte Tendenz zur Dominanz einer Spezies. Den geringsten Wert wies das Kunststoffrohr am Ende der Druckleitung auf. Die für das molekularbiologische Verfahren berechneten Equitabilitäten lagen in den meisten Fällen unterhalb der für das kulturelle Verfahren berechneten Werte. Insbesondere für das Filterrohr und die Melkbecherablagen ergab sich mit Werten von 0,44 und 0,66 eine deutliche Tendenz zur Dominanz einer Spezies.

3.4 Antibiotikaresistente Bakterien in Melkanlagen-Biofilmen

3.4.1 Gesamtkeimzahlen und Keimzahlen antibiotikaresistenter Bakterien

In Abb. 11 sind die kulturell ermittelten GKZ und die Keimzahlen antibiotikaresistenter Mikroorganismen auf den verschiedenen Antibiotika-TSA für eine repräsentative Probenahme dargestellt.

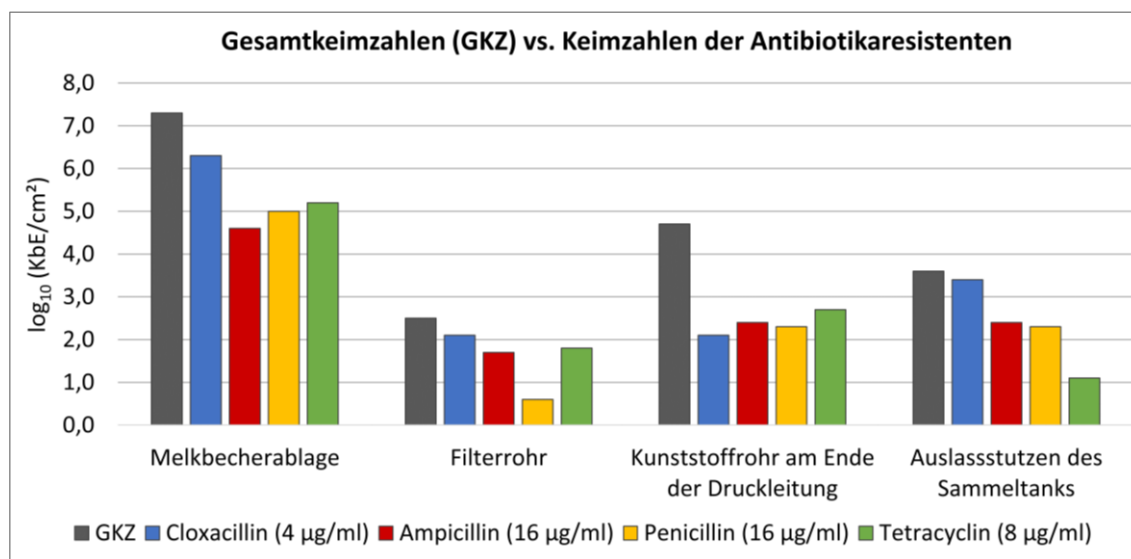


Abbildung 11: Kulturell ermittelte Gesamtkeimzahlen (GKZ) (anthrazit) sowie Keimzahlen resistenter Mikroorganismen gegen die in den angegebenen Konzentrationen eingesetzten Antibiotika Cloxacillin (blau), Ampicillin (rot), Penicillin G (gelb) und Tetracyclin (grün).

Mit Ausnahme des Kunststoffrohrs am Ende der Druckleitung lag an allen Probenahmeorten die Keimzahl der Cloxacillin-resistenten Mikroorganismen etwa in derselben Höhe wie die GKZ. Auf der Melkbecherablage und dem Auslassstutzen des Milchsammel tanks war sie zudem um etwa eine log-Stufe höher als die Keimzahlen der Ampicillin- und Penicillin-Resistenten. Ansonsten waren die Keimzahlen der Resistenten gegenüber den drei getesteten β -Lactam-Antibiotika etwa gleich hoch (Kunststoffrohr am Ende der Druckleitung), oder die Keimzahl der Penicillin-Resistenten war geringer als die Keimzahlen der Cloxacillin- und Ampicillin-Resistenten (Filterrohr). Die Keimzahl der Tetracyclin-resistenten Mikroorganismen lag an den meisten beprobten Stellen im selben Bereich wie die der Resistenten gegenüber den β -Lactam-Antibiotika. Eine Ausnahme bildet der Auslassstutzen des Milchsammel tanks, wo die Keimzahl der Tetracyclin-Resistenten um eine bis zwei log-Stufen unterhalb der Keimzahlen der β -Lactam-Antibiotika-Resistenten lag.

Während die Differenzen zwischen der GKZ und den Keimzahlen aller Antibiotikaresistenten am Kunststoffrohr am Ende der Druckleitung etwa 2,5 log-Stufen betragen, waren sie an allen anderen Probenahmeorten geringer.

Unabhängig von der DNA-Extraktionsmethode (G+, für Gram-positive oder G-, für Gram-negative Bakterien) wurden 16S rRNA-Gene an allen Probenahmeorten mittels RT-qPCR nachgewiesen. Für die β -Lactamase-Gene bzw. -Gengruppen *blaZ*, OXA-1 und OXA-10 wurden keine Signale detektiert. Im Gegensatz dazu konnten Signale für die OXA-2-Gengruppe ausschließlich in den DNA-Extrakten der Melkbecherablagen detektiert werden. *tetM*-Gene wurden dagegen an allen Probenahmeorten nachgewiesen.

In Abb. 12 sind die aus den RT-qPCR-Ergebnissen berechneten Keimzahläquivalente den kulturell auf TSA ermittelten GKZ und Keimzahlen der Antibiotikaresistenten gegenübergestellt. Da nur OXA-2 und *tetM*-Gene nachgewiesen wurden, sind hier nur die kulturell ermittelten Keimzahlen auf Cloxacillin- und Tetracyclin-haltigem TSA dargestellt.

Die mit dem Extraktionsprotokoll für Gram-positive Bakterien erhaltenen DNA-Extrakte lieferten im Fall der 16S-rRNA-Gene stärkere Signale in der RT-qPCR, als die mit dem Protokoll für Gram-negative Bakterien erhaltenen DNA-Extrakte aus denselben Tupferabschwemmlösungen. Folglich sind für das entsprechende Protokoll die berechneten GKZ-Äquivalente höher. Im Gegensatz dazu wurden Signale für den *tetM*-Nachweis lediglich in den nach dem Protokoll für Gram-negative Bakterien gewonnenen DNA-Extrakten des Filterrohrs, des Edelstahlrohrs am Ende der Druckleitung und des Auslassstutzens des Milchsammeltanks detektiert.

Die molekularbiologisch ermittelten GKZ-Äquivalente lagen überwiegend oberhalb der kulturell ermittelten GKZ. Besonders ausgeprägt waren die Unterschiede im Rohrleitungssystem der Melkanlage. So lag die kulturell ermittelte GKZ im Edelstahlrohr am Ende der Druckleitung unter der Nachweisgrenze, während die molekularbiologisch ermittelten GKZ-Äquivalente zwischen 3 und 4 log₁₀ KbE-Äquivalenten/cm², und damit etwa im Bereich des Filterrohrs lagen. Die Melkbecherablage wies sowohl kulturell als auch molekularbiologisch die höchste GKZ auf, gefolgt vom Kunststoffrohr am Ende der Druckleitung, dem Auslassstutzen des Milchsammeltanks, dem Filterrohr, und dem Edelstahlrohr am Ende der Druckleitung.

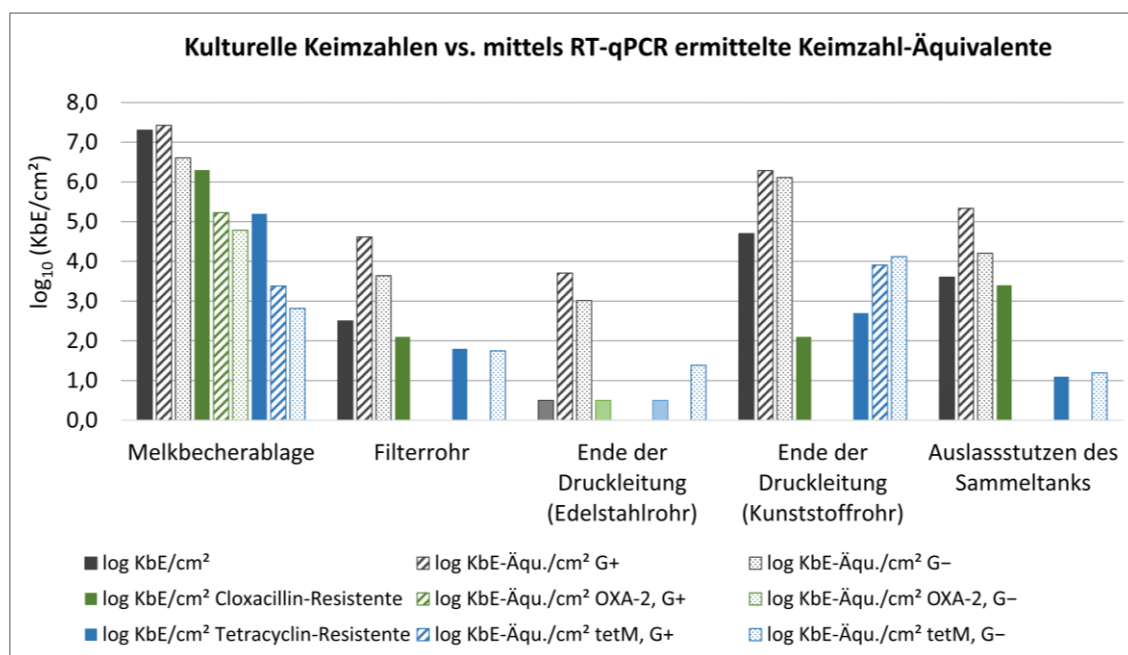


Abbildung 12: Gegenüberstellung der kulturell (durchgehende Füllung) und molekularbiologisch mittels RT-qPCR (Musterfüllung) ermittelten Keimzahlen bzw. Keimzahläquivalente auf verschiedenen Teilen der Melkanlage. Dargestellt sind die Gesamtkeimzahl (GKZ) (anthrazit) sowie die Keimzahlen der Cloxacillin- (grün) und Tetracyclin- (blau) Resistenten. Blasser dargestellte Balken repräsentieren Keimzahlen unterhalb der Nachweisgrenze des kulturellen Verfahrens. DNA-Extraktionsprotokoll G+: für Gram-positive Bakterien; G-: für Gram-negative Bakterien.

Im RT-qPCR-Nachweis der OXA-2-Gruppe konnten ausschließlich Signale für die Melkbecherablage detektiert werden, während kulturell an allen Probenahmeorten Cloxacillin-resistente Mikroorganismen nachgewiesen wurden. Die kulturell ermittelte Keimzahl der Cloxacillin-Resistenten lag etwa eine log-Stufe über den molekularbiologisch ermittelten Keimzahl-Äquivalenten. Im Gegensatz dazu lag die kulturell ermittelte Keimzahl der Tetracyclin-Resistenten nur auf der Melkbecherablage um etwa zwei log-Stufen höher als die molekularbiologisch ermittelten Keimzahl-Äquivalente. An allen anderen Probenahmeorten waren die kulturell und molekularbiologisch ermittelten Keimzahlen der Tetracyclin-Resistenten etwa gleich hoch (Filterrohr und Auslassstutzen), oder die molekularbiologisch ermittelten Keimzahl-Äquivalente waren um eine log-Stufe höher, wie am Kunststoffrohr am Ende der Druckleitung. Obwohl auf dem Edelstahlrohr am Ende der Druckleitung kulturell keine Mikroorganismen nachweisbar waren, wurden an dieser Stelle *tetM*-Gene mittels RT-qPCR detektiert.

3.4.2. Zusammensetzung der antibiotikaresistenten Biofilmgemeinschaft

In Abb. 13 ist ein phylogenetischer Stammbaum der antibiotikaresistenten Bakteriengattungen, dargestellt. Die Isolate entstammten den Phyla *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes* und *Actinobacteria*. Bei mehr als einem Vertreter pro Gattung ist die Breite der Dreiecke proportional zur Anzahl der enthaltenen Isolate. Wenn die Gattung durch mehr als eine Spezies repräsentiert wurde, ist die Anzahl der vertretenen Spezies in Klammern hinter dem Gattungsnamen aufgeführt. Die mittels Farbschema dargestellten Resistenzen entsprechen dem Isolierungsmedium, von dem die Isolate stammen. Bei den Gram-negativen Phyla *Proteobacteria* und *Bacteroidetes* spielten vor allem die Gattungen *Acinetobacter* und *Chryseobacterium* eine Rolle. Beide waren mit hohen Anzahlen an Isolaten sowie großen Speziesvielfalten vertreten. Zudem wurden Isolate von TSA-Platten mit allen vier getesteten Antibiotika gewonnen.

In Tab. 23 sind die Gattungen der Isolate aufgeführt, in deren Plasmid-DNA-Extrakten Resistenzgene mittels RT-qPCR nachgewiesen wurden. Alle sequenzierten Genabschnitte stimmten untereinander zu 100 % überein. Während die *blaZ*- und *tetM*-Gene sowohl in Gram-positiven als auch Gram-negativen Gattungen detektiert wurden, wurden β -Lactamase-Gene der OXA-2 Gengruppe nur in Gram-negativen Bakterien nachgewiesen. In der Gattung *Acinetobacter* wurden alle drei Resistenzgene bzw. -gengruppen detektiert. Der Abgleich der Gensequenzen der Isolate mit der NCBI-Datenbank zeigte eine hohe Übereinstimmung mit bereits hinterlegten Gensequenzen. So wies die 120 bp lange *tetM*-Gensequenz der Isolate eine hohe Übereinstimmung (> 99 %) mit Gensequenzen verschiedener *Staphylococcus*- und *Enterococcus*-Spezies auf. Zudem zeigte sich eine 100 %ige Übereinstimmung der 409 bp langen OXA-2-Gensequenz der Isolate mit den laut Datenbankeintrag teilweise auf Integrons, Transposons und Plasmiden lokalisierten Gensequenzen von Bakterien der Gattungen *Acinetobacter*, *Aeromonas*, und *Pseudomonas*.

Tabelle 23: In den Plasmid-DNA-Extrakten der Isolate mittels RT-qPCR nachgewiesene Gene/Gengruppen mit Auflistung der Gattungen, in denen die Gene detektiert wurden.

Gen/Gengruppe	Gattung
<i>blaZ</i>	<i>Acinetobacter</i> , <i>Chryseobacterium</i> , <i>Kocuria</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Sphingobacterium</i>
OXA-2	<i>Acinetobacter</i> , <i>Aeromonas</i> , <i>Brevundimonas</i> , <i>Raoultella</i>
<i>tetM</i>	<i>Acinetobacter</i> , <i>Brachybacterium</i> , <i>Chryseobacterium</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>Kocuria</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Sphingobacterium</i> , <i>Staphylococcus</i>

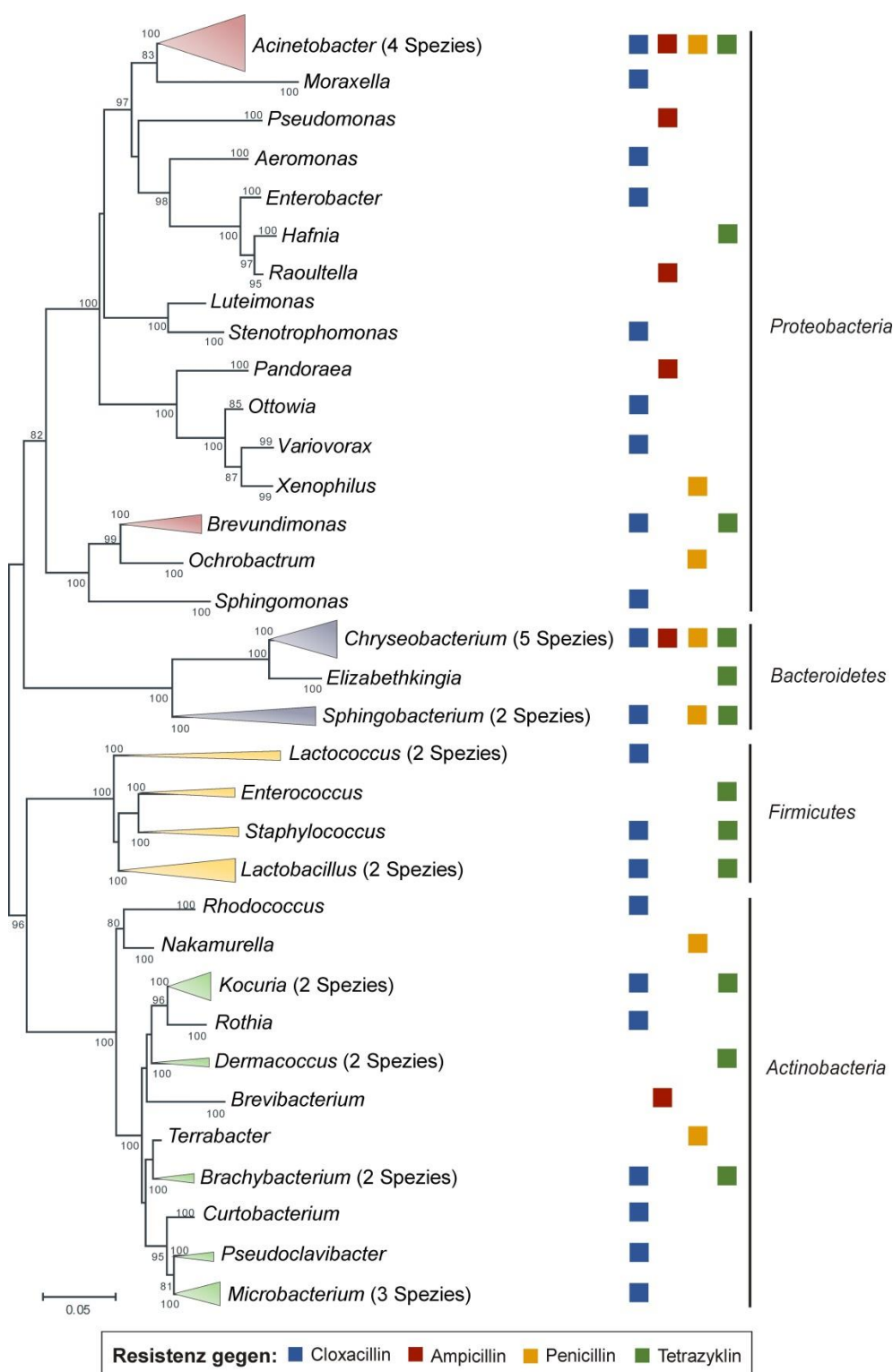


Abbildung 13: Phylogenetischer Stammbaum basierend auf den 16S rRNA Gensequenzen der antibiotikaresistenten Isolate. Dargestellt sind die Verwandtschaftsverhältnisse auf Gattungsebene. Dreiecke repräsentieren mehr als ein Isolat pro Gattung, ihre Höhe ist proportional zur Anzahl der Isolate. Die Anzahl verschiedener Spezies ist in Klammern hinter jeder Gattung angegeben. Die im Isolierungsmedium enthaltenen Antibiotika sind farblich hinter den Gattungsbezeichnungen gekennzeichnet.

3.4.3 Zusammenhang zwischen Zelldichte und Auftreten von Antibiotikaresistenzen

Abb. 14 zeigt den Zusammenhang zwischen der Zelldichte und der Häufigkeit des Auftretens von Antibiotikaresistenzen am Beispiel der Tetracyclinresistenz. Dabei sind die Daten aus dem molekularbiologischen und kultivierungsgestützten Ansatz für die jeweiligen Probenahmeorte farblich voneinander abgehoben. Betrachtet man die Datenpunkte für den Auslassstutzen des Milchsammeltanks (ST) und das Kunststoffrohr am Ende der Druckleitung (ED) für beide Ansätze, sowie den Datenpunkt für die Melkbecherablage (MBA) des kultivierungsgestützten Verfahrens, ergibt sich eine ansteigende Tendenz der Häufigkeit des Auftretens von Tetracyclin-Resistenzen mit steigender GKZ. Jedoch sind auch einige Ausreißer zu verzeichnen. Trotz relativ geringer Gesamtkeimzahlen wurden sowohl im molekularbiologischen als auch im kultivierungsgestützten Verfahren im Filterrohr (FR) verhältnismäßig viele Tetracyclinresistenzen nachgewiesen. Im DNA-Extrakt der Melkbecherablage wurden mittels RT-qPCR dagegen im Vergleich zur hohen GKZ verhältnismäßig wenig *tetM*-Gene nachgewiesen. Somit stellt dieser Punkt einen Ausreißer in die entgegengesetzte Richtung dar. Insgesamt ist kein eindeutiger Trend erkennbar, dass mit steigender Gesamtkeimzahl der Anteil der antibiotikaresistenten Mikroorganismen zunimmt.

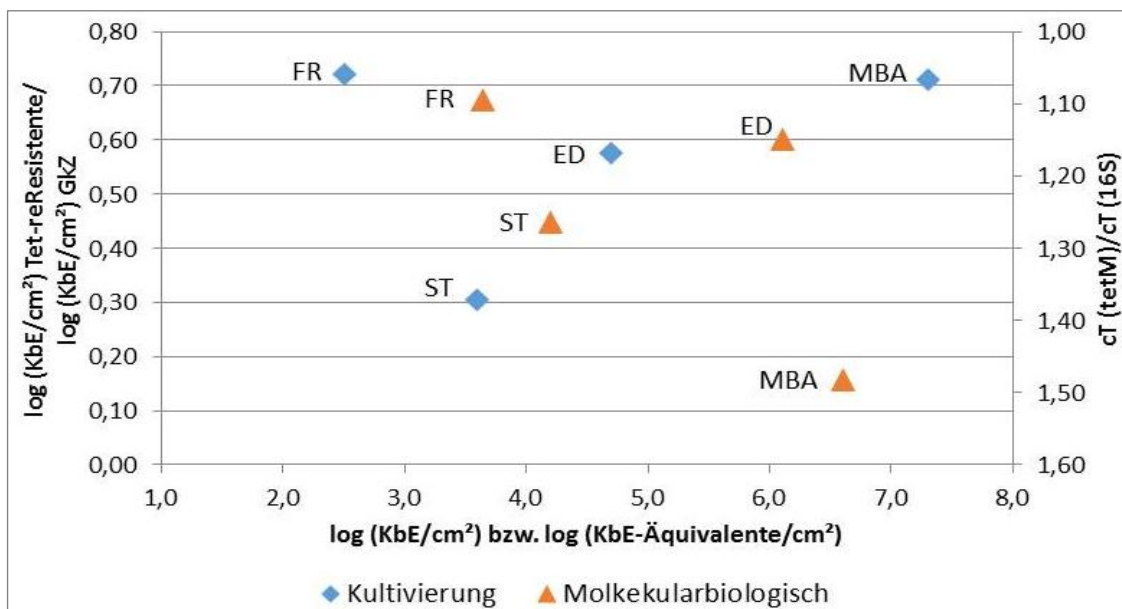


Abbildung 14: Zusammenhang zwischen Zelldichte und Häufigkeit des Auftretens von Antibiotikaresistenzen am Beispiel der Tetracyclin-Resistenz. Auf der Primärachse (links) sind die Datenpunkte für das kultivierungsgestützte Verfahren (blau), auf der Sekundärachse (rechts) die Datenpunkte für das molekularbiologische Verfahren (orange) aufgetragen. MBA, Melkbecherablage; FR, Filterrohr; ED, Kunststoffrohr am Ende der Druckleitung; ST, Auslassstutzen des Milchsammeltanks.

3.5 Biofilmbildungsfähigkeit

3.5.1 Biofilmbildung von Reinkulturen in Polystyrol-Mikrotiterplatten

Die Biofilmbildungsfähigkeit von insgesamt 168 identifizierten Isolaten aus den Tupferprobenahmen wurde in Polystyrol-Mikrotiterplatten getestet. Die Isolate wurden anhand ihrer Absorptionsintensitäten in sehr starke, starke, moderate und schwache Biofilmbildner eingeteilt (Abb. 28 im Anhang). In Tab. 42 im Anhang ist die Biofilmbildungsfähigkeit jedes getesteten Isolats bei 30 °C und 4 °C sowie in Glucose- und Lactose-haltiger TSB aufgeführt.

Tab. 24 stellt die Verbreitung der Fähigkeit zur Biofilmbildung innerhalb der Isolate dar. Zusätzlich sind die Anteile für die aus den Tupferproben und von den Edelstahlcoupons isolierten Bakterien getrennt aufgeführt. Von allen Isolaten zeigte etwa ein Drittel eine sehr starke bis moderate Biofilmbildung bei 30 °C in TSB. Jeweils ein weiteres Drittel entfiel auf schwache Biofilmbildner und Isolate ohne Biofilmbildung. Ähnliche Verteilungen ergaben sich auch in Lactose-TSB bei gleicher Inkubationstemperatur. Während in Lactose-TSB der Anteil sehr starker Biofilmbildner um 2 % sank, stieg der Anteil nicht Biofilm bildender Bakterien um 4 % im Vergleich zu TSB an. Betrachtet man Tupfer- und Coupon-Isolate getrennt voneinander, sind die Anteile der sehr starken und starken Biofilmbildner unter den Tupfer-Isolaten sowohl in TSB als auch in Lactose-TSB bei 30 °C deutlich höher als unter den Coupon-Isolaten. Letztere wiesen höhere Anteile von moderaten und schwachen Biofilmbildnern auf. Der Anteil der Coupon-Isolate ohne Biofilmbildung lag in TSB höher, in Lactose-TSB jedoch geringer als bei den Tupfer-Isolaten.

Bei einer Inkubationstemperatur von 4 °C waren in TSB etwa 55 % der getesteten Isolate zu mindestens schwachem Wachstum fähig. In Lactose-TSB lag der Anteil der wachstumsfähigen Isolate um etwa 10 % geringer. Dabei war kein Unterschied zwischen Tupfer- und Coupon-Isolaten zu beobachten. Bei der geringeren Inkubationstemperatur ging der Anteil der Biofilmbildner im Vergleich zu 30 °C stark zurück, sodass etwa 75 % der Isolate in TSB zu keiner Biofilmbildung mehr fähig waren. Der Anteil der nicht-Biofilmbildner war mit 68 % in Lactose-TSB geringer. Von den biofilmbildenden Isolaten zeigten insgesamt etwa 12 % eine starke bis sehr starke Biofilmbildung in TSB und Lactose-TSB. Während sich die Anteile der Biofilmbildner unter den Tupfer-Isolaten

in beiden Medien zu ungefähr gleichen Teilen auf sehr starke bis starke und moderate bis schwache Biofilmbildner aufteilen, fanden sich unter den Coupon-Isolaten bei Kühltemperaturen lediglich schwache Biofilmbildner. Dabei war der Anteil der schwachen Biofilmbildner in Lactose-TSB doppelt so hoch wie der Anteil in TSB.

Tabelle 24: Prozentuale Verteilung der sehr starken (Abs. 550 nm \geq 2,0), starken ($1,0 \leq$ Abs. 550 nm $<$ 2,0), moderaten ($0,5 \leq$ Abs. 550 nm $<$ 1,0) und schwachen ($0,1 \leq$ Abs. 550 nm $<$ 0,5) Biofilmbildner sowie der Isolate ohne Biofilmbildungsfähigkeit (Abs. 550 nm $<$ 0,1), aufgeteilt nach dem Inkubationsmedium (TSB bzw. Lactose (Lac)-TSB) und der Inkubationstemperatur (30 °C bzw. 4 °C). Die prozentuale Verteilung aller Isolate (Ges.) wird den Verteilungen der von den Tupferproben (T) und den in die Melkanlage verbrachten Edelstahlcoupons (C) stammenden Isolaten gegenübergestellt. Die Anzahl der untersuchten Isolate (n) ist jeweils in Klammern angegeben.

Bedingung	Herkunft	Biofilmbildungsfähigkeit (% Isolate)				
		Sehr stark	Stark	Moderat	Schwach	Keine Biofilmbildung
TSB, 30 °C	Ges. (n = 168)	16,1	8,3	12,5	29,8	33,3
	T (n = 119)	20,2	10,9	10,1	26,9	31,9
	C (n = 49)	6,1	2,0	18,4	36,7	36,7
Lac-TSB, 30 °C	Ges. (n = 163)	14,1	9,2	11,7	27,6	37,4
	T (n = 114)	16,7	10,5	8,8	23,7	40,4
	C (n = 49)	8,2	6,1	18,4	32,7	34,7
TSB, 4 °C	Ges. (n = 95)	7,4	4,2	1,1	12,6	74,7
	T (n = 67)	10,4	6,0	1,5	11,9	70,1
	C (n = 27)	0,0	0,0	0,0	14,8	85,2
Lac-TSB, 4 °C	Ges. (n = 79)	2,5	8,9	2,5	17,7	68,4
	T (n = 53)	3,8	13,2	3,8	11,3	67,9
	C (n = 24)	0,0	0,0	0,0	29,2	70,8

Beispielhaft für die häufig beobachteten stammspezifischen Unterschiede im Biofilmpotenzial sind in Abb. 15 die Unterschiede zwischen verschiedenen Isolaten der Spezies *Acinetobacter guillouiae* und *Kocuria salsicia* dargestellt. Während *A. guillouiae* M9 eine gleichbleibend hohe Biofilmbildung in TSB und Lactose-TSB bei 30 °C und in TSB bei 4 °C aufwies, sank die Absorption in Lactose-TSB bei 4 °C um etwa die Hälfte. Im Gegensatz dazu zeigte sich bei den Isolaten M207 und M226 eine gesteigerte Biofilmbildung bei 4 °C, allerdings ausschließlich in TSB. Zudem unterschieden sich die Absorptionswerte und damit das Ausmaß der Biofilmbildung zwischen den Isolaten. Das Isolat M188 zeigte ausschließlich in TSB bei 30 °C Biofilmbildungsvermögen, während M264 in keiner der getesteten Bedingungen ein Biofilmbildungspotenzial aufwies. Während alle *A. guillouiae*-Isolate zu starkem Wachstum bei 4 °C fähig waren, waren bei den dargestellten *Kocuria salsicia*-Isolaten erhebliche Unterschiede festzustellen. Das Isolat *K. salsicia* M309 wies im Gegensatz zu den anderen dargestellten Isolaten kein

Wachstum bei 4 °C auf. Trotz Wachstum bei 4 °C besaß bei dieser Temperatur keines der *K. salsicia*-Isolate die Fähigkeit zur Biofilmbildung. Während die Isolate M239 und M320 lediglich in Lactose-TSB Biofilmbildung zeigten, war das Ausmaß der Biofilmbildung von M300 und M309 in TSB und Lactose-TSB etwa gleich hoch.

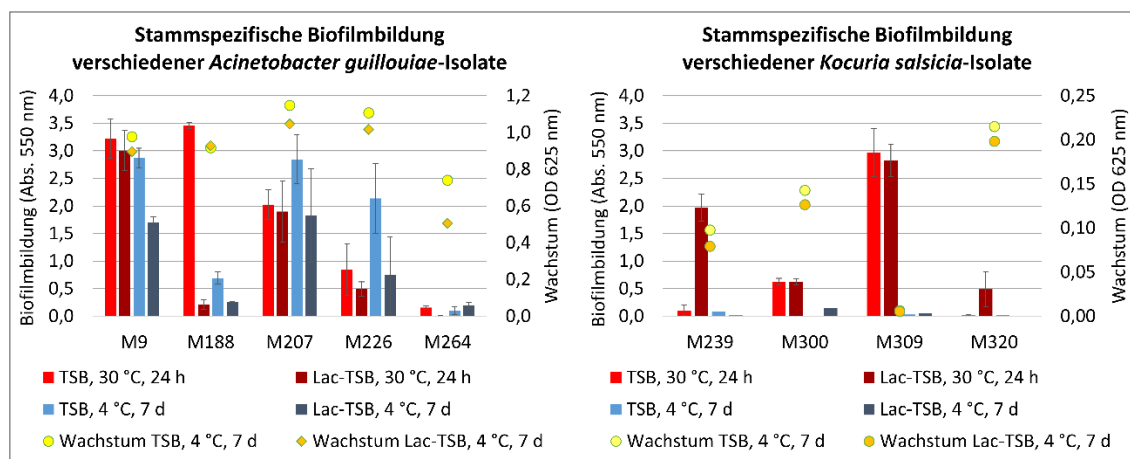


Abbildung 15: Stammspezifische Unterschiede im Biofilmbildungspotential verschiedener Isolate der Spezies *Acinetobacter guillouiae* (links) und *Kocuria salsicia* (rechts). Die Zahlen unter den Balken bezeichnen die verschiedenen Stämme. Neben den Absorptionswerten bei 550 nm als Kennwert für das Biofilmbildungsvermögen in TSB und Lactose-TSB bei 30 °C und 4 °C auf der Primärachse ist auf der Sekundärachse das Wachstum bei 4 °C als optische Dichte (OD) bei 625 nm aufgetragen.

In Abb. 16 ist für verschiedene Isolate der Einfluss von Kühltemperaturen (4 °C) auf die Biofilmbildung dargestellt. Etwa die Hälfte aller Isolate war bei 4 °C zu keinem Wachstum fähig. Ein Großteil der Isolate mit Wachstum bei 4 °C zeigte eine verringerte oder keine Biofilmbildung im Vergleich zur Inkubation bei 30 °C. Dies traf auch für die hier beispielhaft dargestellten Isolate der Gattungen *Raoultella*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas* und *Corynebacterium* zu. Während bei den meisten dargestellten Isolaten bei 4 °C überhaupt keine Biofilmbildung stattfand, zeigten *P. gessardii* M152 und *A. guillouiae* M188 lediglich eine verringerte Biofilmbildung, insbesondere in Lactose-TSB. Insgesamt gab es keine Isolate, die bei beiden Inkubationstemperaturen eine konstante Biofilmbildung aufwiesen. Wenige Isolate wiesen eine verstärkte Biofilmbildung bei 4 °C auf. Dabei handelte es sich um die *A. guillouiae*-Isolate M207 und M226 (nur TSB) sowie *Pantoea agglomerans* M31, *Pseudomonas poae/trivialis* M43 und *Pseudomonas koreensis* M92 in beiden Medien.

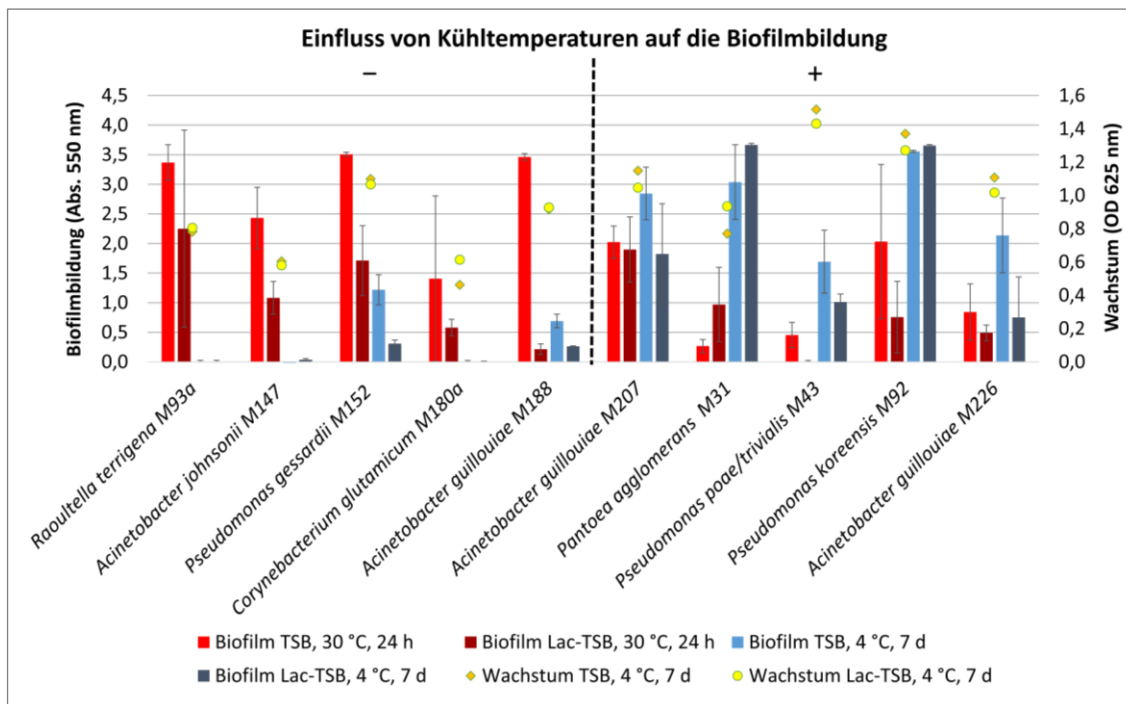


Abbildung 16: Einfluss der Inkubationstemperatur auf die Biofilmbildung. Dargestellt ist die Biofilmbildungsfähigkeit ausgewählter Isolate als Absorption bei 550 nm auf der Primärachse in TSB und Lactose-TSB bei 30 °C und 4 °C. Auf der Sekundärachse ist das Wachstum bei 4 °C als optische Dichte (OD) bei 625 nm aufgetragen. –: Verminderte Biofilmbildung bei 4 °C; +: verstärkte Biofilmbildung bei 4 °C.

In Abb. 17 ist der Einfluss des Austauschs von Glucose durch Lactose im Nährmedium auf die Intensität der Biofilmbildung dargestellt. Aufgeführt sind ausschließlich die Biofilmbildungsintensitäten bei 30 °C, da der Effekt von Lactose bei dieser Inkubationstemperatur am deutlichsten sichtbar war. Einige Isolate wiesen mit Lactose eine verringerte Biofilmbildung auf. Dazu gehörten neben den hier dargestellten Isolaten der Gattungen *Bacillus*, *Empedobacter* und *Pseudomonas* auch Isolate der Gattung *Acinetobacter* (z. B. M188 und M147, Abb. 15, 16). Neben der verminderten Biofilmbildungsintensität zeigte sich teilweise auch eine Destabilisierung des Biofilms unter Lactose-Einfluss, was durch erhöhte Standardabweichungen, z. B. bei *P. gessardii* M152, erkennbar war. Bei den meisten Isolaten hatte der Austausch der Kohlenstoffquelle im Nährmedium keinen Einfluss auf die Biofilmbildungsintensität. Dargestellt sind hier beispielhaft Isolate der Gram-negativen Spezies *Sphingobacterium spiritivorum*, *Serratia marcescens*, *Stenotrophomonas maltophilia* und *Paracoccus yeei*, sowie die Gram-positiven Isolate *Bacillus paralicheniformis* M33, *Kocuria kristinae* M230a und *Microbacterium flavum/lacticum* M310.

Viele Isolate reagierten auf den Austausch von Glucose durch Lactose mit gesteigerter Biofilmbildung. Auch hier waren stammspezifische Unterschiede erkennbar. Während die Isolate *Escherichia coli* M122 und *Microbacterium flavum/lacticum* M310 eine gleichbleibende Biofilmbildung mit Lactose aufwiesen, war bei den Isolaten M159 und M322 der jeweils selben Spezies eine stärkere Biofilmbildung unter Lactose-Einfluss zu beobachten. Zudem wiesen zwei verschiedene *Gordonia*-Spezies sowie Isolate der Spezies *Macrococcus caseolyticus*, *Sphingomonas olei/panaciterrae*, *Kocuria salsicia*, *Bacillus safensis* und *Chryseobacterium bovis* eine gesteigerte Biofilmbildung in Lactose-TSB auf. Während die meisten genannten Isolate auch in TSB bereits ein Biofilmbildungspotenzial besaßen, waren die Isolate *K. salsicia* M239, *C. bovis* M326, und *G. polyisoprenivorans* M328 ausschließlich bei Vorhandensein von Lactose zur ausgeprägten Biofilmbildung fähig.

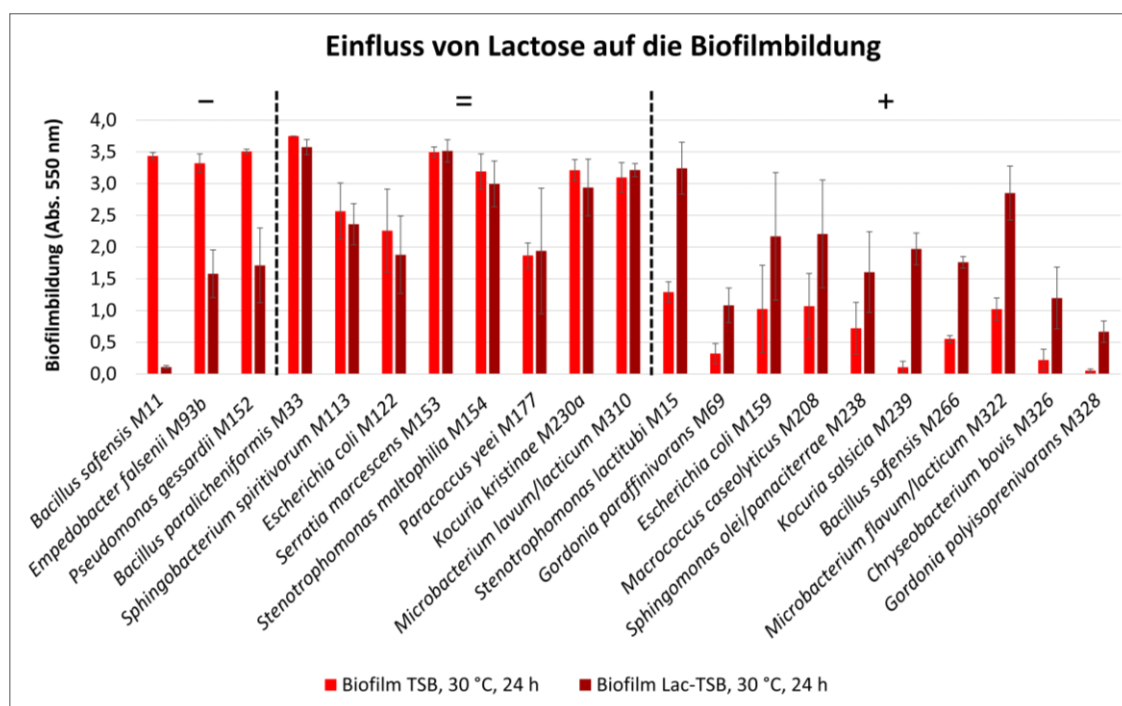


Abbildung 17: Einfluss des Austauschs von Glucose gegen Lactose im Nährmedium Trypton-Soja-Bouillon (TSB) auf die Biofilmbildung. Dargestellt ist die Biofilmbildungsfähigkeit ausgewählter Isolate als Absorption bei 550 nm in TSB (mit Glucose) und Lactose-TSB bei 30 °C. -: Verminderte Biofilmbildung mit Lactose; =: gleichbleibende Biofilmbildung mit Lactose +: verstärkte Biofilmbildung mit Lactose.

3.4.2 Reinigungs- und Desinfektionsmittelresistenz der Biofilme

Isolate, die in TSB bei 30 °C Biofilmbildungspotenzial aufwiesen, wurden weiter auf ihre Resistenz gegenüber den zur Reinigung und Desinfektion der Melkanlage eingesetzten Mitteln Circo Super SFM (sauer) und Circo Super AFM (alkalisch) in der vom Hersteller empfohlenen Konzentration von 0,4 % (v/v) getestet. In Abb. 18 sind die Biofilmintensitäten von Isolat gezeigt, die etwa gleich hohe Resistenzen gegenüber beiden Reinigungs- und Desinfektionsmitteln aufwiesen. Dabei gab es einerseits Isolate, bei denen weder die Behandlung mit A. dest. noch mit den Reinigungs- und Desinfektionsmitteln zu einer Reduzierung der Biofilme führte, wie *A. guillouiae* M9 und *D. nishinomiyaensis* M293a, andererseits führte bei den meisten hier dargestellten Isolaten die A. dest.- bzw. Reinigungs- und Desinfektionsmittelbehandlung zu einer Reduzierung der Biofilme zu gleichen Teilen. So zum Beispiel bei *S. marcescens* M27, *S. spiritivorum* M113, *A. johnsonii* M147 und *S. maltophilia* M154. Bei *B. paralicheniformis* M33 hatte die Behandlung mit A. dest. mit anschließendem Spülen der Mikrotiterplatte mit PBS-Puffer die stärkste reduzierende und destabilisierende Wirkung auf den Biofilm.

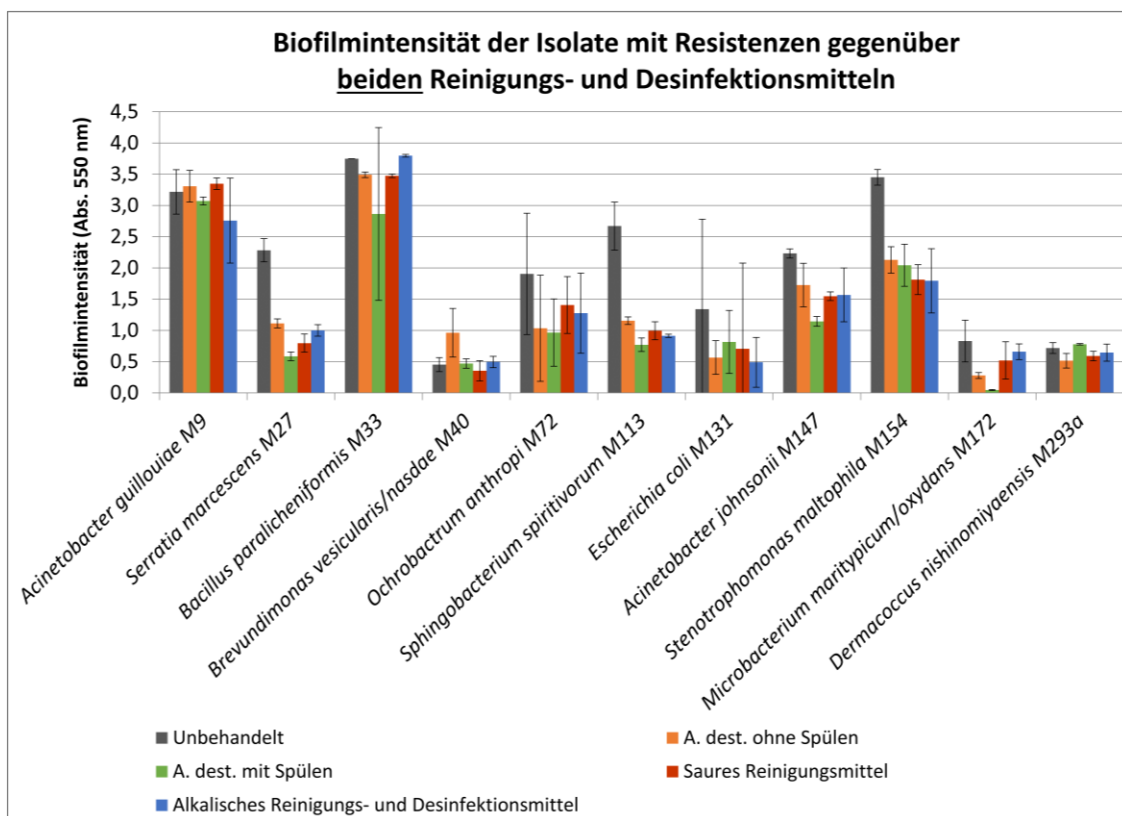


Abbildung 18: Beschreibung siehe nächste Seite...

Abbildung 18: Biofilmintensität als Absorption bei 550 nm von Isolaten mit etwa gleich hohen Resistenzen gegenüber beiden zur Reinigung und Desinfektion der Melkanlage eingesetzten Mitteln. Dargestellt ist außerdem die Intensität der unbehandelten Biofilme und nach der Behandlung mit A. dest.

Nur wenige Isolate wiesen eine ausgeprägtere Resistenz gegenüber dem sauren Reinigungsmittel auf. Diese sind in Abb. 19 dargestellt. Zu unterscheiden ist dabei zwischen den Isolaten, die ausschließlich gegenüber dem sauren Reinigungsmittel resistent waren, wie *C. haifense* M100 und *A. russicus* M292, und den Isolaten, die lediglich eine ausgeprägtere Resistenz gegenüber dem sauren Reinigungsmittel aufwiesen. Von diesen war die Wirkung des sauren Mittels bei den Isolaten *B. paralicheniformis* M14, *R. radiobacter* M186 und *M. flavum/lacticum* M310 schwächer als die Wirkung von destilliertem Wasser mit und ohne Spülen. Die Behandlung mit dem alkalischen Mittel führte bei allen dargestellten Isolaten zu einer starken Reduktion der Biofilme, sodass diese nur noch als schwach bis moderat eingestuft wurden. Lediglich *R. radiobacter* M186 wies auch nach der Behandlung mit dem alkalischen Mittel noch einen sehr starken Biofilm auf.

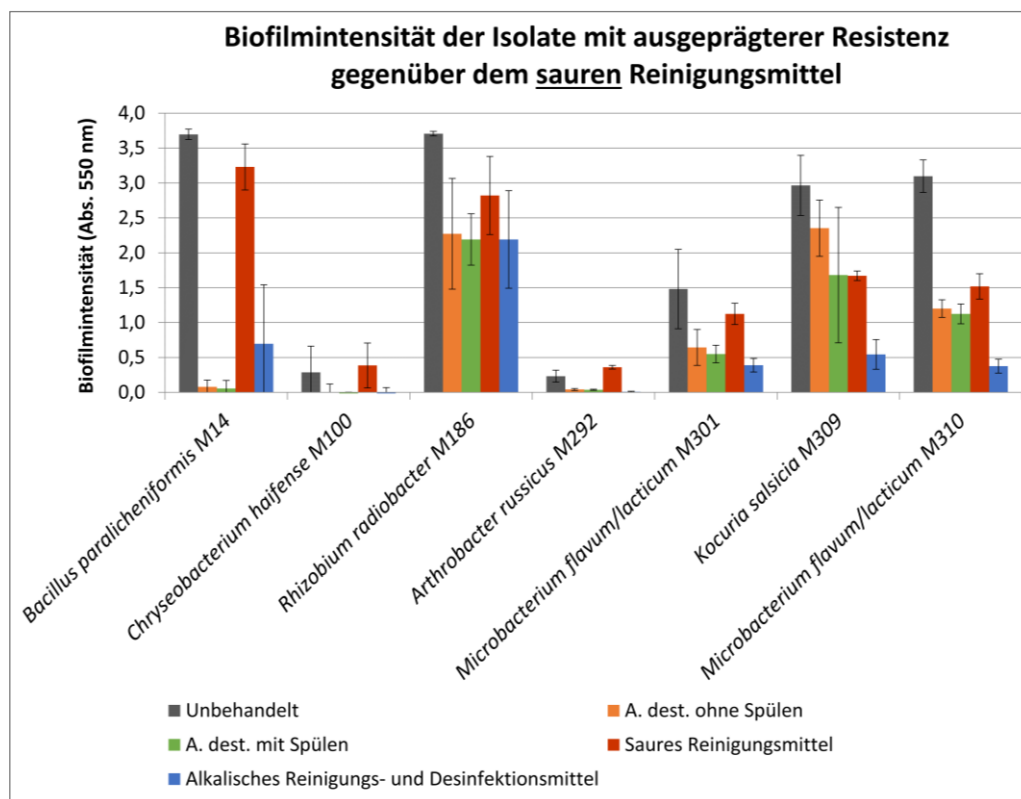


Abbildung 19: Biofilmintensität als Absorption bei 550 nm von Isolaten mit ausgeprägterer Resistenz gegenüber dem sauren zur Reinigung der Melkanlage eingesetzten Mittel Circo Super SFM. Dargestellt ist außerdem die Intensität der unbehandelten Biofilme und nach der Behandlung mit A. dest.

In Abb. 20 sind die Biofilmintensitäten der Isolate mit ausgeprägterer Resistenz gegenüber dem alkalischen Reinigungs- und Desinfektionsmittel dargestellt. Dieser Fall trat bei einer größeren Anzahl der getesteten Isolate auf, als eine ausgeprägtere Resistenz gegenüber dem sauren Mittel. Bei den Isolaten *S. lactitubi* M15, *M. maritypicum/oxydans* M29, *R. terrigena* M93a und *A. guillouiae* M176 hatte die Behandlung mit dem alkalischen Reinigungs- und Desinfektionsmittel im Vergleich zur unbehandelten Probe keinen Einfluss auf die Biofilme. Die Behandlung mit A. dest. oder dem sauren Mittel führte dagegen zu einer Reduktion des Biofilms. Während die meisten hier dargestellten Isolate keine oder nur sehr geringe Resistenzen gegenüber dem sauren Reinigungsmittel aufwiesen, wurden die Biofilme der Isolate *S. lactitubi* M15, *A. guillouiae* M176 und *K. kristinae* M245 nach Behandlung mit dem sauren Mittel weiterhin als moderat oder stark eingestuft.

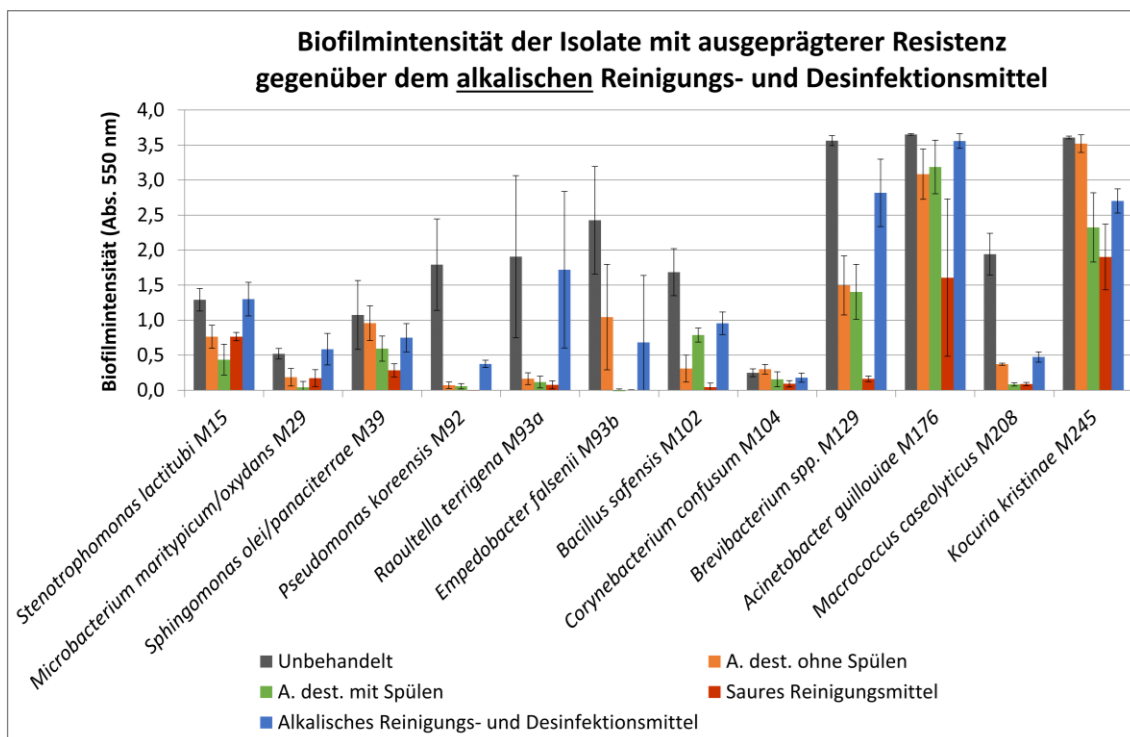


Abbildung 20: Biofilmintensität als Absorption bei 550 nm von Isolaten mit ausgeprägterer Resistenz gegenüber dem alkalischen zur Reinigung und Desinfektion der Melkanlage eingesetzten Mittel Circo Super AFM. Dargestellt ist außerdem die Intensität der unbehandelten Biofilme und nach der Behandlung mit A. dest.

Die Ergebnisse der Kristallviolettfärbung der unbehandelten Biofilme sowie nach Behandlung mit A. dest. und den Reinigungs- und Desinfektionsmitteln sind für alle getesteten Isolate in Tab. 43 im Anhang aufgeführt. Die Einstufung der Biofilmintensität nach der Behandlung wurde dabei nach dem in Abb. 28 im Anhang dargestellten Farbschema vorgenommen. Insgesamt führte die Reinigungs- und Desinfektionsmittelbehandlung nur bei wenigen Isolaten zur vollständigen Entfernung des Biofilms. Häufig war bereits eine deutliche biofilmreduzierende Wirkung einer 15-minütigen A. dest.-Behandlung erkennbar. Diese wurde teilweise durch die Reinigungs- und Desinfektionsmittelbehandlung verstärkt. In manchen Fällen erschien die Behandlung mit A. dest. sogar wirkungsvoller bei der Entfernung der Biofilme als die Reinigungs- und Desinfektionsmittelbehandlung.

Die Biofilme von Isolaten mit Resistenzen gegenüber einem oder beiden Mitteln wurden weiterhin auf ihre Zellviabilität nach der Reinigungs- und Desinfektionsmittelbehandlung getestet. Wie in Abb. 29 im Anhang dargestellt, unterschieden sich die Absorptionsintensitäten der unbehandelten Biofilme verschiedener Isolate stark voneinander, was einen direkten Vergleich der Zellviabilitäten zwischen den Isolaten nach Reinigungs- und Desinfektionsmittelbehandlung erschwerte. Um eine Vergleichbarkeit dennoch zu gewährleisten, wurden die Absorptionen der unbehandelten Biofilme im Weiteren als 100 % angenommen und die Absorptionen der mit sterilem Leitungswasser bzw. Reinigungs- und Desinfektionsmittel behandelten Proben als Prozentanteile dieser Absorption angegeben.

Die prozentualen Zellviabilitäten nach der Behandlung mit sterilem Leitungswasser bzw. mit dem sauren und alkalischen Reinigungs- und Desinfektionsmittel sind für alle 29 getesteten Isolate in Tab. 44 im Anhang angegeben. In den meisten Fällen bewirkte bereits die Behandlung mit Leitungswasser ohne Spülen eine drastische Reduktion der gemessenen Zellviabilität. Nur sehr wenige Isolate wiesen nach der Reinigungs- und Desinfektionsmittelbehandlung weiterhin geringe Zellviabilitäten, zumeist begleitet von hohen Standardabweichungen, auf.

Abb. 21 zeigt diejenigen Isolate, deren Biofilme auch nach der Reinigungs- und Desinfektionsmittelbehandlung noch Atmungsaktivitäten aufwiesen und somit noch lebende Zellen enthielten. Die meisten Viabilitätswerte lagen unterhalb von 10 %. Während die Behandlung mit Leitungswasser beim überwiegenden Anteil der Isolate

schon eine signifikante Reduktion der Zellviabilität bewirkte, wiesen die Biofilme der Isolate *A. guillouiae* M9, *S. maltophilia* M154, *R. radiobacter* M186, *K. salsicia* M239 und *K. kristinae* M245 nach der Behandlung mit Wasser ohne Spülen noch Viabilitäten zwischen 38,2 % und 90,6 % auf. Das zweimalige Spülen bewirkte aber auch bei diesen Isolaten bereits eine Abnahme der Werte auf unter 15 %. Messbare Atmungsaktivitäten nach der Behandlung sowohl mit dem sauren als auch mit dem alkalischen Reinigungs- und Desinfektionsmittel wiesen die Isolate *A. guillouiae* M9, *B. safensis* M102, *S. maltophilia* M154 und *K. kristinae* M245 auf. Letzteres zeigte die höchste noch messbare Zellviabilität von 32,1 % ($\pm 14,1$ %) nach Behandlung mit dem sauren Mittel. Ebenfalls geringe mittlere Zellviabilitäten, verbunden mit hohen Standardabweichungen, nach der Behandlung mit dem sauren Mittel zeigten sich für *R. terrigena* M93a, *E. falsenii* M93b und *K. salsicia* M239. Geringe Zellviabilitäten nach Behandlung mit dem alkalischen Mittel waren für die Isolate *A. guillouiae* M176, *B. paralicheniformis* M14, *P. gessardii* M152 und *R. radiobacter* M186 messbar.

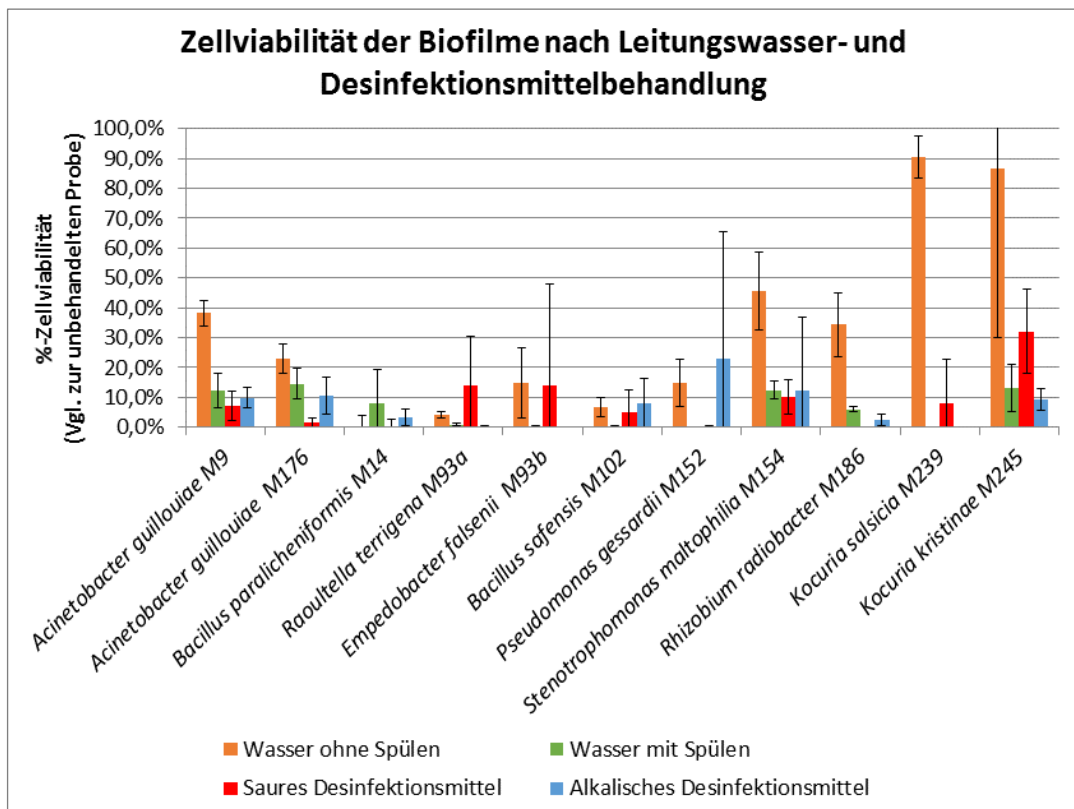


Abbildung 21: Prozentuale Zellviabilität der Biofilme nach Behandlung mit Leitungswasser mit und ohne anschließendes Spülen sowie nach Behandlung mit dem zur Reinigung und Desinfektion der Melkanlage eingesetztem sauren und alkalischen Mittel. Angegeben ist die prozentuale Absorption bei 430 nm im Vergleich zur unbehandelten Probe.

3.5.3 Biofilmbildung in Mischkultur

Um zu untersuchen, ob es bei der Biofilmbildung in Mischkultur zu synergistischen oder antagonistischen Effekten kommt, wurden Mischkulturen von Isolaten jeweils derselben Probenahme untersucht. In Abb. 22 ist für ausgewählte Isolate der zweiten Probenahme die Biofilmbildungsintensität für die Rein- und Mischkulturen graphisch dargestellt. Bei allen dargestellten Mischkulturen war eine deutliche Steigerung der Biofilmbildung im Vergleich zu den Reinkulturen feststellbar, teilweise allerdings mit hohen Standardabweichungen.

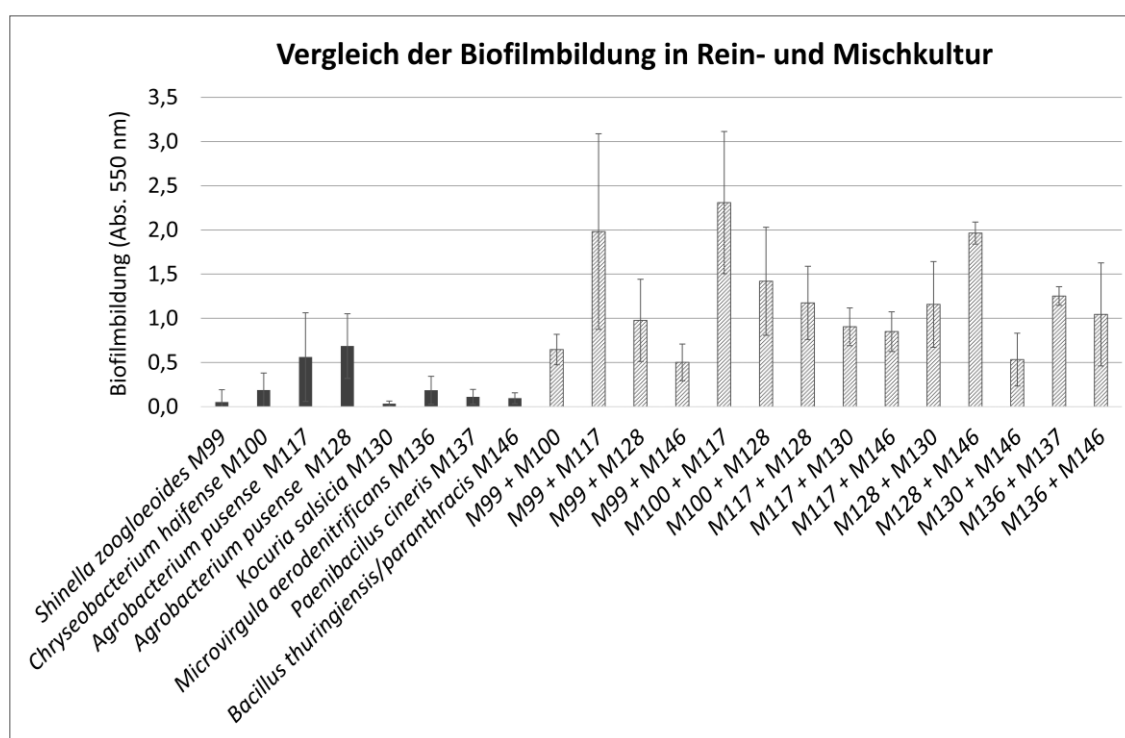


Abbildung 22: Biofilmbildung als Absorption bei 550 nm von ausgewählten Isolaten in Rein- und Mischkultur. Die Biofilmbildung der Reinkulturen ist in dunkelgrau dargestellt, die der Mischkulturen mit Musterfüllung. Bei allen Werten handelt es sich um Vierfachansätze; die Mischkulturen bestanden bei Animpfen der Mikrotiterplatten aus jeweils gleichen Teilen der auf dieselbe $OD_{625\text{ nm}}$ eingestellten Vorkulturen.

Die Grafik zeigt, dass die Isolate *Agrobacterium pusense* M117 und M128 und *Bacillus thuringiensis/paranthracis* M146 in Kombinationen mit mehreren anderen Isolaten sowie untereinander zu einer deutlich gesteigerten Biofilmbildung führten. Auffallend hohe Steigerungen mit geringen Standardabweichungen wiesen die Kombinationen aus *Shinella zoogloeoides* M99 und *Chryseobacterium haifense* M100 (+ 242,8 %), *S. zoogloeoides* M99 und *B. thuringiensis/paranthracis* M146 (+ 418,5 %) sowie *Microvirgula aerodenitrificans* M136 und *Paenibacillus cineris* M137 (+ 569,8 %) auf.

Eine prozentual betrachtet geringere Steigerung von 68,5 %, jedoch mit einer deutlich verringerten Standardabweichung im Vergleich zu den Reinkulturen, wies die Kombination aus *A. pusense* M128 und *B. thuringiensis/paranthracis* M146 auf.

In den Tab. 45 und 46 im Anhang sind für die Isolate der ersten und zweiten Probenahme die prozentualen Veränderungen der Biofilmbildung der Mischkulturen im Vergleich zur jeweiligen Reinkultur dargestellt. Die Zusammensetzung der Mischkulturen ist dafür in Tab. 47 im Anhang aufgeführt. Bei gesteigerter Biofilmbildung in Mischkultur bezieht sich die prozentuale Zunahme auf den höchsten Absorptionswert der Reinkulturen, bei verringerter Absorption auf den geringsten Absorptionswert der Reinkulturen. Befand sich die Absorption der Mischkultur im Bereich zwischen den beiden Reinkulturen, wurde von keiner Änderung der Biofilmbildungsintensität ausgegangen. Wie aus Tab. 45 im Anhang hervor geht, wurde besonders häufig eine gesteigerte Biofilmbildung für Mischkulturen mit den Isolaten *Staphylococcus cohnii* M34, *Pandoraea pnomenusa* M55 und *Gordonia paraffinivorans* M69 beobachtet. So wies die Mischkultur aus *S. cohnii* M34 und *Pantoea agglomerans* M31 eine um 443 % gesteigerte Biofilmbildung auf, während eine Kombination aus *S. cohnii* M34 und *Bacillus clausii* M75 sogar zu einer um 2645 % gesteigerten Biofilmbildung führte. In letzterem Fall war die Standardabweichung jedoch in etwa genauso hoch wie der Mittelwert der gemessenen Biofilmbildung. Mischkulturen aus *G. paraffinivorans* M69 und den Isolaten *Curtobacterium flaccumfaciens* M17, *S. cohnii* M34 und *B. clausii* M75 führten jeweils zu einer über 200 % gesteigerten Biofilmbildung. Auch wenn die Steigerungen der Mischkulturen von *P. pnomenusa* M55 und den Isolaten *Microbacterium flavum/lacticum* M51, *Microbacterium maritypicum/oxydans* M58 und *Leifsonia soli* M59 nur zwischen 107 und 176 % lagen, zeichneten sich die absoluten Werte durch geringe Standardabweichungen aus.

Neben der häufig zu beobachteten gesteigerten Biofilmbildung in Mischkultur wurde für einige Kombinationen, die das Isolat *M. maritypicum/oxydans* M58 enthielten, eine Verringerung der Biofilmbildung festgestellt. Besonders deutlich wurde dies in Kombination mit *Enterococcus faecalis* M60 (- 43,0 %), *G. paraffinivorans* M69 (- 78,6 %) und *Leifsonia soli* M81 (- 61,7 %).

3.5.4 Biofilmbildung auf Edelstahlcoupons

Da die meisten Melkanlagenbestandteile aus Edelstahl bestehen, wurde die Übertragbarkeit der mittels Mikrotiterplatten erzielten Ergebnisse auf die Biofilmbildung auf Edelstahlcoupons überprüft. Hierzu wurden Isolate ausgewählt, die sich in den Mikrotiterplattenversuchen als starke bis sehr starke Biofilmbildner zeigten.

In Abb. 23 sind die Biofilmbildungsintensitäten der Isolate auf den Edelstahlcoupons dargestellt. Die meisten Isolate wiesen auf Edelstahl im Vergleich zu den Polystyrol-Mikrotiterplatten eine deutlich geringere oder gar keine Biofilmbildungsfähigkeit auf. So lagen die Absorptionen bei 550 nm von *A. guillouiae* M9, *S. lactitubi* M15, *M. maritypicum/oxydans* M193 und *K. salsicia* M239 unter 0,5. Dies würde nach dem in der vorliegenden Arbeit angewendeten Schema (Abb. 28 im Anhang) eine Einstufung als schwache Biofilmbildner bedeuten. Eine weiterhin deutliche Biofilmbildung war für die Isolate *O. anthropi* M72, *E. falsenii* M93b, *A. johnsonii* M147 und *Brevibacterium spp.* M129 zu beobachten. Dabei stach besonders letzteres Isolat heraus, da es eine so starke Biofilmbildung aufwies, dass die Lösung vor der Absorptionsmessung verdünnt und der Wert anschließend hochgerechnet werden musste.

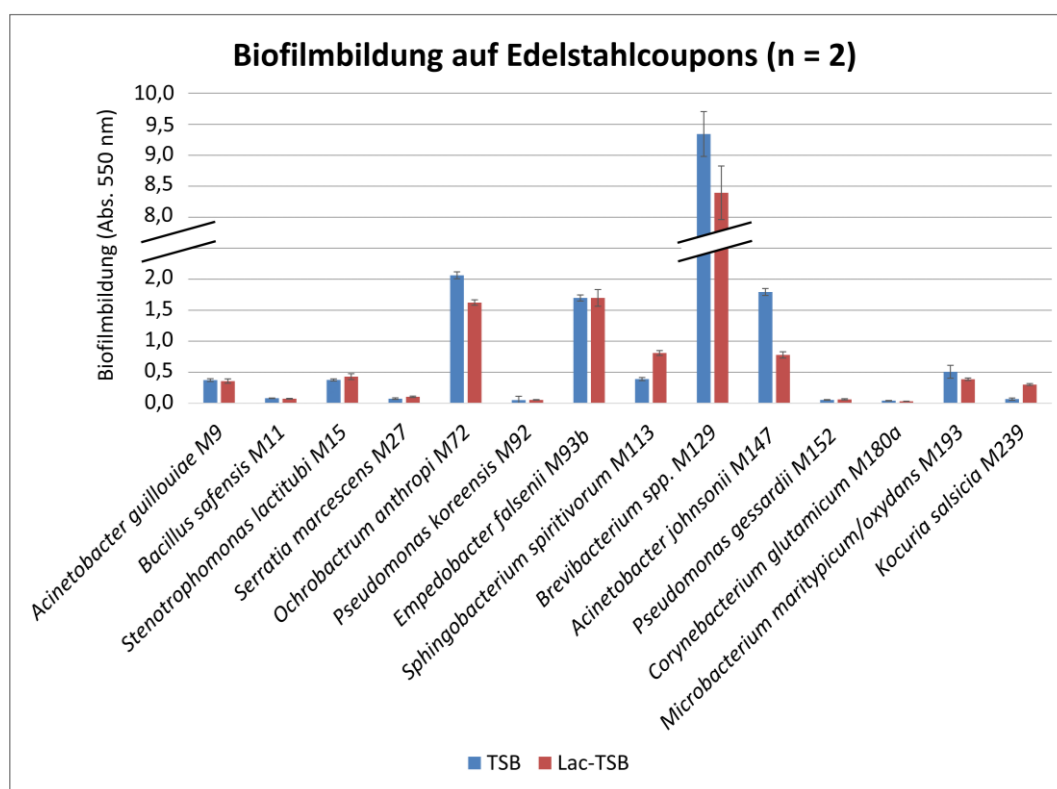


Abbildung 23: Biofilmbildung auf Edelstahlcoupons nach 24-stündiger Inkubation in TSB und Lactose-TSB bei 30 °C. Bei allen Messungen handelt es sich um Doppelmessungen.

3.6 Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung von Biofilmen

Zur weiteren kultivierungsunabhängigen Untersuchung wurden die in die Melkanlage verbrachten Edelstahlcoupons für die Durchführung von Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierungen (FISH) mit Oligonukleotidsonden hybridisiert. Da die Zellmorphologie in den PFA-fixierten Proben besser erhalten wurde als in den Ethanol-fixierten Proben, sind im weiteren nur mikroskopische Aufnahmen von PFA-fixierten Edelstahlcoupons gezeigt. Alle Coupons wurden vor der Hybridisierung einer Lysozymbehandlung unterzogen.

In Abb. 30 im Anhang sind verschiedene Problematiken gezeigt, die zu Schwierigkeiten bei der Auswertung führten. Zunächst waren nur sehr geringe Zelldichten auf den Edelstahlcoupons vorzufinden. So enthielten die meisten Sichtfelder keine oder nur sehr wenige Bakterienzellen, wie in den Aufnahmen A1-A3 gezeigt. In den Aufnahmen B1-B3 ist gezeigt, dass die Zellmorphologie von Einzelzellen, insbesondere bei dicht zusammengelagerten Zellansammlungen, nur schwer bis gar nicht erkennbar war. Somit war eine Auszählung zur Zellzahlbestimmung nicht möglich. Eine weitere Schwierigkeit ergab sich bei der Unterscheidung zwischen Bakterienzellen und unspezifischen Signalen, wie in den Aufnahmen C1-C3 und D1-D3 gezeigt.

Aufgrund der geringen Zellzahlen sowie der Schwierigkeiten bei der eindeutigen Identifizierung von Bakterienzellen durch unspezifische Signale und der dichten Zusammenlagerung zu Zellverbänden, ließen sich weder eine Quantifizierung noch eine Diversitätsbeurteilung der nachzuweisenden Bakteriengruppen verlässlich durchführen. Dennoch konnten auf den Coupons verschiedene Stadien der Biofilmbildung beobachtet werden.

In Abb. 24 sind verschiedene Aufnahmen dargestellt, die vier Phasen der Biofilmbildung zeigen sollen. Dabei ist zu beachten, dass die einzelnen Phasen ineinander übergehen und somit auch in den dargestellten Aufnahmen nicht immer eindeutig voneinander abgrenzbar waren. Alle Bilder zeigen die zusammengeführten Aufnahmen aus DAPI- und Cy3-/Cy5-Kanal. In den meisten Fällen handelt es sich um mit der Sonde Eub338 zum Nachweis aller Bakterien hybridisierte Coupons.

Wie bereits beschrieben, waren in den meisten Sichtfeldern des Mikroskops nur sehr wenige Einzelzellen erkennbar, wie auf den Bildern A1 und A2 gezeigt. Dennoch handelt es sich dabei um adhärierende Zellen, was die Grundvoraussetzung zur Phase 1 der

Biofilmbildung ist. Zudem wiesen die adhärierenden Zellen unterschiedliche Zellmorphologien von Kokken über Stäbchen verschiedener Längen auf, was darauf schließen lässt, dass es sich um verschiedene Bakteriengruppen handelte.

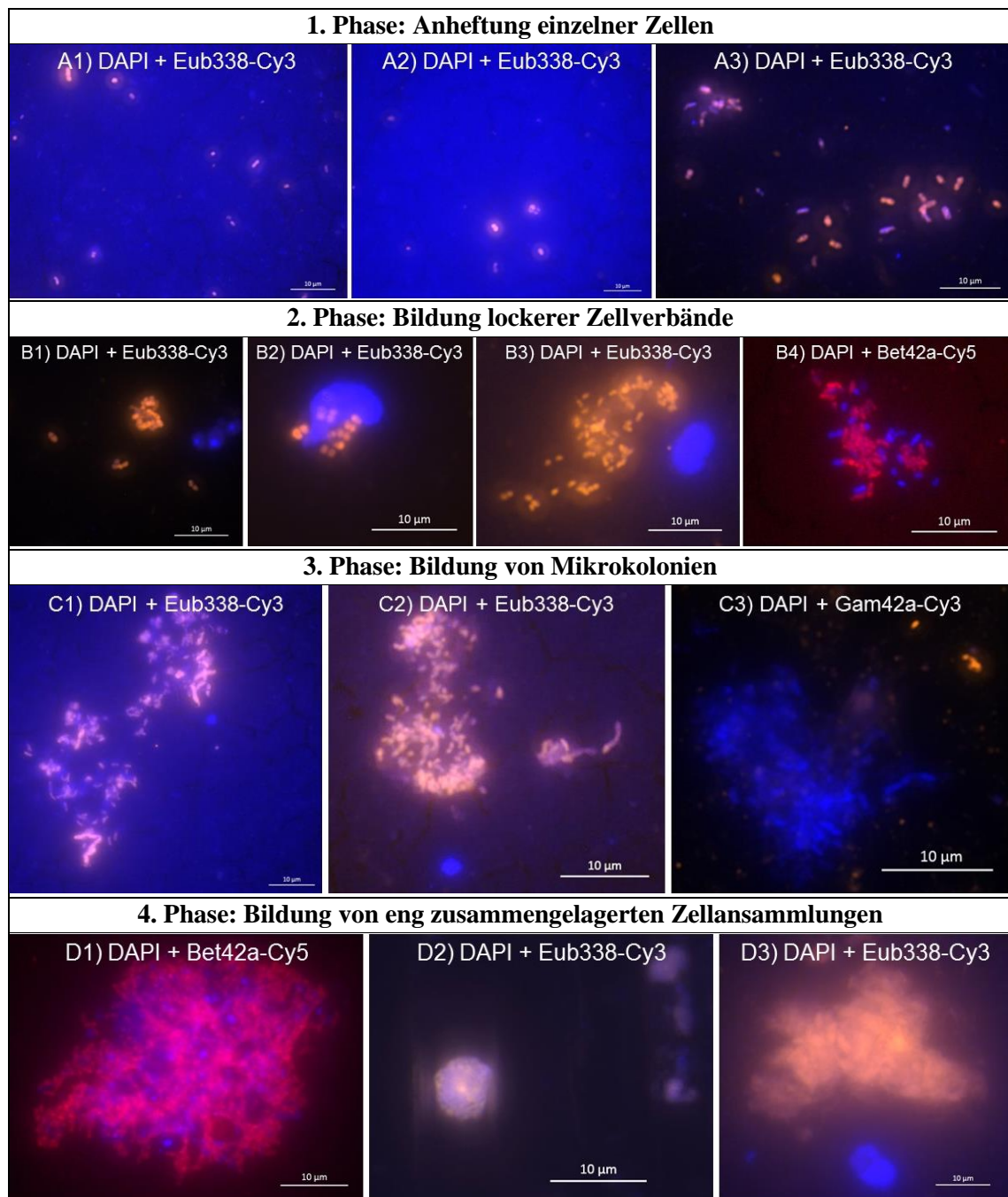


Abbildung 24: Verschiedene Phasen der Biofilmbildung auf in die Melkanlage eingebrachten Edelstahlcoupons, welche mittels Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung nachgewiesen wurden. Bei allen dargestellten Bildern handelt es sich um die zusammengeführten Aufnahmen aus DAPI- und Cy3- bzw. Cy5-Kanal. Alle Aufnahmen stammen von den für 48 h in der Melkanlage verbliebenen Coupons, lediglich Aufnahme D2 stammt von dem für 72 h exponierten Coupon. Gleiche Buchstaben kennzeichnen zusammengehörige Phasen der Biofilmbildung. Der dargestellte Maßstabsbalken auf jedem Bild entspricht einer Länge von 10 µm.

Im Bild A3 sind größere Zellansammlungen zu sehen, die teilweise bereits dichter zusammengelagert sind. Dies stellt den Übergang zu Phase 2 der für die Abbildung getroffenen Einteilung der Biofilmbildung dar: die Bildung von lockeren Zellverbänden. Dies ist auf den Bildern B1 bis B4 für weitere Zellverbände gezeigt. Dabei handelt es sich oftmals um Zellen mit ähnlicher Morphologie, wie Kokken in B2 oder kurze Stäbchen in B3. Dennoch war bereits in dieser Phase die räumliche Nähe von unterschiedlichen Zellen zu beobachten, wie in B1 zwischen ausschließlich DAPI-gefärbten Hefezellen und den in unmittelbarer Nähe befindlichen Bakterienzellen. Die Bildung eines gemischten Biofilms aus mit der Sonde Bet42a markierten *Betaproteobacteria*-Zellen und ausschließlich DAPI-gefärbten weiteren stäbchenförmigen Bakterienzellen ist in B4 zu sehen. In dieser Aufnahme besteht schon eine starke räumliche Nähe zwischen den Bakterienzellen, die den Übergang zu Phase 3, der Bildung von Mikrokolonien, kennzeichnet.

In den für die Bildung von Mikrokolonien repräsentativ dargestellten Bildern C1-C3 sind sehr dicht gepackte bakterielle Zellverbände sichtbar, die sich teilweise bereits überlagern und somit beginnen, räumliche Strukturen auszubilden. Während auf den Bildern C1 und C2 in den meisten Fällen einzelne Zellen noch voneinander unterschieden werden können, sind die Stäbchen in C3 bereits so dicht gepackt und überlagert, dass eine Differenzierung von Einzelzellen nur schwer möglich ist. Dies kennzeichnet den Übergang zu Phase 4, der Bildung von eng zusammengelagerten Zellansammlungen, bei denen keine Unterscheidung zwischen einzelnen Zellen unter dem Mikroskop mehr getroffen werden konnte. Diese Phase stellt ein fortgeschrittenes Stadium der Biofilmbildung dar und ist in den Bildern D1 bis D3 gezeigt. D1 zeigt erneut einen Biofilm aus stäbchenförmigen Zellen, die mit der Sonde Bet42a für *Betaproteobacteria* markiert sind. Offensichtlich handelt es sich auch hier um einen gemischten Biofilm, da einige Signale ausschließlich im DAPI-Kanal detektiert wurden. Während man in diesem Bild noch einzelne Bakterienzellen am Rand erkennen kann, ist das in den Bildern D2 und D3 nicht mehr möglich. Besonders D2 zeigt einen kompakten Verband aus sowohl DAPI- als auch Eub338-Cy3-gefärbten Zellen. Dieses Bild wurde von dem Coupon gemacht, der im Dezember 2015 für 72 Stunden in der Melkanlage verblieben ist, während alle anderen Bilder von Coupons aufgenommen wurden, die für 48 Stunden in die Melkanlage eingebracht wurden. Auf allen Aufnahmen des für 72 Stunden in der Melkanlage verbliebenen Coupons konnten lediglich wie in D2 dargestellte kompakte Zellklumpen mittels FISH detektiert werden, während auf den für 48 Stunden in der

Melkanlage verbliebenen Coupons verschiedene Stadien der Biofilmbildung gleichzeitig auftraten, wie in den weiteren Bildern von Abb. 24 gezeigt.

Auf den Bildern A1, C1 und C2 sind rissartige Strukturen sichtbar, die im DAPI-Kanal an vielen Stellen der Edelstahlcoupons erkennbar waren und möglicherweise die Oberflächenbeschaffenheit des Edelstahls widerspiegeln.

3.7 Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Biofilmen

In Abb. 25 sind die elektronenmikroskopischen Aufnahmen des Isolats *Kocuria salsicia* M239 auf einem Edelstahlcoupon nach Inkubation in Lactose-TSB dargestellt. In der geringsten Vergrößerung sieht man einen massiven Biofilm, der an einigen Stellen aus mehreren Schichten der kokkoiden Zellen zu bestehen scheint. Bei stärkerer Vergrößerung ist zu erkennen, dass die Oberflächenstruktur deutlich sichtbare Unebenheiten und Rillen aufweist. In diesen lagern sich vermehrt die Bakterienzellen von *K. salsicia* M239 ein.

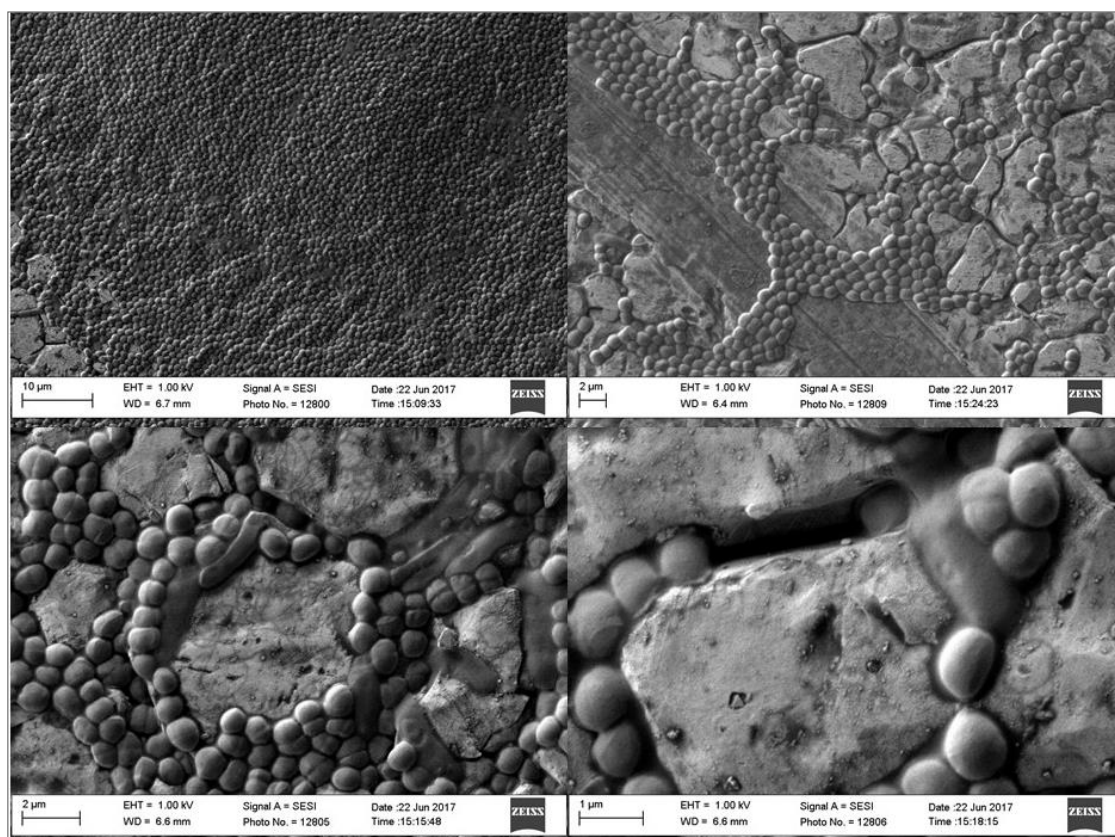


Abbildung 25: Elektronenmikroskopische Aufnahmen des Isolats *Kocuria salsicia* M239 auf einem Edelstahlcoupon nach Inkubation in Lactose-TSB (30 °C, 24 h). Durchgeführt und zur Verfügung gestellt von Matthias Mail, INRES, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.

Abb. 26 zeigt die elektronenmikroskopischen Aufnahmen von *A. guillouiae* M9 auf einem fabrikneuen Kunststoffschlauch wie dem in der Melkanlage nach Inkubation in TSB. Hier traten aufgrund der gebogenen Oberfläche des Schlauchstücks sowie durch mögliches Ausdampfen des Kunststoffs beim Anlegen des Hochvakuums zum Mikroskopieren einige Probleme auf, die zu deutlich unschärferen Aufnahmen und überbelichteten Stellen im Vergleich zu Abb. 25 führten. Dennoch ist ein deutlicher Biofilm von *A. guillouiae*-Zellen zu erkennen, der fast die gesamte Oberfläche bedeckt. Die Bakterienzellen im Biofilm bildeten hier wabenartige Strukturen aus und scheinen sich im Gegensatz zu den *K. salsicia*-Zellen auf dem Edelstahlcoupon nicht zu überlagern. Verglichen mit der Edelstahloberfläche konnte auf der unbesiedelten Kunststofffläche keine so starke Oberflächenstruktur mit Rillen und Unebenheiten beobachtet werden. Neben den Bakterienzellen waren an einigen Stellen fadenförmige Strukturen zu erkennen, die die Bakterienzellen teilweise umgaben.

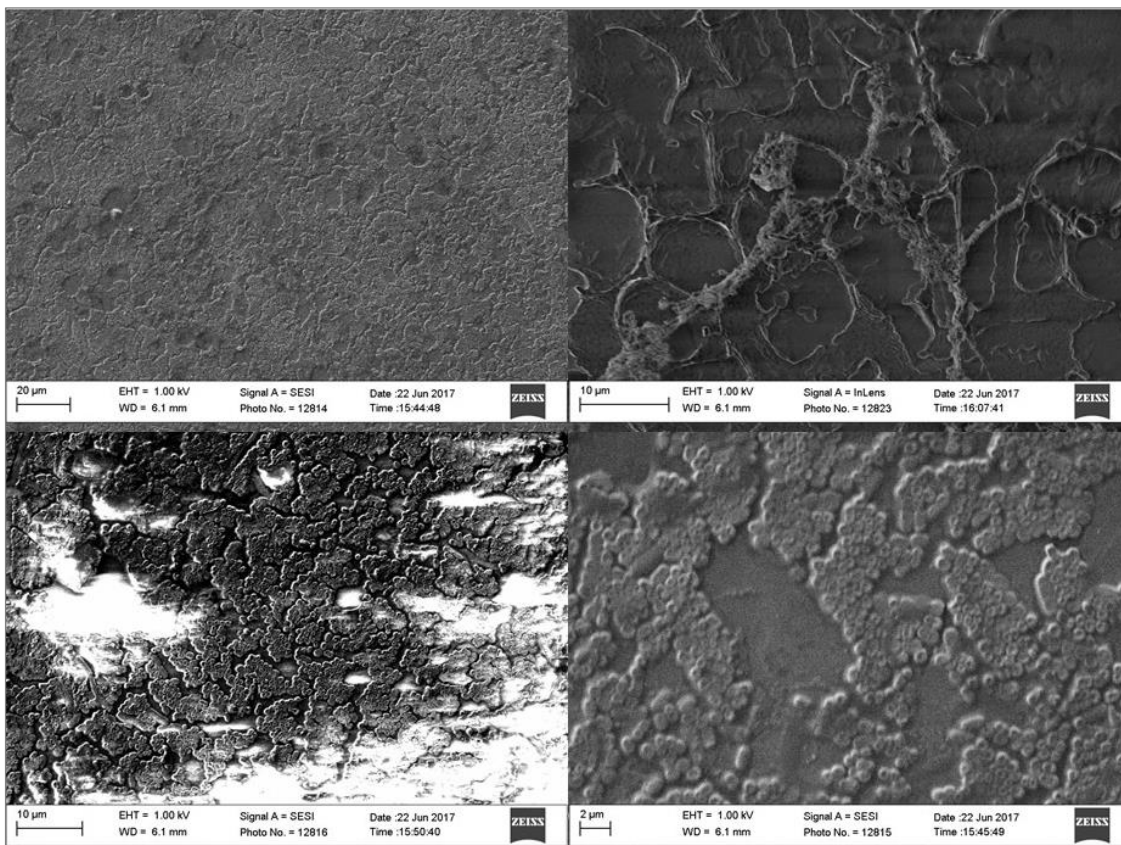


Abbildung 26: Elektronenmikroskopische Aufnahmen des Isolats *Acinetobacter guillouiae* M9 auf einem Stück Kunststoffschlauch nach Inkubation in TSB (30 °C, 24 h). Durchgeführt und zur Verfügung gestellt von Matthias Mail, INRES, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.

3.8 Differentielle Genexpression von Biofilm-Isolaten in Glucose und Lactose

Die Isolate *Acinetobacter guillouiae* M9 und *Kocuria salsicia* M239 zeigten unterschiedliches Biofilmbildungsverhalten in Glucose- und Lactose-haltiger TSB. So wies *A. guillouiae* M9 in Mikrotiterplattentests eine nur geringfügig stärker ausgeprägte Biofilmbildung in Glucose-TSB auf, während *K. salsicia* M239 eine deutlich stärkere Biofilmbildung in Lactose-TSB zeigte. Aufgrund dieser Befunde wurden die beiden Isolate ausgewählt, um Transkriptomanalysen zur differentiellen Genexpression bei Biofilmbildung in Glucose- bzw. Lactose-haltiger TSB durchzuführen. Um die daraus hervorgehenden Ergebnisse besser auf die Biofilmbildung in der Melkanlage beziehen zu können, wurden Biofilme auf Edelstahlcoupons herangezogen.

Abb. 31 im Anhang zeigt die auf Agarosegele aufgetragenen RNA-Extrakte für beide Isolate und Medien sowie für jede der drei biologischen Replikate. Während zwischen den RNA-Extrakten von *A. guillouiae* M9 aus Glucose- und Lactose-haltiger TSB kein sichtbarer Konzentrationsunterschied feststellbar war, konnte eine deutlich höhere RNA-Konzentration für alle drei Extrakte von *K. salsicia* M239 aus Lactose-TSB im Vergleich zu Glucose-haltiger TSB beobachtet werden.

In Abbildung 32 im Anhang ist das Ergebnis der Hauptkomponenten-Analyse (PCA) für die Genexpression der jeweils drei biologischen Parallelen pro Inkubationsmedium (Glucose- vs. Lactose-haltige TSB) dargestellt. Bei *A. guillouiae* M9 war Komponente 1 für 40,4 % aller beobachteten Unterschiede in der Genexpression verantwortlich, Komponente 2 für 30,1 % der beobachteten Unterschiede. Die Messpunkte der Ansätze 1 und 2 der jeweils selben Kondition (Glucose- vs. Lactose-TSB) clusterten nah nebeneinander, während die Messpunkte der unterschiedlichen Bedingungen deutliche Unterschiede aufwiesen. Dies zeigt, dass ein Unterschied im Genexpressionsmuster des Stammes unter den gewählten Konditionen zu erwarten war. Der dritte Ansatz beider Konditionen clusterte jeweils weit entfernt von den Parallelansätzen 1 und 2.

Bei *K. salsicia* M239 war Komponente 1 für 54,1 % aller beobachteten Unterschiede in der Genexpression verantwortlich, während Komponente 2 24,7 % der Unterschiede ausmachte. Bei diesem Isolat zeigten sich deutliche Unterschiede bei den drei biologischen Replikaten aus Lactose-TSB, während alle drei Replikate aus Glucose-TSB zusammen clusterten. Da die Genexpressionsdaten unter den verschiedenen Konditionen beider Isolate dennoch entfernt voneinander clustern, kann davon ausgegangen werden,

dass Unterschiede in der Genexpression vorhanden waren, die sich auf die Inkubation in den verschiedenen Medien zurückführen lassen und nicht zufallsbedingt sind.

Um zu ermitteln, in welcher Wachstumsphase sich die Isolate bei der RNA-Extraktion befanden, wurden Wachstumskurven in Glucose- und Lactose-haltiger TSB erstellt, die unter leichtem Schütteln bei 30 °C inkubiert wurden. Die Wachstumskurven sind in Abb. 33 im Anhang dargestellt. Es zeigte sich eine deutlich längere Lag-Phase des Isolats *K. salsicia* M239 von etwa vier Stunden in beiden Medien im Vergleich zum Isolat *A. guillouiae* M9, welches keine messbare Lag-Phase aufwies. Dieses Isolat erreichte deutlich schneller die stationäre Phase nach etwa sieben bis acht Stunden Inkubationszeit, während *K. salsicia* M239 erst nach etwa 18-22 Stunden in die stationäre Phase übergang. Der genaue Zeitpunkt des Eintritts in die stationäre Phase konnte in den dargestellten Messungen nicht genau bestimmt werden. Eine zweite Messung (Daten nicht gezeigt) bestätigte, dass *K. salsicia* M239 in beiden Medien nach 15-18 Stunden in die stationäre Phase übergang. Die Wachstumskurven desselben Isolats in Glucose- und Lactose-TSB unterschieden sich entweder gar nicht (*A. guillouiae* M9) oder nur minimal (*K. salsicia* M239). *K. salsicia* M239 zeigte ein etwas langsames Wachstum in Lactose-TSB im Vergleich zu Glucose-TSB.

Die RNA-Extraktion von *A. guillouiae* M9 erfolgte nach etwa 12 Stunden Inkubation. Dabei war die gemessene OD_{625 nm} in Glucose-TSB mit etwa 1,2 höher als in Lactose-TSB mit etwa 0,8. Dennoch zeigen die Wachstumskurven, dass sich das Isolat zum Zeitpunkt der RNA-Extraktion in der spätexponentiellen bzw. beginnenden stationären Phase befand. Um ebenfalls eine OD_{625 nm} des Kulturüberstandes von 0,5 zu erreichen, musste das Isolat *K. salsicia* M239 vor der RNA-Extraktion etwa 15 Stunden inkubiert werden. Auch in diesem Fall lag die OD_{625 nm} in allen drei Parallelansätzen in Glucose-TSB mit etwa 1,3 fast doppelt so hoch wie in Lactose-TSB mit 0,6-0,7. Die Wachstumskurven zeigten, dass das Isolat sich zu diesem Zeitpunkt am Ende der exponentiellen Phase befunden hat. Die Unterschiede der OD_{625 nm} in Lactose-TSB zum gemessenen Zeitpunkt können mit dem langsameren Wachstum des Isolats in Lactose-TSB erklärt werden.

In den Tab. 25 und 26 sind Übersichten über die Anzahl der differentiell exprimierten Gene von *A. guillouiae* M9 und *K. salsaicia* M239 dargestellt. Dabei wird zwischen differentiell positiv und negativ in Glucose exprimierten Genen unterschieden. Zusätzlich findet eine Unterteilung in verschiedene Ausmaße der differentiellen Genexpression, gemessen am fold-change, statt. Ein positiver fold-change-Wert von 5 sagt zum Beispiel aus, dass das entsprechende Gen in Glucose-TSB fünfmal stärker exprimiert wurde, als in Lactose-TSB. Weiterhin werden in den Tabellen verschiedene Abstufungen der Signifikanz anhand der statistischen Kenngrößen p-Wert (p), False Discovery Rate (FDR) und Bonferroni-Wert (B) angegeben. Statistisch signifikante Angaben sind zu erwarten, wenn p und FDR jeweils kleiner als 0,05 sind und der Bonferroni-Wert 0,1 nicht überschreitet. Bei einigen Genen, insbesondere denjenigen mit hohen fold-changes, wurde für alle statistischen Kenngrößen ein Wert von 0 angegeben, sodass keine Aussage über die statistische Signifikanz des Befundes gemacht werden konnte.

Bei den meisten Genen mit hohem fold-change von über 5 handelte es sich um differentiell negativ exprimierte Gene, das heißt, sie wurden in Glucose schwächer als in Lactose exprimiert. Viele Gene mit fold-changes über 2 wiesen geringe statistische Signifikanzen auf (eine oder mehrere der Kenngrößen überstieg den Grenzwert für statistische Signifikanz) bzw. waren statistisch nicht signifikant.

Besonders große Unterschiede zwischen den Anzahlen differentiell positiv und negativ in Glucose exprimierter Gene waren für das Isolat *K. salsaicia* M239 zu beobachten. Bei diesem Isolat war die Anzahl der in Glucose schwächer exprimierten Gene mit fold-changes zwischen 2 und 5 dreimal höher als die der stärker exprimierten Gene.

Für das Isolat *A. guillouiae* M9 wurden insgesamt etwa doppelt so viele differentiell exprimierte Gene aufgelistet als für das Isolat *K. salsaicia* M239. Davon wies etwas mehr als die Hälfte fold-changes von über 1,2 auf. Von den insgesamt 2.545 aufgelisteten Genen von *K. salsaicia* M239 zeigten etwa 75 % fold-changes von über 1,2.

Tabelle 25: Zusammenfassung der differentiellen Genexpression von *Acinetobacter guillouiae* M9. Neben der Einteilung nach differentiell positiv und negativ in Glucose-TSB exprimierten Genen erfolgt eine Abstufung nach dem Ausmaß der Veränderung (fold-change). Zudem sind die Zeilen nach absteigenden statistischen Signifikanzen anhand des p-Wertes (p), False Discovery Rate (FDR) und Bonferroni-Wert (B.) geordnet. Für statistisch signifikante Ergebnisse gilt: $p \leq 0,05$; $FDR \leq 0,05$ und $B. \leq 0,1$ (hervorgehoben).

<i>Acinetobacter guillouiae</i> M9		Differentiell positiv	Differentiell negativ
fold-change $\geq 5,0$	insgesamt	42 (1 %)	119 (3 %)
	p, FDR $\leq 0,05$; B. $\leq 0,1$	5	10
	p, FDR $\leq 0,05$; B. $> 0,1$	8	4
	p $\leq 0,05$; FDR $> 0,05$; B. $> 0,1$	2	1
	p, FDR $> 0,5$; B. $> 0,1$	21	7
	p = FDR = B. = 0	6	97
2,0 \leq fold-change $< 5,0$	insgesamt	256 (6 %)	197 (5 %)
	p, FDR $\leq 0,05$; B. $\leq 0,1$	72	98
	p, FDR $\leq 0,05$; B. $> 0,1$	64	34
	p $\leq 0,05$; FDR $> 0,05$; B. $> 0,1$	30	10
	p, FDR $> 0,5$; B. $> 0,1$	78	20
	p = FDR = B. = 0	12	35
1,2 \leq fold-change $< 2,0$	insgesamt	1.041 (25 %)	1.114 (27 %)
	p, FDR $\leq 0,05$; B. $\leq 0,1$	44	54
	p, FDR $\leq 0,05$; B. $> 0,1$	247	282
	p $\leq 0,05$; FDR $> 0,05$; B. $> 0,1$	148	184
	p, FDR $> 0,5$; B. $> 0,1$	602	594
	p = FDR = B. = 0	0	0
Gene insgesamt		2185	1981

Tabelle 26: Zusammenfassung der differentiellen Genexpression von *Kocuria salsicia* M239. Neben der Einteilung nach differentiell positiv und negativ in Glucose-TSB exprimierten Genen erfolgt eine Abstufung nach dem Ausmaß der Veränderung (fold-change). Zudem sind die Zeilen nach absteigenden statistischen Signifikanzen anhand des p-Wertes (p), False Discovery Rate (FDR) und Bonferroni-Wert (B.) geordnet. Für statistisch signifikante Ergebnisse gilt: $p \leq 0,05$; $FDR \leq 0,05$ und $B. \leq 0,1$ (hervorgehoben).

<i>Kocuria salsicia</i> M239		Differentiell positiv	Differentiell negativ
fold-change $\geq 5,0$	insgesamt	7 (0,3 %)	92 (4 %)
	p, FDR $\leq 0,05$; B. $\leq 0,1$	0	13
	p, FDR $\leq 0,05$; B. $> 0,1$	1	14
	p $\leq 0,05$; FDR $> 0,05$; B. $> 0,1$	0	12
	p, FDR $> 0,5$; B. $> 0,1$	1	30
	p = FDR = B. = 0	5	23
2,0 \leq fold-change $< 5,0$	insgesamt	109 (4 %)	304 (12 %)
	p, FDR $\leq 0,05$; B. $\leq 0,1$	86	140
	p, FDR $\leq 0,05$; B. $> 0,1$	9	52
	p $\leq 0,05$; FDR $> 0,05$; B. $> 0,1$	2	18
	p, FDR $> 0,5$; B. $> 0,1$	6	77
	p = FDR = B. = 0	6	17
1,2 \leq fold-change $< 2,0$	insgesamt	773 (30 %)	689 (27 %)
	p, FDR $\leq 0,05$; B. $\leq 0,1$	66	38
	p, FDR $\leq 0,05$; B. $> 0,1$	272	207
	p $\leq 0,05$; FDR $> 0,05$; B. $> 0,1$	88	76
	p, FDR $> 0,5$; B. $> 0,1$	347	368
	p = FDR = B. = 0	0	0
Gene insgesamt		1.163	1.382

Die Tab. 27 und 28 zeigen ausgewählte in Glucose-TSB jeweils differentiell positiv bzw. negativ exprimierte Gene des Isolats *A. guillouiae* M9. Dabei sind die Gene nach übergeordneten Funktionsbereichen gruppiert. Die Tab. 48 und 49 im Anhang zeigen eine vollständige Darstellung hoch- bzw. herunterregulierter Gene. Neben dem \log_2 fold-change und den statistischen Kenngrößen ist in den Tabellen im Anhang zudem, wenn möglich, die Anzahl ähnlicher Gene, die ebenfalls hoch- oder herunterreguliert wurden, angegeben. Dies war eher für bestimmte Genfamilien, wie Phagen-Proteine oder Transporter, und weniger für Enzym-codierende Gene möglich.

Wie in den Tab. 27 und 48 im Anhang dargestellt, waren bei Inkubation in Glucose-TSB auffällig viele LSU ribosomale Proteine von *A. guillouiae* M9 im Vergleich zur Inkubation in Lactose-TSB stärker exprimiert. Zudem wurden einige Pilus-codierende Gene bei der Biofilmbildung in Glucose verstärkt exprimiert, von denen die meisten jedoch statistisch nicht signifikant waren, oder die Signifikanz nicht beurteilt werden konnte. Dennoch wiesen die von den Genen *sfmC* und *sfmH* codierten Fimbrien-Chaperone bzw. Fimbrien-ähnliche Adhäsine signifikant um die Faktoren 4,6 bzw. 2,5 verstärkte Expressionen in Glucose-TSB auf. Weiterhin wurde in Glucose-TSB eine Vielzahl Phagen-assoziiierter Gene verstärkt exprimiert. Insgesamt wurden 47 Gene Phagen-assoziierten Proteinen zugeordnet.

Zu den stressassoziierten Genen, die in Glucose im Vergleich zu Lactose verstärkt exprimiert wurden, zählten mehrfach solche, die für Resistenzen gegenüber Schwermetallen wie Kupfer oder Tellur codierten. Dabei handelte es sich um Oxidasen (z. B. Kupfer-Oxidase), oder um verschiedene Schwermetall-Effluxtransporter, unter anderem Gene der *czc*-Familie (Cobalt-Zink-Cadmium-Resistenzproteine). Zusätzlich waren mehrere Superoxiddismutasen in Glucose hochreguliert. Bei fast allen genannten Genen handelte es sich um statistisch signifikante Befunde.

Neben den bereits genannten Schwermetall-Effluxtransportern wurden bei Inkubation von *A. guillouiae* M9 in Glucose-TSB vermehrt Protein-Sekretionssysteme der Typen I, II und IV exprimiert. Auch weitere Protein-/Biopolymer-Transporter wiesen eine verstärkte Genexpression auf. Insgesamt wurden 21 Gene als Siderophor-Transporter und entsprechende Ferrichrom-Eisen-Rezeptoren identifiziert. Bei fast allen sprachen alle drei statistischen Kenngrößen für eine signifikant stärkere Expression in Glucose-TSB. Zusätzlich zu den Siderophoren wurden weitere Eisenion-Transporter signifikant stärker

in Glucose exprimiert. Mehrere in Glucose hochregulierte Gene codierten für Aminosäure- (*gltJ*-Gene), Dipeptid- (*dpp*-Gene) oder Oligopeptid- (*opp*-Gene) Transporter. Insgesamt drei Gene der *pst*-Familie, die für Phosphationen-Transporter codieren, waren ebenfalls in Glucose-TSB stärker exprimiert als in Lactose-TSB. Bei allen genannten Genen sprachen p-Wert und FDR für statistisch signifikante Ergebnisse, jedoch war der Bonferroni-Wert größer als 0,1.

In Glucose-TSB waren Gene für den Lactat- und Propionat-Metabolismus signifikant stärker exprimiert als in Lactose-TSB. Dabei handelte es sich bei erstgenannten Genen sowohl um Transporter zur Aufnahme von Lactat, Lactat-abhängige Transkriptions-Regulatoren sowie die in Tab. 27 repräsentativ für die Lactat-Verwertung aufgeführte Lactat-Dehydrogenase.

Eine deutlich verstärkte Expression wies das für die Dihydrofolat-Synthase/Folylpolyglutamat-Synthase codierende Gen auf. Dieses Enzym ist am Folsäure-Metabolismus beteiligt. Diverse Gene des Lipid-Metabolismus waren bei Inkubation von *A. guillouiae* M9 in Glucose-TSB verstärkt exprimiert. Dabei handelte es sich sowohl um Gene, die für den Abbau von Fettsäuren mittels beta-Oxidation codierten, als auch um Gene zur Fettsäure-Biosynthese.

Diverse konjugative Transferegene der *tra*-Familie wurden in Glucose-TSB verstärkt exprimiert. Dabei handelte es sich häufig um Transferegene für IncF-Plasmide. Aufgrund von Bonferroni-Werten von über 0,1 handelte es sich bei vielen Genen um statistisch nicht eindeutig signifikante Befunde. Allerdings waren das in Tab. 27 repräsentativ aufgeführte *traA*-Gen sowie die Gene *traD* und *trbI* anhand aller drei statistischen Kenngrößen signifikant verstärkt exprimiert.

Jeweils um den Faktor 2 signifikant stärker in Glucose-TSB exprimiert waren Gene, die der Zellwandorganisation bzw. der Peptidoglykan- und Teichonsäure-Biosynthese zugeordnet wurden. Die verstärkte Expression von drei Genen der Phospholipid-Biosynthese konnte anhand des Bonferroni-Wertes von 1,0 statistisch nicht eindeutig als signifikant eingestuft werden.

Diverse Gene, unter anderem die in Tab. 27 aufgeführten für Citrat-Lyase und Phosphoenolpyruvat-Carboxylase codierenden Gene, konnten funktionell dem Citrat-Zyklus bzw. Tricarboxylsäure (TCA)-Zyklus und damit dem Energiestoffwechsel zugeordnet werden. Die aufgeführten Gene wiesen höhere Werte als den Bonferroni-

Grenzwert von 0,1 für statistische Signifikanz auf, können anhand von p-Wert und FDR dennoch als relevant betrachtet werden.

Verschiedene Effektoren der Genregulation waren in Glucose-TSB hochreguliert. Dabei handelte es sich um das für ein Toxin-Antitoxin (TA)-System codierende Gen *relE*, Gene zur Synthese bzw. Hydrolyse des second messengers c-di-GMP sowie um Sensorinasen von Zwei-Komponenten-Systemen (TCS), wie CheA. Nicht alle Befunde waren statistisch signifikant. Weitere Gene, die in Glucose-TSB differentiell stärker exprimiert wurden, waren unter anderem *piuB*, welches für einen Eisen-Uptake-Faktor codiert, sowie ein für das Zeta-Toxin codierendes Gen. Bei beiden handelte es sich um signifikante Befunde.

Tabelle 27: Ausgewählte differentiell stärker in Glucose exprimierte Gene von *Acinetobacter guillouiae* M9. Die Gene sind jeweils repräsentativ für einen übergeordneten Funktionsbereich angegeben. Die den Genen zugewiesenen GO-Term-Funktionen sowie der \log_2 fold-change der Genexpression und die statistischen Kenngrößen p-Wert, False Discovery Rate (FDR) und Bonferroni-Wert sind ebenfalls angegeben. Folgende Kriterien gelten für statistisch signifikante Ergebnisse: $p \leq 0,05$; $FDR \leq 0,05$; $Bonferroni \leq 0,1$.

Ausgewählte differentiell <u>positiv</u> exprimierte Gene, d. h. Glucose > Lactose					
Genbezeichnung/ Protein	GO-Term-Funktionen	\log_2 fold-change	p-Wert	FDR	Bonferroni
Translation					
LSU ribosomales Protein L36p	Bestandteil von Ribosomen, Translation	8,8	$1,3 \cdot 10^{-4}$	0,001	0,55
Pilus/Adhäsion/Biofilmbildung					
<i>fimA</i> (Typ I Fimbrien Untereinheit A)	Pilus-Assembly, Adhäsion	2,6	0	0	0
CsuA (Typ I Pilus Protein)	Pilus	1,8	0,009	0,04	1,0
SfmH (Fimbriae-like Adhäsion)	Pilus, Adhäsion	1,3	$4,3 \cdot 10^{-5}$	$4,1 \cdot 10^{-4}$	0,19
PilH (Twitching motility Protein)	Phosphorelay-Signaltransduktionssystem	0,6	0,03	0,1	1,0
FlgJ (Flagellenprotein, Peptidoglycan-Hydrolase)	Flagellum-Assembly, Zellwandorganisation	0,9	$3,9 \cdot 10^{-7}$	$5,4 \cdot 10^{-6}$	0,002
Phagen-assoziierte Proteine					
Phagen-Protein		2,5	$1,5 \cdot 10^{-7}$	$2,1 \cdot 10^{-6}$	$6,3 \cdot 10^{-4}$
Reaktion auf Stimulus/Stress					
Mangansuperoxiddismutase	Antioxidative Aktivität, Entfernung von Superoxidionen, Antwort auf div. Stressoren	1,9	$1,9 \cdot 10^{-6}$	$2,3 \cdot 10^{-5}$	$8,0 \cdot 10^{-3}$

Tabelle 27 Fortsetzung...

Ausgewählte differentiell <u>positiv</u> exprimierte Gene, d. h. Glucose > Lactose					
Genbezeichnung/ Protein	GO-Term-Funktionen	log ₂ fold- change	p- Wert	FDR	Bon- ferroni
Transmembrantransport					
<i>gspD</i> (Genereller Sekretionsweg Protein D)	Proteinsekretion über den Typ II-Sekretionsweg	0,9	1,5 · 10 ⁻⁷	2,1 · 10 ⁻⁶	6,3 · 10 ⁻⁴
VirB11 (ATPase für Assembly des Typ IV-Sekretionskomplexes und Sekretion des T-DNA-Komplexes)	Sekretion durch Typ IV-Sekretionssystem	1,1	1,1 · 10 ⁻¹²	2,5 · 10 ⁻¹¹	4,8 · 10 ⁻⁹
TonB-abhängiger Rezeptor, Rezeptor für Ferrierterochelin und Colicine	Siderophor-Transport	1,3	6,7 · 10 ⁻¹⁰	1,2 · 10 ⁻⁸	2,9 · 10 ⁻⁶
CzcC-Familie (Schwermetall-RND-Efflux Protein)	Efflux-Transmembran-Transport	1,0	2,4 · 10 ⁻⁶	2,9 · 10 ⁻⁵	0,01
MotA/TolQ/ExbB (Protonenkanal-Familie)	Transmembrantransport von Proteinen	1,1	1,9 · 10 ⁻¹¹	3,9 · 10 ⁻¹⁰	8,2 · 10 ⁻⁸
GltL (Glutamat-/Aspartat-Transport, ATP-bindendes Protein)	Transmembrantransport von Aminosäuren (Glutamat/Aspartat)	0,9	1,6 · 10 ⁻⁶	2,0 · 10 ⁻⁵	0,007
Lactat-Metabolismus					
D-Lactat-Dehydrogenase	Lactat-Oxidation, Atmungskette, Transmembrantransport	1,3	5,6 · 10 ⁻¹⁴	1,4 · 10 ⁻¹²	2,4 · 10 ⁻¹⁰
Propionat-Metabolismus					
2-Methylnitrat- <i>cis-trans</i> -Isomerase	Propionat-Katabolismus, 2-Methylcitratzyklus	1,0	5,9 · 10 ⁻⁹	9,8 · 10 ⁻⁸	2,5 · 10 ⁻⁵
Folsäure-Metabolismus					
Dihydrofolat-Synthase/ Folylpolyglutamat-Synthase	Folsäure-Biosynthese, Cofaktor-Biosynthese	5,3	5,6 · 10 ⁻¹⁶	1,5 · 10 ⁻¹⁴	2,4 · 10 ⁻¹²
Lipid-Metabolismus					
3-Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase	Fettsäure-beta-Oxidation	1,6	1,7 · 10 ⁻⁹	3,0 · 10 ⁻⁸	7,3 · 10 ⁻⁶
Biotin-Carboxyl-Carrier Protein der Acetyl-CoA-Carboxylase	Fettsäurebiosynthese, Malonyl-CoA-Biosynthese	0,8	4,1 · 10 ⁻⁶	4,6 · 10 ⁻⁵	0,02
Fettsäure-Desaturase	Biosynthese ungesättigter Fettsäuren	1,5	1,1 · 10 ⁻⁴	9,6 · 10 ⁻⁴	0,48
Horizontaler Gentransfer (HGT)					
TraA (Konjugatives Transfer-Protein/Relaxase)	Konjugation	1,5	4,5 · 10 ⁻¹³	1,1 · 10 ⁻¹¹	2,0 · 10 ⁻⁹
Zellwandorganisation/Peptidoglykan-Biosynthese					
(Peptidoglykan-) Glykosyltransferase	Peptidoglykan-Biosynthese, Zellwandorganisation	1,0	4,0 · 10 ⁻⁶	4,5 · 10 ⁻⁵	0,02
Poly-(Glycerol-Phosphat)-alpha-Glucosyltransferase	Teichonsäure-Biosynthese, Zellwandorganisation	0,9	9,8 · 10 ⁻⁷	1,3 · 10 ⁻⁵	0,004
Phospholipid-Metabolismus					
Glycerol-3-phosphat-Acyltransferase	Phospholipid-Biosynthese	0,7	7,8 · 10 ⁻⁴	0,005	1,0

Tabelle 27 Fortsetzung...

Ausgewählte differentiell <u>positiv</u> exprimierte Gene, d. h. Glucose > Lactose					
Genbezeichnung/ Protein	GO-Term-Funktionen	log ₂ fold- change	p- Wert	FDR	Bon- ferroni
Citrat-Zyklus/Tricarboxylsäure (TCA)-Zyklus					
Citrat-Lyase	Acetyl-CoA-Metabolismus	1,0	1,9 · 10 ⁻⁸	3,0 · 10 ⁻⁷	8,3 · 10 ⁻⁵
Phosphoenolpyruvat-Carboxylase	Tricarboxylsäurezyklus, Oxalacetat-Metabolismus	0,6	7,6 · 10 ⁻⁵	6,9 · 10 ⁻⁴	0,33
Regulation der Genexpression					
RelE	Toxin-Antitoxin-System	1,0	4,4 · 10 ⁻⁴	3,2 · 10 ⁻³	1,0
Diguanylat-Cyclase/ Phosphodiesterase	c-di-GMP-Synthese/ Hydrolyse	0,9	0,03	0,1	1,0
CheA (Histidin-Kinase)	Zwei-Komponenten-System	0,7	7,0 · 10 ⁻⁵	6,4 · 10 ⁻⁴	0,3
Diverse Gene					
PiuB (Eisen-Uptake-Faktor)	Oxidoreduktase-Aktivität, FMN-Bindung	1,3	2,1 · 10 ⁻¹⁵	5,7 · 10 ⁻¹⁴	9,1 · 10 ⁻¹²
Zeta-Toxin		1,0	1,8 · 10 ⁻⁹	3,3 · 10 ⁻⁸	8,0 · 10 ⁻⁶

Die Tab. 28 und 49 im Anhang zeigen ausgewählte in Glucose-TSB differentiell negativ, d. h. im Vergleich zur Inkubation in Lactose-TSB herunterregulierte Gene von *A. guillouiae* M9. Auch diese sind nach Funktionsbereichen geordnet. In Tab. 49 im Anhang ist zusätzlich, falls möglich, die Gesamtanzahl funktionell ähnlicher Gene angegeben. Neben dem log₂ fold-change sind die statistischen Kenngrößen p-Wert, FDR und Bonferroni-Wert angegeben.

Verschiedene Gene des Schwefel-Metabolismus waren bei Inkubation von *A. guillouiae* M9 in Lactose-TSB stärker exprimiert. Dabei handelte es sich neben Sulfat- und Thiosulfat-Transportern der *cys*-Genfamilie um Gene, die für Enzyme der Sulfat-Assimilation codieren, wie die in Tab. 28 repräsentativ aufgeführte Thioredoxin-abhängige Phosphoadenylyl/Adenylyl-Sulfat-Reduktase. Zusätzlich wurden insgesamt sechs Dibenzothiophen-Entschwefelungsenzyme codierende Gene vermehrt in Lactose-TSB exprimiert, von denen eines in Tab. 28 aufgeführt ist. Das entsprechende Gen wies nur knapp statistische Signifikanz anhand des p-Wertes und der FDR auf. Der Bonferroni-Wert von 1,0 überschritt deutlich den Signifikanz-Grenzwert von 0,1. Bei allen anderen Genen des Schwefelmetabolismus waren die statistischen Kenngrößen mit Null

angegeben, sodass die statistische Relevanz der Befunde nicht abschließend beurteilt werden kann.

Ebenfalls mit fehlenden Signifikanz-Kennwerten, jedoch mehrfach mit Faktoren zwischen 42- und 111-fach in Lactose-TSB stärker exprimiert waren Gene des Alkansulfonat-Metabolismus. Dabei handelte es sich in den meisten Fällen um Alkansulfonat-Transporter, aber auch um Alkansulfonat-abhängige Transkriptionsfaktoren sowie um eine Alkansulfonat-Monooxygenase, die repräsentativ in Tab. 28 aufgelistet ist. Ähnliches gilt für Gene des Taurin-Metabolismus. Auch hier waren die statistischen Kenngrößen zur Beurteilung der Signifikanz mit Null angegeben, jedoch wiesen insgesamt sechs Gene Taurin-bindende/-transportierende oder katabolische Funktionen auf. Als Beispiele sind in Tab. 28 ein Gen der *tau*-Taurintransportfamilie sowie ein für eine Taurin-Dioxygenase codierendes Gen aufgeführt.

Ebenso wie die bereits erwähnten in Glucose-TSB hochregulierten Gene des Eisen-Transportes wurden auch einige entsprechende herunterregulierte Gene detektiert. Hierbei handelte es sich um Bacterioferritin-codierende Gene sowie um TonB-abhängige Eisen-Siderophor-Transporter. Von der Anzahl überwogen mit insgesamt 21 Proteinen mit ähnlicher Funktion allerdings die in Glucose verstärkt exprimierten Eisen-Siderophor-Transporter gegenüber den neun herunterregulierten.

Im Vergleich zu den in Glucose-TSB verstärkt exprimierten Transporter-codierenden Genen, unter denen oftmals RND-Efflux-Transporter zu finden waren, befanden sich unter den herunterregulierten Genen deutlich mehr ABC-Transporter mit verschiedenen Substraten. Unter den insgesamt 19 ABC-Transportern waren besonders viele Methionin- und Taurin-Transporter zu finden. Die meisten ABC-Transporter wiesen hohe negative fold-change-Werte auf, allerdings waren alle statistischen Kenngrößen mit Null angegeben, sodass keine abschließende Aussage über die statistische Signifikanz der vermehrten Expression in Lactose-TSB möglich ist. Ebenfalls unter den in Lactose-TSB hochregulierten Genen fanden sich einige Aminosäure-Transporter, insbesondere zum Transport aromatischer Aminosäuren (*aro*-Genfamilie). Zu erwähnen sind außerdem verschiedene Gene, die für Proteinsekretionssysteme codieren, wie die Gene der *tat*-Familie sowie Multidrug-Efflux-Transporter. Neben den Eisenionen-Transportern wurden vier Chromat- und drei Zink-Transporter vermehrt in Lactose-TSB exprimiert.

Genau wie unter den in Glucose vermehrt exprimierten Genen fanden sich auch unter den schwächer exprimierten Genen des Lipid-Metabolismus sowohl solche, die für Enzyme der Fettsäure-beta-Oxidation codierten als auch solche für die Fettsäure-Biosynthese.

Besonders viele Gene des Aminosäure-Metabolismus waren bei der Inkubation von *A. guillouiae* M9 in Lactose-TSB im Vergleich zu Glucose-TSB hochreguliert. Dabei handelte es sich überwiegend um Aminosäure-Biosynthesegene. Vor allem Gene für die Biosynthese schwefelhaltiger Aminosäuren, wie Cystein und Methionin, waren in Lactose-TSB signifikant verstärkt exprimiert. Dazu zählen zum Beispiel die in Tab. 28 aufgeführten Gene für die Cystein-Synthase und die Homoserin-O-Acetyltransferase. Weiterhin wurden verschiedene Gene in Lactose deutlich stärker exprimiert, die für Enzyme des Metabolismus aromatischer Aminosäuren codieren. Bei hohen fold-changes von 5 bis 18 wurden gleichzeitig die statistischen Kenngrößen mit Null angegeben, sodass die Signifikanz der differentiellen Expression dieser Gene nicht abschließend beurteilt werden kann.

In Lactose hochreguliert waren Gene des Malonat-, Trehalose- und Polysaccharid-Metabolismus, die alle zum übergeordneten Kohlenstoff-Metabolismus gezählt wurden. Zwei der insgesamt drei für verschiedene Untereinheiten der Malonat-Decarboxylase-codierenden Gene wiesen statistisch signifikante Expressionen mit hohen fold-changes auf.

Weiterhin waren in Lactose vermehrt Gene des Cofaktor-Metabolismus exprimiert. Hier sind insbesondere Gene des Eisen-Schwefel-Cluster-Assemblys und der Folsäure-Biosynthese (z. B. Dihydropteroat-Synthase) zu nennen. Letzterem Stoffwechselweg wurden insgesamt acht Gene zugeordnet. Beim überwiegenden Anteil handelte es sich um signifikante Befunde. Neben Genen des Aminosäure- und Cofaktor-Metabolismus waren auch Gene des Metabolismus aromatischer Verbindungen, besonders des 3,4-Dihydroxybenzoat-Katabolismus und des Beta-Ketoadipat-Stoffwechselweges, in Lactose-TSB stärker exprimiert als in Glucose-TSB. Bei den meisten Genen handelte es sich um statistisch signifikante Befunde.

In Lactose-TSB waren insgesamt 27 Phagen-assoziierte Gene stärker exprimiert als in Glucose-TSB. Dennoch überwogen zahlenmäßig die 47 in Glucose hochregulierten Phagen-assoziierten Gene. Bezüglich des horizontalen Gentransfers wurde in Lactose-

TSB eine putative Transposase um den Faktor 11 stärker exprimiert als in Glucose-TSB. Dabei handelte es sich allerdings um keinen signifikanten Befund.

Während es sich bei den in Glucose-TSB vermehrt exprimierten stressassoziierten Genen überwiegend um Schwermetall-Resistenzgene handelte, wurden im Vergleich dazu in Lactose-TSB vermehrt Hitzeschockgene und Chaperone exprimiert, von denen DnaK als repräsentativer Vertreter in Tab. 28 aufgeführt ist. Beim überwiegenden Anteil der stressassoziierten Gene konnte entweder aufgrund der als Null angegebenen Kenngrößen keine Aussage über die statistische Signifikanz ihrer verminderten Expression in Glucose gemacht werden, oder mindestens eine der Kenngrößen überschritt das Kriterium für statistische Signifikanz. Dennoch wies z. B. das für das Kohlenstoffmangel-Protein A (carbon starvation protein A, CsrA) codierende Gen eine signifikant um den Faktor 1,9 verstärkte Expression in Lactose-TSB auf.

Ausschließlich signifikante in Lactose-TSB verstärkte Expressionen wiesen Gene des Nukleotid-Metabolismus auf, von denen die für die Amidophosphoribosyltransferase- und Dihydroorotase-codierenden Gene repräsentativ in Tab. 28 aufgelistet sind. Die meisten Gene codierten für Enzyme, die an der UMP-Biosynthese bzw. der *de novo* Pyrimidin-Nukleobasen-Synthese beteiligt sind.

Auch in Lactose-TSB wurden biofilmassoziierte Gene vermehrt exprimiert. Hierbei handelte es sich insbesondere um drei Gene der Biofilm-PGA-Synthese (*pga*-Genfamilie). Alle drei Gene waren jeweils um einen Faktor von etwa 1,7 verstärkt in Lactose-TSB exprimiert. Bei zwei von drei Genen sprachen alle statistischen Kenngrößen für signifikante Befunde.

Unter den diversen Genen, die keinem übergeordneten Funktionsbereich zugeordnet werden konnten, befand sich bei den in Lactose-TSB hochregulierten Genen von *A. guillouiae* M9 unter anderem ein für eine Beta-Lactamase der Klasse C codierendes Gen sowie ein der Diacylglucosamin-Hydrolase ähnliches Gen, welches somit an der Lipid A-Biosynthese beteiligt sein könnte. Zudem war ein Kupfer-Resistenzprotein stärker in Lactose-TSB exprimiert.

Tabelle 28: Ausgewählte differentiell schwächer in Glucose exprimierte Gene von *Acinetobacter guillouiae* M9. Die Gene sind jeweils repräsentativ für einen übergeordneten Funktionsbereich angegeben. Die den Genen zugewiesenen GO-Term-Funktionen sowie der \log_2 fold-change der Genexpression und die statistischen Kenngrößen p-Wert, False Discovery Rate (FDR) und Bonferroni-Wert sind ebenfalls angegeben. Folgende Kriterien gelten für statistisch signifikante Ergebnisse: $p \leq 0,05$; $FDR \leq 0,05$; $Bonferroni \leq 0,1$.

Ausgewählte differentiell <u>negativ</u> exprimierte Gene, d. h. Glucose < Lactose					
Genbezeichnung/ Protein	GO-Term-Funktionen	\log_2 fold-change	p-Wert	FDR	Bonferroni
Schwefel-Metabolismus					
Sulfit-Reduktase [NADPH] Häm-Protein, beta-Komponente	Sulfit-Reduktion zu Sulfat	- 3,5	0	0	0
Phosphoadenylyl-Sulfat-Reduktase [Thioredoxin]/ Adenylyl-Sulfat-Reduktase [Thioredoxin]	Sulfat-Assimilation, Schwefelwasserstoff-Biosynthese, Cystein-Metabolismus	- 1,5	0	0	0
Acyl-CoA-Dehydrogenase; wahrsch. Dibenzothiophen-Entschwefelungsenzym	Metabolismus schwefelhaltiger Verbindungen	- 7,1	0	0	0
Alkansulfonat-Metabolismus					
Alkansulfonat-Monooxygenase	Monooxygenase	- 6,8	0	0	0
Taurin-Metabolismus					
TauA (Taurin-bindendes periplasmatisches Protein)	Taurin-Transport, Antwort auf Schwefelmangel	- 5,7	0	0	0
Alpha-Ketoglutarat-abhängige Taurin-Dioxygenase	Metabolismus schwefelhaltiger Verbindungen	- 4,3	0	0	0
Eisen-Metabolismus					
Bacterioferritin	Eisenion-Transport, Eisen-Homöostase, Eisenspeicher	- 1,1	1,1 · 10 ⁻¹⁶	3,2 · 10 ⁻¹⁵	4,8 · 10 ⁻¹³
Transport					
Methionin-ABC-Transporter, Substrat-bindendes Protein	Transmembrantransport	- 5,7	0	0	0
AroP (Aromatische Aminosäuren-Transportprotein)	Aminosäuretransport	- 1,2	1,3 · 10 ⁻⁵	1,4 · 10 ⁻⁴	0,06
TatB (Twin-Arginin-Translokationsprotein)	Proteinsekretion	- 3,6	3,5 · 10 ⁻⁹	5,9 · 10 ⁻⁸	1,5 · 10 ⁻⁵
Biopolymer-Transportprotein ExbD/TolR	Proteintransport	- 2,0	1,9 · 10 ⁻⁶	2,3 · 10 ⁻⁵	0,008
TonB (Eisen-Siderophor-Transportsystem, periplasmatisches Bindeprotein)	Siderophor-Transport	- 3,1	3,9 · 10 ⁻⁶	4,4 · 10 ⁻⁵	0,02
Lipid-Metabolismus					
2,4-Dienoyl-CoA Reduktase	Fettsäure-beta-Oxidation	- 2,7	0	0	0
Malonyl-CoA Acyl Carrier Protein Transacylase	Fettsäure-Biosynthese	- 2,2	3,0 · 10 ⁻⁶	3,5 · 10 ⁻⁵	0,01
Delta-9-Fettsäure-Desaturase	Biosynthese ungesättigter Fettsäuren	- 0,8	6,9 · 10 ⁻⁶	7,4 · 10 ⁻⁵	0,03

Tabelle 28 Fortsetzung...

Ausgewählte differentiell negativ exprimierte Gene, d. h. Glucose < Lactose					
Genbezeichnung/ Protein	GO-Term-Funktionen	log ₂ fold-change	P-Wert	FDR	Bonferroni
Aminosäure-Metabolismus					
4-Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase	Metabolismus aromatischer Aminosäuren	- 3,3	0	0	0
Cystein-Synthase B	Cystein-Biosynthese aus Serin	- 1,2	5,8 · 10 ⁻¹³	1,3 · 10 ⁻¹¹	2,5 · 10 ⁻⁹
Homoserin-O-Acetyltransferase	Methionin-Biosynthese	- 1,2	2,3 · 10 ⁻¹²	5,1 · 10 ⁻¹¹	1,0 · 10 ⁻⁸
Ferredoxin-abhängige Glutamat-Synthase	Glutamat-Biosynthese	- 1,1	3,0 · 10 ⁻¹⁰	5,7 · 10 ⁻⁹	1,3 · 10 ⁻⁶
Aspartat-Semialdehyd-Dehydrogenase	<i>de novo</i> L-Methionin-Biosynthese, Diaminopimelat-, Leucin-/Isoleucin-, Threonin-Biosynthese	- 0,9	1,3 · 10 ⁻⁷	1,9 · 10 ⁻⁶	5,5 · 10 ⁻⁴
3-Hydroxyisobutyrat-Dehydrogenase	Valin-Katabolismus	- 1,0	4,0 · 10 ⁻⁹	6,7 · 10 ⁻⁸	1,7 · 10 ⁻⁵
Kohlenhydrat-Metabolismus					
Malonat-Decarboxylase, Beta Untereinheit	Kohlenhydrat-Metabolismus	- 2,1	5,4 · 10 ⁻⁷	7,3 · 10 ⁻⁶	0,002
Trehalose-6-phosphat-Phosphatase	Trehalose-Biosynthese, Glykan-Biosynthese	- 1,1	0,02	0,06	1,0
WlaX (Polysaccharid-Biosynthese-protein)		- 1,0	9,4 · 10 ⁻¹⁰	1,7 · 10 ⁻⁸	4,1 · 10 ⁻⁶
Cofaktor-Metabolismus					
Nfu (Fe-S Protein-Reifung)	Eisen-Schwefel-Cluster-Assembly, Proteinreifung	- 1,4	5,1 · 10 ⁻¹⁴	1,3 · 10 ⁻¹²	2,2 · 10 ⁻¹⁰
Dihydropteroat-Synthase	Folsäure-Biosynthese, Tetrahydrofolat-Biosynthese	- 1,2	7,8 · 10 ⁻⁷	1,0 · 10 ⁻⁵	0,003
Riboflavin-Synthase	Riboflavin-Synthase	- 0,8	1,2 · 10 ⁻⁴	0,001	0,53
Phagen-assoziierte Proteine					
Phagen-Protein		- 3,6	0	0	0
DNA-Rekombination/HGT					
Putative Transposase	DNA-Integration, DNA-vermittelte Integration	- 3,5	0,17	0,35	1,0
Metabolismus aromatischer Verbindungen					
p-Hydroxybenzoat-Hydroxylase	Katabolismus aromatischer Verbindungen	- 2,5	3,0 · 10 ⁻⁸	4,7 · 10 ⁻⁷	1,3 · 10 ⁻⁴
Beta-Ketoadipat Enol-Lacton-Hydrolase	Beta-Ketoadipat-Stoffwechselweg	- 2,5	2,7 · 10 ⁻¹¹	5,4 · 10 ⁻¹⁰	1,2 · 10 ⁻⁷
Cyclohexanon-Monooxygenase	Katabolismus aromatischer Verbindungen	- 2,2	5,6 · 10 ⁻¹⁶	1,5 · 10 ⁻¹⁴	2,4 · 10 ⁻¹²
Chaperone/ Reaktion auf Stress					
DnaK (Chaperon-Protein)	Proteinfaltung, Bindung ungefalteter Proteine	- 3,3	0	0	0

Tabelle 28 Fortsetzung...

Ausgewählte differentiell <u>negativ</u> exprimierte Gene, d. h. Glucose < Lactose					
Genbezeichnung/ Protein	GO-Term-Funktionen	log ₂ fold-change	p-Wert	FDR	Bonferroni
Chaperone/ Reaktion auf Stress Fortsetzung...					
Putativer Stress-responsiver Transkriptionsregulator		- 2,0	1,2 · 10 ⁻⁸	1,9 · 10 ⁻⁷	5,0 · 10 ⁻⁵
Carbon starvation protein A (CsrA)	Reaktion auf Nährstoffmangel	- 0,9	4,2 · 10 ⁻⁸	6,5 · 10 ⁻⁷	1,8 · 10 ⁻⁴
Nukleotid-Metabolismus					
Amidophosphoribosyltransferase	Purin-Nukleobasenbiosynthese, <i>de novo</i> UMP-Biosynthese	- 1,1	6,7 · 10 ⁻¹²	1,4 · 10 ⁻¹⁰	2,9 · 10 ⁻⁸
Dihydroorotase	<i>de novo</i> Pyrimidin-Nukleobasenbiosynthese, <i>de novo</i> UMP-Biosynthese	- 0,8	9,4 · 10 ⁻⁶	1,4 · 10 ⁻⁴	0,04
Adhäsion/Pilus/Biofilmbildung					
PapD (Pilus-Assembly Protein, Chaperon)	Pilus-Organisation, Chaperon-vermittelte Proteinfaltung	- 0,9	1,9 · 10 ⁻⁶	2,4 · 10 ⁻⁵	0,008
PgaB (Biofilm-PGA-Synthese, Deacetylase)		- 0,7	5,6 · 10 ⁻⁶	6,2 · 10 ⁻⁵	0,02
PgaC (Biofilm-PGA-Synthese, N-Glycosyltransferase)		- 0,8	5,3 · 10 ⁻⁷	7,2 · 10 ⁻⁶	0,002
PgaD (Biofilm-PGA-Synthese, Helfer-Protein)		- 0,7	9,4 · 10 ⁻⁴	0,006	1,0
Diverse Gene					
Beta-Lactamase Klasse C u. a. Penicillin-bindende Proteine		- 1,7	1,8 · 10 ⁻⁵	1,8 · 10 ⁻⁴	0,08
Diacylglucosamin-Hydrolase-ähnlich	Lipid A-Biosynthese	- 1,2	7,6 · 10 ⁻¹²	1,6 · 10 ⁻¹⁰	3,3 · 10 ⁻⁸
Acetat-Kinase	Acetyl-CoA-Biosynthese, Metabolismus organischer Verbindungen	- 1,2	1,1 · 10 ⁻¹¹	2,3 · 10 ⁻¹⁰	4,7 · 10 ⁻⁸
Kupfer-Resistenzprotein B	Kupferionen-Homöostase	- 1,1	4,2 · 10 ⁻⁸	6,4 · 10 ⁻⁷	1,8 · 10 ⁻⁴

Die Tab. 29 und 30 zeigen ausgewählte in Glucose-TSB hoch- bzw. herunterregulierte Gene des Isolats *K. salsicia* M239. Die Gene sind nach übergeordneten Funktionsbereichen gruppiert. Die Tab. 50 und 51 im Anhang zeigen eine vollständige Darstellung hoch- bzw. herunterregulierter Gene. Neben dem log₂ fold-change und den statistischen Kenngrößen p-Wert, FDR und Bonferroni-Wert ist in den Tabellen im Anhang zudem, wenn möglich, die Anzahl ähnlicher ebenfalls differentiell positiv bzw. negativ exprimierter Gene angegeben.

Bei Inkubation von *K. salsicia* M239 in Glucose-TSB war die Expression diverser Gene des Stickstoffmetabolismus erhöht. Dazu zählten insgesamt vier Gene, die für Nitrat-Reduktasen der Atmungskette codieren, aber auch zwei Nitrit-Reduktasen. Bei den meisten dieser um mindestens den Faktor vier differentiell positiv exprimierten Gene konnte die statistische Signifikanz nicht beurteilt werden, da die Kenngrößen mit Null angegeben waren. Neben den genannten Enzymen der Nitratatmung und -assimilation wurden jeweils zwei Gene in Glucose verstärkt exprimiert, die für die Enzyme Urease und aliphatische Amidase codierten.

Insgesamt wurden 55 Transporter-codierende Gene stärker in Glucose-TSB exprimiert. Dabei handelte es sich um Oligopeptid-Transporter der Opp-Familie, diverse Efflux-Transporter sowie um verschiedene ABC-Transporter, insbesondere Methionin-ABC-Transporter. Weiterhin wurden zwei Kupfer-Resistenzgene und ein Teichonsäure-Transporter in Glucose-TSB stärker exprimiert. Bei den genannten Genen handelte es sich überwiegend um signifikante Befunde.

Im Vergleich zu Lactose-TSB waren in Glucose-TSB verschiedene Gene des Nukleotid-metabolismus hochreguliert. Hierzu zählten vor allem Gene, die für Enzyme der UMP- bzw. *de novo* Pyrimidin-Nukleobasen-Biosynthese codierten, wie die in Tab. 29 repräsentativ aufgelistete Dihydroorotase. Bei allen differentiell positiv exprimierten Genen handelte es sich um statistisch signifikante Befunde.

Relativ wenige Gene des Aminosäure-Metabolismus wurden stärker in Glucose-TSB exprimiert. Dazu zählten ausschließlich Aminosäurebiosynthese-Gene, vor allem für die Lysin- und Serin-Biosynthese via Diaminopimelat. Von den zum Kohlenhydrat-Metabolismus gezählten Genen waren zwei Gene der Polysaccharidbiosynthese sowie das für die Phosphoglycerol-Transferase codierende Gen der Glucanbiosynthese in Glucose-TSB stärker exprimiert.

Überwiegend signifikant stärker in Glucose exprimiert waren Gene von *K. salsicia* M239, die dem Metabolismus porphyrinhaltiger Verbindungen dienen. Auch diverse Gene des Cofaktor-Metabolismus wurden in Glucose-TSB verstärkt exprimiert. Dazu zählten vor allem Gene, die für Enzyme des Folsäuremetabolismus codierten, aber auch um Enzyme der Coenzym A-, Pantothenat-, Menachinon- und Thiamin-Biosynthese.

Einen bedeutenden Anteil an den in Glucose-TSB signifikant hochregulierten Genen machten DNA- bzw. RNA-modifizierende Enzyme aus. Dabei handelte es sich in vielen Fällen um Enzyme zur Methylierung der RNA, 16S rRNA und tRNA. Weiterhin fanden sich unter den verstärkt exprimierten Genen einige, die für Enzyme der DNA-Reparatur codieren sowie solche, die für die negative Regulation der Transkription verantwortlich sind. Unter den DNA-Reparatur-Genen waren auch solche vertreten, bei denen als GO-Term-Funktion die DNA-Rekombination angegeben war, z. B. das Gen *ruvB*, welches für eine Holliday Junction DNA-Helicase codiert. Dies stellt eine direkte Verbindung zu den am horizontalen Gentransfer (HGT) beteiligten Genen dar, die in Glucose stärker exprimiert waren, wie das *recO*-Gen. Dieses codiert für ein DNA-Rekombinations- und Reparaturprotein. Weiterhin wurde ein Protein des *comE*-Operons verstärkt exprimiert, das die Kompetenzentwicklung zur Transformation auslöst. Zusätzlich zu den an der Transformation beteiligten Genen, waren insgesamt 12 auf mobilen genetischen Elementen (MGE) gelegene Gene in Glucose-TSB hochreguliert.

In Glucose-TSB waren zudem diverse Gene für Oxidoreduktasen zur Entfernung von Superoxid-Radikalen und zur Aufrechterhaltung der Redox-Homöostase stärker exprimiert. Dazu zählen die in den Tab. 29 und 50 im Anhang aufgeführten Redoxin- und Thioredoxin-codierenden Gene.

Bei Inkubation von *K. salsicia* M239 in Glucose-TSB wurden zwei mit der Zellteilung und drei mit der Peptidoglykanbiosynthese in Zusammenhang stehende Gene verstärkt exprimiert. Beispielhaft sind hierfür das Segregations- und Kondensations-Protein A und das für das Enzym D-Alanin-D-Alanin-Ligase codierende Gen in Tab. 29 aufgeführt. Bei allen Genen handelte es sich um statistisch signifikante Befunde.

Zwei in Glucose-TSB signifikant positiv exprimierte Gene wurden dem Isoprenoid-Metabolismus zugeordnet. Ein nur schwach in Glucose-TSB hochreguliertes Gen codierte für die Exopolyphosphatase und war damit anhand seiner zugewiesenen GO-Term-Funktionen biofilmassoziiert. Unter anderem könnte es damit am Quorum-Sensing und der Einzelspezies-Biofilmbildung beteiligt sein. Allerdings sprachen nur p-Wert und FDR für eine signifikante Expression, während der Bonferroni-Wert mit 0,8 den Grenzwert von 0,1 deutlich überstieg.

Tabelle 29: Ausgewählte differentiell stärker in Glucose exprimierte Gene von *Kocuria salsicia* M239. Die Gene sind jeweils repräsentativ für einen übergeordneten Funktionsbereich angegeben. Die den Genen zugewiesenen GO-Term-Funktionen sowie der \log_2 fold-change der Genexpression und die statistischen Kenngrößen p-Wert, False Discovery Rate (FDR) und Bonferroni-Wert sind ebenfalls angegeben. Folgende Kriterien gelten für statistisch signifikante Ergebnisse: $p \leq 0,05$; $FDR \leq 0,05$; Bonferroni $\leq 0,1$.

Ausgewählte differentiell <u>positiv</u> exprimierte Gene, d. h. Glucose > Lactose					
Genbezeichnung/ Protein	GO-Therm-Funktionen	\log_2 fold-change	p-Wert	FDR	Bonferroni
Stickstoff-Metabolismus					
Nitrat-Reduktase der Atmungskette, Gamma-Kette	Nitrat-Metabolismus	2,2	$2,2 \cdot 10^{-15}$	$9,5 \cdot 10^{-14}$	$5,7 \cdot 10^{-12}$
Nitrit-Reduktase [NAD(P)H], große Untereinheit	Nitrat-Assimilation	0,8	$4,1 \cdot 10^{-5}$	$2,6 \cdot 10^{-4}$	0,1
AmiE (Aliphatische Amidase)	Metabolismus stickstoffhaltiger Verb.	1,0	$2,7 \cdot 10^{-6}$	$2,5 \cdot 10^{-5}$	0,007
Transport					
OppC (Oligopeptid-Transport-system, Permeaseprotein)	Transmembrantransport	1,3	$1,3 \cdot 10^{-7}$	$1,5 \cdot 10^{-6}$	0,0003
EmrB/QacA (Wirkstoffresistenz-Transporter)	Transmembrantransport	1,5	$5,9 \cdot 10^{-12}$	$1,6 \cdot 10^{-10}$	$1,5 \cdot 10^{-8}$
TagH (Teichonsäure-Export, ATP-bindendes Protein)	Teichonsäure-Export	1,4	$1,4 \cdot 10^{-5}$	0,0001	0,04
Format-Efflux-Transporter	Format-Transmembrantransport	1,1	$3,5 \cdot 10^{-8}$	$4,6 \cdot 10^{-7}$	$9,1 \cdot 10^{-5}$
Methionin-ABC-Transporter, ATP-bindendes Protein	Methionin-Transport	1,0	$8,2 \cdot 10^{-6}$	$6,5 \cdot 10^{-5}$	0,02
Efflux-Protein der LysE-Familie	Aminosäure-Transport	0,8	$7,5 \cdot 10^{-4}$	0,003	1,0
Nukleotid-Metabolismus					
Dihydroorotase	<i>de novo</i> UMP-Biosynthese, Pyrimidin-Nukleobasen-biosynthese	1,7	$2,4 \cdot 10^{-8}$	$3,3 \cdot 10^{-7}$	$6,3 \cdot 10^{-5}$
Thymidylat-Kinase	dTDP-, dTTP-Biosynthese	1,1	$2,6 \cdot 10^{-7}$	$2,9 \cdot 10^{-6}$	0,0007
Aminosäure-Metabolismus					
N-Succinyl-L,L-Diaminopimelat-Aminotransferase	Lysin-Biosynthese via Diaminopimelat	1,1	$2,2 \cdot 10^{-8}$	$2,5 \cdot 10^{-7}$	$4,6 \cdot 10^{-5}$
Prephenat-Dehydratase	L-Phenylalanin-Biosynthese	0,8	$1,5 \cdot 10^{-4}$	$8,4 \cdot 10^{-4}$	0,40
Kohlenhydrat-Metabolismus					
OpcA (Allosterischer Effektor der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase)	Pentosephosphatweg	1,2	$2,7 \cdot 10^{-8}$	$3,6 \cdot 10^{-7}$	$7,0 \cdot 10^{-5}$
Undecaprenyl-Phosphat-Galactosephosphotransferase	Polysaccharid-Biosynthese	1,1	$6,1 \cdot 10^{-7}$	$6,4 \cdot 10^{-6}$	0,002
Phosphoglycerol-Transferase	Glucan-Biosynthese, Oligosaccharid-Lipid-Intermediat-Biosynthese	1,1	$1,7 \cdot 10^{-8}$	$2,4 \cdot 10^{-7}$	$4,3 \cdot 10^{-5}$

Tabelle 29 Fortsetzung...

Ausgewählte differentiell positiv exprimierte Gene, d. h. Glucose > Lactose					
Genbezeichnung/ Protein	GO-Therm-Funktionen	log ₂ fold-change	p-Wert	FDR	Bonferroni
Metabolismus porphyrinhaltiger Verbindungen					
Porphobilinogen-Synthase	Protoporphyrinogen IX-Biosynthese	1,3	5,0 · 10 ⁻¹¹	1,2 · 10 ⁻⁹	1,3 · 10 ⁻⁷
Cofaktor-Metabolismus					
5-Formyltetrahydrofolat-Cyclo-Ligase	Metabolismus folsäurehaltiger Verbindungen, Dormanz-Prozess	1,2	1,2 · 10 ⁻¹⁰	2,7 · 10 ⁻⁹	3,7 · 10 ⁻⁷
Dephospho-CoA-Kinase	Coenzym A-Biosynthese	0,9	2,4 · 10 ⁻⁵	1,7 · 10 ⁻⁴	0,06
3-Methyl-2-Oxobutanoat-Hydroxymethyltransferase	Pantothemat-Biosynthese	0,8	1,1 · 10 ⁻⁵	8,2 · 10 ⁻⁵	0,03
DNA-/RNA-Modifikation, Transkription/Translation					
A/G-spezifische Adenin-Glycosylase	Basen-Exzisions-Reparatur	1,3	4,4 · 10 ⁻¹²	1,2 · 10 ⁻¹⁰	1,1 · 10 ⁻⁸
GidB (rRNA kleine UE-7-Methylguanidin (m7G)-Methyltransferase)	Methylierung der 16S rRNA	1,3	5,0 · 10 ⁻⁹	7,8 · 10 ⁻⁸	1,3 · 10 ⁻⁵
MraZ (Zellteilungsprotein)	Negat. Regulation der Transkription	1,3	9,3 · 10 ⁻¹⁰	1,8 · 10 ⁻⁸	2,4 · 10 ⁻⁶
RuvB (Holliday Junction DNA-Helicase)	SOS-Antwort, DNA-Reparatur, DNA-Rekombination	0,9	2,1 · 10 ⁻⁶	1,9 · 10 ⁻⁵	0,005
HGT: Konjugation/Transformation					
ComE Operon Protein 1	Kompetenzentwicklung zur Transformation	1,0	9,2 · 10 ⁻⁴	0,004	1,0
RecO (DNA Rekombinations- und Reparaturprotein)	DNA-Reparatur, DNA-Rekombination	0,8	2,4 · 10 ⁻⁵	1,7 · 10 ⁻⁴	0,06
Oxidoreduktasen					
Redoxin	Redox-Homöostase	1,1	5,7 · 10 ⁻⁷	6,0 · 10 ⁻⁶	0,001
Thioredoxin-Reduktase	Entfernung von Superoxidradikalen	1,0	4,6 · 10 ⁻⁸	5,9 · 10 ⁻⁷	1,2 · 10 ⁻⁴
Peptidoglykan-Synthese, Zellteilung					
Segregations- und Kondensationsprotein A	Zellteilung, Zellzyklus, Chromosomensegregation	1,0	8,0 · 10 ⁻⁷	8,2 · 10 ⁻⁶	0,002
D-Alanin-D-Alanin-Ligase	Peptidoglykan-Biosynthese	0,9	2,6 · 10 ⁻⁵	1,8 · 10 ⁻⁴	0,07
Isoprenoid-Biosynthese					
Geranylgeranyl-Pyrophosphat-Synthetase	Isoprenoid-Biosynthese	1,1	4,4 · 10 ⁻⁹	7,0 · 10 ⁻⁸	4,3 · 10 ⁻⁵
Biofilmassoziierte Gene					
Exopolyphosphatase	Glykolipid-Biosynthese, Pathogenese, Quorum-Sensing, Einzelspezies-Biofilmbildung	0,7	3,2 · 10 ⁻⁴	0,002	0,82

In den Tab. 30 und 51 im Anhang sind ausgewählte in Glucose-TSB schwächer (negativ) exprimierte Gene aufgelistet. Diese Gene waren somit stärker bei Inkubation von *K. salsicia* M239 in Lactose-TSB exprimiert.

Im Gegensatz zu den insgesamt 13 in Glucose-TSB stärker exprimierten Oxidoreduktasen wurden in Lactose-TSB insgesamt 44 Oxidoreduktasen-codierende Gene stärker exprimiert. Darunter befand sich auch das in Tab. 30 aufgeführte Superoxiddismutase-Gen. Unter den in Lactose-TSB signifikant hochregulierten Genen fanden sich weiterhin solche, die für Enzyme des Schwefelmetabolismus codieren. In Tab. 30 ist als repräsentativer Vertreter das für eine Untereinheit der Sulfat-Adenylyltransferase codierende Gen aufgeführt.

Während in Glucose-TSB insgesamt 55 Transporter-assoziierte Gene verstärkt exprimiert wurden, waren in Lactose-TSB mit 93 etwa doppelt so viele entsprechende Gene hochreguliert. Dabei handelte es sich häufig um ABC-Transporter mit Methionin, Prolin/Glycinbetain, N-Acetyl-Glucosamin und Maltose/Maltodextrin als Substrate. Allerdings waren auch Eisen-Siderophor-ABC-Transporter in Lactose-TSB hochreguliert. Weiterhin wiesen diverse weitere Aminosäure-Transporter sowie Oligopeptid-Transporter der *opp*-Genfamilie eine verstärkte Expression in Lactose-TSB auf. Zusätzlich wurden insgesamt vier Kaliumionen-Transporter, diverse Tricarboxylat-Transporter der *tct*-Genfamilie sowie insgesamt fünf Phosphationen-Transporter in Lactose-TSB stärker exprimiert. Bei den in den Tab. 30 und 51 im Anhang dargestellten Genen handelte es sich überwiegend um statistisch signifikante Befunde. Dennoch waren für einige Transporter-codierende Gene mit besonders hohen fold-changes die Kenngrößen mit Null angegeben.

Einige Gene des Lipid-Metabolismus waren in Lactose-TSB signifikant stärker exprimiert. Dazu zählten insbesondere Gene, die für Acetoacetyl-CoA-Synthetasen, Hydroxybutyryl-CoA-Dehydrogenasen und Enoyl-CoA-Hydratasen codierten. Hiervon wurden insgesamt 11 um Faktoren zwischen 2,6 und 11,3 stärker in Lactose-TSB exprimiert. Lediglich die Bonferroni-Werte erfüllten nicht immer die Kriterien für signifikante Befunde. Weiterhin waren drei Gene in Lactose-TSB stärker exprimiert, die für Enzyme der Fettsäure-beta-Oxidation codierten.

Ebenso wie die in Glucose-TSB hochregulierten Gene des Aminosäuremetabolismus fanden sich auch schwächer exprimierte Gene desselben übergeordneten

Funktionsbereiches. Im Gegensatz zu den in Glucose-TSB hochregulierten Aminosäurebiosynthese-Genen handelte es sich bei den schwächer exprimierten Genen in vielen Fällen um Gene des Aminosäurekatabolismus. Besonders Gene, welche für den Valin- und Histidinkatabolismus notwendige Enzyme codierten, waren stärker in Lactose exprimiert. Beispielhaft sind in Tab. 30 die für die Methylmalonat-Semialdehyd-Dehydrogenase und Urocanat-Hydratase codierenden Gene aufgeführt.

Hervorzuheben sind die in den meisten Fällen statistisch signifikant in Lactose stärker exprimierten Gene des Kohlenhydrat-Metabolismus. Hierzu zählen einige Gene des Galactosemetabolismus, wie das beta-Galactosidase-Gen, welches in Lactose-TSB um den Faktor 2 signifikant stärker exprimiert wurde. Des Weiteren waren Gene des Citrat- bzw. Tricarboxylsäure-Zyklus sowie der Glykolyse, und somit des Energiestoffwechsels, in Lactose-TSB hochreguliert. Außerdem waren verschiedene Gene der Glykan-Biosynthese in Lactose-TSB signifikant stärker exprimiert. Dazu gehörten die in Tab. 30 beispielhaft aufgeführten Malto-Oligosyltrehalose-Trehalohydrolase und ADP-Glucose-Transglucosylase-codierenden Gene.

Bei Inkubation von *K. salsicia* M239 in Lactose-TSB wiesen deutlich weniger Gene des Cofaktor-Metabolismus eine verstärkte Expression auf. Zusätzlich handelte es sich um Biosynthese-Gene für andere Cofaktoren als in Glucose-TSB. So waren in Lactose-TSB Gene der Acetyl-CoA-Synthese, des Eisen-Schwefel-Cluster-Assemblys sowie der NAD-Biosynthese hochreguliert.

In Lactose-TSB wurde ein putatives Tra-ähnliches konjugatives Transferprotein vermehrt exprimiert. p-Wert und FDR sprachen dabei für einen signifikanten Befund, während der Bonferroni-Wert von 1,0 deutlich über dem Signifikanz-Grenzwert lag. Dennoch wurden in Lactose-TSB mit insgesamt 33 auf mobilen Elementen gelegenen Genen deutlich mehr HGT-assoziierte Gene exprimiert als in Glucose-TSB mit 12 entsprechenden Genen. Bei allen detektierten Genen sprachen Bonferroni-Werte von 1,0 jeweils für statistisch nicht eindeutig signifikante Befunde.

Besonders viele Gene des Metabolismus aromatischer Verbindungen wurden stärker in Lactose-TSB exprimiert. Herausstechend waren dabei die für Enzyme des Phenylacetat-Katabolismus codierenden Gene der *paa*-Familie, von denen *paaJ* in Tab. 30 aufgeführt ist. Die meisten Gene codierten für Phenylacetat-Oxygenasen. Statistisch signifikant in Glucose-TSB herunterreguliert wurden alle sechs detektierten Aldehyd-Dehydrogenasen.

Von den stressassoziierten Genen wurden in Lactose-TSB insbesondere Chaperone und Hitzeschock-Gene (u. a. der *groE*-Familie) verstärkt exprimiert. Auch ein Phage-Shock-Protein (PspA) sowie ein universelles Stressprotein wurden signifikant stärker in Lactose-TSB exprimiert. Diverse mit dem Nukleotid-Metabolismus assoziierte Gene waren in Lactose-TSB hochreguliert. Dazu zählte zum Beispiel die in Tab. 30 aufgeführte Uricase, die am Purin-Nukleobasen-Metabolismus beteiligt ist, und in Lactose-TSB 5,6-mal stärker exprimiert wurde als in Glucose-TSB.

In Lactose-TSB wurden verschiedene biofilmassoziierte Gene von *K. salsicia* M239 stärker exprimiert als in Glucose-TSB. Dazu zählten vor allem EPS-Biosynthesegene der *eps*-Familie sowie ein Typ IV-Pilus codierendes Gen der *tatE*-Familie. Die fold-changes der differentiellen Genexpression lagen zwischen 1,6 und 4,9. Bei keinem der detektierten Gene handelte es sich allerdings um statistisch signifikante Befunde. Neben den biofilmassoziierten Genen wurden zwei an der Zellteilung beteiligte Gene in Lactose-TSB signifikant hochreguliert, unter anderem ein Zellteilungs-Inhibitor. Unter den diversen Genen, welche eine verstärkte Expression in Lactose-TSB aufwiesen, befanden sich unter anderem Gene, die für eine Lactat-Dehydrogenase codierten.

Tabelle 30: Ausgewählte differentiell schwächer in Glucose exprimierte Gene von *Kocuria salsicia* M239. Die Gene sind jeweils repräsentativ für einen übergeordneten Funktionsbereich angegeben. Die den Genen zugewiesenen GO-Term-Funktionen sowie der \log_2 fold-change der Genexpression und die statistischen Kenngrößen p-Wert, False Discovery Rate (FDR) und Bonferroni-Wert sind ebenfalls angegeben. Folgende Kriterien gelten für statistisch signifikante Ergebnisse: $p \leq 0,05$; $FDR \leq 0,05$; Bonferroni $\leq 0,1$.

Ausgewählte differentiell negativ exprimierte Gene, d. h. Glucose < Lactose					
Genbezeichnung/ Protein	GO-Therm-Funktionen	\log_2 fold-change	p-Wert	FDR	Bonferroni
Oxidoreduktasen					
Superoxid-Dismutase [Mn]	Oxidase-Aktivität	- 1,2	$1,8 \cdot 10^{-8}$	$2,5 \cdot 10^{-7}$	$4,6 \cdot 10^{-5}$
Schwefel-Metabolismus					
Sulfat-Adenyltransferase, Untereinheit 2	Schwefelwasserstoff-Biosynthese	- 1,6	$7,1 \cdot 10^{-10}$	$1,4 \cdot 10^{-8}$	$1,8 \cdot 10^{-6}$
Transport					
ABC-Typ Fe ³⁺ Siderophor-Transportsystem, Permease Komponente	Transmembrantransport	- 2,0	0,04	0,09	1,0
TRAP Transporter, 4TM/12TM Fusionsprotein, unbekanntes Substrat	Transmembrantransport	- 2,0	$2,4 \cdot 10^{-12}$	$6,9 \cdot 10^{-11}$	$6,1 \cdot 10^{-9}$
Aminosäure-Transporter	Aminosäure-Transmembrantransport	- 2,0	$1,2 \cdot 10^{-13}$	$4,1 \cdot 10^{-12}$	$3,1 \cdot 10^{-10}$

Tabelle 30 Fortsetzung...

Ausgewählte differentiell negativ exprimierte Gene, d. h. Glucose < Lactose					
Genbezeichnung/ Protein	GO-Therm-Funktionen	log ₂ fold-change	p-Wert	FDR	Bonferroni
Transport Fortsetzung...					
Methionin-ABC-Transporter, ATP-bindendes Protein	Methionin-Transport	- 1,7	3,8 · 10 ⁻¹³	1,2 · 10 ⁻¹¹	9,8 · 10 ⁻¹⁰
OppA (Oligopeptid ABC-Transporter, periplasmatisches Oligopeptid-Bindeprotein)	Transmembrantransport	- 1,9	2,5 · 10 ⁻¹²	7,2 · 10 ⁻¹¹	6,5 · 10 ⁻⁹
Kalium-transportierende ATPase	Kalium-Transport	- 2,3	1,4 · 10 ⁻⁶	1,3 · 10 ⁻⁵	0,004
PstC (Phosphat-Transportsystem, Permeaseprotein)	Phosphationen-Transport	- 1,2	4,6 · 10 ⁻¹⁰	9,3 · 10 ⁻⁹	1,2 · 10 ⁻⁶
Lipid-Metabolismus					
Acetoacetyl-CoA-Synthetase/ langkettige Fettsäure-CoA-Ligase	Lipid-Metabolismus	- 1,8	4,8 · 10 ⁻¹⁴	1,8 · 10 ⁻¹²	1,2 · 10 ⁻¹⁰
Enoyl-CoA-Hydratase/3-Hydroxy-acyl-CoA-Dehydrogenase/ 3-Hydroxybutyryl-CoA-Epimerase	Fettsäure-Metabolismus	- 1,4	5,6 · 10 ⁻⁵	3,5 · 10 ⁻⁴	0,14
3-Ketoacyl-CoA-Thiolase @ Acetyl-CoA-Acetyltransferase	Fettsäure-beta-Oxidation	- 2,4	7,2 · 10 ⁻¹¹	1,7 · 10 ⁻⁹	1,8 · 10 ⁻⁷
Aminosäure-Metabolismus					
Methylmalonat-Semialdehyd-Dehydrogenase	Valin-Katabolismus	- 1,4	3,5 · 10 ⁻⁴	0,002	0,89
O-Acetylhomoserin-/ O-Succinyl-homoserin-Sulfhydrylase	Aminosäure-Metabolismus	- 2,5	0,01	0,03	1,0
Urocanat-Hydratase	Histidin-Katabolismus zu Glutamat und Formamid bzw. Glutamat und Format	- 2,4	1,7 · 10 ⁻¹³	5,8 · 10 ⁻¹²	4,4 · 10 ⁻¹⁰
Aromatische Aminosäure-Aminotransferase Beta	Aspartat-, Leucin-Bio-synth., Phenylalanin-Biosynth. aus Chorismat via Phenylpyruvat, Tyrosin-Biosynth. aus Chorismat via 4-Hydroxyphenylpyruvat	- 2,2	5,8 · 10 ⁻¹³	1,8 · 10 ⁻¹¹	1,5 · 10 ⁻⁹
Acetolactat-Synthase, große Untereinheit	Valin-Biosynthese, Isoleucin-Biosynthese	- 1,1	1,8 · 10 ⁻¹¹	4,6 · 10 ⁻¹⁰	4,5 · 10 ⁻⁸
D-3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase	L-Serin-Biosynthese, Lysin-Biosynthese über Diaminopimelat	- 1,1	5,0 · 10 ⁻⁶	4,2 · 10 ⁻⁵	0,01
Kohlenhydrat-Metabolismus					
Beta-Galactosidase	Galactose-Metabolismus	- 1,0	4,7 · 10 ⁻⁶	4,0 · 10 ⁻⁵	0,01
Malat-Dehydrogenase	Kohlenhydrat-Metabolismus, Tricarboxylsäurezyklus	- 1,9	4,0 · 10 ⁻¹³	1,3 · 10 ⁻¹¹	1,0 · 10 ⁻⁹

Tabelle 30 Fortsetzung...

Ausgewählte differentiell negativ exprimierte Gene, d. h. Glucose < Lactose					
Genbezeichnung/ Protein	GO-Therm-Funktionen	log ₂ fold-change	P-Wert	FDR	Bonferroni
Kohlenhydrat-Metabolismus Fortsetzung...					
Malto-Oligosyltrehalose-Trehalohydrolase	Trehalose-Synthese, Glykan-Biosynthese	- 1,2	4,1 · 10 ⁻⁹	6,6 · 10 ⁻⁸	1,1 · 10 ⁻⁵
Vermutlich Glycogen-Synthase, ADP-Glucose-Transglucosylase	Glucan-Biosynthese	- 1,0	1,1 · 10 ⁻⁵	8,6 · 10 ⁻⁵	0,03
Cofaktor-Metabolismus					
Acetyl-Coenzym A-Synthetase	Acetyl-CoA-Synthese aus Acetat	- 1,7	8,2 · 10 ⁻¹³	2,5 · 10 ⁻¹¹	2,1 · 10 ⁻⁹
SufB (Fe-S-Cluster Assembly-Protein)	Fe-S-Cluster-Assembly	- 1,0	9,8 · 10 ⁻⁶	7,6 · 10 ⁻⁵	0,03
DNA-Rekombination/HGT					
Putatives TraA-ähnliches Konjugatives Transferprotein	Konjugation	- 1,4	0,007	0,02	1,0
Mobiles genetisches Element-Protein		- 3,5	0,01	0,04	1,0
Metabolismus aromatischer Verbindungen					
PaaJ (Phenylacetat-CoA-Oxygenase)	Phenylacetat-Katabolismus	- 2,3	1,1 · 10 ⁻¹⁶	5,3 · 10 ⁻¹⁵	2,9 · 10 ⁻¹³
Protocatechuat-3,4-Dioxygenase, Beta Kette	3,4-Dihydroxybenzoat-Katabolismus	- 2,0	1,3 · 10 ⁻⁴	7,3 · 10 ⁻⁴	0,34
Aldehyd-Metabolismus					
Aldehyd-Dehydrogenase	Aldehyd-Metabolismus	- 2,0	3,2 · 10 ⁻¹²	1,1 · 10 ⁻¹¹	8,3 · 10 ⁻¹⁰
Chaperone/Reaktion auf Stress					
DnaK (Chaperon-Protein)	DNA-Replikation, Proteinfaltung, Reaktion auf Hitze	- 1,7	1,2 · 10 ⁻¹²	3,5 · 10 ⁻¹¹	3,0 · 10 ⁻⁹
UpsA (Universelles Stressprotein)	Reaktion auf Stress	- 1,4	6,9 · 10 ⁻⁷	7,1 · 10 ⁻⁶	0,002
PspA (Phage Shock Protein A)	Reaktion auf Hitze, Negative Regulation der Transkription	- 1,3	2,3 · 10 ⁻⁸	3,1 · 10 ⁻⁷	5,8 · 10 ⁻⁵
Nukleotid-Metabolismus					
Uricase (Urat-Oxidase)	Purin-Nukleobasen-Metabolismus	- 2,5	4,3 · 10 ⁻⁸	5,6 · 10 ⁻⁷	1,1 · 10 ⁻⁴
Ribonucleotid-Reduktase der Klasse Ib, Beta Untereinheit	Deoxyribonucleotid-Biosynthese	- 1,8	3,3 · 10 ⁻¹⁶	1,5 · 10 ⁻¹⁴	8,6 · 10 ⁻¹³
Dihydroorotase	de novo UMP-Biosynthese	- 1,0	4,2 · 10 ⁻⁶	3,5 · 10 ⁻⁵	0,01
Adhäsion/Pilus/Biofilmbildung					
Protein der TatE-Familie	Typ IV-Pilus assoziiert	- 2,3	0,08	0,17	1,0
Mögl. Etk-like Tyrosin-Kinase, involviert in EPS-Biosynthese	EPS-Biosynthese, Lipopolysaccharid-Biosynthese	- 1,2	0,18	0,31	1,0
EpsD (Tyrosin-Proteinkinase)	EPS-Biosynthese, Lipopolysaccharid-Biosynthese	- 0,7	0,05	0,11	1,0

Tabelle 30 Fortsetzung...

Ausgewählte differentiell negativ exprimierte Gene, d. h. Glucose < Lactose					
Genbezeichnung/ Protein	GO-Therm-Funktionen	log ₂ fold- change	p- Wert	FDR	Bon- ferroni
Adhäsion/Pilus/Biofilmbildung Fortsetzung...					
EpsF (Exopolysaccharid-Bio- synthese Glycosyltransferase)	Polysaccharid-Biosynthese	- 0,7	0,26	0,39	1,0
Zellteilung					
Zellteilungs-Inhibitor	Zellteilung	- 1,0	8,6 · 10 ⁻⁷	8,8 · 10 ⁻⁶	0,002
FtsH (Zellteilungsprotein)	Zellteilung, Protein-Katabolismus	- 0,9	1,1 · 10 ⁻⁵	8,3 · 10 ⁻⁵	0,03
Diverse Gene					
Amin-Oxidase	Amin-Metabolismus	- 2,1	8,9 · 10 ⁻⁵	5,3 · 10 ⁻⁴	0,23
D-Lactat-Dehydrogenase	Lactat-Oxidation	- 0,9	3,1 · 10 ⁻⁵	2,1 · 10 ⁻⁴	0,08

4 Diskussion

4.1 Besiedelungsdichte von verschiedenen Stellen der Melkanlage

Insgesamt gab es große Unterschiede zwischen den Gesamtkeimzahlen der verschiedenen Probenahmeorte innerhalb der Melkanlage (Abb. 6, 11). Die mittels RT-qPCR ermittelten GKZ-Äquivalente lagen an allen Probenahmeorten über den kulturell ermittelten (Abb. 12). Gründe hierfür sind die Diskriminierung von auf TSA nicht vermehrungsfähigen Mikroorganismen im kulturellen Verfahren sowie die zusätzliche Erfassung von eDNA und ruhenden (VBNC) Zellen im molekularbiologischen Verfahren. Die tatsächliche Anzahl von 16S rRNA-Genkopien pro Bakterienzelle kann sich je nach Gattung oder Spezies mehr oder weniger stark unterscheiden, sodass der tatsächliche Wert von der Spezieszusammensetzung des jeweiligen Probenahmeortes abhängig ist. Die Annahme einer durchschnittlichen Anzahl von 4,2 Genkopien pro Bakterienzelle stellte sich jedoch als geeignet heraus, um die GKZ-Äquivalente aus dem RT-qPCR- Nachweis zu berechnen.

Die Melkbecherablagen waren die Stellen mit der höchsten Besiedelungsdichte in der gesamten Melkanlage. Der Hauptgrund hierfür liegt höchstwahrscheinlich darin, dass sie nicht vom CIP-Verfahren zur Reinigung der Melkanlage erfasst werden. Der Melkstand wird zwar nach jedem Melkvorgang mit Hochdruck gereingt, jedoch sind die Melkbecherablagen nach dem Melkvorgang vom dort abgelegten Melkgeschirr verdeckt und werden daher nicht vom Hochdruckstrahl erfasst. Bei allen Probenahmen waren deutliche Reste von Fäzes oder weiteren Staub-/ Schmutzpartikeln, mit bloßem Auge auf den Melkbecherablagen zu erkennen. Die Voraussetzungen für den Eintrag und die Vermehrung von Mikroorganismen auf den Melkbecherablagen sind optimal: Durch den engen Kontakt zu den Milchkühen und deren Eutern während des Melkvorganges kann eine Oberflächenkonditionierung mit Milchbestandteilen erfolgen. Zusätzlich kann es zum Eintrag von Mastitiserregern oder Kommensalen der Eutermikrobiota kommen. Durch Auflegen der nach der Reinigung noch nassen Melkbecher auf die Ablagen wird dort Flüssigkeit eingetragen, die sich aufgrund von nicht vorhandenen Abläufen ansammeln kann. In dem so entstehenden Milieu können sich Mikroorganismen stark vermehren. Durch die mangelhafte Reinigung ist es denkbar, dass an dieser Stelle bereits ältere, reife Biofilme persistieren können.

Obwohl die Melkbecherablagen genau genommen nicht mit zur Melkanlage gehören, wurden sie aufgrund des engen Kontaktes zum Kuheuter und den Melkbechern, und damit als potenzielle Überträger von Mastitiserregern innerhalb der Herde, trotzdem in die Untersuchung mit einbezogen. Die Relevanz der Übertragung von Mastitiserregern zwischen verschiedenen Kühen während des maschinellen Melkvorgangs wird durch den Nachweis hoher Keimzahlen antibiotikaresistenter Mikroorganismen auf den Melkbecherablagen (Abb. 11) bestätigt.

Da die Melkbecher sowohl in engem Kontakt zu ihren Ablagen, als auch während des Melkens zum Kuheuter stehen, wäre dort eine ähnlich hohe Besiedlungsdichte zu erwarten wie auf den Ablagen selbst. Hier wurden allerdings in den meisten Probenahmen nur sehr geringe Keimzahlen bzw. Keimzahlen unterhalb der Nachweisgrenze detektiert. Dies kann daran liegen, dass die Melkbecher zwischen jeder gemolkenen Kuh von Reinigungsflüssigkeit durchspült werden. Somit kann es zu keiner Konditionierung durch Milchbestandteile kommen. Zudem werden weniger stark adhärierende Mikroorganismen mit dem Flüssigkeitsstrom ausgetragen, bevor es zur Biofilmbildung kommen kann. Zusätzlich findet ein häufigerer Austausch der Sitzgummis statt, während andere Teile der Melkanlage weniger häufig ersetzt werden. Auch Latorre *et al.* (2010) [143] konnten auf den Oberflächen von Sitzgummis zwar Oberflächenrauigkeiten und adhärierende organische Bestandteile, jedoch keine Bakterienzellen mittels SEM nachweisen.

Die Rohrleitungen der Melkanlage wiesen, mit Ausnahme des Kunststoffrohrs am Ende der Druckleitung, eher geringe Besiedlungsdichten im Bereich von 10^2 - 10^3 KbE/cm² auf. Als Gründe sind neben einer effektiven Reinigung und Desinfektion durch das angewendete CIP-Verfahren die vergleichsweise hohen Geschwindigkeiten der turbulenten Strömungen in den Leitungen zu nennen. Die Strömungsgeschwindigkeit von Flüssigkeiten kann durch die Ausübung von Scherkräften Einfluss auf die Anhaftung von Mikroorganismen und damit auf die Biofilmzusammensetzung und -architektur haben [144]. So entstehen bei hohen Scherraten dünnere, dichter gepackte Biofilme [21, 145]. Dies erschwert womöglich auch deren Erfassung durch eine Tupferprobenahme, sodass ggf. die tatsächlichen Keimzahlen in den Rohrleitungen unterschätzt wurden. Zusätzlich kann eine Selektion für besonders stark adhärierende Mikroorganismen stattgefunden haben [146].

Insgesamt waren in der beprobten Melkanlage, mit Ausnahme des Rohmilchsammeltanks, die Edelstahloberflächen weniger stark besiedelt als die Kunststoff- oder Gummioberflächen. Dies fällt besonders beim Kunststoffrohr am Ende der Druckleitung auf, wo die kulturell ermittelten GKZ durchschnittlich bei 10^4 KbE/cm², meist jedoch noch höher lagen. Dort wurden die Tupferabstriche nahe der Verbindung zwischen dem Edelstahlrohr und dem Kunststoffrohr genommen, welche aufeinander geschoben werden. An der entstandenen Verbindungsstelle könnte es durch Änderung der Strömungsgeschwindigkeit zu einer vermehrten Ablagerung von Milchbestandteilen gekommen sein. Eine solche Oberflächenkonditionierung erleichtert die Anlagerung von Mikroorganismen und die darauffolgende Biofilmbildung. Eine verstärkte Materialabnutzung, zu der es eher bei Kunststoff- als bei Edelstahlteilen kommt, kann durch die entstehenden Oberflächenrauigkeiten zusätzlich die Reinigung und Desinfektion erschweren [31, 70, 147]. Für einen persistenten Biofilm auf der Kunststoffoberfläche sprechen zudem die sehr konstanten Keimzahlen über alle Probenahmen hinweg, mit Ausnahme die der Staphylokokken (Abb. 6).

Obwohl es sich beim Auslassstutzen des Milchsammeltanks ebenfalls um eine Edelstahloberfläche handelt, wurden hier schwankende, aber häufig erhöhte Gesamtkeimzahlen im Bereich zwischen 10^2 - 10^6 KbE/cm² nachgewiesen. Ähnlich hohe Belastungen mit mesophilen und psychrotrophen Bakterien konnten Flach *et al.* (2014) [146] auf den Auslassstutzen von sieben verschiedenen Milchsammeltanks nachweisen. Im Gegensatz dazu wiesen die beprobten Innenflächen des Sammeltanks deutlich geringere Besiedelungsdichten auf. Diese Beobachtung wurde auch in der vorliegenden Arbeit gemacht. Die Innenflächen des Rohmilchsammeltanks wurden nur bei einer Probenahme untersucht und keine nachweisbaren Keimzahlen detektiert (Daten nicht gezeigt). Ein Grund für die hohe Besiedelungsdichte und schwankende Keimzahlen ist, dass der Auslassstutzen nicht nach jedem Melkvorgang durch die CIP-Reinigung erfasst wird. Stattdessen wird er, zusammen mit dem Inneren des Rohmilchsammeltanks, alle drei Tage nach der Abholung der Milch durch die Molkerei in einem eigenen CIP-Verfahren gereinigt. In der Zwischenzeit kommt es vereinzelt zur Milchprobenahme durch Mitarbeiter des Versuchsguts, wonach Milchreste durch Abspülen mit Leitungswasser manuell entfernt werden. Verbleibende Milch- und Leitungswasserreste begünstigen die Anlagerung und Vermehrung von Mikroorganismen. Da der Auslassstutzen des Sammeltanks kein in sich geschlossenes Rohrleitungssystem darstellt,

können zusätzlich biofilmbildende Umweltkeime aus Staub, über Aerosole, aber auch über Melkerhände und Insekten eingetragen werden. Beim nächsten Milhdurchfluss können diese sich mit der Rohmilchmikrobiota vermischen, in den Sammel tank gelangen und möglicherweise in milchverarbeitende Betriebe weitergetragen werden. Aufgrund der von Biofilmen am Auslassstutzen des Milchsammel tanks ausgehenden indirekten Verbrauchergefährdung wurde auch dieser Probenahmeort in die Untersuchung mit einbezogen, obwohl er ebenfalls keinen direkten Bestandteil der Melkanlage darstellt.

Insbesondere in den Rohrleitungen der Melkanlage wurden starke Unterschiede zwischen den kulturell und molekularbiologisch ermittelten GKZ festgestellt (Abb. 12). Ein Grund hierfür könnte sein, dass es sich bei einem großen Teil der dort ansässigen Biofilmbesiedler um Milchsäurebakterien handelt. Dies wird an den zunehmenden Keimzahlen auf MRS-Agar vom Filterrohr bis hin zum Kunststoffrohr am Ende der Druckleitung deutlich (Abb. 6). Milchsäurebakterien haben besonders hohe Nährstoffansprüche, weshalb sie sich auf TSA nur schwer kultivieren lassen, oder von weniger anspruchsvollen Begleitkeimen überwachsen werden. Zusätzlich sind die Milchsäurebakterien zwar aerotolerant, können aber keinen Sauerstoff zur Vermehrung nutzen, weshalb sie unter aeroben Bedingungen aufgrund der geringeren Energieausbeute der Milchsäuregärung deutlich langsamer wachsen als zur aeroben Atmung fähige Mikroorganismen. Durch die anaerobe Inkubation auf MRS-Agar werden obligate Aerobier ausgeschlossen, die die Milchsäurebakterien überwachsen könnten. Da bis auf die Spezies *E. faecalis* kein von MRS-Agar stammendes Isolat zu aerobem Wachstum auf TSA fähig war, kann davon ausgegangen werden, dass die Keimzahlen auf MRS-Agar keinen Teil der auf TSA ermittelten „GKZ“ darstellen, sondern noch zur Keimzahl auf TSA hinzuaddiert werden müssten. Die Wiederfindung der meisten in der vorliegenden Arbeit isolierten Spezies ausschließlich auf dem anaerob inkubierten, nährstoffreichen MRS-Agar spricht für die Wichtigkeit, diesen für die Untersuchung von milchassoziierten Habitaten einzusetzen, da es andernfalls zur Unterschätzung der Milchsäurebakterien kommen könnte [118]. Da die DNA der kulturell auf TSA nicht nachweisbaren Milchsäurebakterien aus der Tupferabschwemmlösung trotzdem extrahiert werden konnte, sind die höheren Keimzahl-Äquivalente in den Rohrleitungen mit ihrem Nachweis in der RT-qPCR zu erklären.

Erhöhte Keimzahlen der Gram-negativen Pseudomonaden und Enterobakterien wurden ausschließlich in Biofilmen auf den dicht besiedelten Melkbecherablagen und dem Auslassstutzen des Sammel tanks nachgewiesen (Abb. 6). Dies suggeriert, dass diese häufig mit Kontamination, Verderbnisprozessen [50] und mangelhafter Hygiene assoziierten Bakteriengruppen eher eine Rolle in Biofilmen mit hoher Besiedelungsdichte zu spielen scheinen, während Gram-positive, mit der Milchumgebung und Eutermikrobiota assoziierte Bakterien in Biofilmen mit geringerer Bakteriendichte dominieren.

Die höchsten Keimzahlen der Gattung *Staphylococcus* wurden auf den Melkbecherablagen nachgewiesen. Dies ist durch ihre unmittelbare Nähe zu den Eutern zu erklären, da Staphylokokken, neben anderen Gram-positiven Bakterien, einen Teil der Hautmikrobiota darstellen. Auffällig war zudem der Nachweis von Staphylokokken auf verschiedenen Oberflächen, jedoch nicht auf den Edelstahlteilen der Melkanlage, was für ihre geringe Fähigkeit zur Besiedelung entsprechender Oberflächen spricht. Entgegen dieser Annahme wurden verschiedene Spezies der Gattung *Staphylococcus* von den in die Melkanlage eingebrachten Edelstahlcoupons isoliert. Ksontini *et al.* (2013) [13] zeigten, dass Staphylokokken im Vergleich zu *Bacillus spp.* und Milchsäurebakterien aus der natürlichen Rohmilchmikrobiota eine verzögerte Adhäsion und Biofilmbildung auf Edelstahlcoupons aufwiesen. Möglicherweise konnten sich nur wenige Staphylokokken auf den Edelstahloberflächen der in der vorliegenden Arbeit beprobten Melkanlage gegen ihre Konkurrenzmikrobiota durchsetzen.

Die Edelstahlcoupons wiesen nach 48 h Verbleib in der Melkanlage kulturelle GKZ von maximal 5 Kbe/cm² auf. Nach weiteren 24 h in der Anlage verdoppelte sich die GKZ (Tab. 15). Da die Coupons ebenso wie die Edelstahloberflächen der Melkanlage den CIP-Verfahren zur Reinigung und Desinfektion ausgesetzt waren, zeigte sich damit die enorme Fähigkeit der milchassoziierten Mikrobiota zur Besiedelung entsprechender Oberflächen und ihre Widerstandsfähigkeit gegen Reinigungs- und Desinfektionsverfahren. Aufgrund der insgesamt geringen Besiedelungsdichte konnten auf den Selektivmedien überwiegend keine Kolonien detektiert werden, weshalb die Charakterisierung der Erstbesiedler von Edelstahloberflächen anhand der Identifizierung der Isolate von TSA erfolgte.

Auch wenn die Besiedelungsdichte sich je nach beprobtem Teil der Melkanlage stark unterschied, wurde auf diversen Flächen über einen Probenahmezeitraum von drei Jahren das konstante Vorhandensein von Biofilmen nachgewiesen. Da die Tupferprobenahmen wenige Stunden nach der Reinigung und Desinfektion der Melkanlage erfolgten, deuten die Befunde aus der vorliegenden Arbeit darauf hin, dass die verwendeten CIP-Verfahren bereits bestehende Biofilme nicht ausreichend entfernen konnten. Der Nachweis von adhätierenden Bakterien auf den für 48 bzw. 72 h in die Melkanlage eingebrachten Edelstahlcoupons zeigte zudem, dass auch eine Neubesiedelung der entsprechenden Flächen nicht komplett verhindert werden konnte. Dabei könnten die Biofilmbildner entweder während des Melkvorgangs eingetragen worden sein, oder es hat eine Rekontamination nach der Reinigung und Desinfektion der Melkanlage stattgefunden. Der Eintrag potentieller Biofilmbildner könnte zum Beispiel durch das Leitungswasser erfolgt sein, welches zum Nachspülen der Anlage nach dem CIP-Verfahren verwendet wird. Das Leitungswasser zum Spülen der Anlage als Kontaminationsquelle von Biofilmbildnern wurde bereits von Flach *et al.* (2014) [146] diskutiert.

Als Schwachpunkte des Melkvorgangs in der beprobten Anlage mit erhöhter Biofilmbildung wurden die Melkbecherablagen, das Kunststoffrohr am Ende der Druckleitung und der Auslassstutzen des Milchsammeltanks identifiziert. Um der Biofilmbildung an diesen Stellen entgegen zu wirken, könnten Modifikationen am Aufbau der Melkanlage vorgenommen werden. So könnten die Melkgeschirre magnetisch aufgehängt werden, statt wie bisher auf die Melkbecherablagen aufgesteckt. Dies würde das Risiko des Eintrages von Bakterien von den dicht besiedelten Melkbecherablagen in die Melkanlage verringern. Beim derzeitigen Aufbau der Melkbecherablagen sollte vermehrt auf deren Reinigung geachtet sowie die Ansammlung von Wasser, Milch und Schmutzpartikeln vermieden werden. Aufgrund ihrer Flexibilität sind Kunststoffschläuche vermutlich anfälliger für Materialermüdung als Edelstahlrohre [143]. Da das Kunststoffrohr am Ende der Druckleitung während des Melkvorgangs die Milch in den Sammel tank einführt und anschließend zum Schließen des Reinigungs- und Desinfektionsmittelkreislaufs während des CIP-Verfahrens umgesteckt wird, erhöht sich das Risiko für Materialermüdung. Andererseits muss es sich aufgrund der auszuübenden Funktionen zwingend um ein flexibles Material handeln. Ein Weg zur Verringerung der Biofilmbildung wäre demnach nur ein häufigerer Austausch des Kunststoffrohrs [143].

Der Auslassstutzen des Milchsammeltanks stellt einen Bereich dar, dessen Besiedelungsdichte bei verschiedenen Probenahmen stark variierte. Dies war vermutlich davon abhängig, wie lange die CIP-Reinigung des Sammeltanks nach Abholung der Anlieferungsmilch her war. Hier sollte auf die Hygiene bei der Entnahme von Milchproben und dem anschließenden Ausspülen des Stutzens vermehrt geachtet werden, um die Ablagerung von Milchbestandteilen als Nährboden für Biofilmbildner zu verringern [146].

4.2 Antibiotikaresistenzen in Melkanlagen-Biofilmen

Insgesamt wurden auf fast allen beprobten Oberflächen der Melkanlage resistente Mikroorganismen gegen alle vier getesteten Antibiotika nachgewiesen (Abb. 11). Dabei waren die kulturell ermittelten Keimzahlen für Cloxacillin-resistente Mikroorganismen in den meisten Fällen etwa genauso hoch wie die GKZ. Eine Erklärung für das häufige Auftreten von Cloxacillin-Resistenzen in den Melkanlagen-Biofilmen ist der präventive Einsatz des Cloxacillin-haltigen Präparates Orbenin zum Trockenstellen der Milchkühe im untersuchten Milchviehbetrieb. Die präventive Gabe von Antibiotika zum Trockenstellen ist gängige Praxis in deutschen, sowie auch in europäischen und internationalen Milchviehbetrieben [3, 4, 148]. Der so entstehende Selektionsdruck kann zum Entstehen und zur Verbreitung entsprechender Resistenzen geführt haben [149]. Aufgrund ihrer heterogenen Zusammensetzung und der fördernden Wirkung von Biofilmen auf den horizontalen Gentransfer konnten sich die Resistenzgene vermutlich über die gesamte Melkanlage verbreiten.

Diese Beobachtungen decken sich mit Berichten aus der Literatur, wonach Multispezies-Biofilme das Wirtsspektrum für Resistenzgen-enthaltende mobile genetische Elemente (MGE) erweitern können und ein Reservoir für diese darstellen [69, 74]. Zudem können Antibiotikaresistenzgene und mit der Biofilmbildung assoziierte Gene auf demselben Plasmid codiert sein und gleichzeitig via HGT weiterverbreitet werden. Durch Co-Selektion können diese dann für längere Zeit in den Biofilmen erhalten bleiben [150]. Cloxacillin-Resistenzen werden meist durch OXA- β -Lactamasen der Gruppe D codiert, die häufig auf MGE in Gram-negativen Bakterien nachgewiesen werden [64, 151]. Von den prominentesten OXA- β -Lactamase-Gruppen 1, 2 und 10 [151] wurden in der untersuchten Melkanlage lediglich positive Signale für die OXA-2-Gruppe in den Tupfer-DNA-Extrakten der Melkbecherablage und in Plasmid-DNA-Extrakten von

ausgewählten Isolaten detektiert (Abb. 12, Tab. 23). Sharma & Anand (2002a) [51] fanden ebenfalls hohe Cloxacillin-Resistenzraten von über 85 %, allerdings in Gram-positiven Isolaten aus zwei verschiedenen Milch pasteurisierenden Unternehmen, und nicht wie in der vorliegenden Arbeit in Gram-negativen Isolaten. Diese Beobachtung unterstreicht die Bedeutung der Verbreitung von antibiotikaresistenten Bakterien aus Melkanlagen-Biofilmen über die Rohmilch in die milchverarbeitende Industrie, auch über phylogenetisch weit voneinander entfernte Taxa.

Trotz des unterschiedlichen Wirkmechanismus von Tetracyclin im Vergleich zu β -Lactam-Antibiotika wurden an allen untersuchten Stellen hohe Keimzahlen Tetracyclin-resistenter Organismen nachgewiesen. Diese waren in den meisten Fällen etwa gleich hoch wie die Keimzahlen der Penicillin- und Ampicillin-Resistenten (Abb. 11). Tetracyclin wird im untersuchten Betrieb selten und nur therapeutisch zur Behandlung von akuten Infektionen eingesetzt. Ein möglicher Grund für den hohen Resistenzstatus der Biofilme könnte neben der generell erhöhten Stabilisierung von Resistenz-vermittelten Plasmiden die schlechte biologische Abbaubarkeit von Tetracyclin sein. Dieses wird unverändert ausgeschieden und kann in der Umwelt länger persistieren und einen stetigen Selektionsdruck ausüben [55, 56]. Ein möglicher Eintrag von Tetracyclin-Resistenzen könnte daher u. a. auch über Darmbesiedler aus dem Fäzes der Milchrinder stattgefunden haben.

Gegen Tetracyclin sind verschiedene Resistenzmechanismen bekannt, wovon Effluxpumpen und ribosomale Schutzproteine die häufigsten sind. Während Effluxpumpen häufiger bei Gram-negativen Bakterien zu finden sind, kommen ribosomale Schutzproteine eher in Gram-positiven Organismen vor [65]. In der vorliegenden Arbeit wurde nur das ribosomale Schutzprotein codierende *tetM*-Gen untersucht. *tetM*-Gene sind häufig auf MGE wie Transposons und Plasmiden codiert und damit horizontal übertragbar. Neben dem positiven RT-qPCR-Nachweis in den Biofilm-DNA-Extrakten aller Probenahmeorte konnte das Gen auch in Plasmid-DNA-Extrakten der Isolate detektiert werden (Tab. 23). Der Nachweis sowohl in Gram-positiven als auch in Gram-negativen Gattungen in dieser, wie auch in anderen Studien, spricht für die Übertragung durch HGT und das breite Wirtsspektrum der entsprechenden MGE [65].

Im Gegensatz zu den untersuchten β -Lactamase-Genen konnte das *tetM*-Gen mittels RT-qPCR an allen Probenahmeorten nachgewiesen werden. Dabei lagen die berechneten

Keimzahl-Äquivalente gleich hoch oder höher als die kulturell ermittelten Keimzahlen der Tetracyclin-Resistenten (Abb. 12). Vermutlich lagen demnach mehrere Kopien des Gens pro Zelle vor, sodass die Berechnung zu einer Überschätzung der tatsächlichen Anzahl Tetracyclin-resistenter Bakterien geführt hat.

Die aus dem Nachweis der OXA-2-Gene berechneten Keimzahl-Äquivalente lagen an allen Probenahmeorten deutlich unterhalb der kulturell ermittelten Keimzahlen der Cloxacillin-Resistenten (Abb. 12). Trotz hoher kultureller Keimzahlen resistenter Mikroorganismen gegenüber β -Lactam-Antibiotika wurden keine weiteren β -Lactamase-codierenden Resistenzgene in den DNA-Extrakten der Tupferproben detektiert. Dies spricht für eine hohe Vielfalt der Resistenzgene in den Biofilmen, sodass vermutlich andere als die untersuchten Gene für die hohe Anzahl an Resistenten verantwortlich waren.

Möglicherweise besteht ein Zusammenhang zwischen Penicillin- und Ampicillin-Resistenzen, da die Keimzahlen der Resistenten gegen beide Antibiotika an den meisten Probenahmeorten gleich hoch waren. Da es sich bei beiden Antibiotika, wie auch bei Cloxacillin, um β -Lactam-Antibiotika handelt, könnte es zur horizontalen Weitergabe eines β -Lactamase-codierenden Gens gekommen sein, welches die Fähigkeit zur Spaltung beider oder aller drei getesteten Antibiotika verleiht. Aufgrund der Unterschiede zwischen Cloxacillin- und Ampicillin-/Penicillin-Resistenten ist eine wahrscheinlichere Erklärung jedoch das Vorkommen verschiedener β -Lactamasen. Dafür spricht auch, dass es sich bei Ampicillin und Penicillin um Penicillinase-sensitive Antibiotika handelt, während Cloxacillin durch entsprechende Enzyme nicht inaktiviert wird. Aus der Literatur geht hervor, dass mehrere tausend verschiedene β -Lactamasen mit stark variierender Affinität zu verschiedenen β -Lactam-Antibiotika bekannt sind [64, 149]. Somit ist das Auftreten verschiedener Gene in den hoch diversen Melkanlagen-Biofilmen sehr wahrscheinlich. Zudem besteht die Möglichkeit, dass verschiedene Antibiotikaresistenzen auf demselben MGE codiert sind [59, 64].

Eine Gefahr der Übertragung von antibiotikaresistenten Bakterien auf Verbraucher ist direkt nur durch den Verzehr von Rohmilch und Rohmilchprodukten gegeben [3]. Dennoch erfreut sich dieses Ernährungsverhalten immer größerer Beliebtheit, sodass auch die Wahrscheinlichkeit dieses Übertragungsweges zunimmt [150]. Jedoch kann es durch den Eintrag von antibiotikaresistenten Biofilmbildnern mit der Milch in

milchverarbeitende Betriebe [25] auch dort zur Neuausstattung von potenziellen Pathogenen mit Antibiotikaresistenzgenen kommen [4, 69]. Hier besteht die Möglichkeit, dass die Erreger eine Sekundärkontamination des Lebensmittels nach dem Pasteurisieren verursachen, wodurch das Risiko für die Verbraucher erhöht wird. Gelangen antibiotikaresistente Mikroorganismen mit dem Spülwasser der Melkanlage oder über Dung in die Umwelt, können sich die enthaltenen Antibiotikaresistenzgene dort ebenfalls weiterverbreiten [56]. Schlussendlich kann es auf verschiedenen Wegen zur Neuausstattung von Pathogenen mit klinisch relevanten Antibiotikaresistenzen kommen [60, 69], auf die Biofilme in Melkanlagen einen direkten oder indirekten Einfluss haben können.

Aufgrund der hohen Resistenzrate gegenüber Cloxacillin konnte in der vorliegenden Arbeit ein positiver Zusammenhang zwischen dem präventiven Einsatz von Cloxacillin-haltigen Trockenstellpräparaten und dem vermehrten Auftreten entsprechender Antibiotikaresistenzen gezeigt werden. Dementsprechend sollte über Alternativen zur präventiven Gabe von Antibiotika in Milchviehbetrieben nachgedacht werden. So könnte häufiger zwischen verschiedenen Wirkstoffen gewechselt werden, um den Selektionsdruck für die Entstehung und Weitergabe der entsprechenden Antibiotikaresistenzen gering und zeitlich begrenzt zu halten. Weiterhin ist das „selektive Trockenstellen“ ein innovatives Konzept, bei dem die Kühe ohne Antibiotikagabe trockengestellt werden, in diesem Zeitraum jedoch streng überwacht werden, um die Entstehung von Mastitiden frühzeitig zu erkennen. Mit Hilfe einer Identifizierung der Erreger und Erstellung von Antibiogrammen kann bei Auftreten einer Mastitis gezielt ein wirksames Antibiotikapräparat verabreicht werden. Diese Methode ist zeitaufwändiger und daher mit höheren Kosten verbunden. Dementsprechend bietet sie sich eher für Herden mit einem hohen Eutergesundheitsstatus an.

4.2.1 Korrelation der Besiedelungsdichte und Übertragung von Antibiotikaresistenzen

Aufgrund der wenigen Datenpunkte aus dem molekularbiologischen Nachweis von Resistenzgenen in der vorliegenden Arbeit konnte die Hypothese der gesteigerten Übertragung von Antibiotikaresistenzen in dicht besiedelten Biofilmen bisher nur anhand von Tetracyclin-Resistenzen bewertet werden. Demnach kann die Hypothese weder bestätigt noch vollständig verworfen werden.

Als Grund für diese Beobachtungen ist zu nennen, dass die Frequenz des HGT vermutlich nicht von der Zelldichte alleine, sondern von vielen verschiedenen Faktoren abhängt. Ein wichtiger Faktor ist die Spezieszusammensetzung und -vielfalt der Biofilme, die sich je nach Probenahmeort stark unterscheiden kann. Weiterhin ist die Ausstattung der vorzufindenden Biofilmbesiedler mit Antibiotikaresistenzgenen sowie deren Mobilisierbarkeit und horizontale Übertragbarkeit von Bedeutung. Auch die Zusammensetzung der Biofilmmatrix kann einen Einfluss auf den HGT haben. So kann das Vorliegen von eDNA in der EPS-Schicht die Kompetenzentwicklung bestimmter Spezies zur Aufnahme freier DNA (Transformation) triggern [69]. Des Weiteren stellt die EPS-Schicht eine wichtige Voraussetzung für die Zell-Zell-Kommunikation über QS-Moleküle dar [15, 74].

An Stellen mit hohem relativem Vorkommen von Antibiotikaresistenzgenen trotz geringer GKZ ist eine Absättigung der vorhandenen Bakterien mit den entsprechenden Resistenzgenen denkbar. Weiterhin könnten die Resistenzen auf „Multi-copy-Plasmiden“ vorliegen, welche in hoher Anzahl in einer Bakterienzelle vorhanden sind und bei der Berechnung von Keimzahläquivalenten aus der RT-qPCR-Amplifikation hohe Keimzahlen lediglich suggerieren. Zusätzlich spielen das Alter und die Architektur von Biofilmen vermutlich eine Rolle. So ist eine horizontale Übertragung von Resistenzgenen in älteren, reiferen Biofilmen, wie sie vermutlich auf den Melkbecherablagen vorzufinden sind, aufgrund der massiven EPS-Schicht womöglich nur eingeschränkt in den oberen Schichten des Biofilms möglich [25, 69, 152].

4.3 Charakterisierung der Isolate

Aufgrund der hohen Vielfalt der gewonnenen Isolate wird im Folgenden nur auf die für die Milchindustrie besonders relevanten Bakteriengruppen eingegangen. Diese zeichneten sich durch ihr produktschädigendes Potenzial aufgrund von Vermehrungsfähigkeit bei Kühltemperaturen sowie der Fähigkeit zur Zersetzung von Milchinhaltstoffen durch Proteolyse- und Lipolyse aus. Zusätzlich werden Biofilmbildner aufgrund ihrer Fähigkeit zur Besiedelung verschiedener Oberflächen, auch in der milchverarbeitenden Industrie, näher betrachtet. Biofilme stellen aufgrund ihrer hohen Resistenz gegenüber Reinigungs- und Desinfektionsverfahren eine kontinuierliche Kontaminationsquelle mit Verderbniserregern und/oder Pathogenen in allen Bereichen der Produktion dar.

Die Literaturdaten stimmen weitestgehend mit den in der vorliegenden Arbeit generierten Fettsäureprofilen der Isolate aus Fettsäuregruppe 1 überein [153-155]. Für die Isolate der Gattung *Kocuria* zeigte sich eine Verteilung der Isolierungsorte über die gesamte Melkanlage (Tab. 16, Abb. 7). Dies spricht, zusammen mit der großen Anzahl von 18 Mitgliedern der Fettsäuregruppe 1A, für ein persistentes Vorkommen von Spezies dieser Gattung in Biofilmen auf verschiedenen Oberflächen der beprobten Melkanlage. Dafür spricht zudem das ausgeprägte Biofilmbildungsvermögen in Mikrotiterplatten, welches für einen großen Anteil der gewonnenen Isolate nachgewiesen wurde (Tab. 42 im Anhang). Auffällig war der Einfluss des Austauschs von Glucose durch Lactose im Nährmedium, der eine deutlich verstärkte Biofilmbildung einiger Isolate der Spezies *K. salsaicia* bewirkte (Abb. 15, 17, Tab. 42 im Anhang). Trotz Wachstumsfähigkeit bei Kühltemperaturen war keines der *K. salsaicia*-Isolate in der Lage, Biofilme zu bilden (Abb. 15). Somit ist die Besiedlung des gekühlten Innenraums des Milchsammeltanks durch diese Gattung unwahrscheinlich. Die Biofilme diverser *Kocuria*-Isolate wiesen Resistenzen gegenüber den zur Reinigung und Desinfektion der Melkanlage verwendeten Mitteln auf (Abb. 19, 20). Die gebildeten Biofilme, vor allem von *K. kristinae* M245, besaßen noch eine schwache bis moderate Atmungsaktivität nach der Reinigungs- und Desinfektionsmittelbehandlung (Abb. 21). Dies zeigt, dass die Behandlung in der vom Hersteller empfohlenen Konzentration von 0,4 % weder zur Entfernung noch zur vollständigen Abtötung der Biofilme führte.

Während für die Spezies *K. salsaicia* kein pathogenes Potential bekannt ist, wird die Spezies *K. kristinae* als opportunistisches Pathogen eingeschätzt und in der Literatur mehrfach im Zusammenhang mit nosokomialen Infektionen wie Sepsis, Bakteriämie und Endocarditis genannt [156-159]. Dennoch werden alle Spezies der Gattung *Kocuria* in Risikogruppe 1 eingeordnet (TRBA 466). Obwohl es sich bei den beiden Spezies also nicht um lebensmittelassoziierte Pathogene handelt, könnten ihre Biofilme bei mangelhafter Effizienz der Reinigungs- und Desinfektionsmaßnahmen die Grundlage zur Ansiedlung und Vermehrung von Lebensmittelinfektionen oder –intoxikationen verursachenden Pathogenen sowie Verderbniserregern bieten. Dafür spricht die gesteigerte Biofilmbildung des Isolats *K. salsaicia* M130 in Mischkultur mit den Spezies *Agrobacterium pusense* M117 und M128 sowie *Bacillus thuringiensis/paranthracis* M146 (Abb. 22). In der Literatur konnte bereits eine vermehrte Inkorporation von *Listeria*

monocytogenes in Biofilme auf Edelstahl bei Anzucht in Mischkultur mit der Spezies *Kocuria varians* nachgewiesen werden [160].

Das Isolat *K. salsicia* M239 war zu einer schwachen Biofilmbildung auf Edelstahlcoupons fähig (Abb. 23). Dies unterstreicht seine Fähigkeit zur Besiedelung unterschiedlicher Oberflächen der untersuchten Melkanlage. Da die Biofilmbildung des Isolats auf Edelstahlcoupons durch den Austausch von Glucose durch Lactose im Nährmedium deutlich gesteigert werden konnte, ist davon auszugehen, dass das Biofilmbildungspotential der Gattung *Kocuria* in der Milchindustrie nicht unterschätzt werden sollte. Dafür sprechen auch die elektronenmikroskopischen Aufnahmen des Isolats *K. salsicia* M239 auf Edelstahlcoupons, bei denen eine deutliche Biofilmbildung mit verstärkter Einlagerung der Biofilmzellen in Oberflächenunebenheiten erkennbar war (Abb. 25). Auch Latorre *et al.* (2010) [143] stellten mittels SEM die bevorzugte Einlagerung von Bakterienzellen in Kratzer auf den Oberflächen von Milchmengenmessern fest.

Möglicherweise besitzen verschiedene Stämme der Gattung *Kocuria* zusätzlich zu ihrem Biofilmbildungsvermögen produktschädigendes Potential, da für einige Isolate der Fettsäuregruppe 1A die Fähigkeit zur Lipolyse, Proteolyse oder zur Durchführung beider Reaktionen nachgewiesen wurde (Tab. 16). Dabei war kein Zusammenhang zwischen der Fähigkeit zur Enzymproduktion und dem Biofilmbildungspotential erkennbar. Aufgrund ihrer Fähigkeit zur Verstoffwechslung von Milchhaltsstoffen macht die Gattung *Kocuria* häufig einen geringen Anteil der Mikrobiota von Rohmilch zur Produktion von Rohmilchkäse, im Inneren des Rohmilchkäses sowie auf den häufig aus Holz bestehenden Behältnissen zur Käseproduktion aus, wo sie vermutlich zur Aromaproduktion beitragen können [161-163]. Aufgrund ihrer Fähigkeit zur Biofilmbildung ist eine Übertragung aus der Melkanlage über die Rohmilch in die Käseherstellenden Betriebe durchaus wahrscheinlich. Auch die Gattung *Brachybacterium* aus der Fettsäuregruppe 1D gehört, wie einige weitere coryneforme Bakteriengattungen, die ebenfalls in der vorliegenden Arbeit detektiert wurden, zu den Aromaproduzenten in oberflächengereiftem Käse [154, 161, 164].

Die Isolate aus der zweitgrößten Fettsäuregruppe 2 wurden überwiegend als verschiedene Spezies der Gattung *Microbacterium* identifiziert. Die Hauptfettsäuren C15:0 anteiso, C16:0 iso und C17:0 anteiso stimmten mit den Literaturangaben überein [165, 166]. Die

Isolate der Gattung *Microbacterium* wurden zu verschiedenen Probenahmezeitpunkten von verschiedenen Oberflächen der Melkanlage sowie von den eingebrachten Edelstahlcoupons gewonnen. Dies spricht für ihr persistentes Vorkommen in Form von Biofilmen. Hinsichtlich ihres Biofilmbildungsvermögens in Mikrotiterplatten wiesen die Isolate stammspezifische Unterschiede auf (Tab. 42 im Anhang). Die Inkubation des Isolats *M. maritypicum/oxydans* M58 in Mischkultur mit mehreren anderen Gram-positiven Spezies führte zu einer Abnahme der Biofilmbildung. Dies könnte auf die Ausschüttung von Hemmstoffen aufgrund von Konkurrenz um Platz und Nährstoffe, insbesondere mit Bakterien mit ähnlichen Ansprüchen, zurückzuführen sein. Für verschiedene Spezies der Gattung *Microbacterium*, insbesondere *M. testaceum*, wurde in der Literatur bereits die Produktion von AHL-degradierenden Enzymen (Lactonasen) beschrieben [167, 168]. Eine Ausschüttung dieser Enzyme könnte somit QS-Vorgänge zwischen den Zellen anderer Spezies inhibieren und somit zu einer verminderten Biofilmbildung führen. Dagegen spricht im vorliegenden Fall, dass AHLs von Gram-negativen Bakterien gebildet werden, die Hemmung durch *M. maritypicum/oxydans* M58 aber in Mischkultur mit anderen Gram-positiven Organismen auftrat.

Das gehäufte Vorkommen sowie die Biofilmbildungsfähigkeit auf verschiedenen Materialien, die Reinigungs- und Desinfektionsmittelresistenz der gebildeten Biofilme und das proteolytische und teils lipolytische Potential machen einige Stämme der Gattung *Microbacterium* relevant für die Milchindustrie. Aus der Literatur ist der Beitrag der Spezies *M. foliorum*, welche auch in der vorliegenden Arbeit isoliert wurde, zur Aromaproduktion bei der Käseherstellung bekannt [169]. Dabei finden sich Bakterien der Gattung *Microbacterium* überwiegend als erwünschte Reifekulturen auf der Oberfläche von geschmiertem Käse [170].

Die stäbchenförmigen Isolate der Fettsäuregruppen 3 und 4 wurden überwiegend verschiedenen Spezies der Gattung *Bacillus* aus dem Phylum *Firmicutes* zugeordnet (Tab. 17, Abb. 9). Die Hauptfettsäuren C15:0 iso, C15:0 anteiso, C17:0 iso und C17:0 anteiso entsprachen weitestgehend den Literaturangaben [171-173].

Die detektierten Spezies wurden bereits in anderen Studien in Rohmilch sowie in fast allen Bereichen der Milchverarbeitung nachgewiesen. Als ursprüngliche Kontaminationsquelle von *Bacillus* spp. werden Verunreinigungen mit Erde, Einstreu, Silage, Fäzes und Leitungswasser zum Spülen des Equipments angenommen [46, 48].

Die als *B. safensis* identifizierten Isolate wiesen besonders starke Proteolyse- und Lipolysefähigkeit auf und besaßen somit produktschädigendes Potential. Die Bildung von hitzeresistenten Enzymen wurde für die Gattung *Bacillus* bereits in der Literatur beschrieben [25, 48, 49]. Die Fähigkeit dieser Gattung zur Sporenbildung, einhergehend mit teils starkem Biofilmbildungspotential, macht ihre Übertragung auf Milchtankwagen [44] und in die milchverarbeitende Industrie wahrscheinlich. Dort können sich aufgrund der Hitzeresistenz der Endosporen Biofilme auch in Rohrleitungen nach der Pasteurisierung etablieren, die Sekundärkontaminationen von Konsummilch verursachen können [5, 46, 48, 51]. Aufgrund der Fähigkeit von einigen Spezies der *B. cereus*-Gruppe zur Bildung von Enterotoxinen stellt ihr ubiquitäres Vorkommen in der Milchproduktion eine direkte Verbrauchergefährdung dar [46, 48, 49].

Ein sehr starkes Biofilmbildungspotential in Mikrotiterplatten sowohl in TSB als auch teilweise in Lactose-TSB wurde auch für die meisten Isolate der Gattung *Bacillus* in der vorliegenden Arbeit nachgewiesen (Tab. 42 im Anhang). Dabei wirkte sich der Austausch von Glucose durch Lactose im Nährmedium stammspezifisch entweder hemmend oder steigernd auf die Biofilmbildung aus (Abb. 17). Duanis-Assaf *et al.* (2015) [102] zeigten in diesem Zusammenhang, dass Lactose eine vermehrte Biofilmbildung von *B. subtilis* induzierte, welche die Autoren auf eine Aktivierung des LuxS/AI-2-QS-Systems sowie damit einhergehend eine vermehrte EPS-Produktion zurückführten.

Insgesamt stammten nur zwei der als *B. safensis* identifizierten Isolate von den in die Melkanlage verbrachten Edelstahlcoupons, alle anderen Mitglieder stammten aus den Tupferabstrichen. Dies spricht für eine wenig ausgeprägte Biofilmbildungsfähigkeit der Gattung auf Edelstahl. Auch Sadiq *et al.* (2017b) [28] konnten für diverse aus Milchpulver stammende Isolate der *B. cereus*-Gruppe mit Hilfe der Kristallviolett färbung nur eine geringe Biofilmbildungsfähigkeit auf Edelstahlcoupons nachweisen, während in Polystyrol-Mikrotiterplatten moderate Biofilme gebildet wurden. Dennoch wurden Lebendkeimzahlen zwischen 2,7 und 5 log₁₀ KbE/cm² auf den untersuchten Edelstahlcoupons nachgewiesen. Einen gegensätzlichen Befund machten Kwon *et al.* (2017) [174], die für *B. cereus* eine ähnlich starke Biofilmbildung auf Edelstahlcoupons wie in Mikrotiterplatten beobachteten. Die Autoren zeigten weiterhin eine ausgeprägtere Biofilmbildung auf lebensmittelassoziierten Edelstahl- als Plastikoberflächen. Auch laut Kumari & Sarkar (2016) [46] kann *B. cereus* stärkere Biofilme auf Edelstahl- als auf

Polystyroloberflächen bilden. Allerdings sei diese Eigenschaft abhängig von der Inkubationszeit, der Temperatur und dem pH-Wert des umgebenden Mediums. Zudem bilden *Bacillus spp.* stärkere Biofilme an der Grenzschicht zwischen Flüssigkeit und Luft, was bevorzugt in halb mit Flüssigkeit gefüllten Rohrleitungen und Lagertanks der Fall sein könnte [21, 46]. Gopal *et al.* (2015) [48] führten an, dass *B. cereus* für die Kolonisierung von Edelstahloberflächen Milchbestandteile wie natürliche Tenside oder Phospholipide benötigt und dass selbst verdünnte Milch die Biofilmbildungsfähigkeit mindert. Diese Eigenschaft könnte die nicht vorhandene Fähigkeit zur Biofilmbildung in TSB in der vorliegenden Arbeit erklären.

In den durchgeführten Versuchen war der überwiegende Anteil der *Bacillus*-Isolate zu keinem Wachstum bei 4 °C fähig und auch die Isolate mit schwachem Wachstum bei Kühltemperaturen wiesen keine Biofilmbildung auf. Somit scheint eine Besiedelung von gekühlten Flächen, wie dem Innenraum des Milchsammeltanks, eher unwahrscheinlich.

Hervorzuheben ist die zum Teil stark ausgeprägte Resistenz der gebildeten Biofilme gegenüber beiden oder einem der zur Reinigung und Desinfektion der Melkanlage eingesetzten Mittel. Das Überleben der Reinigungs- und Desinfektionsmittelbehandlung von nur wenigen Biofilm-Zellen reicht aus, um in der Zeit zwischen den Melkintervallen zur weiteren Proliferation des Biofilms beizutragen. Die Spezies *B. licheniformis*, die anhand ihrer 16S rRNA-Gensequenz nicht von der in der vorliegenden Arbeit nachgewiesenen nahe verwandten Spezies *B. paralicheniformis* abzugrenzen ist, wird häufig in pasteurisierter Milch, Molke und Milchpulver nachgewiesen [48, 49]. Aufgrund ihrer Fähigkeit zur Sporenbildung besteht die Möglichkeit, dass biofilmbildende Stämme dieser Spezies von der Rohmilch über die gesamte Milchverarbeitung bis zur Milchpulverproduktion übertragen werden können [49]. Ihre Fähigkeit zur Biofilmbildung, einhergehend mit der in der vorliegenden Arbeit beobachteten Reinigungs- und Desinfektionsmittelresistenz macht die Entfernung von bereits gebildeten Biofilmen nahezu unmöglich.

Weiterhin relevant für die hochdiverse Zusammensetzung von Biofilmen in der Milchindustrie waren die Ergebnisse der Mischkultur-Versuche mit dem Isolat *B. thuringiensis/paranthracis* M146 aus der *B. cereus*-Gruppe. Dieses führte in Mischkultur mit verschiedenen Gram-positiven und -negativen Isolaten zur einer deutlich gesteigerten Biofilmbildung (Abb. 22). *B. thuringiensis/paranthracis* M146 dominierte

deutlich im Überstand der Mischkultur und im gebildeten Biofilm. Der Überstand des Isolats allein oder der Mischkultur wirkte sich hemmend auf die Biofilmbildung der jeweiligen Reinkulturen aus (Daten nicht gezeigt). Dies legt die Vermutung nahe, dass das Isolat in der Lage ist, das Wachstum seiner Konkurrenz-Mikrobiota zu hemmen und sich dadurch einen Wachstumsvorteil zu verschaffen. Dies könnte zum Beispiel auf die Produktion von Bacteriocinen oder Biotensiden wie zyklischen Lipopeptiden/Surfactin [147, 175, 176] sowie von Quorum-Sensing-Molekülen wie dem Second Messenger zyklisches di-Adenylat-Monophosphat (c-di-AMP) zurückzuführen sein [177]. In der Literatur wurde bereits die Rolle von sekretiertem c-di-AMP als Signalmolekül bei der Biofilmbildung der Spezies *B. subtilis* auf Pflanzen beschrieben. Da dieses Signalsystem unter verschiedenen Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien verbreitet ist, könnte es auch in der interzellulären Kommunikation eine Rolle spielen [178, 179].

Die Fettsäuregruppe 5 (Tab. 18) enthielt verschiedene Spezies der Gattung *Staphylococcus*. Die Isolate stammten überwiegend von den Melkbecherablagen und den in die Melkanlage eingebrachten Edelstahlcoupons. Damit befinden sich viele Staphylokokken in unmittelbarer Nähe zu den Kuhzitzen. Die in der vorliegenden Studie detektierten Spezies wurden von Braem *et al.* (2013) [180] häufig von den Zitzen von Milchkühen in Belgien isoliert. Die Spezies *S. arlettae*, *S. cohnii* und *S. haemolyticus* wurden zudem in vielen Fällen auf den Zitzen von Kühen mit subklinischer Mastitis detektiert.

Einige der in der vorliegenden Arbeit detektierten Koagulase-negativen *Staphylococcus* (KNS)-Spezies wurden bereits als Auslöser von subklinischer Mastitis in der Literatur beschrieben [181-184]. Dies ist besonders im Zusammenhang mit der Antibiotikabehandlung von Mastitiden von Bedeutung, da unter den antibiotikaresistenten Isolaten in der vorliegenden Studie auch Cloxacillin- und Tetracyclin-resistente *Staphylococcus*-Isolate waren (Abb. 13). Bal *et al.* (2010) [185] wiesen in KNS-Isolaten aus Milchproben hohe Resistenzraten von über 50 % gegenüber den β -Lactam-Antibiotika Penicillin G und Ampicillin nach. In der vorliegenden Studie konnten zwar keine Isolate von den mit diesen Antibiotika versetzten TSA-Platten gewonnen werden, dennoch ist das Vorhandensein von Kreuzresistenzen gegenüber verschiedenen β -Lactam-Antibiotika denkbar. Die Autoren testeten nicht auf Resistenzen gegenüber Cloxacillin. Die Resistenzrate von 7 % gegenüber Tetracyclin war geringer als in anderen Studien. Die

Autoren begründeten unterschiedliche Resistenzraten mit unterschiedlichen Mastitis-Managementsystemen in verschiedenen Herden und/oder Ländern [185]. Tremblay *et al.* (2014) [2] wiesen erhöhte Resistenzraten verschiedener KNS-Spezies gegenüber Penicillin G/Novobiocin und Ceftiofur in Biofilmen im Vergleich zu planktonischen Kulturen nach. Sie empfahlen die Verwendung von Iod-haltigen Zitzendesinfizierern nach dem Melkvorgang zur Reduktion von KNS-Biofilmen auf der Euterhaut, um Mastitiden zu verhindern.

KNS als Auslöser subklinischer und teilweise persistenter Mastitiden sind besonders kritisch, da sich diese nur durch erhöhte Zellzahlen und nicht durch klinische Symptome äußern [182, 186, 187]. Dementsprechend könnten an subklinischer Mastitis erkrankte Kühe die Erreger in der Herde verbreiten, bevor die Erkrankung entdeckt und die Kühe zur Behandlung separiert werden. Zu einem möglichen Übertragungsweg zählt dabei das Melkgeschirr beim maschinellen Melkvorgang.

Im Gegensatz zu dem möglichen Übertragungsweg von KNS über Biofilme konnte in keiner Probenahme *S. aureus* nachgewiesen werden. Dies ist verwunderlich, da dieser Erreger in der Milchviehherde des untersuchten Betriebs häufig als Auslöser von Mastitiden identifiziert wird. Dementsprechend besteht für dieses Pathogen wahrscheinlich ein anderer Übertragungsweg als über kontaminiertes Melkzeug.

Es wird vermutet, dass die KNS aufgrund ihrer ubiquitären Verbreitung in der Stallumgebung, auf der Euterhaut, dem Melkzeug und in der Milch [183, 188] vermehrt in Kontakt mit Antibiotika kommen und daher höhere Resistenzraten aufweisen als die eigentlich pathogenere Spezies *S. aureus* [189]. Das Vorkommen mehrerer Spezies, z. B. als Biofilme auf der Euteroberfläche, steht zudem in Verdacht, den Austausch von Antibiotikaresistenzgenen zu begünstigen [180, 184]. So steht für die Entstehung von Methicillin-resistenten *S. aureus*-Stämmen (MRSA) der horizontale Austausch von entsprechenden Resistenzgenen mit KNS in Verdacht [190]. Dies könnte ebenso für Multispezies-Biofilme auf verschiedenen Oberflächen der Melkanlage zutreffen, wo zusätzlich der genetische Austausch mit weiteren bakteriellen Taxa stattfinden könnte, die nicht zu den typischen Besiedlern der Zitzenoberfläche zählen. Eine Rückübertragung entsprechend neu ausgestatteter Zitzenbesiedler würde so zur Erweiterung des genetischen Pools in diesem Habitat beitragen.

Für die Relevanz der detektierten Staphylokokken spricht die Zugehörigkeit der Spezies *S. chromogenes* und *S. haemolyticus* zu Risikogruppe 2 sowie die Einschätzung der übrigen, in Risikogruppe 1 gehörigen Spezies als opportunistische Krankheitserreger (TRBA 466). Die überwiegende Mehrheit der *Staphylococcus*-Isolate besaß zudem produktschädigendes Potential durch Proteolyse- und/oder Lipolyse-Fähigkeit. Die meisten Isolate besaßen jedoch kein bis maximal moderates Biofilmbildungsvermögen in Mikrotiterplatten und waren bei 4 °C nicht in der Lage sich zu vermehren. Ihr Vorkommen auf den in die Melkanlage verbrachten Edelstahlcoupons sowie in verschiedenen Rohmilchproben aus dem Sammel-tank der beprobten Melkanlage [79] sprechen dennoch für ihre Fähigkeit zur Anheftung an verschiedene Flächen der Melkanlage, oder zumindest für ihre Integration in bereits bestehende Biofilme. Dafür spricht auch die gesteigerte Biofilmbildung in verschiedenen Mischkulturen mit dem Isolat *S. cohnii* M34 (Tab. 45 im Anhang). Bei *S. cohnii* handelt es sich diverser Probenahmen zufolge um die in der beprobten Melkanlage und der Stallumgebung am häufigsten vorkommende *Staphylococcus*-Spezies [191, 192]. Dies wurde in der vorliegenden Arbeit erneut bestätigt.

Vier der neun Isolate aus Fettsäuregruppe 6 wurden anhand ihrer 16S rRNA-Gensequenz der Gattung *Stenotrophomonas* zugeordnet (Tab. 19). Die Hauptfettsäuren stimmten mit den Literaturangaben überein [193, 194]. Die 16S rRNA-Gensequenzierung ergab zunächst für alle Isolate aus Gruppe 6 den nächstähnlichen Typstamm *S. maltophilia*, jedoch mit unterschiedlichen prozentualen Übereinstimmungen. Daraufhin durchgeführte *gyrB*-Sequenzierungen, Genomsequenzierungen, digitale und biochemische DNA-DNA-Hybridisierungen sowie phänotypische Unterschiede führten zu einer Neubeschreibung der Spezies *S. lactitubi* mit dem Typstamm M15 [195]. Die hohe genetische Ähnlichkeit zwischen verschiedenen Spezies der Gattung *Stenotrophomonas* macht eine Unterscheidung anhand von 16S rRNA-Gensequenzen generell schwierig, weshalb bis zur Neubeschreibung der Spezies *S. nitritireducens* im Jahre 2000 [196] von einer hohen phänotypischen und genotypischen Variabilität umweltassoziierter und klinischer Stämme der Spezies *S. maltophilia* ausgegangen wurde [197, 198]. Seitdem wurden 14 weitere Spezies der Gattung ohne pathogenes Potential beschrieben [199]. Die Unterscheidung zwischen apathogenen, umweltassozierten Spezies der Gattung *Stenotrophomonas* und dem einzigen bisher bekannten Pathogen, *S. maltophilia* (Risikogruppe 2, TRBA 466), welches häufig mit nosokomialen Infektionen in

Verbindung gebracht wird, ist zur Risikobeurteilung der Erreger in der Lebensmittelproduktion von großer Relevanz.

Im Vergleich zu den zwei vom Auslassstutzen des Sammel tanks isolierten *S. maltophilia*-Isolaten M154 und M158a, die kein Wachstum bei 4 °C aufwiesen, besaßen die zwei von den Melkbecherablagen isolierten *S. lactitubi*-Isolate M15 und M183 sowohl bei 30 °C als auch bei 4 °C ausgeprägtes Wachstum einhergehend mit einem starken bis sehr starken Biofilmbildungsvermögen. Während der Austausch von Glucose durch Lactose im Nährmedium eine gleichbleibend sehr starke Biofilmbildung des Isolats *S. maltophilia* M154 bewirkte, führte der Austausch des Zuckers zu einer drastischen Steigerung der Biofilmbildung von *S. lactitubi* M15 (Abb. 17). Zudem war *S. lactitubi* M15 zur Biofilmbildung auf Edelstahlcoupons in beiden Medien fähig (Abb. 23). Alle Isolate der Gattung *Stenotrophomonas* zeichneten sich weiterhin durch starkes Lipolyse- und Proteolyse-Vermögen aus. Dies zeigt die Adaptierung an die Milchumgebung und das einhergehende produktschädigende Potential. Die gebildeten Biofilme der *Stenotrophomonas*-Isolate waren zudem resistent gegenüber der Behandlung mit beiden zur Reinigung und Desinfektion der beprobten Melkanlage eingesetzten Mitteln (Abb. 18, 20). Allerdings wies nur die pathogene Spezies *S. maltophilia* M154 eine restliche Zellviabilität nach der Behandlung auf (Abb. 21). Dennoch ist die mangelhafte Entfernung der Biofilmmatrix durch die verwendeten Reinigungs- und Desinfektionsverfahren relevant für die erneute Anheftung und Proliferation von biofilmbildenden Mikroorganismen auf Melkanlagenoberflächen.

Fünf der insgesamt neun Isolate der Fettsäuregruppe 7 wurden als *Serratia marcescens* und *Escherichia coli/marmotae* identifiziert (Tab. 19) und gehören damit zur Ordnung *Enterobacterales* aus der Klasse der *Gammaproteobacteria* (Abb. 10). In allen Isolaten konnte die für die Ordnung typische Fettsäure C14:0 3OH nachgewiesen werden. Auch das restliche Fettsäuremuster stimmte weitestgehend mit den Literaturangaben überein [200, 201]. Sowohl bei *S. marcescens* als auch bei *E. coli* handelt es sich um Pathogene der Risikogruppe 2 (TRBA 466). Für *E. marmotae* existiert bisher keine Risikobewertung. Fast alle Isolate aus Gruppe 7 besaßen die Fähigkeit zur Proteolyse, die insbesondere bei den *Serratia*-Isolaten stark ausgeprägt war. Diese Eigenschaft, zusammen mit ihrer zumindest schwachen Vermehrungsfähigkeit bei Kühltemperaturen, macht die Isolate zu potentiellen Produktschädlingen. Dazu zählen auch ihre diversen

Isolierungsorte, unter anderem der Auslassstutzen des Milchsammeltanks, und ihr sehr starkes Biofilmbildungsvermögen bei 30 °C. Da der Auslassstutzen des Milchsammeltanks keiner Kühlung unterliegt, könnte es dort zur Proliferation der Biofilme einhergehend mit einer erhöhten Produktion von Proteasen kommen, die dann bei Abholung durch die Molkerei in die Rohmilch abgeschwemmt werden. So könnte eine Verschleppung der evtl. hitzeresistenten Enzyme inklusive ihrer biofilmbildenden Produzenten in den Milchtankwagen und weiter in die milchverarbeitende Industrie erfolgen [44, 146].

Bei den meisten Isolaten aus Gruppe 7 bewirkte der Austausch von Glucose durch Lactose im Nährmedium keine Veränderung der Biofilmbildung. Beim Isolat *E. marmotae/coli* M159 kam es allerdings zu einer Verdopplung der Biofilmbildung in Lactose-TSB, was für eine Adaptation des Stammes an Milch als Nährmedium spricht (Abb. 17, Tab. 42 im Anhang). Starke Biofilmbildung, insbesondere nach Zugabe von verdünnter rekonstituierter Magermilch zum Medium, wurde für verschiedene milchassoziierte *E. coli*-Stämme bereits in der Literatur beschrieben [150, 202]. Wie die Autoren selber anmerkten, könnte jedoch auch eine Anfärbung der Magermilchbestandteile durch Kristallviolett den Eindruck einer verstärkten Biofilmbildung erweckt haben [150]. In der vorliegenden Arbeit konnte diese Vermutung bestätigt werden, da anfängliche Versuche zur Biofilmbildung in rekonstituierter Magermilch zu einer sehr starken Kristallviolett färbung der Negativkontrollen ohne Inokulum führte, sodass eine Auswertung nicht mehr möglich war. Daher wurde sich in der vorliegenden Studie auf den Austausch des Zuckers Glucose im Medium TSB durch das Hauptkohlenhydrat der Milch, Lactose, beschränkt.

Die gebildeten Biofilme der Isolate, insbesondere der Spezies *S. marcescens*, wiesen deutliche Resistenzen gegenüber beiden zur Reinigung und Desinfektion der Melkanlage eingesetzten Mitteln auf (Abb. 18). Die Zellviabilität nach der Behandlung war allerdings, wie bei fast allen getesteten Isolaten, gering bis nicht vorhanden, sodass auch in diesem Fall von einer effizienten Abtötung der Zellen, jedoch einer mangelhaften Entfernung der Biofilm-Matrix ausgegangen werden kann. Diverse Studien konnten zeigen, dass die Biofilmbildung von *S. marcescens* stark von einer Quorum-Sensing-induzierten Expression von Virulenzfaktoren, z. B. von Typ-I-Fimbrien, abhängig ist. Weiterhin können die Nährstoffverfügbarkeit, die Art und Konzentration der Kohlenstoffquelle

sowie die zu besiedelnde Oberfläche einen Einfluss auf die Biofilmbildung haben [203-206]. Somit könnten QS-Inhibitoren genutzt werden, um die Biofilmbildung dieser Spezies zu verhindern oder zumindest zu inhibieren.

Das Isolat *S. marcescens* M27, welches eine sehr starke Biofilmbildung in Mikrotiterplatten aufwies, war nur zu einer kaum messbaren Biofilmbildung auf Edelstahl fähig (Abb. 23). Daran zeigt sich, dass die Ergebnisse aus den Mikrotiterplattenassays nur einen Hinweis auf die Biofilmbildungsfähigkeit von Reinkulturen geben und nicht ohne Weiteres auf Edelstahloberflächen sowie auf die realen Begebenheiten in der Lebensmittelindustrie übertragen werden können. Dies wurde auch in einer Studie festgestellt, in der nur ein *E. coli*-Stamm zur Biofilmbildung auf Edelstahlcoupons fähig war, während fast alle getesteten Stämme starkes Biofilmbildungsvermögen in Mikrotiterplatten aufwiesen [150].

Das Vorliegen von *E. coli*-Stämmen in Melkanlagen-Biofilmen ist zusätzlich aufgrund der weiten Verbreitung von horizontal übertragbaren Extended-Spectrum-Beta-Lactamasen (ESBL)-codierenden Genen innerhalb dieser Spezies von Bedeutung [207]. Die Tierproduktion, auch die Milcherzeugung, steht im Verdacht, Ausstattungsort von humanpathogenen Erregern mit entsprechenden Antibiotikaresistenzgenen zu sein [208, 209]. Das Vorhandensein von Biofilmen begünstigt den Austausch dieser sowie anderer Virulenzfaktor-codierender Gene via HGT, auch über Spezies- und Gattungsgrenzen hinweg [150]. Auch Fliegen in der Milchviehhaltung wurden bereits als potentielle Vektoren für die Verbreitung von multiresistenten *E. coli*-Stämmen identifiziert [210]. Außerdem handelt es sich bei *E. coli* um einen möglichen Mastitiserreger [211, 212]. Der Nachweis dieses Pathogens auf den Melkbecherablagen, das heißt in unmittelbarer Nähe zu den Kuheutern während des Melkvorgangs, lässt auf eine mögliche Gefahr der Übertragung des Erregers innerhalb der Herde schließen.

Auch in der vorliegenden Arbeit wurden gegen Beta-Lactam-Antibiotika resistente Bakterien der Ordnung *Enterobacterales* (Gattungen *Enterobacter* und *Raoultella*) detektiert (Abb. 13). In einem Isolat der Gattung *Raoultella* wurde ein Beta-Lactamase-Gen der OXA-2-Gruppe nachgewiesen (Tab. 23), welche derzeit als Schmalspektrum-Beta-Lactamasen charakterisiert werden, von denen Antunes *et al.* (2014) [213] jedoch zeigen konnten, dass sie auch Carbapeneme hydrolysieren können. Odenthal *et al.* (2016) [214] wiesen zudem das hochfrequente Vorkommen von ESBL

der CTX-M-Familie, insbesondere in der Spezies *E. coli*, aber auch in den Gattungen *Hafnia* und *Enterobacter* aus Rohmilchproben aus Sammeltanks von 866 verschiedenen Milchviehbetrieben in Deutschland nach. Die Produktion von ESBL ist demnach nicht nur für die Übertragung z. B. auf Darmbesiedler bei Rohmilchverzehr von Bedeutung, sondern stellt auch aufgrund der möglichen Entstehung von multiresistenten Mastitiserregern eine Gefährdung für die Milchviehherde dar [214-216].

Die mit insgesamt 20 Isolaten viertgrößte Fettsäuregruppe 8 beinhaltete zwei verschiedene Spezies der Gattung *Acinetobacter*. Dabei dominierte die Spezies *A. guillouiae* deutlich vor *A. johnsonii* (Tab. 19). Dieselben Spezies wurden bereits mehrfach in Rohmilch aus dem Sammeltank des beprobten Milchviehbetriebs nachgewiesen [79], was für ihr persistentes Vorkommen in Biofilmen spricht. Bei beiden Spezies handelt es sich um Pathogene der Risikogruppe 2 (TRBA 466). Die Isolate stammten von verschiedenen Stellen der Melkanlage, jedoch ausschließlich von den Tupferproben. Dies zeigt zum einen ihr ubiquitäres Vorkommen in Biofilmen auf verschiedenen Oberflächen in der beprobten Melkanlage, gibt jedoch auch einen Hinweis auf Defizite in der zeitnahen Besiedelung von in die Melkanlage eingebrachten Edelstahlloupons. Ihre ausgeprägte Lipolyse-Fähigkeit sowie das starke Wachstum bei Kühltemperaturen, häufig einhergehend mit einer sehr starken Biofilmbildung, macht diese Gattung zu potentiellen Verderbniserregern. Dies wird durch Studien bestätigt, bei denen die Gattung *Acinetobacter*, zusammen mit den ebenfalls psychrotrophen Pseudomonaden, zur dominierenden Mikrobiota in gekühlter Rohmilch zählte [118].

In der Intensität der Biofilmbildung sowie des Einflusses von Kühltemperaturen und des Austauschs von Glucose durch Lactose zeigten sich stammspezifische Unterschiede der Spezies *A. guillouiae* (Abb. 15). Kang & Park (2010) [217] beschrieben den Einfluss von Signalen eines AHL-QS-Systems auf die Biofilmbildung von *Acinetobacter* sp. DR1. Möglicherweise ist dieses System auch für die in der vorliegenden Arbeit beobachteten Unterschiede in der Biofilmbildung verschiedener Stämme unter diversen Umwelteinflüssen verantwortlich. Die meisten Biofilme der *Acinetobacter*-Stämme wiesen ausgeprägte Resistenzen gegenüber beiden zur Reinigung und Desinfektion der Melkanlage eingesetzten Mitteln auf. Die Zellviabilitätsmessungen zeigten, dass die Biofilme der *A. guillouiae*-Isolate nach der Reinigungs- und Desinfektionsmittelbehandlung noch Rest-Atmungsaktivitäten aufwiesen (Abb. 21).

Somit können die verbliebenen vermehrungsfähigen Zellen nach der Reinigung und Desinfektion der Melkanlage die mangelhaft bis gar nicht entfernte EPS-Matrix zur raschen Regeneration und weiteren Proliferation des Biofilms nutzen, was eine Gefahr für die Hygiene der betroffenen Flächen darstellt. Im Vergleich zu seiner sehr starken Biofilmbildung in Mikrotiterplatten wies *A. guillouiae* M9 nur eine schwache Biofilmbildung auf Edelstahlcoupons auf.

In einer Studie von Bardbari *et al.* (2017) [218] konnten die Autoren eine Korrelation zwischen Antibiotikaresistenzen und Biofilmbildungspotential von umweltassoziierten und klinischen *A. baumannii*-Isolaten nachweisen. Dies ist im Zusammenhang mit der vorliegenden Arbeit von Bedeutung, da Spezies der Gattung *Acinetobacter* unter den antibiotikaresistenten Isolaten aus Melkanlagen-Biofilmen deutlich dominierten und Resistenzen gegenüber allen getesteten Antibiotika aufwiesen (Abb. 13). Ihr Vorliegen in Biofilmen kann die Weitergabe der Resistenzen via HGT begünstigen und zu neuen genetischen Kombinationen mit erhöhter Virulenz beitragen, welche auf verschiedenen Wegen auch in den humanpathogenen Bereich übertragen werden können.

Die Fettsäuregruppe 9 war mit 36 Isolaten die vertreterstärkste Gruppe. Bei allen identifizierten Vertretern handelte es sich um Milchsäurebakterien der Gattungen *Lactobacillus*, *Enterococcus* und *Pediococcus* (Tab. 20). Milchsäurebakterien spielen eine wichtige Rolle bei der Herstellung von Milchverarbeitungsprodukten wie Joghurt oder Käse. Zumeist werden der Milch für deren Herstellung spezielle Starterkulturen, z. B. bestehend aus *Lactococcus lactis*, *Streptococcus thermophilus* und *Leuconostoc mesenteroides* zugesetzt [219]. Es gibt jedoch auch traditionelle Käsesorten, bei denen die natürliche Mikrobiota der Milch bzw. von Biofilmen auf Oberflächen des Herstellungsbetriebes als Starterkulturen dienen [220, 221]. Allerdings kann das Vorkommen von Nicht-Starter-Milchsäurebakterien (non-starter lactic acid bacteria, NSLAB) auch zur Produktion unerwünschter Fehlgerüche oder anderen sensorischen Defekten führen [222, 223]. Dennoch tragen NSLAB in späteren Phasen der Käsureifung vermutlich zur Entwicklung erwünschter Aromen bei, da sie in vielen Käsesorten am Ende des Reifungsprozesses die natürlichen Starterkulturen verdrängt haben [219, 224]. Sowohl die natürlichen Starterkulturen als auch die NSLAB stammen vermutlich aus der Rohmilch und die Wahrscheinlichkeit ist hoch, dass diese über Biofilme in die milchverarbeitende Industrie eingetragen werden und dort persistieren können [222]. Die

vorliegende Arbeit bestätigt diese Vermutung, da die hier isolierten Gattungen bzw. Spezies häufig auch in der Käseherstellung detektiert werden [225, 226]. So wiesen Gori *et al.* (2013) [219] *Lb. paracasei* als dominierende NSLAB-Spezies im Kern von dänischen industriell hergestellten Käsesorten verschiedener Molkereien nach. Diese Spezies, bzw. die anhand ihrer 16S rRNA-Gensequenz nicht unterscheidbare Spezies *Lb. casei*, konnte in der vorliegenden Arbeit ebenfalls als dominierende *Lactobacillus*-Spezies in den Melkanlagen-Biofilmen nachgewiesen werden.

Im Gegensatz zu den erwünschten NSLAB werden Enterokokken in vielen Lebensmitteln als Hygieneindikatoren betrachtet, da sie natürlicherweise im Darm von Säugetieren vorkommen [227]. Ihr Auftreten in hohen Zahlen ist entsprechend unerwünscht [170, 225]. Dennoch ist das Vorkommen der Spezies *E. faecium* und *E. faecalis* in Rohmilch nicht ungewöhnlich. Zudem besitzen verschiedene *Enterococcus*-Spezies vermutlich positive Eigenschaften bei der Produktion von italienischen Käsesorten wie „Fontina“ [225, 227, 228].

Milchsäurebakterien werden in diversen Studien als natürliche Inhibitoren der Biofilmbildung pathogener oder verderbniserregender Mikroorganismen vorgeschlagen [22, 220, 229, 230], da sie verschiedene antimikrobielle Substanzen (Bakteriocine) produzieren können. So bilden manche Stämme der Gattung *Lactococcus* das Lantibiotikum Nisin, welches besonders gegen andere Gram-positive Bakterien, z. B. *L. monocytogenes*, wirksam, und als Lebensmittelkonservierungsstoff zugelassen ist [42, 231, 232]. Neuere Studien weisen vermehrt darauf hin, dass die in Biofilmen auf den Oberflächen der Käseherstellung persistierenden Milchsäurebakterien die Ansiedlung von Pathogenen und Verderbniserregern verhindern und damit zu einer stabilen Produktqualität beitragen können [220, 225]. Stellato *et al.* (2015) [220] konnten in diesem Zusammenhang zeigen, dass die Gattungen *Streptococcus* und *Lactococcus* möglicherweise die Ansiedlung von Verderbniserregern der Gattungen *Pseudomonas* und *Acinetobacter* auf verschiedenen Oberflächen der Käseherstellung verhindern könnten. In der vorliegenden Arbeit wurde kein Isolat diesen Gattungen zugeordnet. Dennoch ist möglicherweise auch die Dominanz der Gattungen *Enterococcus*, *Lactobacillus* und *Pediococcus* im Rohrleitungssystem der beprobten Melkanlage auf antibakterielle Effekte einhergehend mit einer Hemmung der Konkurrenzmikrobiota zurückzuführen.

Die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Isolate zeigten überwiegend die Fähigkeit zur Proteolyse, nur wenige betrieben zusätzlich Lipolyse. Ob die produzierten Abbauprodukte einen positiven oder negativen Einfluss auf die Qualität von Milchveredelungsprodukten hätten, kann nicht abschließend beurteilt werden. Dennoch spricht die Isolation vieler verschiedener Milchsäurebakterien-Spezies in der Melkanlage für die Relevanz ihres Eintrags aus der Milchproduktion in milchverarbeitende Betriebe. Die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Isolate bildeten nur schwache Biofilme in Mikrotiterplatten (Tab. 42 im Anhang). Bis auf die *Enterococcus faecalis*-Isolate, welche starkes Wachstum bei 4 °C aufwiesen, waren alle anderen Milchsäurebakterien bei 4 °C höchstens zu schwachem Wachstum in der Lage. Die psychrotrophen Eigenschaften der Gattung *Enterococcus* wurden bereits in der Literatur beschrieben [227].

Die heterogene Fettsäuregruppe 10 enthielt die Gattungen *Xenophilus*, *Pseudomonas* und *Microvirgula* (Tab. 20). Die als Pseudomonaden identifizierten Spezies gehören taxonomisch dem *Pseudomonas fluorescens*-Komplex an [233]. Alle nächstähnlichen Typstämme werden in Risikogruppe 1 eingeteilt (TRBA 466), sodass auch die aus der Melkanlage isolierten Stämme vermutlich kein pathogenes Potential besitzen. Die verschiedenen *Pseudomonas*-Spezies unterschieden sich in ihren produktschädigenden Eigenschaften. Während *P. koreensis* M92 sowohl Lipolyse als auch Proteolyse betrieb, waren *P. congelans* M79 und *P. gessardii* M152 weder zur Proteolyse noch zur Lipolyse fähig. *P. poae/trivialis* M43 betrieb, wie die meisten anderen Isolate aus dieser Gruppe, ausschließlich Lipolyse. Das produktschädigende Potential der Pseudomonaden zeigte sich zusätzlich anhand ihres starken Wachstums bei 4 °C (Tab. 42 im Anhang). Interessanterweise konnten die beiden Isolate ohne Lipolyse- und Proteolyse-Fähigkeit sich zwar bei 4 °C vermehren, jedoch keinen oder einen deutlich schwächeren Biofilm bilden. Diejenigen Isolate mit Lipolyse- und/oder Proteolysefähigkeit zeigten eine deutlich gesteigerte Biofilmbildung bei 4 °C im Vergleich zu 30 °C (Abb. 16). Somit besteht möglicherweise ein Zusammenhang zwischen der Fähigkeit zur Verwertung von Milchinhaltsstoffen und der Besiedelung von gekühlten Oberflächen, wie dem Rohmilchsammeltank. Obwohl diese Eigenschaften für eine Anpassung der Isolate an Milch als Nährmedium sprechen, zeigte der Austausch von Glucose durch Lactose im Nährmedium eine hemmende Wirkung auf die Biofilmbildung der Isolate *P. gessardii* M152 und *P. poae/trivialis* M43, während ein hemmender Einfluss bei *P. koreensis* M92 nur bei 30 °C Inkubationstemperatur nachweisbar war (Abb. 16, 17).

Rossi *et al.* (2016) [234] konnten für verschiedene *P. fluorescens*-Isolate aus Milchprodukten ebenfalls eine gesteigerte Biofilmbildung bei Kühltemperaturen von 10 °C zeigen. Auch Morimatsu *et al.* (2012) [235] wiesen mittels Kristallviolett-Färbung eine stärkere Biofilmbildung von *P. putida* bei Kühltemperaturen von 5 °C und 10 °C im Vergleich zu 20 °C und 30 °C nach. Neben der gesteigerten Biofilmbildung eines aus einem milchverarbeitenden Betrieb stammenden *P. fluorescens*-Isolats in TSB bei 4 °C konnten Aswathanarayan & Vittal (2014) [41] eine höhere metabolische Aktivität der Biofilm-Zellen bei 4 °C feststellen. Liu *et al.* (2015b) [236] konnten neben der gesteigerten Biofilmbildung eines aus Schweinefleisch isolierten *P. lundensis*-Isolats bei 4 °C und 10 °C eine gesteigerte Proteolyse im Biofilm im Vergleich zu planktonischem Wachstum zeigen. Diese Ergebnisse lassen sich auch auf die Milchindustrie übertragen und betonen das gesteigerte Verderbnispotential von in Biofilmen angesiedelten Pseudomonaden, besonders bei Kühltemperaturen [226].

Die von den meisten *Pseudomonas*-Isolaten bei 30 °C in TSB gebildeten Biofilme ließen sich durch die Reinigungs- und Desinfektionsmittelbehandlung stark reduzieren oder vollständig entfernen. Allerdings ist die Gültigkeit dieser Beobachtungen für die Isolate aus der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Melkanlage kritisch zu betrachten, da die für die Biofilmbildung optimalen Bedingungen für die Isolate mehr oder weniger stark von den für diese Versuche gewählten Bedingungen (TSB, 30 °C) abwichen.

Besonders hervorzuheben sind die beobachteten speziesspezifischen Unterschiede zur Beurteilung der Relevanz von Pseudomonaden als potentielle Primärbesiedler von milch- bzw. lebensmittelassoziierten Oberflächen, welche von weiteren Verderbniserregern und Pathogenen zur Vermehrung benutzt werden könnten [21, 226]. Demnach besitzt das Isolat *P. gessardii* M152 selbst kein produktschädigendes Potential, jedoch übersteht der gebildete Biofilm möglicherweise zum Teil den Reinigungs- und Desinfektionsvorgang, weshalb das Vorkommen dieser Spezies in der beprobten Melkanlage nicht unterschätzt werden sollte. Dies trifft aufgrund des reduzierten, jedoch immer noch vorhandenen Biofilmbildungspotentials bei 4 °C auch auf Biofilme im Rohmilchsammeltank zu.

Die Isolate der Fettsäuregruppe 11 gehörten den Gattungen *Gordonia*, *Rhodococcus* und *Dietzia* aus dem Phylum *Actinobacteria* an (Tab. 21). Während alle *Rhodococcus*-Isolate ausschließlich von den in die Melkanlage verbrachten Edelstahlcoupons stammten, wurde die überwiegende Anzahl der verschiedenen *Gordonia*-Spezies ebenfalls von den

Coupons oder dem Filterrohr der Melkanlage isoliert (Abb. 7). Demnach handelt es sich bei diesen Gattungen vermutlich um bedeutende Primärbesiedler von Edelstahloberflächen, die in reifen Biofilmen, das heißt auf den weiteren Melkanlagen-Oberflächen mit höherer Besiedlungsdichte, nicht mehr oder nur in geringer Anzahl wiedergefunden werden. Die hydrophobe Beschaffenheit ihrer Zelloberflächen durch das Vorkommen von Mykolsäuren macht ihre Präferenz zur Biofilmbildung auf hydrophoben Oberflächen wie Edelstahl oder Kunststoff wahrscheinlich [237]. Verschiedene Studien konnten in diesem Zusammenhang zeigen, dass die Spezies *Rhodococcus erythropolis* die Hydrophobizität ihrer Zelloberfläche durch Variation der Lipidzusammensetzung an die zu besiedelnde Oberfläche und das Wachstumsmedium anpassen kann [238, 239].

Die meisten Isolate der Fettsäuregruppe 11 wiesen keine Fähigkeit zur Proteolyse auf, betrieben jedoch Lipolyse und besaßen somit produktschädigendes Potential. Die Mitglieder der Spezies *Dietzia maris/schimae*, *Gordonia bronchialis* und *Rhodococcus degradans/qingshengii* waren zudem zum Wachstum bei 4 °C fähig (Tab. 42 im Anhang). Der Großteil der Isolate war zu keiner oder nur schwacher Biofilmbildung fähig, allerdings zeigte sich bei mehreren Isolaten, wie z. B. *G. paraffinivorans* M69 oder *G. polyisoprenivorans* M328, die Tendenz zur verstärkten Biofilmbildung mit Lactose statt Glucose als Kohlenstoffquelle im Nährmedium (Abb. 17, Tab. 42 im Anhang). Dies zeigt die Spezialisierung dieser Spezies auf die Verwertung von Milch und ihre Fähigkeit durch Biofilmbildung in der Melkanlage zu persistieren.

Das Isolat *G. paraffinivorans* M69 führte zudem in Mischkultur mit anderen Gram-positiven Isolaten zu einer gesteigerten Biofilmbildung (Tab. 45 im Anhang). Zusammen mit der möglichen Rolle verschiedener Spezies der Gattung *Gordonia* als Erstbesiedler von Edelstahloberflächen bietet dieser Befund Grund zu der Vermutung, dass die gebildeten Biofilme die Anheftung von weiteren Bakterien begünstigen können. Im Gegensatz dazu wird in der Literatur beschrieben, dass einige Mitglieder der Gattung *Gordonia* in der Lage sind, antimikrobielle Substanzen zu bilden, die unter anderem gegen die humanpathogenen Spezies *E. coli*, *B. cereus* oder *S. aureus* wirken können [240]. Da diese Spezies auch in der Milchproduktion und -verarbeitung vorkommen, könnte die Besiedelung entsprechender Flächen mit *Gordonia*-Spezies die Integration von Pathogenen in den Biofilm unterbinden. Die Hemmung der Adhäsion verschiedener Gram-positiver und -negativer Spezies der Gattungen *Bacillus*, *Corynebacterium*,

Escherichia und *Pseudomonas* aufgrund der Produktion von Biotensiden durch die Spezies *Rhodococcus ruber* wurde ebenfalls bereits in der Literatur beschrieben. Die Autoren führten den Effekt auf die hydrophilere Oberflächenbeschaffenheit durch die Konditionierung mit Biotensiden zurück, welche eine Adhäsion von Bakterien mit hydrophober Zelloberfläche inhibiert [241].

Mehrere Spezies der Gattung *Gordonia* werden in Risikogruppe 2 gruppiert, so auch die in der vorliegenden Arbeit detektierten Spezies *G. bronchialis* und *G. sputi* (TRBA 466). Wie die meisten in der vorliegenden Arbeit isolierten Risikogruppe 2-Spezies handelt es sich auch bei *G. bronchialis* und *G. sputi* um opportunistische Pathogene, die Sekundärinfektionen in immunsupprimierten Personen auslösen [240]. Somit stellen sie für gesunde Menschen kein Risiko für eine Lebensmittelinfektion dar, selbst bei direktem Verzehr von kontaminierter Rohmilch.

Die Fettsäuregruppe 12 (Tab. 21) wird von Isolaten der Gattung *Corynebacterium* gebildet. Kein Isolat dieser Gruppe wurde von den Edelstahloberflächen der untersuchten Melkanlage gewonnen. Die ursprünglich aus klinischem Material isolierten Spezies *C. confusum* und *C. falsenii* [242, 243] besitzen, wie auch einige andere *Corynebacterium*-Spezies, pathogenes Potential und werden damit der Risikogruppe 2 zugeordnet (TRBA 466). Aufgrund des Isolierungsortes von *C. confusum* M104 von den Melkbecherablagen besteht das Risiko der Übertragung dieses potentiellen Pathogens innerhalb der Herde. Die Spezies *C. confusum* ist bereits mehrfach in Rohmilchproben des untersuchten Milchviehbetriebes nachgewiesen worden [79, 244], was für ihr persistentes Vorkommen in Biofilmen auf den Oberflächen der Melkanlage spricht. Andere Spezies der Gattung, die mehrfach in Rohmilch nachgewiesen wurden, wie *C. frankenforstense* [79, 245], konnten in der vorliegenden Arbeit dagegen nicht in den Melkanlagen-Biofilmen detektiert werden, was gegen ihr Potential zur Besiedelung der entsprechenden Oberflächen, sondern für eine direkte Übertragung z. B. von der Euteroberfläche in die Rohmilch spricht.

4.4 Zusammensetzung und Diversität der bakteriellen Gemeinschaft

In den kulturell und molekularbiologisch untersuchten Tupferproben sowie den in die Melkanlage verbrachten Edelstahlcoupons wurden Bakterien der Phyla *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes* und *Proteobacteria* nachgewiesen (Abb. 7-10). Denselben Phyla wurden die antibiotikaresistenten Isolate zugeordnet (Abb. 13). Die detektierten Phyla werden häufig aus Rohmilch [79, 228] und verschiedenen Bereichen der Milchproduktion [246] isoliert. Dazu zählen auch Rohmilchtankwagen [44] und milchverarbeitende Betriebe [1, 40, 47, 51, 247, 248].

Beim molekularbiologischen Ansatz aus den Tupferproben zeigte sich eine deutliche Überrepräsentation des Gram-negativen Phylums *Bacteroidetes*. Dieses machte sowohl bei den Tupfer- als auch bei den Coupon-Isolaten nur geringe Anteile von je 7 % aus, während 34 % der Tupfer-Klonsequenzen diesem Phylum zugeordnet wurden. Im Gegensatz dazu wurde keine Coupon-Klonsequenz den *Bacteroidetes* zugeordnet. Hier zeigte sich eher eine Dominanz der ebenfalls Gram-negativen *Proteobacteria*, die über die Hälfte der Klonsequenzen ausmachten, jedoch weniger als 5 % der Coupon-Isolate repräsentierten. Die Beobachtung, dass in Klonierungsansätzen zur Charakterisierung der bakteriellen Gemeinschaft häufig Gram-negative Phyla dominieren und dass sich diese Dominanz nicht in parallel durchgeführten kulturellen Verfahren zeigt, wurde bereits beschrieben [79]. Dies wurde auf einen mangelhaften Zellaufschluss von Gram-positiven Bakterien, insbesondere von Lysozym-resistenten Staphylokokken, bei der DNA-Extraktion zurückgeführt. Allerdings wurde aufgrund dessen in der vorliegenden Arbeit die Lysozym-Konzentration von 5 mg/ml auf 20 mg/ml erhöht sowie zusätzlich Lysostaphin eingesetzt. Zudem sollte eine DNA-Extraktion aus Ringerlösung, wie in der vorliegenden Arbeit, deutlich effizienter erfolgen als aus Rohmilch. Gegen einen mangelhaften Zellaufschluss von Gram-positiven Bakterien in der vorliegenden Arbeit spricht außerdem der Nachweis von je fünf Klonsequenzen des Phylums *Firmicutes* in den Tupfer- und Coupon-DNA-Extrakten sowie der Nachweis von acht Sequenzen der Gattung *Micrococcus* aus dem Phylum *Actinobacteria* in den Coupon-DNA-Extrakten.

Der Unterschied im Anteil des Phylums *Actinobacteria* zwischen dem kulturellen und molekularbiologischen Verfahren kann nicht durch deren geringes Vorkommen in den Melkanlagen-Biofilmen erklärt werden, da sowohl Tupfer- als auch Coupon-Isolate dieses Phylums deutlich höhere Anteile ausmachten als die korrespondierenden

Klonsequenzen (28 % vs. 0 % bzw. 69 % vs. 29 %). Dies kann am hohen GC-Gehalt der DNA von Mitgliedern dieses Phylums liegen. Aufgrund des resultierenden höheren Schmelzpunktes könnten bei der PCR-Amplifikation der 16S rRNA-Gene aus DNA-Extrakten von Mischkulturen diejenigen der *Actinobacteria* diskriminiert worden sein.

Schon am unterschiedlichen Gramfärbeverhalten der Isolate aus den Tupferproben und von den Edelstahlcoupons ließ sich deren unterschiedliche Zusammensetzung erkennen. Während die Gram-positiven Bakterien unter den Coupon-Isolaten mit fast 85 % deutlich dominierten, zeigte sich eine nahezu Gleichverteilung von Tupfer-Isolaten mit positivem bzw. negativem Gramfärbeverhalten. Eine ungefähre Gleichverteilung von Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien stellten Cherif-Antar *et al.* (2016) [1] auch in Rohmilchleitungen von Milch pasteurisierenden Betrieben fest. Erst der Erhitzungsprozess selektierte für Gram-positive Bakterien, die in Post-Pasteurierungs-Leitungen mit ca. 70 % dominierten. Auch bei der Verteilung der Coupon-Isolate auf die verschiedenen Phyla zeigte sich, dass die überwiegende Mehrheit von mehr als zwei Dritteln der Isolate aus dem Phylum *Actinobacteria* stammte, gefolgt von 20 % des ebenfalls Gram-positiven Phylums *Firmicutes*. Nur vereinzelt wurden Isolate den Gram-negativen Phyla *Bacteroidetes* und *Proteobacteria* von den Coupons gewonnen. Unter den Tupfer-Isolaten dominierten dagegen die *Proteobacteria* mit ca. 40 %, während auf die Gram-positiven *Actinobacteria*- und *Firmicutes*-Isolate jeweils nur etwa ein Drittel entfiel. Die geringsten Anteile entfielen jeweils auf Isolate des Phylums *Bacteroidetes*, sodass hier kein Unterschied zwischen den Coupon- und Tupfer-Isolaten feststellbar war.

Während die meisten dem Phylum *Actinobacteria* zugeordneten Tupfer-Isolate von nicht-Edelstahloberflächen stammten, stammten zwei Drittel der Coupon-Isolate aus diesem Phylum. Dies kann ein Hinweis darauf sein, dass ein gravierender Unterschied zwischen den Primärbesiedlern, die innerhalb kürzester Zeit auf Edelstahloberflächen adhäreren und die Biofilmbildung initiieren können, und der Mikrobiota von reiferen Biofilmen auf diesem Material besteht. Auch Ksontini *et al.* (2013) [13] beobachteten zeitliche Veränderungen der Mikroorganismen-Zusammensetzung auf Silikon- und Edelstahloberflächen, die für insgesamt 48 h in Rohmilch inkubiert wurden. Die Ergebnisse dieser Autoren sind allerdings nur bedingt vergleichbar mit denen aus der vorliegenden Arbeit, da in der vorliegenden Arbeit die Edelstahlcoupons nicht dauerhaft in Rohmilchkontakt standen und zudem auch den CIP-Zyklen zur Reinigung der

Melkanlage unterlagen. Höhere Diversitäten auf älteren Spiralmembranen in der milchverarbeitenden Industrie beobachteten allerdings auch Chamberland *et al.* (2017) [248] mit Hilfe von Metagenomanalysen der 16S rRNA Gene.

Die dominierenden Gattungen des Phylums *Actinobacteria* in den Melkanlagen-Biofilmen waren *Microbacterium*, *Kocuria*, *Corynebacterium* und *Gordonia*, von denen einige Spezies eine Rolle bei der Reifung von Käse spielen (s. Abschnitt 4.3). Einige Isolate aus diesem Phylum wiesen Resistenzen gegenüber Cloxacillin auf. Innerhalb des Phylums *Bacteroidetes* dominierte deutlich die Gattung *Chryseobacterium*. Diese wies auch unter den antibiotikaresistenten Isolaten die größte Speziesvielfalt auf, wobei Resistenzen gegenüber allen getesteten Antibiotika vorlagen (Abb. 13). Spezies dieser Gattung werden aufgrund ihrer psychrotrophen Eigenschaften häufig mit der Vermehrung in gekühlten Lebensmitteln in Verbindung gebracht [79].

Aus dem Phylum *Firmicutes* wiesen vor allem die Gattungen *Bacillus* und *Staphylococcus* hohe Speziesvielfalten auf. Aufgrund ihres starken Biofilmbildungsvermögens, der Bildung von Enterotoxinen und ihrer Fähigkeit zur Sporenbildung verursachen Vertreter der Gattung *Bacillus* häufig Probleme in der milchverarbeitenden Industrie, wo sie auch die Bereiche nach der Pasteurisierung besiedeln und Sekundärkontaminationen verursachen können. Die Gattung *Staphylococcus* ist als Mastitiserreger bekannt. So können die KNS-Spezies subklinische, aber persistente Mastitisinfektionen verursachen, sodass ihr Vorkommen in Melkanlagen-Biofilmen ein Risiko der Übertragung der Erreger innerhalb der Herde darstellt. In diesem Zusammenhang ist auch der Nachweis von antibiotikaresistenten Vertretern der Gattung *Staphylococcus* von Bedeutung (Abb. 13). Die in großer Vielfalt nachgewiesenen Milchsäurebakterien spielen ebenfalls eine Rolle in der Käseproduktion, können dort aber als NSLAB auch unerwünschte Fehlgerüche produzieren. Da diverse NSLAB bereits in Biofilmen von Molkereien nachgewiesen wurden, spricht ihr Vorkommen in Melkanlagen-Biofilmen für einen Transfer der Bakterien in die milchverarbeitende Industrie über die Rohmilch.

Aus dem Phylum *Proteobacteria* wiesen die Gattungen *Acinetobacter* und *Pseudomonas* die höchsten Speziesvielfalten auf. Beide sind bereits als dominierende Gattungen in gekühlter Rohmilch [118] und auf Oberflächen der Käseproduktion [220] nachgewiesen worden. Sie sind für ihre Fähigkeit zur Biofilmbildung und zur Produktion von

verderbniserregenden Enzymen bekannt [25]. Verschiedene Spezies der Gattung *Acinetobacter* wiesen zudem Resistenzen gegenüber allen getesteten Antibiotika auf (Abb. 13).

Einige Isolate wurden verschiedenen Spezies der Ordnung *Enterobacterales* zugeordnet. Von diesem besitzt *E. coli* die größte Bedeutung als Mastitiserreger und Hygieneindikator [50], sodass dessen Detektion auf den Melkbecherablagen und dem Auslassstutzen des Sammel tanks auf Mängel in der Reinigung und Desinfektion hinweist. Auffällig war weiterhin die Zuordnung von insgesamt 24 Klonsequenzen verschiedener Tupferprobenahmeorte und Coupons zur Spezies *Rhodanobacter glycinis*, die jedoch nicht als Isolat vorkam (Abb. 10). Laut der Neubeschreibung der Spezies sollte sie sich jedoch eigentlich auf TSA kultivieren lassen [249].

Der Nachweis einer großen Vielfalt verschiedener Isolate und Klonsequenzen von den Edelstahlcoupons zeigt die Geschwindigkeit der Adhäsion an Oberflächen durch Mikroorganismen. Bereits auf den für 48 h in der Melkanlage verbliebenen Coupons konnten Klonsequenzen der pathogenen Spezies *Listeria monocytogenes* nachgewiesen werden (Abb. 9), deren Vorkommen in Rohmilchprodukten und anderen Lebensmitteln eine der größten Verbrauchergefährdungen im Lebensmittelbereich darstellt [42, 250]. Der Nachweis von *L. monocytogenes* als Klonsequenz in Coupon-Extrakten unterschiedlicher Probenahmen zeigt folglich deren persistentes Vorkommen in der beprobten Melkanlage. Ferreira *et al.* (2014) [250] listeten verschiedene Studien auf, bei denen ebenfalls die Persistenz von *L. monocytogenes* in verschiedenen Bereichen der Milchindustrie über mehrere Monate oder sogar Jahre hinweg nachgewiesen wurde. Latorre *et al.* (2009, 2010) [143, 251] isolierten *L. monocytogenes* aus in-line Milchfiltern, dem Melkgeschirr, dem Auslassstutzen des Milchsammel tanks und der Melkstandumgebung einer Melkanlage ebenfalls über einen längeren Zeitraum hinweg, jedoch erst nach selektiver Anreicherung. Wie in der vorliegenden Arbeit wiesen auch diese Autoren *L. monocytogenes* in zwei Proben mittels PCR nach, die Kultur-negativ waren. Dass das Pathogen in der vorliegenden Arbeit aufgrund der nicht erfolgten Anreicherungsschritte nicht isoliert wurde, suggeriert dessen Präsenz in geringen Anzahlen. Dementsprechend ist seine Detektion mit Hilfe von kultivierungsgestützten Verfahren ohne vorherige selektive Anreicherung unwahrscheinlich.

Dzieciol *et al.* (2016) [247] detektierten *L. monocytogenes* in Bodenabläufen von Käseproduzierenden Betrieben nur in geringen Anteilen mittels Pyrosequenzierung, jedoch trotz Anreicherung nicht mit kulturellen Methoden. Das Vorkommen des Pathogens in Bodenabläufen wäre auch im Melkstand von Bedeutung, da es bei der Hochdruckreinigung nach jedem Melkvorgang über Aerosole z. B. auf das Melkgeschirr gelangen könnte [19, 247]. Von dort aus könnte eine weitere Verbreitung mit der Milch über die gesamte Melkanlage erfolgen. Weiler *et al.* (2013) [42] konnten bereits das Potential zur Integration von *L. monocytogenes* in von der Rohmilchmikrobiota auf Glasobjektträgern gebildete Biofilme nachweisen. Die Anteile der zugesetzten *L. monocytogenes*-Isolate waren in den gebildeten Biofilmen mit maximal 6 % sehr gering. Es überwogen die Gattungen *Lactococcus* und *Citrobacter*, die auch in den nicht mit *L. monocytogenes* inokulierten Biofilmen den überwiegenden Anteil ausmachten. Ähnlich geringe Anteile von *L. monocytogenes* in auf Edelstahlcoupons gebildeten Biofilmen beobachteten Heir *et al.* (2018) [252] bei der Inkubation verschiedener *L. monocytogenes*-Stämme mit Mischkulturen aus Gram-negativen Bakterien der Gattungen *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Serratia* und *Stenotrophomonas*. Diese Befunde sprechen ebenfalls für die Fähigkeit von *L. monocytogenes* zur Integration und Persistenz in milchassoziierten Biofilmen, jedoch auch für die geringen Anteile dieses Pathogens in Multispezies-Biofilmen.

Die höchsten Shannon-Diversitäts-Indices wurden für die Melkbecherablagen und die Edelstahlcoupons ermittelt (Tab. 22). Dementsprechend war die mikrobielle Gemeinschaft an diesen Probenahmeorten deutlich diverser als in den Rohrleitungen und am Auslassstutzen des Milchsammeltanks. Gleichzeitig wurden dort die geringsten Coverages von je ca. 85 % ermittelt, sodass davon ausgegangen werden muss, dass die tatsächliche bakterielle Vielfalt dort noch nicht vollständig dargestellt wurde. Zusätzlich zeigten sich im kultivierungsgestützten Verfahren jeweils mindestens doppelt so hohe Shannon-Indices wie im parallel durchgeführten molekularbiologischen Verfahren. Dies führt zu der Vermutung, dass sich die bakterielle Vielfalt besser durch die kultivierungsgestützten Verfahren darstellen lassen. Die Melkbecherablagen und das Filterrohr wiesen im molekularbiologischen Verfahren die geringsten Equitabilitätswerte von allen Probenahmeorten auf (Tab. 22). Dementsprechend besteht dort die Tendenz zur Dominanz weniger Spezies. Dies wird zusätzlich anhand des geringsten Shannon-Diversitäts-Indexes des Filterrohrs von allen Probenahmeorten bestätigt.

Die deutlich höheren Equitabilitätswerte des kultivierungsgestützten Verfahrens sind mit dem Zellaufschluss bei der DNA-Extraktion sowie die anschließende PCR-Amplifikation der 16S rRNA-Gene zu erklären, welche für bestimmte Bakteriengruppen selektiert haben könnten. Dabei handelt es sich jeweils um leicht aufzuschließende Bakterien mit dünner Zellwand bzw. um Organismen mit geringerem GC-Gehalt ihrer DNA. Des Weiteren ist die Bildung von Fettsäuregruppen zwar hilfreich für die Reduzierung der Identifizierungsreaktionen, jedoch kann mittels der Identifizierung repräsentativer Isolate noch keine Aussage über die tatsächliche Zusammensetzung der beprobten Biofilme getroffen werden. Lediglich anhand der Größe der Fettsäuregruppen sind Aussagen möglich. So kann in der vorliegenden Arbeit davon ausgegangen werden, dass die Milchsäurebakterien sowie die Gattungen *Kocuria*, *Microbacterium* und *Acinetobacter* in den Biofilmen der beprobten Melkanlage dominierten.

Ein Vergleich der in der vorliegenden Arbeit detektierten Mikrobiota der Melkanlagen-Biofilme mit der Literatur gestaltet sich schwierig. Häufig werden aufgrund der größeren Relevanz für die Endverbraucher Biofilme in milchverarbeitenden Betrieben, wie zum Beispiel solchen zur Pasteurisierung [40, 248], Käse- [219] oder Milchpulverherstellung, untersucht. Zudem fanden einige Studien in nicht-europäischen Ländern wie Algerien [47], Ägypten [253], Israel [246] oder Tunesien [13] statt, die aufgrund der klimatischen Begebenheiten oder Unterschieden in der Gesetzgebung nur eine geringe Vergleichbarkeit zu europäischen Betrieben aufweisen [254]. Aufgrund des Pasteurisierungsvorganges kommt es zu einer Selektion von hitzeresistenten Biofilmbildnern, sodass die Zusammensetzung von Post-Pasteurierungs-Biofilmen nur bedingt mit Melkanlagen-Biofilmen vergleichbar ist [25]. In Ersteren überwiegt aufgrund der starken Hitzeresistenz ihrer Endosporen zumeist die Gattung *Bacillus*, allerdings werden häufig ebenso Staphylokokken, diverse Milchsäurebakterien und Gram-negative Gattungen nachgewiesen. Der Nachweis der Gattungen *Bacillus*, *Enterococcus*, *Staphylococcus*, *Escherichia*, *Acinetobacter*, *Serratia* und *Pseudomonas* sowohl in Melkanlagen-Biofilmen als auch in milchverarbeitenden Betrieben spricht für die Übertragung dieser Biofilmbildner mit der Rohmilch und deren dortige Etablierung als persistierende Biofilme [1, 5, 25, 40, 46, 51].

Auch wenn es eindeutig typische milchassoziierte Gattungen gibt, die in verschiedenen Studien nachgewiesen wurden, besitzt vermutlich jeder Milchviehbetrieb eine standort-

spezifische Spezieszusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft [246, Weber *et al.*, unveröffentlicht]. Diese ist unter anderem abhängig von den Haltungsbedingungen der Tiere (Weidegang, Fütterung, Stallumgebung, Antibiotikaeinsatz, Melkintervalle) einhergehend mit der Größe des Betriebs (Anzahl der gehaltenen Tiere, Häufigkeit des täglichen Melkens und der Abholung der Milch durch die Molkerei), der hygienischen Bedingungen (Art, Häufigkeit und Effizienz der CIP-Reinigung der Melkanlage und des Rohmilchsammeltanks, mikrobielle Belastung des zum Nachspülen verwendeten Leitungswassers), der geographischen Lokalisierung des Betriebs und des Alters der vorherrschenden Biofilme [246, 255]. Die betriebsspezifische Mikrobiota von Melkanlagen-Biofilmen wird über die Rohmilch in milchverarbeitende Betriebe übertragen, wo sie sich mit der Mikrobiota von anderen Betrieben vermischt und zur Entstehung molkereichspezifischer Biofilme beiträgt.

4.5 Einflussfaktoren auf die Biofilmbildung

Es gibt viele Faktoren, die die Biofilmbildung von Bakterien beeinflussen können. In der vorliegenden Arbeit wurden das umgebende Medium (Glucose- vs. Lactose-haltige TSB), die Temperatur (4 °C vs. 30 °C) sowie die zu besiedelnde Oberfläche (Polystyrol-Mikrotiterplatten vs. Edelstahlcoupons) untersucht. Da es sich bei lebensmittelassoziierten Biofilmen in den meisten Fällen um Multispezies-Biofilme handelt, wurden zusätzlich Biofilmbildungstests in Mischkulturen aus jeweils zwei Spezies durchgeführt.

Bezüglich des Mediums ist vor allem dessen Zusammensetzung von Bedeutung. So fanden viele Autoren eine verstärkte Biofilmbildung lebensmittelassoziierteter Isolate in Minimalmedien [256, 257] oder 1:10-verdünnten Vollmedien wie TSB [19, 41, 258, 259]. Als Argument gaben sie an, dass die Oberflächen mit Lebensmittelkontakt in lebensmittelverarbeitenden Betrieben im Anschluss an die Produktion gereinigt und desinfiziert werden und die ursprüngliche Nährstoffdichte durch das Spülen mit Wasser stark verdünnt wird [260]. In milchverarbeitenden Betrieben trifft diese Hypothese vermutlich weniger stark zu, da Pasteurisierungsläufe mehrere Stunden anhalten und die gebildeten Biofilme dementsprechend lange mit dem unverdünnten Produkt in Kontakt treten. Für Melkanlagen ist sie jedoch eher relevant, da die Biofilme in den Rohrleitungen nur während des Melkvorgangs mit der unverdünnten Rohmilch in Kontakt kommen. Anschließend erfolgt sofort die Reinigung und Desinfektion, sodass die Milchbestandteile stark verdünnt oder komplett ausgewaschen werden.

Allerdings haben bereits viele Studien gezeigt, dass besonders Milchproteine in der Lage sind, an Oberflächen zu adsorbieren und sie zu konditionieren [28]. Der konditionierende Film kann die Adhäsion von Bakterien entweder begünstigen oder behindern [21, 25, 33]. So konnte gezeigt werden, dass die Biofilmbildung von Stämmen der Spezies *B. licheniformis*, *S. aureus*, *E. coli*, *L. monocytogenes* und *S. marcescens* auf Edelstahloberflächen in Magermilch geringer war als z. B. in TSB oder auf nicht konditionierten Oberflächen [28, 261]. Während die von Sadiq *et al.* (2017b) [28] untersuchten *B. licheniformis*-Stämme dabei aus Magermilchpulver isoliert wurden, untersuchten Barnes *et al.* (1999) [261] Stämme aus Stammsammlungen. Die beobachteten Effekte könnten bei Letzteren daher auch auf die mangelnde Anpassung der Bakterien an das Medium Milch zurückzuführen sein. Im Gegensatz dazu stellten Moradi & Tajik (2017) [262] eine stärkere Biofilmbildung auf Edelstahloberflächen durch die Spezies *L. monocytogenes*, *E. coli* und *P. aeruginosa* aus Stammsammlungen in pasteurisierter Milch im Vergleich zu LB-Medium fest. Die Nährstoffe des konditionierenden Films können im Anschluss an die Anheftung der weiteren Vermehrung und somit der Bildung von Biofilmen dienen. In älteren, reifen Biofilmen ist es zudem denkbar, dass die Milchbestandteile durch Wechselwirkungen mit der EPS-Schicht während des Durchflusses zurückgehalten und dann zur Proliferation des Biofilms genutzt werden können.

Bei der für die Biofilmbildungstests verwendeten TS-Bouillon wurde Glucose durch dieselbe Einwaage Lactose ersetzt. Beide Medien enthielten damit 0,25 % (w/v) des jeweiligen Kohlenhydrats. In Milch liegt der Lactose-Gehalt bei etwa 5 %, also um ein Vielfaches höher als in den verwendeten TSB-Medien. Da in TSB unter anderem Trypton aus Casein enthalten ist, besitzt die Peptid- bzw. Aminosäurezusammensetzung der Bouillon zumindest eine gewisse Ähnlichkeit zur Proteinzusammensetzung von Milch.

Die ursprüngliche Hypothese lautete, dass die Zusammensetzung von Lactose-TSB ähnlicher zu Milch ist und dementsprechend die aus der Melkanlage stammenden Isolate besser an dieses Medium adaptiert sein müssten. Diese Vermutung bestätigte sich zwar für einige Isolate, jedoch waren deutliche stammspezifische Unterschiede zwischen den meisten milchassoziierten Spezies festzustellen. Während der Austausch des Zuckers im Nährmedium bei einigen Stämmen zu einer deutlich gesteigerten Biofilmbildung führte, zeigte sich bei anderen Stämmen kein Einfluss oder eine verminderte Biofilmbildung in

Lactose-TSB. Diese Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass sich die tatsächlichen Genexpressionsmuster trotz der phylogenetischen Verwandtschaft zwischen verschiedenen Stämmen derselben Spezies oder unterschiedlichen Spezies einer Gattung stark unterscheiden können. So wiesen verschiedene Autoren in einem Großteil der untersuchten Stämme einer Spezies typische biofilmassoziierte Gene nach, jedoch unterschieden sich die Stämme deutlich in ihrer Fähigkeit zur Biofilmbildung unter *in vitro*-Bedingungen. Zudem waren auch Stämme, die keine Kopien von biofilmassoziierten Genen besaßen, in der Lage zur Biofilmbildung [184]. Demnach können vermutlich alternative Stoffwechselwege zur Biofilmbildung eingeschlagen werden, die bisher wenig erforscht sind. Weiterhin besteht die Möglichkeit, dass die für die Biofilmbildung benötigten Gene in verschiedenen Stämmen durch Mutation funktionsunfähig geworden sind, oder dass zusätzliche auf Plasmiden lokalisierte Gene von Bedeutung sind, die nicht alle Stämme einer Spezies besitzen.

Bei den meisten Isolaten führte eine Absenkung der Inkubationstemperatur von 30 °C auf 4 °C trotz der Fähigkeit zur Vermehrung zu einer deutlich verringerten Biofilmbildung oder sogar zum vollständigen Verlust des Biofilmbildungspotentials (Abb. 16, Tab. 42 im Anhang). Die mangelnde Anpassung der meisten Isolate an Kühltemperaturen ist damit zu erklären, dass die Probenahmestellen innerhalb der Melkanlage keiner Kühlung unterliegen. Ihre Vermehrungsfähigkeit bei 4 °C legt trotzdem die Vermutung nahe, dass sich die aus dem Biofilm bei Milchdurchfluss abgelösten Bakterien in der gekühlten Rohmilch vermehren können. Paz-Méndez *et al.* (2017) [260] erklärten die verringerte Fähigkeit von Bakterien zur Biofilmbildung bei Kühltemperaturen mit einer verringerten Stoffwechselrate und dementsprechend geringerer Produktion von zur Adhäsion notwendigen Zellstrukturen wie Flagellen oder Pili. Dennoch zeigten in der vorliegenden Arbeit einige Stämme der als psychrotrophe Verderbniserreger bekannten Gattungen *Acinetobacter* und *Pseudomonas* eine deutlich gesteigerte Biofilmbildung bei Kühltemperaturen (Abb. 19, Tab. 42 im Anhang). Diese sind demnach vermutlich zur Besiedelung von gekühlten Oberflächen, wie des Rohmilchsammeltanks, fähig. So wiesen Flach *et al.* (2014) [146] eine deutliche Dominanz von Pseudomonaden in Biofilmen auf verschiedenen Flächen von Rohmilchsammeltanks nach. Die Veränderung des Biofilmbildungspotentials bei verschiedenen Temperaturen konnte bereits in der Literatur bestätigt werden. So wiesen Nagar *et al.* (2017) [257] eine gesteigerte

Biofilmbildung verschiedener *Aeromonas*-Stämme bei 10 °C im Vergleich zu 30 °C und 37 °C in TSB nach.

Die meisten Autoren begründen eine veränderte Biofilmbildung bei unterschiedlichen Temperaturen mit einer Veränderung der Zusammensetzung der Zelloberfläche und damit einhergehend der Hydrophobizität der Zellen. So führt eine Steigerung der Temperatur zu einer höheren Hydrophobizität und entsprechend zu einem erhöhten Biofilmbildungspotential [19, 21, 81, 263, 264]. Zudem wurde mehrfach eine Veränderung der Biofilmarchitektur bei unterschiedlichen Inkubationstemperaturen nachgewiesen [265]. So sind bei Kühltemperaturen gebildete Biofilme eher flach und dicht, während bei moderaten Temperaturen deutlich dickere Biofilme mit der typischen 3D-Struktur ausgebildet werden. Bei einer weiteren Temperaturerhöhung nimmt dann die Dicke des Biofilms wieder ab [14, 150, 266, 267]. Da bei der Kristallviolett-färbung sowohl die Zellen als auch die EPS-Matrix angefärbt werden [256, 268], könnte es aufgrund der veränderten Architektur bei den *in vitro* Versuchen in der vorliegenden Arbeit aufgrund der dünneren EPS-Schicht zu einer Unterschätzung des Biofilmbildungspotentials bei Kühltemperaturen gekommen sein.

Bei den meisten Isolaten zeigte sich eine deutlich schwächere Biofilmbildung auf Edelstahlcoupons als in den Mikrotiterplatten. Beim Isolat *Brevibacterium spp.* M129 war dagegen eine deutlich gesteigerte Biofilmbildung auf den Coupons festzustellen. Hinsichtlich der Übertragbarkeit der Ergebnisse aus Mikrotiterplattentests auf die Beurteilung der Biofilmbildungsfähigkeit auf Edelstahloberflächen besteht Uneinigkeit in der Literatur [1]. Manche Autoren fanden eine gute Korrelation zwischen den Ergebnissen aus Mikrotiterplattentests und Edelstahlcoupons [253, 263]. Dies konnte in der vorliegenden Arbeit hinsichtlich der Intensität der Biofilmbildung nicht bestätigt werden. Sadiq *et al.* (2017b) [28] fanden ebenfalls keine gute Übereinstimmung zwischen der Biofilmbildungsfähigkeit von *Bacillus*-Isolaten in Mikrotiterplatten und auf Edelstahlcoupons nach Kristallviolett-färbung. Ebenso wie in der vorliegenden Arbeit detektierten sie große stammspezifische Unterschiede im Ausmaß der Biofilmbildung verschiedener *B. licheniformis*-Stämme.

Möglicherweise liegen die beobachteten Unterschiede jedoch auch an Unterschieden im experimentellen Design. Viele Autoren wuschen die Kavitäten der Mikrotiterplatten vor der Anfärbung durch Kristallviolett, um lose adhärierende Zellen zu entfernen. In der

vorliegenden Arbeit wurden die Kavitäten durch Absaugen ausgeleert und anschließend direkt gefärbt. Im Gegensatz dazu wurden die Edelstahlcoupons vor dem Färben in Ringerlösung gewaschen, um lose adhärierende Zellen zu entfernen. Demnach könnte es in den Mikrotiterplattentests zu einer Überschätzung des Biofilmbildungsvermögens einiger Isolate gekommen sein. Dennoch könnten die beobachteten Unterschiede auch auf das verwendete Material zurückgeführt werden. So ist Edelstahl im Vergleich zu Polystyrol weniger hydrophob, was die Bildung von konditionierenden Filmen durch Medienbestandteile sowie die Anheftung der Bakterien selbst beeinflusst haben könnte [28, 40]. Die meisten Autoren beobachteten in diesem Zusammenhang eine bevorzugte Besiedelung von hydrophoben Oberflächen [25, 263, 268]. Jedoch bestehen auch dabei gattungs- oder speziesspezifische Unterschiede [70]. Zudem konnten Ksontini *et al.* (2013) [13] zeigen, dass die Hydrophobizität von Edelstahl und Silikon nach 7 h Inkubation in Rohmilch zunächst abnahm, um nach etwa 24 h wieder ungefähr zum ursprünglichen Zustand zurückzukehren. Laut dieser Autoren wurde die Biofilmbildung auf hydrophileren Oberflächen begünstigt, was mit einem deutlichen Anstieg der Keimzahlen verschiedener Gram-positiver und -negativer Bakteriengruppen auf den Oberflächen nach 7 h Inkubation begründet wurde.

Es wurde beobachtet, dass deutlich weniger Coupon-Isolate ein starkes bis sehr starkes Biofilmbildungspotential aufwiesen als Tupfer-Isolate (Tab. 24). Die meisten wurden aufgrund dessen nicht auf ihre Fähigkeit zur Biofilmbildung auf Edelstahlcoupons untersucht. Jedoch könnte die Gewinnung der Isolate von den für mehrere Tage in die Melkanlage verbrachten Edelstahlcoupons bereits für Biofilmbildner auf Edelstahloberflächen selektiert haben. Zudem könnten diese Isolate noch stärker an Milch als umgebendes Medium adaptiert sein und somit ihr Biofilmbildungspotential in der realen Melkanlagen-Umgebung durch die durchgeführten Versuche in TSB nicht dargestellt werden. Für eine Adaptation an die Melkanlagen-Umgebung einiger Isolate spricht außerdem, dass die meisten Isolate der anhand der kulturellen Keimzahlbestimmung als in den Rohrleitungen dominierenden Milchsäurebakterien maximal moderates, häufig aber überhaupt kein Biofilmbildungspotential in Mikrotiterplatten aufwiesen. Bei den beobachteten Diskrepanzen könnten neben der Oberfläche auch Unterschiede in der Zusammensetzung des Mediums (Milch vs. TSB) sowie weiterer Faktoren (z. B. Sauerstoffverfügbarkeit) eine Rolle spielen.

Bei einigen der aus der Melkanlage isolierten Stämme ohne Biofilmbildungspotential kann es sich auch um Sekundärbesiedler von bereits bestehenden Biofilmen handeln. Ein Beispiel ist die Spezies *Chryseobacterium carnipullorum*. Diese wurde von verschiedenen Tupferproben der Melkanlage als einer der Hauptbesiedler isoliert, zeigte jedoch unter keiner der gewählten Inkubationsbedingungen und Medien ein Biofilmbildungspotential in Mikrotiterplatten. Auch Cherif-Antar *et al.* (2016) [1] zeigten, dass die meisten aus Pre- und Post-Pasteurierungs-Rohrleitungen stammenden Isolate unter den gewählten Inkubationsbedingungen von *in vitro* Tests kein oder nur schwaches Biofilmbildungspotential aufwiesen. Sie nahmen ebenfalls eine Integration dieser Stämme in bereits bestehende Biofilme an.

Typische Primärbesiedler stammen aus der Gattung *Pseudomonas* [21]. Fast alle aus der Melkanlage isolierten Stämme dieser Gattung wiesen in Mikrotiterplatten ein starkes Biofilmbildungspotential auf, was für ihre Rolle als Primärbesiedler spricht (Tab. 42 im Anhang). Für keines der getesteten *Pseudomonas*-Isolate konnte jedoch die Fähigkeit zur Biofilmbildung auf Edelstahlcoupons bei 30 °C festgestellt werden (Abb. 23). Zudem handelte es sich nur bei sehr wenigen der von den in die Melkanlage eingebrachten Edelstahlcoupons stammenden Isolate um Gram-negative Organismen. Keines konnte der Gattung *Pseudomonas* zugeordnet werden. Die aus der vorliegenden Arbeit stammenden Befunde lassen vermuten, dass die Gattung *Pseudomonas* keine große Rolle als Erstbesiedler auf Edelstahloberflächen spielt, sondern dass dort eher Gram-positive Organismen des Phylums *Actinobacteria* von Bedeutung sind. Allerdings wiesen die meisten *Pseudomonas*-Isolate eine deutlich verstärkte Biofilmbildung bei 4 °C auf. Dementsprechend kann nicht ausgeschlossen werden, dass Pseudomonaden als Primärbesiedler von gekühlten Oberflächen, wie des Milchsammeltanks, eine wichtige Rolle spielen, wie in der Studie von Flach *et al.* (2014) [146]. Auch Aswathanarayan & Vittal (2014) [41] konnten eine höhere metabolische Aktivität von *P. fluorescens*-Biofilmen bei 4 °C im Vergleich zu 30 °C Inkubationstemperatur zeigen. Als prominente Verderbniserreger wäre dies von großer Bedeutung, da sowohl die Pseudomonaden selbst als auch ihre Enzyme in die Rohmilch abgeschwemmt und bei Abholung in den Milchtankwagen und Molkereien weitergetragen werden könnten [25].

Viele Autoren geben zu bedenken, dass Unterschiede zwischen der Fähigkeit zur Adhäsion an Oberflächen und der Fähigkeit zur weiteren Vermehrung und Ausbildung

von echten Biofilmen bestehen [52, 253]. So kann bei den von den in die Melkanlage verbrachten Edelstahlcoupons stammenden Isolaten nicht zwischen denjenigen unterschieden werden, die dort lediglich zur Adhäsion fähig waren, und denjenigen, die in der Lage waren, die Oberfläche zur Vermehrung und Ausbildung von Biofilmen zu nutzen. Dass sowohl Einzelzellen als auch Mikrokolonien und dicht gepackte Zellverbände auf den Coupons vorhanden waren, zeigten die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen (Abb. 24).

Die meisten *in vitro* Biofilmbildungstests werden mit einzelnen Spezies durchgeführt und berücksichtigen dabei nicht, dass es sich bei der überwiegenden Mehrheit der natürlichen Biofilme um Multispezies-Biofilme handelt [19]. Auch in der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Intensität der Biofilmbildung in Mischkulturen aus zwei Spezies im Vergleich zu den einzelnen Spezies deutlich gesteigert werden konnte (Abb. 22; Tab. 45, 46 im Anhang). Die Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Spezies können dabei durch QS-Signale oder andere Stoffwechselprodukte ausgelöst werden. So konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass der Kulturüberstand des Isolats *Microvirgula aerodenitrificans* M136 eine deutliche Steigerung der Biofilmbildung von *Paenibacillus cineris* M137 sowie einer Mischkultur aus beiden Spezies bewirkte (Daten nicht gezeigt).

Die Wechselwirkung verschiedener Spezies in realen Biofilmen kann nicht annähernd in *in vitro* Untersuchungen nachgestellt werden, da natürliche Biofilme deutlich mehr als zwei verschiedene Spezies enthalten. Dementsprechend weisen sie höchstwahrscheinlich einen deutlich komplexeren Aufbau mit einer Vielzahl verschiedener Nischen auf. Andere Autoren konnten ebenfalls eine gesteigerte Biofilmbildung in Mischkulturen nachweisen. In viele Fällen nahm dabei nicht die Lebendzellzahl pro besiedelter Fläche, sondern vielmehr die Gesamtmasse des Biofilms zu [18]. Demnach kann es in Multispezies-Biofilmen zu einer gesteigerten EPS-Produktion kommen [25]. Da die Kristallviolettfröbung nicht zwischen Zellen und EPS-Bestandteilen unterscheidet, könnte die gemessene Steigerung der Biofilmbildung in den Mischkulturen auch in der vorliegenden Arbeit auf eine vermehrte EPS-Produktion zurückzuführen sein.

Insgesamt bieten Mikrotiterplattentests zur Bestimmung des Biofilmbildungspotentials aufgrund ihrer leichten Durchführbarkeit und des hohen Durchsatzes einen guten Anhaltspunkt zur Beurteilung der bedeutendsten Biofilmbildner in der Milchumgebung.

Allerdings besteht eine mangelnde Vergleichbarkeit zwischen den getesteten und in Lebensmittelbetrieben verwendeten Oberflächen. So können durch Korrosion aufgrund der Verwendung von scharfen Reinigungs- und Desinfektionsmitteln sowie durch mechanische Abnutzung und Materialermüdungserscheinungen bei beweglichen und langjährig verwendeten Materialien Oberflächenrauigkeiten entstehen, die die Effizienz der CIP-Verfahren vermindern und die Anlagerung von Bakterienzellen begünstigen [31, 52, 70]. Zudem können verschiedene Faktoren, wie die Zusammensetzung des Mediums oder die gewählte Inkubationstemperatur, das beobachtete Biofilmbildungspotential stark beeinflussen.

Ein Vergleich der Biofilmbildungsaktivität mit Literaturangaben gestaltet sich aus verschiedenen Gründen schwierig. Zum einen kann aufgrund von stammspezifischen Unterschieden nicht alleine von der Spezies auf dessen Fähigkeit zur Besiedelung von milchassoziierten Oberflächen geschlossen werden [150, 253, 256, 263]. Zudem gibt es kein Standardverfahren zur Untersuchung der Biofilmbildung. So unterscheiden sich in der Literatur nicht nur die verwendeten Medien, Inokulationsdichten und Inkubationsbedingungen, sondern auch die Protokolle zum eigentlichen Ablauf der Tests. So wurden die Kavitäten der Mikrotiterplatten nach Ausleeren des Nährmediums vor dem Anfärben von vielen Autoren gespült, um lose adhärierende Zellen abzulösen (s. o.). Des Weiteren unterscheidet sich die Konzentration des Kristallvioletts in der Färbelösung sowie dessen Einwirkzeit in verschiedenen Studien voneinander [1, 28, 49, 150, 268]. Ein weiterer Unterschied besteht im verwendeten Medium zur Extraktion des Farbstoffs aus dem Biofilm sowie dessen Einwirkzeit. In einigen Studien wurde statt Ethanol Eisessig (33 %) [1, 28, 49, 262] verwendet mit deutlich kürzeren Einwirkzeiten als die in der vorliegenden Arbeit gewählten 60 Minuten [263]. Weiterhin unterscheidet sich die Wellenlänge, bei der die Absorption anschließend gemessen wurde.

Zusätzlich unterscheiden sich verschiedene Studien in der Einteilung des Ausmaßes der Biofilmbildung. Während in der vorliegenden Arbeit der Blank von den Messwerten abgezogen wurde und die Einteilung in schwache, moderate, starke und sehr starke Biofilmbildner nach der Farbeintensität stattfand, verwenden die meisten Studien ein anderes Schema. In den meisten Fällen wird dabei der Blank nicht von den Messwerten abgezogen, sondern dient nach Addition von zumeist drei Vielfachen seiner Standardabweichung als Schwellenwert für die Einteilung des Ausmaßes der

Biofilmbildung. Eine weitere Unterteilung findet dann mit Hilfe weiterer Schwellenwerte statt, die Vielfache des ursprünglichen Schwellenwertes darstellen. In der vorliegenden Arbeit wurde diese Einteilung absichtlich nicht gewählt, weil damit fast alle Isolate als starke Biofilmbildner eingestuft worden wären. Für eine differenziertere Betrachtung wurden daher strengere Kriterien gewählt.

4.5 Reinigungs- und Desinfektionsmittelresistenz der Biofilme

Die zur Reinigung und Desinfektion der in der vorliegenden Arbeit beprobten Melkanlage eingesetzten Mittel sind kommerziell erhältlich. Das alkalische Reinigungs- und Desinfektionsmittel Circo Super AFM enthält unverdünnt ca. 35 % Natriumhypochlorit (NaOCl) mit 12,5 % aktivem Chlor sowie ca. 15 % Natriumhydroxid (NaOH) (GEA Farm Technologies). Zur Reinigung und Desinfektion der Melkanlage wird das Mittel auf 0,4 % verdünnt. Dementsprechend liegt die NaOH-Konzentration bei 0,06 % und die eingesetzte Menge an aktivem Chlor bei 175 ppm. Im Vergleich zu Literaturangaben ist dies eine relativ geringe Konzentration [30, 258, 269]. Die Konzentrationen von Phosphor- und Salpetersäure im sauren Reinigungsmittel Circo Super SFM liegen im unverdünnten Mittel bei jeweils 20 % (GEA Farm Technologies), sodass ihre effektive Konzentration zur Reinigung der Melkanlage bei 0,08 % liegt. Bei Natriumhypochlorit und Salpetersäure handelt es sich laut Bremer *et al.* (2006) [52] um die am häufigsten in der Milchindustrie eingesetzten Wirkstoffe. Auch der abwechselnde Gebrauch von sauren und alkalischen CIP-Verfahren ist üblich [46, 52, 248].

Der 15-minütige Einsatz der oben genannten Reinigungs- und Desinfektionsmittel in der vom Hersteller empfohlenen Konzentration von 0,4 % führte bei einem Großteil der Isolate zu keiner vollständigen Entfernung der bei 30 °C in TSB gebildeten Biofilme. Dabei gab es Isolate, die resistent gegenüber beiden Mitteln waren (Abb. 18), oder jeweils eine stärkere Resistenz gegenüber dem sauren (Abb. 19) oder alkalischen (Abb. 20) Mittel aufwiesen. Unterschiede im Resistenzverhalten zwischen Gram-positiven und Gram-negativen Spezies wurden in den durchgeführten Versuchen nicht festgestellt. Im Gegensatz dazu geben verschiedene Autoren eine höhere Resistenz von Gram-positiven im Vergleich zu Gram-negativen Organismen an [270].

Besonders hohe Resistenzen gegenüber der Reinigungs- und Desinfektionsmittelbehandlung wiesen verschiedene Isolate der Gattungen *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Kocuria*, *Microbacterium*, *Serratia* und *Stenotrophomonas* auf (Tab. 43 im Anhang). In einigen

Fällen führte sogar die Behandlung mit sterilem destilliertem Wasser anstelle des Reinigungs- und Desinfektionsmittels zu einer stärkeren Ablösung des Biofilms als die Reinigungs- und Desinfektionsmittelbehandlung. Ein Grund hierfür könnte sein, dass die Reinigungs- und Desinfektionsmittelbehandlung z. B. durch die Denaturierung von Proteinen, zu einer stärkeren Adhäsion der Bakterienzellen bzw. EPS-Bestandteilen an die Polystyrol-Oberfläche beigetragen hat. Für die Anwendung in der Praxis wäre eine solche Wirkungsweise unerwünscht. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, dass durch das Wasser schwach adhärierende Zellen bereits abgelöst werden konnten [266]. Der ablösende Einfluss von destilliertem Wasser könnte außerdem aus dem osmotischen Druck resultieren, der zum Übergang von Ionen und anderen löslichen Bestandteilen aus der EPS-Matrix des Biofilms in das umgebende Wasser führte, was zur Destabilisierung des Biofilms und der Erleichterung dessen Ablösung geführt haben könnte. Aufgrund dieser Vermutung wurde statt des destillierten Wassers in den Versuchen zur Zellviabilitätsmessung steriles Leitungswasser verwendet. Dies spiegelt die Bedingungen bei der Reinigung und Desinfektion der Melkanlage realistischer wieder.

Insgesamt wiesen mehr Isolate Resistenzen gegenüber dem alkalischen Mittel als gegenüber dem sauren Mittel auf. Die Biofilme derjenigen Isolate, die eine Resistenz gegenüber dem sauren Reinigungsmittel besaßen, wiesen nach der Behandlung meist geringere Standardabweichungen auf, als diejenigen der Isolate nach Behandlung mit dem alkalischen Mittel. Dies spricht dafür, dass die Behandlung mit dem sauren Mittel die Biofilme nur bis zu einem gewissen Grad ablösen konnte, während das alkalische Reinigungs- und Desinfektionsmittel die Biofilmmatrix zusätzlich destabilisiert. So könnten sich größere Teile des Biofilms beim Spülen der Mikrotiterplatten nach der Färbung abgelöst haben. Diese Vermutung deckt sich mit dem Zweck des Einsatzes von sauren Mitteln zur Ablösung von Mineralstoffablagerungen (z. B. Calciumphosphat) und alkalischen Mitteln zur Ablösung von Milchproteinen und -fetten von den entsprechenden Oberflächen [48, 271]. Die EPS-Schicht von Biofilmen besteht überwiegend aus Polysacchariden, Proteinen und eDNA, welche vermutlich durch das alkalische Reinigungs- und Desinfektionsmittel effizienter abgelöst werden konnten. Auch Kumari & Sakar (2014) [6] gaben an, dass der alkalische Reinigungsschritt vermutlich hauptverantwortlich für die Entfernung von Biofilmen ist. Die Fähigkeit von NaOCl zur Reaktion mit organischen Bestandteilen der EPS-Schicht kann jedoch auch einen

Nachteil darstellen, da die effektive Konzentration des Wirkstoffs zur Abtötung der Bakterienzellen dadurch gesenkt wird [30, 272, 273].

Auch wenn die gebildeten Biofilme durch die Reinigungs- und Desinfektionsmittelbehandlung nicht vollständig aus den Mikrotiterplatten abgelöst werden konnten, zeigte sich ihre Effektivität bei der Abtötung der Isolate in den Versuchen zur Zellviabilitätsmessung (Abb. 21). Alle bisher als reinigungs- und desinfektionsmittelresistent eingestuften Isolate wiesen hier nach der Behandlung nur noch geringe prozentuale Atmungsaktivitäten im Vergleich zum unbehandelten Biofilm auf. Dieser Versuch bestätigte erneut eine effiziente Reduktion der Zellviabilität durch die Behandlung mit sterilem Leitungswasser, insbesondere in Verbindung mit dem Ausspülen der Kavitäten nach der Behandlung.

Auch Abdallah *et al.* (2015) [266] konnten zeigen, dass die Behandlung von Biofilmen von *L. monocytogenes* und *S. aureus* mit kommerziell erhältlichen Desinfektionsmitteln zwar zu einer vollständigen Abtötung, jedoch nicht zur kompletten Ablösung des Biofilms führte. Ähnliche Ergebnisse erzielten Lee *et al.* (2016) [274] bei der Behandlung von 48 h alten Biofilmen von milchassozierten *L. monocytogenes*- und *S. aureus*-Stämmen auf Edelstahlcoupons mit 0,5 % Peressigsäure. Während eine vollständige Abtötung der Zellen bereits nach 30-sekündiger Behandlung stattfand, konnten selbst nach zweiminütiger Behandlung nur die *S. aureus*-Biofilme, nicht jedoch die *L. monocytogenes*-Biofilme vollständig von der Oberfläche entfernt werden.

Insgesamt war die abtötende Wirkung des alkalischen Mittels scheinbar stärker als die des sauren Mittels, weil bei Letzterem in mehreren Fällen noch Restatmungsaktivitäten, wenn auch mit hoher Standardabweichung, nachgewiesen werden konnten. Auch Cai *et al.* (2018) [275] fanden im Vergleich mit Chlordioxid und saurem elektrolysiertem Wasser die größte Effizienz von NaOCl (200 ppm) bei der Inaktivierung von Monospezies-Biofilmen der Spezies *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella oxytoca* und *Citrobacter freundii* auf Edelstahlcoupons. Bremer *et al.* (2006) [52] stellten bei Durchführung eines CIP-Verfahrens zur Reinigung von in rekonstituierter Magermilch inkubierten Edelstahlcoupons eine Reduktion der Lebendzellzahl nach Behandlung mit 1 % NaOH um ca. 2 log-Einheiten fest, während nach der direkt im Anschluss folgenden Behandlung mit Salpetersäure (1 %) keine weitere Reduktion der Lebendzellzahl erzielt wurde. Im Gegensatz dazu konnten Speranza *et al.* (2017) [271] zeigen, dass die

Behandlung von *Salmonella spp.*-Biofilmen auf Edelstahlcoupons mit Peressigsäure die Zellen effektiver abtötete als eine Behandlung mit NaOH. Zusätzlich waren geringere Einwirktemperaturen der Peressigsäure notwendig. Diese Ergebnisse sind allerdings nur bedingt mit denjenigen aus der vorliegenden Arbeit vergleichbar. So wurden von Speranza *et al.* (2017) [271] höhere Temperaturen von 45 °C-65 °C bei geringeren Konzentrationen eingesetzt. Zusätzlich unterscheiden sich die in der vorliegenden Arbeit getesteten Mittel in ihrer Zusammensetzung. Das saure Reinigungsmittel aus der vorliegenden Arbeit enthielt statt Peressigsäure Phosphor- und Salpetersäure, während das alkalische Mittel zusätzlich zu NaOH noch NaOCl enthielt. Auch Rosado de Castro *et al.* (2017) [276] fanden eine größere Effizienz der Reduktion der Lebendzellzahl von Biofilmen der Spezies *Enterococcus faecium* auf Edelstahlcoupons bei der Behandlung mit Peressigsäure im Vergleich zu NaOCl. Sie argumentierten, dass NaOCl bei sauren pH-Werten effektiver ist als bei alkalischen pH-Werten, da es zwischen pH 4-7 als HClO vorliegt, während es bei pH-Werten über 9 zu OCl⁻ dissoziiert [12, 269, 277]. Dies ist besonders für die Reinigungsleistung des in der vorliegenden Arbeit untersuchten alkalischen Mittels relevant, da dieses neben NaOCl auch NaOH enthält. Dementsprechend liegt hier das Hypochlorit bei einem alkalischen pH-Wert vor.

Obwohl NaOCl häufig als Desinfektionsmittel in der Lebensmittelindustrie eingesetzt wird [21] und aufgrund seiner oxidierenden Eigenschaft ein breites Wirkungsspektrum besitzt, hat es auch Nachteile. So besitzt es einen korrosiven Effekt gegenüber Metallen, kann bei Reaktion mit Ammonium oder sauren Körperflüssigkeiten zu toxischem Chlorgas und mit organischem Material zu mutagenen und karzinogenen Verbindungen reagieren [270, 278]. Aufgrund des Molybdänanteils sind Edelstahloberflächen des Grades 316 beständiger gegenüber durch freies Chlor hervorgerufenen Korrosionsschäden („Pitting“) als Grad 304-Edelstahloberflächen [29, 33]. In der Melkanlage, die in der vorliegenden Arbeit untersucht wurde, ist vorwiegend der korrosionsanfälligeren Edelstahl Grad 304 verbaut, aus dem auch die für alle *in vitro*-Tests eingesetzten Coupons gefertigt waren. Bei der täglichen Reinigung mit dem alkalischen Mittel besteht in der Anlage die Gefahr der Korrosion der Edelstahlbestandteile, die aufgrund einer erhöhten Oberflächenrauigkeit eine Ablagerung von Milchbestandteilen und dementsprechend die Biofilmbildung begünstigen könnte.

Mit Hilfe von SEM-Mikroskopie konnten Gupta & Anand (2018) [29] das Hervorrufen von Biokorrosion durch *Geobacillus stearothermophilus*-Biofilme auf Grad 304 und 316 Edelstahloberflächen nachweisen. Nach Inkubation in steriler rekonstituierter Magermilch wiesen auch die nicht inokulierten Edelstahloberflächen wabenartige Strukturen auf, die in der vorliegenden Arbeit nach Inkubation in TSA ebenfalls beobachtet wurden (Abb. 25). Dieselben Strukturen zeigten auch die SEM-Aufnahmen von anderen Autoren [21]. Ob es sich um Proteinablagerungen aus dem Medium oder die Beschaffenheit der Edelstahloberfläche handelt, kann nicht abschließend geklärt werden. Gupta & Anand (2018) [29] gaben jedoch an, dass die rissige Oberflächenstruktur aus der V2A-Oberflächenbehandlung resultiert, welche auch für die Edelstahlcoupons aus der vorliegenden Arbeit vorgenommen wurde. Die Kontroll-Edelstahlcoupons mit polierter Oberfläche besaßen keine rissige Oberfläche [29].

Trotz der hohen Abtötungsrate konnten restliche Atmungsaktivitäten für verschiedene Isolate nach der Reinigungs- und Desinfektionsmittelbehandlung nachgewiesen werden. Der Anteil der überlebenden Zellen könnte ausreichen, um nach dem CIP-Verfahren zu einer rasanten Proliferation des verbliebenen Biofilms beizutragen. Auch Bayoumi *et al.* (2012) [253] konnten mittels Kultivierung überlebende Zellen von 2-72 h alten Biofilmen der Spezies *S. aureus*, *C. sakazakii* und *S. enterica* Serovar Typhimurium in Mikrotiterplatten und auf Edelstahlcoupons nachweisen, nachdem diese für 30 s mit 250 ppm NaOCl behandelt wurden. Die Messung der Atmungsaktivität nach der Reinigungs- und Desinfektionsmittelbehandlung bietet nur einen Anhaltspunkt über den tatsächlichen Anteil der überlebenden Zellen. Eine Strategie von Biofilmbewohnern, die Reinigungs- und Desinfektionsmittelbehandlung zu überstehen, besteht in einer deutlich herabgesetzten Stoffwechselaktivität im Vergleich zu planktonischen Zellen. Dementsprechend könnte die Stoffwechselrate der verbliebenen Zellen zu gering gewesen sein, um messbare Ergebnisse bei der WST-Messung zu erzielen. Weiterhin könnten sublethal geschädigte Zellen direkt nach der Behandlung zwar nicht in der Lage gewesen sein, Zellatmung zu betreiben, wären aber möglicherweise nach einer Erholungsphase wieder in der Lage sich zu vermehren. Das Rohrleitungssystem der Melkanlage wird im letzten Schritt des CIP-Verfahrens mit Leitungswasser durchspült, um Bestandteile des Reinigungs- und Desinfektionsmittels zu entfernen. Anschließend steht die Flüssigkeit in der Anlage für mehrere Stunden bei Raumtemperatur, sodass optimale Bedingungen zur Erholung und Proliferation der Biofilme herrschen. Zusätzlich

können mit dem Leitungswasser weitere Mikroorganismen in die Anlage eingetragen werden, die entweder selbst zur Adhäsion und Biofilmbildung fähig sind, oder sich in bereits bestehende Biofilme integrieren können.

Bei der Beurteilung der Effektivität der eingesetzten Reinigungs- und Desinfektionsmittel muss bedacht werden, dass diese bei Verwendung in der Melkanlage auf 40-60 °C erwärmt werden und zusätzlich die Rohrleitungen durchströmen. Die erhöhten Temperaturen sowie die Scherkräfte durch die Strömung konnten in den *in vitro* Versuchen nicht nachgestellt werden, erhöhen aber vermutlich die Reinigungsleistung in der Praxis [21, 43]. Zudem kann das Vor- und Nachspülen der Melkanlage mit Leitungswasser nach dem Reinigungs- und Desinfektionsvorgang zusätzlich zur Entfernung der Biofilme beitragen. Nur wenige Studien berücksichtigen komplette CIP-Abläufe bei der Untersuchung der Effizienz von bestimmten Reinigungs- und Desinfektionsmitteln oder deren Kombinationen, so wie Dufour *et al.* (2004) [269], Bremer *et al.* (2006) [52] oder Kumari & Sakar (2014) [6].

Eine Überwachung der korrekten Einhaltung von vorgeschriebenen Konzentrationen und Temperaturen bei den CIP-Verfahren ist sinnvoll, da Latorre *et al.* (2010) [143] die dauerhafte Unterschreitung der vorgeschriebenen Temperatur von 73 °C zur CIP-Reinigung einer Melkanlage nachweisen konnten. Dabei kam es zu deutlich geringeren Temperaturen von maximal 47 °C im Milchsammeltank. Dies könnte damit begründet sein, dass Milchsammeltanks zumeist durch Versprühen des Mittels auf die Innenwände gereinigt werden [21]. Sollte der Reinigungs- und Desinfektionsvorgang direkt im Anschluss an die Abholung der Milch durch die Molkerei erfolgen, könnten die Wände des Sammel tanks noch kühl sein, sodass die effektiven Reinigungstemperaturen vermutlich noch weiter herabgesetzt und die Effizienz des Verfahrens entsprechend reduziert wird. Für eine optimale CIP-Effizienz sollte daher nicht nur die Einhaltung der vorgeschriebenen Temperaturen streng überwacht, sondern auch darauf geachtet werden, dass der Tank sich vor der Durchführung der Reinigung nach Abschalten der Kühlung auf Raumtemperatur erwärmen kann. Eine zu geringe Reinigungstemperatur gaben auch Elmoslemany *et al.* (2009) [279] als Risikofaktor für erhöhte Keimzahlen in der Sammel tankmilch an.

Es darf nicht außer Acht gelassen werden, dass in der vorliegenden Arbeit nur Monospezies-Biofilme auf ihre Reinigungs- und Desinfektionsmittelresistenz getestet

wurden. In der Literatur wurde dagegen bereits mehrfach eine erhöhte Resistenz von Multispezies-Biofilmen gegenüber den typischerweise im Lebensmittelbereich eingesetzten Reinigungs- und Desinfektionsverfahren beschrieben [12, 21]. Dies wird zumeist mit einer erhöhten EPS-Produktion assoziiert [266], oder durch den Schutz von sensiblen Organismen durch den engen Kontakt zu resistenten Organismen im Biofilm erklärt [259]. So konnten Am Jang *et al.* (2006) [272] zeigen, dass die EPS-Schicht die Penetration von Chlordioxid in Biofilme verzögert und dessen Eindringen in tiefere Schichten von Biofilmen komplett verhindert. Auch andere Studien wiesen eine verlangsamte Penetration von Desinfektionsmitteln wie Hypochlorit oder quartären Ammoniumionen in Biofilme nach. Dies kann unter anderem durch die Adsorption von geladenen Wirkstoffen an EPS-Bestandteile erklärt werden [24].

Zudem spielt das Alter der Biofilme eine Rolle bei der Effizienz ihrer Entfernung durch CIP-Verfahren [5]. Dies hängt vermutlich mit der größeren EPS-Menge in reifen Biofilmen zusammen [25]. In diesem Zusammenhang konnten Corcoran *et al.* (2014) zeigen, dass sich 48 h alte *Salmonella enterica*-Biofilme durch die Behandlung mit NaOCl (500 ppm), NaOH (1 M) und Benzalkoniumchlorid (0,02 %) von Beton noch entfernen ließen, während die eingesetzten Mittel selbst bei 90-minütiger Einwirkzeit nicht zur vollständigen Entfernung von 7 Tage alten Biofilmen in der Lage waren. Auch wenn Beton kein lebensmittelassoziiertes Material ist, lassen sich die beobachteten Befunde möglicherweise auch auf Biofilme auf anderen Materialien übertragen.

Bénézech & Faille (2018) [43] stellten eine Zwei-Phasen-Kinetik der Ablösung von 48 h alten *Pseudomonas fluorescens*-Biofilmen von Edelstahlcoupons unter Verwendung verschiedener Scherraten und NaOH-Konzentrationen fest. Während in der ersten Phase von 2-3 Minuten eine schnelle Reduktion der Lebendzellzahl erreicht wurde, bestand die zweite Phase aus einer deutlich langsameren Abtötung. Die Autoren beobachteten, dass NaOH die Biofilmstruktur zerstörte, während die Strömungsgeschwindigkeit für die effektive Abtragung der abgelösten Biofilmbestandteile verantwortlich war. Eine komplette Entfernung der Biofilme wurde auch nach 30-minütiger Behandlung nicht erreicht.

Einige Autoren kritisieren, dass die bakterizide Wirkung der meisten Reinigungs- und Desinfektionsmittel anhand von planktonischen Zellen untersucht wird [6, 30, 33, 53]. Aufgrund der mehrfach erwähnten erhöhten Resistenz von Biofilmen, insbesondere von

in Lebensmittelbetrieben typischerweise vorkommenden Multispezies-Biofilmen, sollte die Optimierung von CIP-Verfahren jedoch unter möglichst praxisnahen Bedingungen durchgeführt werden. Diese Forderung schließt nicht nur die Untersuchung der Wirksamkeit gegenüber Biofilmen mit typischer Spezieszusammensetzung für den betrachteten Lebensmittelbetrieb [5], sondern auch das behandelte Oberflächenmaterial, sowie relevante Nährstoff- und Temperaturbedingungen ein [269, 270]. So könnte zukünftig neben der minimalen Hemm- und bakteriziden Konzentration (MHK/MBK) die minimal benötigte Konzentration zur Entfernung von Biofilmen (minimal biofilm eradication concentration, MBEC) ermittelt werden [2]. Diese liegt in den meisten Fällen vermutlich deutlich höher als die MHK/MBK [2, 30, 258].

Laut Literatur können Reinigungs- und Desinfektionsverfahren in der Lebensmittelindustrie verschiedene Ziele verfolgen. Eine Möglichkeit besteht darin, die Adhäsion von Bakterien zu verhindern und dementsprechend den ersten Schritt der Biofilmbildung zu unterbinden [18, 271]. Da die Oberflächenkonditionierung durch Lebensmittelbestandteile und die anschließende Adhäsion von Mikroorganismen innerhalb von wenigen Sekunden stattfindet [21, 70], kann davon ausgegangen werden, dass dieses Ziel in der Melkanlage nicht zu erreichen ist. Im Unterschied dazu werden die Melkbecher nach jeder gemolkene Kuh mit Flüssigkeit durchspült. Da auf keiner Melkbecheroberfläche Mikroorganismen nachgewiesen werden konnten, handelt es sich dabei vermutlich um ein effektives Verfahren, um Mikroorganismen aus den Melkbechern auszuschwemmen, bevor es zur Adhäsion kommen kann.

In den meisten lebensmittelproduzierenden Betrieben sollen durch die Applikation von chemischen Reinigungs- und Desinfektionsmitteln in Kombination mit erhöhten Temperaturen und Scherkräften durch turbulente Strömung bereits gebildete Biofilme sowie Lebensmittelbestandteile entfernt werden [280]. Im Idealfall sind die verwendeten Mittel fähig zum Aufbrechen bzw. zur Ablösung der EPS-Schicht, um die darin eingebetteten Bakterienzellen freizulegen und diese abzutöten. Werden größere Mengen lebender Zellen aus dem Biofilm abgelöst, besteht die Gefahr, dass sie an anderen Stellen der Anlage erneut adhären und dort Biofilme bilden [18, 25, 40, 47, 150]. Möglicherweise könnte dieses sogenannte „Sloughing“ von Biofilmen auch zu plötzlichen starken Erhöhungen der Keimzahl der Sammel-tankmilch führen. Trotz der mikrobiologisch zumeist einwandfreien Qualität der Rohmilch des beprobten

Milchviehbetriebs mit Keimzahlen zwischen 10^3 - 10^4 KbE/ml, konnten zu diversen Probenahmen deutlich erhöhte Keimzahlen („spikes“) von über 10^5 KbE/ml festgestellt werden [79]. Da entsprechend erhöhte Keimzahlen zu Abzügen des Milchgeldes führen, wäre es für den Betrieb von großer Relevanz, diese Problematik zu beheben.

4.6 Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung

Die FISH mit den für 48 h in die Melkanlage verbrachten Edelstahlcoupons führte zu einer erfolgreichen Detektion von Bakterienzellen. Dennoch bestand die Schwierigkeit des Vorhandenseins vieler unspezifischer Signale oder Artefakte. Möglicherweise wurden Milchbestandteile angefärbt, die die Oberfläche trotz CIP-Reinigung konditionierten. So konnten Whitehead & Verran (2015) [144] zeigen, dass insbesondere Molkenproteine eine starke Anheftung an Edelstahloberflächen aufwiesen. Sie zeigten außerdem, dass sich Bakterienzellen direkt an Lebensmittelbestandteile anlagern, da diese ihnen vermutlich einen Schutz gegenüber schädlichen Umwelteinflüssen gewähren. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, dass die nach dem CIP-Prozess nicht vollständig entfernte EPS-Schicht angefärbt wurde. Insbesondere bei Abb. 24 C3 und D3 sowie Abb. 30 B1 (Anhang) könnte dies der Fall sein, da die diffuse Anfärbung mit DAPI für das Vorhandensein von eDNA spricht. Auch Bénézech & Faille (2018) [43] führten eine diffuse Anfärbung von Biofilmen mit Acridin-Orange auf das Vorhandensein einer EPS-Matrix zurück.

Häufig wurden dicht zusammengelagerte Ansammlungen von Zellen (Mikrokolonien) detektiert, die vermutlich von einer EPS-Matrix umgeben waren. Dies führte zu diffusen Signalen, die weder eine Bestimmung der Zellmorphologie noch die Quantifizierung der Zellen möglich machten. Anhand der Hybridisierung der Edelstahlcoupons mit spezifischen Sonden und DAPI konnte beobachtet werden, dass sich bereits bei der Adhäsion Zellen unterschiedlicher Phyla oder Klassen in unmittelbarer Nähe zueinander befanden (Abb. 24 B1, B4, D1), was deutlich für die Bildung von Multispezies-Biofilmen auf den Melkanlagenoberflächen spricht. Besonders häufig wurden Multispezies-Biofilme bei Anfärbung mit der Sonde Bet42a detektiert (Abb. 24 B4, D1). Möglicherweise bilden Spezies der *Betaproteobacteria* dementsprechend bevorzugt Biofilme mit Bakterien anderer Klassen oder Phyla. Eine Integration von *L. monocytogenes*-Zellen in einen Biofilm der Spezies *Lb. plantarum* konnten auch Kocot & Olszewska (2017) [81] visualisieren. Sie zeigten, ebenso wie in der vorliegenden

Arbeit, dass die Multispezies-Biofilme nicht aus nebeneinanderliegenden Mikrokolonien der verschiedenen Spezies bestehen, sondern dass diese auch innerhalb derselben Mikrokolonie existieren können.

Auch wenn keine Quantifizierung der Besiedelungsdichte durch die FISH-Analyse der in die Melkanlage verbrachten Edelstahlcoupons stattfinden konnte, ließen sich dennoch wertvolle Erkenntnisse gewinnen. So konnte gezeigt werden, dass auf verschiedenen Stellen der hybridisierten Edelstahlcoupons unterschiedliche Stadien der Biofilmbildung vertreten waren (Abb. 24). Die extrem dicht gepackten Zellverbände, wie in Abb. 24 D2 waren vor allem auf den für 72 h in der Melkanlage verbliebenen Coupons feststellbar. Hier konnten kaum noch Einzelzellen oder lockere Zellverbände detektiert werden, zudem waren die gebildeten Mikrokolonien deutlich kompakter und nahmen weniger Fläche ein als die nach 48 h gebildeten Mikrokolonien. Möglicherweise führt der Stress durch Scherkräfte in Verbindung mit erhöhten Temperaturen und Reinigungs- und Desinfektionsmitteln während des CIP-Verfahrens zu einer engen Zusammenlagerung der Zellen und einer vermehrten EPS-Produktion. Dies kann zum Schutz der innen liegenden Zellen vor den Stressoren beitragen. Auch andere Autoren konnten zeigen, dass ältere Biofilme (2-5 Tage) dichter gepackte Mikrokolonien enthielten, bei denen einzelne Zellen ebenfalls nur schwer voneinander zu unterscheiden waren [41, 43, 259].

4.7 Differentielle Genexpression in Biofilmen

Für die differentiellen Genexpressionsanalysen wurden die Isolate *Acinetobacter guillouiae* M9 und *Kocuria salsicia* M239 ausgewählt. In Mikrotiterplatten konnte bei *K. salsicia* M239 eine deutliche Steigerung der Biofilmbildung durch den Austausch von Glucose durch Lactose erzielt werden. Im Gegensatz wurde bei *A. guillouiae* M9 eine leichte Abnahme der Biofilmbildung in Lactose-TSB beobachtet (Abb. 18). Eine Induktion von biofilmassoziierten Genen durch Lactose ist besonders für milch-assoziierte Isolate von Bedeutung, da es sich bei dem Hauptkohlenhydrat von Milch um Lactose handelt.

Das Versuchsdesign hat einen entscheidenden Einfluss auf das Ergebnis und die Sinnhaftigkeit von differentiellen Genexpressionsanalysen. So können das Alter des Biofilms (wenige Stunden bis mehrere Tage) und die Wachstumsphase der planktonischen Zellen (exponentiell vs. stationär) die detektierten Genexpressionsmuster stark beeinflussen [280]. So konnten Beloin *et al.* (2004) [75] zeigen, dass das

Genexpressionsmuster im Biofilm demjenigen von planktonischen Zellen in der stationären Wachstumsphase ähnelt. Demnach führte der Vergleich der Transkriptome von Biofilmen mit exponentiell wachsenden planktonischen Zellen von *E. coli* K12 zur Detektion von vermeintlich biofilmassoziierten Genen, von denen ca. 60 % jedoch auch von planktonisch wachsenden Zellen in der stationären Phase exprimiert wurden.

Um die Veränderung der Genexpression in Biofilmen nachzuvollziehen, sollten Transkriptomanalysen optimalerweise zu verschiedenen Zeitpunkten und damit in verschiedenen Phasen der Biofilmbildung durchgeführt und diese untereinander sowie mit planktonischen Zellen in verschiedenen Wachstumsphasen verglichen werden. Eine entsprechende Studie führten Domka *et al.* (2007) [76] mit 4, 7, 15 und 24 Stunden alten Biofilmen von *E. coli* K12 mit Hilfe von DNA-Microarrays durch. Als Vergleich dienen die planktonischen Zellen aus dem jeweiligen Kulturüberstand. Da entsprechende Studien mittels RNA-Sequenzierung sowohl sehr zeit- als auch kostenaufwändig wären, wurde in der vorliegenden Studie ein anderer Ansatz gewählt. Um die in planktonischen Zellen des Überstandes genauso stark wie im Biofilm exprimierten Gene zu maskieren, wurden die von den Edelstahlcoupons abgelösten Biofilmzellen mit auf eine einheitliche OD_{625 nm} gebrachten planktonischen Zellen des Überstandes vermischt und ihre RNA gemeinsam extrahiert. Dies lässt sich anhand der Agarosegele (Abb. 31 im Anhang) aus der vorliegenden Arbeit nachvollziehen. Die gleichbleibende Konzentration aller RNA-Extrakte von *A. guillouiae* M9 sowie die deutlich höhere RNA-Konzentration von *K. salsicia* M239 in Lactose-TSB spiegeln die annähernd gleichbleibende bzw. deutlich stärkere Biofilmbildung der Isolate in Lactose-TSB wieder. Da alle Überstände vor der RNA-Extraktion auf eine einheitliche OD_{625 nm} gebracht wurden, kann dies nur auf die höhere Zelldichte des Biofilms von *K. salsicia* M239 in Lactose-TSB zurückgeführt werden, aus denen folglich auch mehr RNA extrahiert werden konnte.

Da alle drei biologischen Replikate sowie beide Medien mit derselben Vorkultur des jeweiligen Isolats angeimpft wurden, sollten sich alle Ansätze nach einheitlicher Inkubationszeit in derselben Wachstumsphase befinden. Die Wachstumskurven (Abb. 33 im Anhang) zeigten keine erkennbare Lag-Phase für *A. guillouiae* M9 und etwa gleich lange Lag-Phasen in beiden Medien für *K. salsicia* M239. Die nach derselben Inkubationszeit geringere gemessene OD_{625 nm} des Überstandes in Lactose-TSB im Vergleich zu TSB war dementsprechend auf die geringere Wachstumsrate beider Isolate

in diesem Medium zurückzuführen. Dies kann dadurch erklärt werden, dass für die Verwertung des Disaccharids Lactose zusätzlich das Enzym β -Galactosidase synthetisiert werden muss, welches Lactose in die Monosaccharide Glucose und Galactose hydrolysiert. Die Synthese von Enzymen zur Umwandlung von Galactose in Glucose, um diese im Energiestoffwechsel zu verwerten, ist weiterhin mit erhöhtem Aufwand verbunden. Aufgrund der Wachstumskurven kann davon ausgegangen werden, dass sich die planktonischen Zellen im Kulturüberstand beider Isolate zum Zeitpunkt der RNA-Extraktion jeweils in der spätexponentiellen oder beginnenden stationären Wachstumsphase befanden.

Die Ergebnisse der Principal Component Analyse (PCA) (Abb. 32 im Anhang) weisen darauf hin, dass die Unterschiede in der Genexpression beider Isolate keine Zufallsbefunde sind, sondern sich zumindest teilweise auf die unterschiedliche Zusammensetzung der verwendeten Medien zurückführen lassen. Jedoch zeigten sie auch, dass die Daten jeweils aus dem dritten Ansatz von *A. guillouiae* M9 vermutlich Ausreißer darstellen und deren Einbeziehung in die differentielle Genexpressionsanalyse kritisch zu betrachten ist. Diese Messpunkte hätten als Ausreißer vermutlich aus der differentiellen Genexpressionsanalyse ausgeschlossen werden müssen. Da die Auswertung der Daten von einem externen Kooperationspartner vorgenommen wurde, wurden trotzdem alle Parallelen berücksichtigt. Dasselbe gilt für die breite Streuung aller drei Parallelen bei Inkubation von *K. salsicia* M239 in Lactose-TSB. Aufgrund der großen Variation der Parallelen hätte die Analyse mit den Ansätzen aus Lactose-TSB gegebenenfalls wiederholt werden müssen, jedoch wurden auch hier alle Resultate vom externen Kooperationspartner in die differentielle Genexpressionsanalyse mit einbezogen. Die Beobachtungen aus der PCA geben somit einen Hinweis darauf, warum einige Befunde der differentiellen Expression statistisch als nicht signifikant eingestuft wurden.

Bei der Auswertung der in der vorliegenden Studie generierten Daten trat das Problem auf, dass es zu den untersuchten Spezies *Kocuria salsicia* und *Acinetobacter guillouiae* in der Literatur bisher keine Daten zu biofilmassoziierten Genen gibt. Obwohl die Gattung *Kocuria* bereits als einer der Hauptbesiedler in Biofilmen auf Edelstahloberflächen von Küchenspülbecken sowie auf dort eingebrachten Edelstahlcoupons [281] ebenso wie auf verschiedenen Flächen einer Cafeteria mit

Lebensmittelkontakt [282], nachgewiesen wurde, gibt es zum Biofilmbildungsvermögen oder biofilmassoziierten Genen dieser Gattung keine Studien. Dies liegt vermutlich an ihrer geringen Relevanz im klinischen Bereich, da alle Spezies der Gattung in Risikogruppe 1 gruppiert werden (TRBA 466), sowie der bisher nicht festgestellten Rolle der Gattung als Lebensmittelverderber. Zwar gibt es bereits einige publizierte Genome verschiedener Spezies der Gattung, jedoch diskutierten lediglich Takarada *et al.* (2008) [283] und Gundlapally *et al.* (2015) [284] die Bedeutung der vorausgesagten Gene von *K. rhizophila* DC 2201 bzw. *K. polaris* CMS 76or^T.

Aufgrund der klinischen Relevanz der häufig multiresistenten Spezies *Acinetobacter baumannii* gibt es eine Vielzahl von Studien zu dessen Biofilmbildungsvermögen sowie biofilmassoziierten Genen. Die aus den entsprechenden Studien stammenden Ergebnisse können demnach, unter Berücksichtigung von möglichen speziespezifischen Unterschieden, auf die in der vorliegenden Arbeit untersuchte Spezies *A. guillouiae* übertragen werden.

Auch können die biofilmassoziierten Genexpressionsmuster weiterer Spezies zum Vergleich mit den in der vorliegenden Arbeit differentiell exprimierten Genen herangezogen werden. Dies lässt Rückschlüsse auf allgemein in Biofilmen eingeschlagene Stoffwechselwege oder vermehrt exprimierte Gengruppen zu.

Wie aus den Tab. 25 und 26 hervorgeht, konnten in *A. guillouiae* M9 deutlich mehr differentiell exprimierte Gene festgestellt werden als in *K. salsa* M239. Dies liegt vermutlich an der deutlich geringeren Genomgröße von nur ca. 3 Mb der meisten Actinomyceten der Gattung *Kocuria* [276, 283-285].

Viele Studien setzen als cut-off-Wert für relevante differentiell exprimierte Gene einen fold-change von ≥ 2 an. Orientiert man sich auch für die vorliegende Arbeit an diesem Wert, waren in *A. guillouiae* M9 ca. 4,6 % der insgesamt detektierten Gene signifikant differentiell exprimiert, bei *K. salsa* M239 war der Anteil mit 9,5 % doppelt so hoch. Diese Befunde decken sich mit Literaturangaben, laut denen in den meisten Studien etwa 5-10 % der Gene in Biofilmen im Vergleich zu planktonischen Zellen differentiell exprimiert wurden. Allerdings wurden in manchen Studien auch bis zu 40 % der Gene differentiell exprimiert. Unterschiede lassen sich durch verschiedene Untersuchungsmethoden (DNA-Microarrays, RNA-Seq, 2D Gelelektrophorese von Proteomen) sowie

mit Unterschieden zwischen den verglichenen Zellen (Alter des Biofilms, Wachstumsphase der planktonischen Zellen) begründen [76, 280].

Die Beurteilung der Signifikanz einiger besonders stark differentiell positiv oder negativ exprimierter Gene mit hohen fold-changes war nicht ohne Weiteres möglich, da in der Auswertetabelle für alle statistischen Kenngrößen ein Wert von 0 angegeben war. Die Auswertung der Daten erfolgte durch das MPI mittels der CLC Genomics Workbench von Qiagen. Im CLC-Online-Handbuch lassen sich keine Angaben zur Interpretation der Angabe „0“ finden. In diversen Online-Quellen wird angegeben, dass ein Wert von 0 für sehr geringe statistische Kenngrößen spricht, da sich geringere Werte als 10^{-314} in Excel nicht mehr darstellen lassen und daher auf 0 gerundet werden. Dementsprechend würde es sich um hoch signifikante Befunde handeln.

4.7.1 Differentielle Genexpression von *Acinetobacter guillouiae* M9

Die differentielle Genexpressionsanalyse von *A. guillouiae* M9 zeigte, dass einige biofilmassoziierte Gene wie *csuA*, *fimA* und *pilH*, die für Typ I bzw. Typ IV Pili codieren, in Glucose-haltiger TSB stärker exprimiert waren als in Lactose-haltiger TSB (Tab. 27). Zudem waren weitere, vermutlich auf denselben Operons lokalisierte Gene wie *fimD* bzw. *pilN*, und *pilP* ebenfalls in Glucose-TSB hochreguliert. Dies, zusammen mit den insgesamt 26 in TSB differentiell positiv exprimierten für Pili codierenden Genen (Tab. 48 im Anhang), spricht für die Eindeutigkeit der Befunde, obwohl die statistischen Kennwerte für die *pil*-Gene nicht für signifikante Ergebnisse sprachen.

Obwohl die Unbeweglichkeit von *Acinetobacter spp.* schon im Gattungsnamen verankert ist, und die Gattung keine Flagellen besitzt, konnte bewiesen werden, dass sich ihre Vertreter über zwei Flagellen-unabhängige Mechanismen fortbewegen können. Dabei handelt es sich um die „Twitching Motility“ und die „Swarming Motility“, wobei erstere durch die Kontraktion von Typ I-Pili vermittelt wird. Diverse Studien konnten zeigen, dass Pili für die Anheftung an Oberflächen und die dadurch vermittelte Biofilmbildung von *A. baumannii* notwendig sind [92, 99].

Während die vermehrte Expression von Pili-Genen in Glucose-haltiger TSB sich mit der Beobachtung der leicht verstärkten Biofilmbildung von *A. guillouiae* M9 in diesem Medium deckt, sprachen andere Befunde dagegen. So zeigten die in der vorliegenden Arbeit generierten Daten eine stärkere Expression der *pgaBCD*-Gene in Lactose-TSB,

wobei es sich überwiegend um statistisch signifikante Befunde handelt. Der Nachweis von drei der vier auf demselben Operon lokalisierten Gene spricht weiterhin gegen Zufallsbefunde (Tab. 28). Der *pgaABCD*-Lokus codiert für Proteine zur Synthese des EPS-Polysaccharids Poly- β -1,6-N-Acetylglucosamin (PNAG), welches einen wichtigen Bestandteil von Biofilmen verschiedener Spezies, unter anderem auch von *A. baumannii*, darstellt [303]. Weiterhin wurden in Lactose-TSB mehrere weitere Gene des Kohlenhydrat- bzw. Polysaccharid-Metabolismus wie *wlaX* signifikant stärker exprimiert (Tab. 28), die ebenfalls im Zusammenhang mit einer verstärkten EPS-Synthese stehen könnten. Xue *et al.* (2014) [286] konnten eine Induktion der *icaABCD*-Gene von Mastitis-assoziierten *S. aureus*-Isolaten durch Lactose und Milch im Wachstumsmedium mittels RT-qPCR nachweisen. Allerdings schlossen sie auf speziesspezifische Unterschiede in der genauen Genregulation, da typische biofilmassoziierte Transkriptionsfaktoren nicht in allen getesteten Isolaten ebenfalls stärker exprimiert waren. Falls es auch im milch-assoziierten *A. guillouiae*-Isolat M9 einen Lactose-sensitiven Transkriptionsfaktor gibt, wäre die Induktion der PNAG-Synthese durch Lactose im Medium damit zu erklären.

Es konnte bereits gezeigt werden, dass Pili besonders bei der irreversiblen Anheftung von Zellen an eine Oberfläche eine Rolle spielen und daher in jungen Biofilmen stärker exprimiert werden, während EPS-Bestandteile wie PNAG für die Reifung von Biofilmen und die Ausbildung ihrer dreidimensionalen Struktur von Bedeutung sind. Somit werden entsprechende Gene erst in älteren Biofilmen vermehrt exprimiert [15, 89]. Da das untersuchte Isolat in beiden Medien zu einer schwachen Biofilmbildung fähig ist, könnte spekuliert werden, dass sich die Isolate in Glucose- und Lactose-TSB in unterschiedlichen Phasen der Biofilmbildung befanden. Dementsprechend würde die Biofilmbildung in Lactose-TSB früher einsetzen als in Glucose-haltiger TSB, was in einem „reiferen“ Biofilm zum Zeitpunkt der RNA-Extraktion resultieren würde. Gegen diese Hypothese spricht allerdings, dass die planktonischen Zellen in Lactose-TSB ein deutlich langsames Wachstum aufwiesen als in Glucose-TSB und somit eher der umgekehrte Fall erwartet würde. Allerdings besteht auch die Möglichkeit, dass die Zellen in Lactose-TSB die generierte Energie vermehrt in die Biofilmbildung investiert haben, während diese in Glucose-TSB zunächst für die Vermehrung der planktonischen Zellen genutzt wurde. Diese Hypothese trifft besonders dann zu, wenn das Wachstum in Lactose-TSB einen Stressor für die Zellen darstellt und die Biofilmbildung unter Stress gesteigert ist.

In Glucose-haltiger TSB könnte die Biofilmbildung dann erst aufgrund der durch die beschleunigte Zellteilung erhöhten Zelldichte ausgelöst worden sein.

Mit der gewählten Inkubationsdauer von ca. 12 Stunden wurde generell vermutlich ein frühes Stadium der Biofilmbildung abgedeckt, da in den meisten Studien zur Charakterisierung des Genexpressionsmusters von Biofilmen 24 Stunden bis mehrere Tage alte Biofilme verwendet wurden [73, 75, 287-290]. In der vorliegenden Arbeit führten längere Inkubationszeiten jedoch zu einer drastischen Verringerung der RNA-Ausbeute, die eine Transkriptomanalyse erschwerte. Da die EPS-Zusammensetzung in *Acinetobacter*-Biofilmen je nach Alter variieren kann, sollte die Möglichkeit der Verschiebung der Biofilm-Phasen in den verwendeten Medien jedoch nicht vollständig verworfen werden. So konnte gezeigt werden, dass EPS-Polysaccharide eher in jüngeren Biofilmen für deren Struktur verantwortlich zu sein scheinen, während in älteren Biofilmen vermehrt Proteine und eDNA in der EPS-Schicht nachgewiesen werden. Die differentielle Expression der *pga*-Gene in Lactose-TSB spricht daher dennoch für einen vergleichsweise jungen Biofilm.

UDP-N-Actetylglucosamin als Substrat für die PNAG-Synthese wird über Fructose-6-phosphat generiert, welche wiederum durch Isomerisierung aus Glucose-6-phosphat gebildet wird [291]. Chai *et al.* (2012) [292] konnten zeigen, dass *Bacillus subtilis* über den Leloir-Stoffwechselweg das toxische Intermediat UDP-Galactose durch GalE in UDP-Glucose umwandeln kann. Die Autoren wiesen ebenfalls nach, dass einer Akkumulierung von UDP-Galactose durch vermehrte EPS-Produktion entgegengewirkt wurde. Auch wenn UDP-Galactose im Gegensatz zur EPS-Produktion von *B. subtilis* kein direktes Substrat für die PNAG-Synthese der Gattung *Acinetobacter* darstellt, ist es dennoch möglich, dass nach Hydrolyse des Disaccharids Lactose ein Molekül Glucose über die Glykolyse in den Energiestoffwechsel eingeschleust wird, während das zweite Monosaccharid Galactose nach Umwandlung in Glucose zum Teil für die PNAG-Synthese verwendet wird. Diesen Zusammenhang vermuteten auch Cabral *et al.* (2011) [293] für *Acinetobacter baumannii*. GalE/Gne konnte von Repizo *et al.* (2017) [294] in einem umweltassoziierten *A. baumannii*-Stamm nachgewiesen werden. Shin *et al.* (2009) [295] konnten eine vermehrte Expression der UDP-Galactose-Epimerase GalE/Gne in Biofilmen von *A. baumannii* 1656-2 nachweisen. Sowohl UDP-Glucose als auch UDP-Galactose werden als Substrate für die Kapselpolysaccharid- sowie die

Lipopolysaccharid (LPS)-O-Antigen-Synthese benötigt. Diese tragen ebenfalls zu einer verstärkten Adhäsion an Oberflächen bei [93, 296]. Für die Theorie der PNAG-Synthese als Nebenstoffwechselprodukt sprechen zudem die relativ geringen fold-changes der *pga*-Gene in Lactose-TSB von maximal 1,8, sodass sie in Studien mit einem cut-off-Wert von 2 gar nicht als differentiell exprimiert aufgeführt werden würden.

Die stark gesteigerte Expression von insgesamt 47 Phagen-assoziierten Genen bei Inkubation von *A. guillouiae* M9 in Glucose-TSB sowie die in diesem Medium stärkere Expression von stressassoziierten Genen ist typisch für Biofilme [75, 76] und spiegelt demnach erneut die in Glucose-TSB etwas ausgeprägtere Biofilmbildung des Isolats wieder. Bei den stressassoziierten Genen handelte es sich vor allem um Oxidoreduktasen zur Detoxifizierung von Schwermetallionen. Die Akkumulierung von Schwermetallionen wie Kupfer, Zink, oder Mangan in Biofilmen wurde bereits in der Literatur beschrieben [91]. Chrom ist ein Bestandteil der Legierung der verwendeten Edelstahlcoupons. Ob die Anzucht der Biofilme auf den Coupons einen Einfluss auf deren Schwermetallgehalt hat, müsste untersucht werden.

Als weitere oftmals mit verstärkter Biofilmbildung assoziierte Gene wurde eine Vielzahl konjugativer Transferproteine des *tra*-Operons (z. B. *traA*, Tab. 48 im Anhang) in Glucose-TSB stärker exprimiert als in Lactose-TSB. Sowohl die Induktion von Phagen als auch von Transferproteinen wird mit der Stressantwort in Zusammenhang gebracht [75]. Die für den konjugativen Transfer von MGE notwendigen Sex-Pili können zu einer verstärkten Zellagglomeration beitragen und somit eine verstärkte Biofilmbildung verursachen [73].

Auch die stärkere Expression von Effluxtransportern (z. B. *adeT*) sowie Proteinsekretionssystemen kann mit der etwas stärkeren Biofilmbildung von *A. guillouiae* M9 in Glucose-TSB in Verbindung gebracht werden. Da in *A. baumannii* das Biofilmbildungspotential häufig mit Virulenzfaktoren wie Multiresistenz in Verbindung steht [72, 94], kann davon ausgegangen werden, dass ein Teil der entsprechenden Gene gemeinsam reguliert wird. Gleiches gilt für die in Glucose stärker ausgeprägte Expression eines T1SS-sekretierten Agglutinins sowie des Zeta-Toxins (Tab. 27, Tab. 48 im Anhang). Letzteres ist ein Bakterizid und wird vermutlich aufgrund der hohen Zelldichten im Biofilm und einhergehender Konkurrenz vermehrt ausgeschüttet. Es führt zum programmierten Zelltod und damit auch zur Freisetzung von eDNA aus Subpopulationen

des Biofilms, welche wiederum einen wichtigen EPS-Bestandteil darstellt. Zusätzlich steht es im Verdacht, Dormanz-Prozesse in Bakterien zu induzieren und damit zur Entstehung von Persister-Zellen beizutragen [280, 297]. Vermutlich diene das Zeta-Toxin ursprünglich der Plasmidstabilisierung in Bakterienpopulationen, da nur plasmidtragende Zellen ein entsprechendes Antitoxin bilden und dem Zelltod entgehen können [298].

Proteinsekretionssysteme können der Ausschüttung von extrazellulären hydrolytischen Enzymen [299] oder EPS-Bestandteilen dienen, welche ebenfalls vermehrt in Biofilmen nachgewiesen werden. So können Adhäsine wie BAP über Proteinsekretionssysteme an die Zelloberfläche verbracht werden [91, 92], die zur Biofilmbildung beitragen, indem sie die Adhäsion der Zellen untereinander, an Matrixbestandteile oder die zu besiedelnde Oberfläche vermitteln. Dabei sind T1SS für die Sekretion von EPS-Bestandteilen und Adhäsinen zuständig [92], während T2SS Enzyme und Toxine sekretieren [299]. Die Umstrukturierung der Zellmembran und vermutlich ebenso der Zellwand durch verstärkte Expression verschiedener Transportergene in Glucose-TSB ging einher mit einer differentiellen Expression von Genen, die für Enzyme der Peptidoglykan- und Phospholipidsynthese codieren (Tab. 27).

Auch der Nachweis der stärker in Glucose exprimierten Gene von Eisen-Aquirierungssystemen wie TonB-abhängigen Siderophoren mit entsprechenden Rezeptorproteinen spricht für die ausgeprägtere Biofilmbildung von *A. guillouiae* M9 in Glucose-TSB. Insgesamt wurden 21 entsprechende Gene differentiell positiv in Glucose-TSB exprimiert, weitere Gene der Eisenionen-Homöostase, wie *fecA*, noch nicht mitgezählt. Siderophore sind hochaffine Fe (III)-Chelatoren, die unter Eisenlimitierung über MFS-, RND- oder ABC-Transporter an das umgebende Medium abgegeben werden und dort die schlecht wasserlöslichen Eisen (III)-Ionen binden. Die Siderophor-Eisen-Komplexe können wiederum über Rezeptoren auf der Zelloberfläche erkannt und via ABC-Transporter wieder in die Zelle aufgenommen werden [300]. Da intrazelluläres Eisen zur Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) beitragen kann, unterliegt die Eisenaufnahme in Bakterien strikten Regulationsmechanismen. In den meisten Gram-negativen Bakterien handelt es sich bei Fur (ferric uptake regulator) um den Masterregulator der Eisenaufnahme [287]. Aber auch über 2-Komponenten-Systeme und alternative Sigmafaktoren (*FecA*, *FecR*, *FecI*) kann die Siderophor-Produktion induziert

werden [300]. FecA war ebenfalls in Glucose-TSB stärker exprimiert, was für eine positive Regulation der Siderophor-Produktion spricht. Bei FecA handelt es sich gleichzeitig um einen der Eisen-Siderophor-Rezeptoren auf der äußeren Membran.

Die Eisenverfügbarkeit wird als kritischer Faktor für verschiedene Phasen der Biofilmbildung betrachtet [92-94]. Upritchard *et al.* (2011) [301] vermuteten eine Rolle von rezeptorgebundenen Siderophor-Eisen-Komplexen bei der Adhäsion an Metalloberflächen. Die Autoren vermuteten, dass kovalente Bindungen zwischen den o. g. Komplexen und Metalloxiden gebildet würden. *Pseudomonas syringae*-Mutanten, die unfähig zur Produktion von Siderophoren waren, wiesen eine verminderte Biofilmbildung, vermutlich aufgrund einer reduzierten EPS-Produktion, auf. Zudem ist die Siderophor-Produktion scheinbar notwendig für die „Swarming Motility“ in einigen Organismen [91, 287]. Weiterhin scheinen Siderophore eine Rolle bei der Reifung von Biofilmen zu spielen, da Mutanten deutlich dünnere Biofilme bildeten als Isolate mit der Fähigkeit zur Siderophor-Synthese [300]. Auch ein Zusammenhang mit einem erhöhten Bedarf an Eisen-Schwefel (Fe-S)-Clustern in Biofilmen wurde für die vermehrte Expression von Eisen-Aquirierungssystemen bereits vermutet. Dies steht in direktem Zusammenhang zur erhöhten Expression von Genen des Schwefelmetabolismus und ist vermutlich auf erhöhte Stoffwechselraten in bestimmten Bereichen des Biofilms zurückzuführen [290]. Siderophore sind für das planktonische Wachstum, auch unter Eisenlimitierung nicht essentiell, jedoch werden sie für die Biofilmbildung zwingend benötigt [287]. Demnach spricht ihre differentielle Expression für die stärkere Biofilmbildung von *A. guillouiae* M9 in Glucose-TSB, auch wenn die genauen Mechanismen ihres Beitrags zur Biofilmbildung noch unklar sind, oder sich zwischen verschiedenen Spezies unterscheiden können.

In Glucose-TSB waren zudem einige Regulatoren der Genexpression stärker exprimiert. Dazu zählen das *relE*-Gen eines Toxin-Antitoxin-Systems, das Chemotaxis-Protein *cheA*, eine Histidinkinase eines Zwei-Komponenten-Systems (TCS) sowie das Transkript eines Diguanylat-Cyclase- bzw. Phosphodiesterase-codierenden Operons (Tab. 48 im Anhang). Entsprechende Systeme werden häufig in Zusammenhang mit der Wahrnehmung von Umweltfaktoren und darauffolgender Regulation der Genexpression gebracht [302]. Das Toxin RelE wird mit der Inhibition der Translation diverser Gene bei Nährstoffmangel assoziiert, um das Zellwachstum in *E. coli* zu inhibieren [72, 303].

CheA wird mit Chemotaxis und der Regulation des Flagellenmotors in Verbindung gebracht [89, 304]. Da die Gattung *Acinetobacter* keine Flagellen besitzt, handelt es sich bei dem nachgewiesenen Gen vermutlich um ein Homolog einer entsprechenden TCS-Histidinkinase. Ein homologes System zu CheA von *E. coli* wurde bereits von Chen *et al.* (2017) [99] in *A. baumannii* beschrieben. Dieses besaß eine Bedeutung bei der Biofilmbildung durch Beeinflussung der Expression von EPS-, Pili- und Twitching-Motility-codierenden Genen. Den weiteren regulatorischen Genen konnte keine exakte Funktion zugeordnet werden, bzw. handelte es sich vermutlich ebenfalls um Homologe zu entsprechenden Genen in *E. coli*, sodass der Verdacht einer positiven Regulation der Biofilmbildung in *A. guillouiae* M9 zunächst mittels Mutations- und Komplementationsexperimenten überprüft werden müsste. Für den Verdacht einer positiven Regulation der Biofilmbildung von *A. guillouiae* M9 in Glucose-TSB durch die aufgeführten Gene spricht die schwächere Expression des RNA-bindenden Proteins CsrA in diesem Medium. Dieses inhibiert normalerweise die Biofilmbildung und triggert die Ablösung des Biofilms durch Unterdrückung der *pga*-Genexpression (PNAG-Synthese) und Verringerung der c-di-GMP-Konzentration [302]. Diese Beobachtung steht im Widerspruch zur verstärkten Expression der *pga*-Gene in Lactose-TSB. RT-qPCR-Analysen der entsprechenden Gene könnten Aufschluss über die Regulationswege der Biofilmbildung bzw. PNAG-Synthese in *A. guillouiae* M9 bei Inkubation in Glucose- und Lactose-haltiger TSB geben.

Möglicherweise liegen der Biofilmbildung der Spezies *A. guillouiae* andere oder zusätzliche Regulationsmechanismen zugrunde, als der für *E. coli* und *A. baumannii* beschriebenen. So sind in Glucose-TSB evtl. PNAG-unabhängige Mechanismen der Biofilmbildung von Bedeutung. Choi *et al.* (2009) [305] stellten in *pga*-Deletionsmutanten von *A. baumannii* keine veränderte Biofilmbildung unter statischen Bedingungen fest, jedoch eine verringerte Biofilmbildung bei Inkubation unter starkem Schütteln. Sie führten ihre Beobachtung darauf zurück, dass PNAG vermutlich erst bei starken Scherkräften essentiell für die Adhäsion an Oberflächen ist. Die Kulturen aus der vorliegenden Arbeit wurden während der Inkubation zwar leicht geschüttelt, jedoch hat dies möglicherweise nicht ausgereicht, um eine verstärkte PNAG-Synthese zu induzieren, sodass andere Mechanismen der Biofilmbildung überwogen haben.

Besonders auffällig waren die in Lactose-TSB stärker exprimierte Gene des Schwefelmetabolismus. Dazu zählten Gene der Sulfatassimilation, des Alkansulfonatmetabolismus, sowie Biosynthese- und Transportgene der schwefelhaltigen Aminosäuren Cystein und Methionin. Clark *et al.* (2012) [306] und Liu *et al.* (2016b) [290] führten als möglichen Grund dafür die verstärkte Synthese von Fe-S-Clustern in Biofilmen an. Für die Gene *cysB* und *cysE* konnte bereits ein Zusammenhang mit der Biofilmbildung in *E. coli* nachgewiesen werden. Sturgill *et al.* (2004) [307] konnten zeigen, dass *cysE* verantwortlich für die Produktion eines extrazellulären Signals ist, das eine veränderte Genexpression initiiert. Mutanten der *cysE*- und *cysB*-Gene zeigten eine verstärkte Biofilmbildung, was auf eine negative Regulation von biofilmassoziierten Genen durch den *cysE*-vermittelten Signalweg spricht. Einige Gene der *cys*-Familie waren auch in *A. guillouiae* M9 in Lactose-TSB stärker exprimiert (Tab. 49 im Anhang). Wang *et al.* (2015) [308] konnten für die Biofilmbildung von *Salmonella* Typhimurium auf Edelstahloberflächen eine Anreicherung der Stoffwechselwege der Kohlenstoff-Fixierung und ebenfalls des Schwefelmetabolismus feststellen.

Weiterhin waren Gene des Taurinmetabolismus und -transports in Lactose-TSB verstärkt exprimiert. Dieselbe Beobachtung machten auch Fernández-García *et al.* (2016) [297] bei der Biofilmbildung von *A. baumannii*. Taurin kann von verschiedenen Organismen als Kohlenstoff-, Stickstoff- oder Schwefelquelle verwendet und über Sulfoacetaldehyd zu Acetylphosphat abgebaut werden, welches dann über den TCA-Zyklus in den Energiestoffwechsel einfließen kann. Dabei fällt auch Sulfit an, welches zu Sulfat oxidiert wird [309]. Möglicherweise kann der untersuchte *A. guillouiae*-Stamm Lactose nicht spalten und daher nicht als C-Quelle nutzen. Dies würde erklären, warum in dem Isolat kein für die β -Galactosidase codierendes Gen nachgewiesen werden konnte. Zwar handelt es sich um ein milchassoziiertes Isolat, weshalb es eigentlich an die Verwertung von Lactose als Hauptkohlenhydrat der Milch angepasst sein sollte, allerdings zeigte es eine leicht verminderte Biofilmbildung in Lactose-TSB. Des Weiteren ist Milch reich an weiteren Nährstoffen, die anstelle des Milchzuckers als C-Quelle verwendet werden können.

In Lactose-TSB waren einige Gene des Aminosäure-Metabolismus stärker exprimiert als in Glucose-TSB. Dazu zählten Gene zur Synthese der schwefelhaltigen Aminosäuren Methionin und Cystein, aber auch eine Homoserin-O-Acetyltransferase. Möglicherweise

steht diese in Verbindung zum Quorum-Sensing-System von *Acinetobacter spp.* *A. baumannii* produziert z. B. das QS-Molekül N-3-Hydroxy-dodecanoyl-Homoserin-Lacton (N-3-OH-C₁₂-HSL). Dies würde wiederum für eine höhere Zelldichte der in Lactose-TSB gebildeten Biofilme zum Zeitpunkt der RNA-Extraktion sprechen, da die Produktion von AHL-QS-Molekülen abhängig von der Zelldichte ist [310]. Dou *et al.* (2017) [310] konnten zeigen, dass die Expression von RND-Effluxtransportern der *ade*-Genfamilie, die auch in der vorliegenden Arbeit verstärkt in Lactose-TSB exprimiert wurden, in *A. baumannii* durch QS-Signale aktiviert werden kann. Generell regulieren QS-Moleküle einige biofilmassoziierte Gene, wie solche zur Biosynthese von Pili und Siderophoren. Zudem können sie die Auslösung der Stressantwort induzieren [36]. In diesem Zusammenhang konnten Duanis-Assaf *et al.* (2016) [102] die Induktion der AI-2-Synthese durch Lactose in *B. subtilis* nachweisen.

Insgesamt konnten sowohl bei Anzucht von *A. guillouiae* M9 in Glucose- als auch Lactose-haltiger TSB biofilmassoziierte Gene nachgewiesen werden. Dabei überwogen die typischen biofilmassoziierten Genexpressionsmuster in Glucose-TSB, was den Befund der leicht verstärkten Biofilmbildung in diesem Medium durch Kristallviolett färbung bestätigt. Ob sich die jeweils gebildeten Biofilme in unterschiedlichen Phasen befanden und deshalb ein unterschiedliches Expressionsmuster zeigten (Pili/Adhäsions- vs. EPS-Synthesegene), kann mit den vorliegenden Daten nicht vollständig geklärt werden.

Wie in den meisten Studien zur Identifizierung biofilmassoziierten Gene handelte es sich bei einigen der detektierten differentiell exprimierten Gene um solche mit unbekannter Funktion [75, 88, 311]. Vor dem Hintergrund, dass bisher keine Studien zur Untersuchung biofilmassoziierten Gene der Spezies *A. guillouiae* durchgeführt wurden, es sich bei dieser aber offensichtlich um eine für die Milchindustrie hoch relevante Spezies handelt, wäre eine weitere Charakterisierung ausgewählter Gene mit bisher unbekannter Funktion mittels Mutations- und Komplementationsexperimenten sinnvoll.

4.7.2 Differentielle Genexpression von *Kocuria salsicia* M239

Wie bereits erwähnt, gibt es für die Gattung *Kocuria* keine Studien über biofilmassoziierte Gene, die zum Vergleich der Befunde aus der vorliegenden Arbeit herangezogen werden können. Dennoch erlaubten die in der vorliegenden Studie generierten Daten Aussagen zu Gengruppen oder Stoffwechselwegen, die generell

typisch für die Biofilmbildung sind. Zunächst wurde für die differentielle Genexpressionsanalyse des Isolats *K. salsicia* M239 ein eindeutigeres Expressionsprofil von biofilmassoziierten Genen in Lactose-TSB erwartet, als in *A. guillouiae* M9, da das *K. salsicia*-Isolat weder in Mikrotiterplatten noch auf Edeltstahlcoupons eine nennenswerte Biofilmbildung in Glucose-TSB aufwies.

Die in Lactose-TSB verstärkte Expression von stressassoziierten Genen wie *dnaK*, *upsA* und *groES*, diversen Oxidoreduktasen sowie die differentielle Expression von 93 für Transporter codierenden Genen im Vergleich zu nur 55 differentiell exprimierten Transportern in Glucose-TSB sprachen für eine vermehrte Biofilmbildung in Lactose-TSB. Generell wird die vermehrte Expression von ABC- und TRAP-Transportern, welche in Lactose-TSB stärker exprimiert wurden, mit der Biofilmbildung in Verbindung gebracht [312]. Bei den Transportern handelte es sich unter anderem um Oligopeptidtransporter der Opp-Familie, die in verschiedenen Organismen Adhäsine an die Zelloberfläche transportieren und damit für die Biofilmbildung von Bedeutung sind. Zusätzlich werden Eisen-Siderophor-Transporter ebenfalls oft mit der Biofilmbildung in Verbindung gebracht, die ebenfalls in Lactose-TSB stärker exprimiert wurden. Außerdem wurden bei Anzucht von *K. salsicia* M239 in Lactose-TSB insgesamt vier Kaliumionentransporter stärker exprimiert. Neuere Erkenntnisse weisen darauf hin, dass diese einen Signalweg zur lokalen Kommunikation der Biofilmzellen untereinander darstellen könnten [313], weshalb ihre vermehrte Expression in Lactose-TSB ebenfalls für die stärkere Biofilmbildung des Isolats in diesem Medium spricht.

Im Widerspruch zu der Beobachtung der deutlich verstärkten Biofilmbildung von *K. salsicia* M239 in Lactose-TSB steht die verstärkte Expression von einigen Effluxtransportern in Glucose-TSB. Effluxtransporter werden häufig in Zusammenhang mit verstärkter Antibiotikaresistenz und allgemein vermehrter Expression von Virulenzfaktoren in Biofilmen gebracht. Takarada *et al.* (2008) [283] fanden im Genom von *K. rhizophila* DC2201 eine große Anzahl von Wirkstoff-Effluxpumpen, sodass die Befunde in der vorliegenden Arbeit nicht verwunderlich sind. Die Autoren führten dies auf die Toleranz dieser aus der Rhizosphäre stammenden Spezies gegenüber von Pflanzen ausgeschütteten organischen Verbindungen zurück. Damit im Zusammenhang steht vermutlich auch die Vielzahl von Enzymen zur Verwertung aromatischer Verbindungen im Genom von *K. rhizophila* DC2201, z. B. Protocatechuat und Phenylacetat. Einige

Gene des entsprechenden *paa*-Genclusters wurden auch in *K. salsicia* M239 stärker in Lactose-TSB exprimiert. Ob diese Beobachtung mit der verstärkten Biofilmbildung in diesem Medium zusammenhängt, müsste durch weitere Untersuchungen geklärt werden.

Typisch für biofilmassoziierte Gene sind auch diejenigen zur EPS-Produktion und der Adhäsion durch Pili. Beide Genfamilien (*epsD*, *epsF* und *tatE*) waren in Lactose-TSB stärker exprimiert als in Glucose-TSB, auch wenn es sich um statistisch nicht signifikante Befunde handelte. Eine Induktion der PIA/PNAG-Synthesegene *icaABCD* durch Milch gleichermaßen wie durch Lactose alleine wurde für zwei mastitisassoziierte *S. aureus*-Isolate von Xue *et al.* (2014) [286] gezeigt. Für eine vermehrte EPS-Produktion spricht weiterhin die in Lactose stärker ausgeprägte Expression von Genen, die in Zusammenhang mit der Glykan-Biosynthese stehen. Die EPS-Synthesegene wiesen überwiegend keine hohen fold-changes auf, weshalb sie bei cut-off-Werten von ≥ 2 nicht als differentiell exprimiert angenommen worden wären.

Für die Synthese von Polysacchariden werden häufig UMP-Monosaccharide benötigt. Allerdings wurden an der UMP-Synthese beteiligte Gene in Glucose-TSB stärker exprimiert als in Lactose-TSB, was im Widerspruch zu den in Lactose-TSB stärker exprimierten Polysaccharid-Synthesegenen steht. Trotz der nicht nachweisbaren Biofilmbildung von *K. salsicia* M239 in Glucose-TSB wurden in diesem Medium Oligo- und Polysaccharid-Synthesegene stärker exprimiert als in Lactose-TSB, so zum Beispiel die Exopolyphosphatase, allerdings mit geringen fold-changes.

Ähnlich wie bei *A. guillouiae* M9 waren auch in *K. salsicia* M239 bei Inkubation in Lactose-TSB diverse Gene des Schwefelmetabolismus stärker exprimiert als in Glucose-TSB. Dabei handelte es sich zumeist um Gene der Schwefelwasserstoff-Biosynthese. Demnach ist die differentielle Expression dieser Gene im Gegensatz zu *A. guillouiae* M9 nicht auf die Verwertung von Taurin zurückzuführen. Gegen die Verwertung von Taurin als alternative C-Quelle sprechen außerdem die nicht nachweisbaren Gene des Taurin-metabolismus sowie die verstärkte Expression der β -Galactosidase bei Inkubation in Lactose-TSB. Der Nachweis weiterer Enzyme zur Verstoffwechslung von Galactose, wie der Galactokinase und der Galactose-1-phosphat-Uridyltransferase, sprechen daher für die Möglichkeit des Organismus, Lactose bzw. deren Monosaccharid Galactose zu verstoffwechseln

Die Bedeutung von Genen des Histidinmetabolismus für die Biofilmbildung wurde bisher für *A. baumannii* und *A. oleivorans* beschrieben [288, 292]. Cabral *et al.* (2011) [292] und Jang & Park (2016) [288] vermuteten, dass Histidin zur Produktion von Purinen und Pyrimidinen verwendet wird, welche wiederum für die eDNA-Produktion als wichtigen EPS-Bestandteil von Bedeutung sind. Im Gegensatz dazu vermuteten Liu *et al.* (2016b) [289] einen Zusammenhang zwischen dem in Biofilmen hochregulierten Histidinmetabolismus und der Säuretoleranz. Einige Gene des Histidin-Katabolismus waren bei der Inkubation von *K. salsicia* M239 in Lactose-TSB vermehrt exprimiert, unter anderem die Urucanat-Hydratase, welche von Cabral *et al.* (2011) [292] als Schlüsselenzym des Histidinmetabolismus beschrieben wurde. Diese Befunde sprechen für eine Rolle des Histidinmetabolismus bei der Biofilmbildung der Gram-positiven Spezies *K. salsicia*. Dagegen wurden keine entsprechenden Gene in *A. guillouiae* M9 differentiell exprimiert. Entweder spielen sie bei der Biofilmbildung dieser Spezies keine Rolle, oder die Biofilmbildung in beiden Medien war zu ähnlich, um eine differentielle Expression nachweisen zu können.

Uneindeutig war die differentielle Expression von HGT-assoziierten Genen von *K. salsicia* M239 in beiden Medien. Generell werden HGT-Mechanismen mit Biofilmen in Zusammenhang gebracht [75]. Dabei wird die Kompetenz zur Aufnahme freier DNA mit anschließender Transformation in diversen Bakterien durch das Vorhandensein von eDNA in der EPS-Schicht erst induziert [95], während der vermehrte Austausch von mobilen genetischen Elementen via Konjugation auf die erhöhte Zelldichte in Biofilmen zurückgeführt wird [73]. Bei Inkubation von *K. salsicia* M239 in Glucose-TSB waren Gene der Transformation stärker exprimiert (*comE*, *recO*), während in Lactose-TSB vor allem Gene verstärkt exprimiert wurden, die mit mobilen genetischen Elementen und Konjugationsvorgängen assoziiert sind (*traA*) (Tab. 29, 30). Dementsprechend könnte spekuliert werden, dass auch in Glucose-TSB Biofilme gebildet wurden, in denen jedoch andere Vorgänge eine Rolle spielten als in Lactose-TSB. Dafür spricht auch der Nachweis von EPS-Synthesegenen in Glucose-TSB. Jedoch hätten biofilmassoziierte Zellen sowie EPS-Bestandteile sich in den Vorversuchen durch Kristallviolett anfärben lassen müssen, was nicht geschehen ist. Da es sich bei Kristallviolett um einen basischen Farbstoff handelt, werden von ihm bevorzugt saure EPS-Bestandteile angefärbt. Neutrale oder ebenfalls basische Polymere würden durch Kristallviolett weniger effektiv angefärbt, sodass eine veränderte EPS-Zusammensetzung in den verschiedenen Medien eine

Änderung des Anfärbeverhaltens der Biofilme erklären würde. Neben ihrer Funktion beim Austausch von Resistenzgen-codierenden Plasmiden wird vermutet, dass die konjugativen Sex-Pili auch eine Rolle bei der Biofilmbildung durch Vermittlung von Zell-Zell-Kontakten spielen [73]. Dies würde den Zusammenhang zwischen der in Lactose-TSB stärkeren Expression von an der Konjugation beteiligten Genen und der verstärkten Biofilmbildung erklären.

In Lactose-TSB waren einige regulatorische Gene von *K. salsicia* M239 stärker exprimiert, die häufig mit der Biofilmbildung in Zusammenhang gebracht werden. Dabei handelte es sich zum Beispiel um Sensor-Kinasen von TCS oder um das RelE/StbE-Toxin-Antitoxin-System. Auch hier handelte es sich um nicht weiter spezifizierte Gene, sodass deren positiver oder negativer Einfluss auf die Biofilmbildung über Mutations- und Komplementationsexperimente erst charakterisiert werden müsste.

In Glucose-TSB waren diverse Gene des Cofaktor-Metabolismus stärker exprimiert. Dazu zählten Gene zur Synthese von Folsäure, Panthotenat, Coenzym A, Menachinon und Thiamin. Während Coenzym A Cofaktor für Enzyme des Energiestoffwechsels ist und Panthotenat zu dessen Biosynthese benötigt wird, ist Tetrahydrofolat an der Synthese von DNA-Nukleobasen und damit an der Replikation beteiligt. Thiamin ist ein wichtiger Cofaktor von Enzymen zur Synthese von Kohlenhydraten und verzweigt-kettigen Aminosäuren [314]. Diese Beobachtungen, zusammen mit der stärkeren Expression von Genen in Zusammenhang mit dem Nukleotid-, Aminosäure- und Kohlenhydrat-metabolismus, deuten auf eine erhöhte Stoffwechselrate von *K. salsicia* M239 in Glucose-TSB hin. Da in Biofilmen häufig eine deutlich langsamere Stoffwechselrate vorliegt als beim planktonischen Wachstum [312], weisen diese Befunde auf eine verstärkte Biofilmbildung in Lactose-TSB hin. Dagegen spricht die verstärkte Expression von einigen Genen des Kohlenhydratmetabolismus, insbesondere der Glykolyse und des Citratzyklus, in Lactose-TSB. Dies ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass durch die Spaltung von Lactose zwei Monosaccharide entstehen, von denen eines für den Energiestoffwechsel verwendet wird, während das andere in andere Stoffwechselwege und Syntheseprozesse einfließen kann. Allerdings wiesen Beloin *et al.* (2004) [75] ebenfalls eine verstärkte Expression von Genen des Kohlenhydrat-Metabolismus, insbesondere des Citratzyklus, in Biofilmen von *E. coli* nach. Darunter befanden sich unter anderem die Malat-Dehydrogenase und regulatorische Gene der Lactat-

Dehydrogenase, welche bei *A. guillouiae* M9 stärker bei Inkubation in Glucose-TSB exprimiert wurden, während sie bei *K. salsicia* M239 in Lactose-TSB verstärkt exprimiert waren. Diese Befunde stimmen jeweils mit dem stärkeren Biofilmbildungsvermögen der Isolate in den entsprechenden Medien überein. Zusätzlich führt Lazazzera (2005) [88] als einen Grund für eine erhöhte Expression von ribosomalen Proteinen in Biofilmen an, dass möglicherweise ein Teil der Population in Biofilmen erhöhte Stoffwechselraten aufweist, da sie sich von der EPS-Matrix und autolytierten Zellen ernähren kann. Auch Liu *et al.* (2016b) [290] vermuteten eine höhere Stoffwechselrate in Biofilmen als bisher angenommen. Clark *et al.* (2012) [306] geben an, dass die Stoffwechselrate in Biofilmen geringer ist als die von planktonischen Zellen der exponentiellen Phase, jedoch höher im Vergleich zu planktonischen Zellen der stationären Phase.

Wie auch in *A. guillouiae* M9 wurden auch für *K. salsicia* M239 einige in Lactose-TSB deutlich stärker exprimierte Gene mit bisher unbekannter Funktion detektiert, deren Bedeutung für die Biofilmbildung mit Hilfe von Mutations- und Komplementationsexperimenten weiter eruiert werden sollte.

4.7.3 Vergleich der differentiellen Expressionsdaten

Beim Vergleich der differentiellen Genexpressionsdaten bei der Biofilmbildung auf Edelstahlcoupons in Glucose- bzw. Lactose-haltiger TSB zeigten sich sowohl Gemeinsamkeiten als auch Unterschiede zwischen den Isolaten. Dabei wurde eine gesteigerte Expression von biofilmassoziierten Genen bei *K. salsicia* M239 eindeutig in Lactose-TSB erwartet, da hier in *in vitro* Experimenten eine deutliche Steigerung der Biofilmbildung beobachtet wurde und so gut wie keine Biofilmbildung des Isolats in Glucose-TSB stattfand. *A. guillouiae* M9 zeigte in beiden Medien eine etwa gleich starke Biofilmbildung anhand der Kristallviolettfärbung mit einer etwas stärkeren Anfärbung des in Glucose-TSB gebildeten Biofilms. Dementsprechend war es für dieses Isolat nicht verwunderlich, dass in beiden Medien verschiedene biofilmassoziierte Gene differentiell exprimiert wurden. Als Gemeinsamkeit wiesen beide Isolate eine verstärkte Expression von membranassoziierten Proteinen, insbesondere von Transportern, auf. Die Beobachtung, dass vor allem zellhüllenassoziierte Proteine in Biofilmen verstärkt exprimiert werden, wurde bereits in verschiedenen Studien gemacht [315]. Auch die vermehrte Expression von stressassoziierten Genen wie Sigmafaktoren, Oxidoreduktasen und Chaperonen in Biofilmen wird in der Literatur häufig beschrieben [75, 88] und traf

auch für beide Isolate zu. Zusätzlich wiesen beide Isolate eine verstärkte Expression von Genen der EPS-Polysaccharid-Synthese in Lactose-TSB auf. Die Induktion von EPS-Synthesegenen einhergehend mit verstärkter Biofilmbildung durch Lactose oder Milch wurde bereits für *Bacillus subtilis* und *S. aureus* in der Literatur beschrieben [102, 286]. Duanis-Assaf *et al.* (2016) [102] zeigten außerdem, dass dies auf das QS-Signalmolekül AI-2 zurückgeführt werden konnte.

Während für *K. salsicia* M239 nur ein Pili-assoziiertes Gen nachgewiesen wurde, zeigte sich eine verstärkte Expression von für Pili sowie für den konjugativen Transfer codierenden Genen bei Inkubation von *A. guillouiae* M9 in Glucose-haltiger TSB. Die Rolle von Pili für die initiale Adhäsion an abiotische Oberflächen wurde für *A. baumannii* bereits mehrfach beschrieben. Wie in vielen differentiellen Genexpressionsanalysen [75, 287, 311], konnte auch in der vorliegenden Arbeit einigen differentiell exprimierten Genen der Isolate keine Funktion zugewiesen werden. Dies unterstreicht den Forschungsbedarf, der hinsichtlich biofilmassoziierten Gene und Regulationsmechanismen weiterhin besteht.

In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass die Biofilmbildung von Bakterien strikten Regulationsmechanismen unterliegt. Diese beruhen auf der Wahrnehmung von veränderten Umweltbedingungen [302, 315]. Dazu zählen Temperatur, Nährstoff- und Sauerstoffverfügbarkeit, Osmolarität, pH-Wert, Strömungsgeschwindigkeit und Zelldichte [15]. Während erstere Umweltfaktoren zumeist durch Zwei-Komponenten-Systeme (TCS) über eine Sensor-Kinase wahrgenommen werden, die durch Phosphorylierung eines Response-Regulators zu einer veränderten Genexpression führt, wird die Zelldichte via QS-Moleküle erfasst. Entsprechende Gene wurden in beiden Isolaten ebenfalls jeweils im Medium mit der höheren Biofilmbildung stärker exprimiert.

Neben der Regulation der Transkription spielen häufig posttranskriptionale Regulationsmechanismen bei der Biofilmbildung eine Rolle [302]. Diese würden in Transkriptomanalysen jedoch nicht erfasst. Demnach müssten im Idealfall Transkriptionsanalysen gleichzeitig mit Proteomanalysen durchgeführt werden, um zu überprüfen, ob die differentiell exprimierte mRNA tatsächlich translatiert wird [306, 316]. Eine weitere Schwäche von Transkriptomanalysen liegt in der RNA-Extraktion aus dem gesamten Biofilm. Die Bildung spezifischer Nischen mit lokalen Genexpressionsmustern [280, 287] bleibt dabei ebenso unberücksichtigt wie die Transkripte von

Biofilmzellen in tieferen Schichten, die aufgrund von Sauerstoff- oder Nährstoff-limitierung einen deutlich verlangsamten Stoffwechsel aufweisen [316].

Wie bereits mehrfach beschrieben, können Bakterien ihre Umwelt exakt überwachen und biofilmassoziierte Gene streng regulieren, sodass die Zusammensetzung des Mediums und die Inkubationsbedingungen als Einflussfaktoren auf die Biofilmbildung nicht zu vernachlässigen sind. So konnte beispielsweise bereits mehrfach ein Einfluss der gewählten Kohlenstoffquelle auf die Stärke der Biofilmbildung beobachtet werden [102, 317]. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Inkubationstemperatur einen Einfluss auf die dreidimensionale Biofilmarchitektur hat, was höchstwahrscheinlich ebenfalls mit einem unterschiedlichen Genexpressionsmuster, insbesondere Synthesegenen von EPS-Bestandteilen, zusammenhängt [266, 318]. Diverse Studien konnten zudem Unterschiede in der Biofilmbildung einhergehend mit variablen Genexpressionsmustern zwischen der Anzucht desselben Stammes in Minimal- und Vollmedien nachweisen [15, 288]. Dies kann zum Beispiel mit einer Steigerung des oxidativen Stresses in nährstoffreichen Medien zusammenhängen, welcher zu einer gesteigerten EPS-Synthese führt [288]. Zudem werden Eisen-Akquirierungssysteme nur in Medien mit begrenzter Eisenverfügbarkeit exprimiert. Diese spielen jedoch eine Rolle bei der gesteigerten Biofilmbildung [93, 295, 300].

Insgesamt entsprechen die detektierten differentiell exprimierten Gene den Erwartungen und sind laut Literatur typisch für das Genexpressionsmuster in Biofilmen verschiedener Spezies. Dies spricht für einen sinnvollen Versuchsaufbau zur Erfassung der in Biofilmen in verschiedenen Medien differentiell exprimierten Gene.

5 Zusammenfassung

In der beprobten Melkanlage konnten über den gesamten Untersuchungszeitraum die Melkbecherablagen, das Kunststoffrohr am Ende der Druckleitung und der Auslassstutzen des Milchsammeltanks als Orte mit hoher Besiedlungsdichte identifiziert werden. Dort wurden ebenfalls hohe Keimzahlen antibiotikaresistenter Bakterien detektiert. Der Zusammenhang des präventiven Einsatzes von Cloxacillin als Wirkstoff des Trockenstellpräparates und dem Auftreten der höchsten Resistenzraten gegenüber diesem Antibiotikum konnte eindeutig gezeigt werden. Allerdings ließ sich keine Korrelation zwischen der Besiedlungsdichte der Biofilme und der Frequenz des horizontalen Gentransfers nachweisen. Demnach tragen vermutlich weitere Faktoren zum gesteigerten Austausch von Resistenzgenen via HGT in Biofilmen bei.

Alle Isolate und Klonsequenzen stammten aus den für die Milchindustrie typischen Phyla *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes* und *Proteobacteria*. Im molekularbiologischen Ansatz waren dabei Sequenzen von Gram-negativen Bakterien deutlich überrepräsentiert. Demnach ließ sich die größte bakterielle Vielfalt nur durch eine Kombination von kultivierungsgestützten und molekularbiologischen Verfahren darstellen. Mithilfe der in die Melkanlage eingebrachten Edelstahlcoupons konnte nachgewiesen werden, dass verschiedene Spezies des Phylums *Actinobacteria* eine wichtige Rolle als Primärbesiedler von Edelstahloberflächen zu spielen scheinen. Zudem wurde auf zu unterschiedlichen Zeitpunkten in die Melkanlage verbrachten Coupons *Listeria monocytogenes* molekularbiologisch, jedoch nicht kulturell nachgewiesen. Dies gibt einen Hinweis auf das persistente Vorkommen dieses Pathogens in der Melkanlage in geringen Anteilen. Milchsäurebakterien wurden vorwiegend in den Rohrleitungen der Melkanlage detektiert, während die häufig mit Produktverderb assoziierten Enterobakterien und Pseudomonaden bevorzugt in dicht besiedelten Biofilmen nachgewiesen wurden. Neben diesen Bakteriengruppen spielten weiterhin die Gattungen *Kocuria*, *Micrococcus*, *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Chryseobacterium* und *Acinetobacter* eine wichtige Rolle in den Melkanlagen-Biofilmen.

Mit Hilfe der FISH-Analyse der in die Melkanlage verbrachten Edelstahlcoupons konnte die Biofilmbildung auf diesen verfolgt werden. Die mikroskopischen Aufnahmen geben einen Hinweis auf das Vorliegen von Multispezies-Biofilmen bereits in den sehr jungen

Biofilmen. Eine gesteigerte Biofilmbildung von Multispezies-Biofilmen konnte auch *in vitro* mit Mischkulturen aus zwei Isolaten nachgewiesen werden.

Für viele Isolate wurde ein starkes Biofilmbildungsvermögen, die Fähigkeit zur Vermehrung bei Kühltemperaturen sowie die Produktion von Proteolyse- und Lipolyse-enzymen nachgewiesen. Dementsprechend besaßen einige Biofilmbewohner produktschädigendes Potential. Die durchgeführten *in vitro* Versuche stellten die Effizienz der zur Reinigung und Desinfektion der Melkanlage eingesetzten CIP-Verfahren in Frage. Sie zeigten, dass das saure und alkalische Mittel zwar zumeist zur Abtötung der Bakterienzellen, jedoch nicht zur vollständigen Ablösung des Biofilms fähig waren. Die mangelhafte Entfernung der EPS-Matrix könnte wiederum neuen Besiedlern sowie überlebenden Zellen eine Grundlage zur Vermehrung bieten. Diese Befunde werden anhand der persistenten Besiedelung einiger Stellen der Melkanlage unterstützt.

Weiterhin zeigte sich die Anpassung einiger Isolate an Milch als natürliches Habitat anhand einer gesteigerten Biofilmbildung in Lactose-TSB. Die Daten aus den differentiellen Genexpressionsanalysen der Isolate *Acinetobacter guillouiae* M9 und *Kocuria salsicia* M239 wiesen auf eine Induktion der EPS-Produktion durch Lactose hin.

6 Literatur

- [1] Cherif-Antar, A; Moussa–Boudjemâa, B; Didouh, N; Medjahdi, K; Mayo, B *et al.* 2016. Diversity and biofilm-forming capability of bacteria recovered from stainless steel pipes of a milk-processing dairy plant. *Dairy Sci Technol* 96 (1), 27–38.
- [2] Tremblay, YDN; Caron, V; Blondeau, A; Messier, S; Jacques, M. 2014. Biofilm formation by coagulase-negative staphylococci: impact on the efficacy of antimicrobials and disinfectants commonly used on dairy farms. *Vet Microbiol* 172 (3-4), 511–518.
- [3] Tenhagen, BA; Köster, G; Wallmann, J; Heuwieser, W. 2006. Prevalence of Mastitis Pathogens and Their Resistance Against Antimicrobial Agents in Dairy Cows in Brandenburg, Germany. *J Dairy Sci* 89 (7), 2542–2551.
- [4] Oliver, SP; Murinda, SE; Jayarao, BM. 2011. Impact of antibiotic use in adult dairy cows on antimicrobial resistance of veterinary and human pathogens: a comprehensive review. *Foodborne Pathog Dis* 8 (3), 337–355.
- [5] Sharma, M; Anand, SK. 2002b. Biofilms evaluation as an essential component of HACCP for food/dairy processing industry – a case. *Food Control* 13 (6-7), 469–477.
- [6] Kumari, S; Sarkar, PK. 2014. In vitro model study for biofilm formation by *Bacillus cereus* in dairy chilling tanks and optimization of clean-in-place (CIP) regimes using response surface methodology. *Food Control* 36 (1), 153–158.
- [7] Costerton, JW; Lewandowski, Z; Caldwell, DE; Korber, DR; Lappin-Scott, HM. 1995. Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol* 49, 711–745.
- [8] Olsen, I. 2015. Biofilm-specific antibiotic tolerance and resistance. *Eur J Clin Microbiol* 34 (5), 877–886.
- [9] Gilbert, P; Maira-Litran, T; McBain, AJ; Rickard, AH; Whyte, FW. 2002. The physiology and collective recalcitrance of microbial biofilm communities. In: Bd. 46: Elsevier (Advances in Microbial Physiology), 203–256.
- [10] Garrett, TR; Bhakoo, M; Zhang, Z. 2008. Bacterial adhesion and biofilms on surfaces. *Prog Nat Sci* 18 (9), 1049–1056.
- [11] Garnett, JA; Matthews, S. 2012. Interactions in Bacterial Biofilm Development: A Structural Perspective. *Curr Protein Pept Sc* 13 (8), 739-755.
- [12] Srey, S; Jahid, IK; Ha, SD. 2013. Biofilm formation in food industries: A food safety concern. *Food Control* 31 (2), 572–585.
- [13] Ksontini, H; Kachouri, F; El Abed, S; Ibensouda Koraichi, S; Meftah, H *et al.* 2013. Dairy biofilm: an investigation of the impact on the surface chemistry of two materials: silicone and stainless steel. *J Adhes Sci Technol* 27 (7), 783–793.
- [14] Phillips, CA. 2016. Bacterial biofilms in food processing environments: a review of recent developments in chemical and biological control. *Int J Food Sci Technol* 51 (8), 1731–1743.
- [15] Toyofuku, M; Inaba, T; Kiyokawa, T; Obana, N; Yawata, Y *et al.* 2016. Environmental factors that shape biofilm formation. *Biosci Biotech Bioch* 80 (1), 7–12.
- [16] Gomes, F; Saavedra, MJ; Henriques, M. 2016. Bovine mastitis disease/ pathogenicity: evidence of the potential role of microbial biofilms. *Pathog Dis* 74 (3).
- [17] Abdullahi, UF; Igwenagu, E; Mu'azu, A; Aliyu, S; Umar, MI. 2016. Intrigues of biofilm: A perspective in veterinary medicine. *Vet World* 9 (1), 12–18.
- [18] Mogha, KV; Shah, NP; Prajapati, JB; Chaudhari, AR. 2014. Biofilm - A threat to dairy industry. *Indian J Dairy Sci* 67 (6), 459–466.

- [19] Cappitelli, F; Polo, A; Villa, F. 2014. Biofilm Formation in Food Processing Environments is Still Poorly Understood and Controlled. *Food Eng Rev* 6 (1-2), 29–42.
- [20] Gutiérrez, D; Rodríguez-Rubio, L; Martínez, B; Rodríguez, A; García, P. 2016a. Bacteriophages as weapons against bacterial biofilms in the food industry. *Front Microbiol* 7, 825.
- [21] Marchand, S; Block, J de; Jonghe, V de; Coorevits, A; Heyndrickx, M *et al.* 2012. Biofilm Formation in Milk Production and Processing Environments; Influence on Milk Quality and Safety. *Comp Rev Food Sci F* 11 (2), 133–147.
- [22] Gutiérrez, S; Martínez-Blanco, H; Rodríguez-Aparicio, LB; Ferrero, MA. 2016b. Effect of fermented broth from lactic acid bacteria on pathogenic bacteria proliferation. *J Dairy Sci* 99 (4), 2654–2665.
- [23] Abdallah, M; Benoliel, C; Drider, D; Dhulster, P; Chihib, NE. 2014a. Biofilm formation and persistence on abiotic surfaces in the context of food and medical environments. *Arch Microbiol* 196 (7), 453–472.
- [24] Abdallah, M; Chataigne, G; Ferreira-Theret, P; Benoliel, C; Drider, D *et al.* 2014b. Effect of growth temperature, surface type and incubation time on the resistance of *Staphylococcus aureus* biofilms to disinfectants. *Appl Microbiol Biot* 98 (6), 2597–2607.
- [25] Teh, KH; Flint, S; Palmer, J; Andrewes, P; Bremer, P *et al.* 2014a. Biofilm – An unrecognised source of spoilage enzymes in dairy products? *Int Dairy J* 34 (1), 32–40.
- [26] Kim, D; Kim, JG; Chu, CN. 2016. Aging effect on the wettability of stainless steel. *Mater Lett* 170, 18–20.
- [27] Simões, M; Simões, LC; Vieira, MJ. 2010. A review of current and emergent biofilm control strategies. *LWT - Food Sci Technol* 43 (4), 573–583.
- [28] Sadiq, FA; Flint, S; Yuan, L; Li, Y; Liu, T *et al.* 2017b. Propensity for biofilm formation by aerobic mesophilic and thermophilic spore forming bacteria isolated from Chinese milk powders. *Int J Food Microbiol* 262, 89–98.
- [29] Gupta, S; Anand, S. 2018. Induction of pitting corrosion on stainless steel (grades 304 and 316) used in dairy industry by biofilms of common sporeformers. *Int J Dairy Technol* 71 (2), 519–531.
- [30] Corcoran, M; Morris, D; Lappe, N de; O'Connor, J; Lalor, P *et al.* 2014. Commonly used disinfectants fail to eradicate *Salmonella enterica* biofilms from food contact surface materials. *Appl Environ Microb* 80 (4), 1507–1514.
- [31] Arena, MP; Capozzi, V; Spano, G; Fiocco, D. 2017. The potential of lactic acid bacteria to colonize biotic and abiotic surfaces and the investigation of their interactions and mechanisms. *Appl Microbiol Biot* 101 (7), 2641–2657.
- [32] Liu, DZ; Jindal, S; Amamcharla, J; Anand, S; Metzger, L. 2017. Short communication: Evaluation of a sol-gel-based stainless steel surface modification to reduce fouling and biofilm formation during pasteurization of milk. *J Dairy Sci* 100 (4), 2577–2581.
- [33] Van Houdt, R; Michiels, CW. 2010. Biofilm formation and the food industry, a focus on the bacterial outer surface. *J Appl Microbiol* 109 (4), 1117–1131.
- [34] Giaouris, E; Heir, E; Desvaux, M; Hébraud, M; Møretrø, T *et al.* 2015. Intra- and inter-species interactions within biofilms of important foodborne bacterial pathogens. *Front Microbiol* 6, 841.
- [35] Hawver, LA; Jung, SA; Ng, WL. 2016. Specificity and complexity in bacterial quorum-sensing systems. *FEMS Microbiol Rev* 40 (5), 738–752.

- [36] Eberl, L; Riedel, K. 2011. Mining quorum sensing regulated proteins - Role of bacterial cell-to-cell communication in global gene regulation as assessed by proteomics. *Proteomics* 11 (15), 3070–3085.
- [37] Abisado, RG; Benomar, S; Klaus, JR; Dandekar, AA; Chandler, JR. 2018. Bacterial Quorum Sensing and Microbial Community Interactions. *mBio* 9 (3).
- [38] Xavier, KB; Bassler, BL. 2003. LuxS quorum sensing: more than just a numbers game. *Curr Opin Microbiol* 6 (2), 191–197.
- [39] Whiteley, M; Diggle, SP; Greenberg, EP. 2017. Progress in and promise of bacterial quorum sensing research. *Nature* 551 (7680), 313–320.
- [40] Jindal, S; Anand, S; Metzger, L; Amamcharla, J. 2018. Short communication: A comparison of biofilm development on stainless steel and modified-surface plate heat exchangers during a 17-h milk pasteurization run. *J Dairy Sci* 101 (4), 2921–2926.
- [41] Aswathanarayan, JB; Vittal, RR. 2014. Attachment and biofilm formation of *Pseudomonas fluorescens* PSD4 isolated from a dairy processing line. *Food Sci Biotechnol* 23 (6), 1903–1910.
- [42] Weiler, C; Ifland, A; Naumann, A; Kleta, S; Noll, M. 2013. Incorporation of *Listeria monocytogenes* strains in raw milk biofilms. *Int J Food Microbiol* 161 (2), 61–68.
- [43] Bénézech, T; Faille, C. 2018. Two-phase kinetics of biofilm removal during CIP. Respective roles of mechanical and chemical effects on the detachment of single cells vs cell clusters from a *Pseudomonas fluorescens* biofilm. *J Food Eng* 219, 121–128.
- [44] Teh, KH; Flint, S; Palmer, J; Lindsay, D; Andrewes, P *et al.* 2011. Thermo-resistant enzyme-producing bacteria isolated from the internal surfaces of raw milk tankers. *Int Dairy J* 21 (10), 742–747.
- [45] Teh, KH; Lindsay, D; Palmer, J; Andrewes, P; Bremer, P *et al.* 2014b. Proteolysis in ultra-heat-treated skim milk after exposure to multispecies biofilms under conditions modelling a milk tanker. *Int J Dairy Tech* 67 (2), 176–181.
- [46] Kumari, S; Sarkar, PK. 2016. *Bacillus cereus* hazard and control in industrial dairy processing environment. *Food Control* 69, 20–29.
- [47] Malek, F; Moussa-Boudjemâa, B; Khaouani-Yousfi, F; Kala, A; Kihel, M. 2012. Microflora of biofilm on Algerian dairy processing lines: An approach to improve microbial quality of pasteurized milk. *Afr J Microbiol Res* 6 (17), 3836–3844.
- [48] Gopal, N; Hill, C; Ross, PR; Beresford, TP; Fenelon, MA *et al.* 2015. The Prevalence and Control of *Bacillus* and Related Spore-Forming Bacteria in the Dairy Industry. *Front Microbiol* 6, 1418.
- [49] Zain, SNM; Flint, SH; Bennett, R; Tay, HS. 2016. Characterisation and biofilm screening of the predominant bacteria isolated from whey protein concentrate 80. *Dairy Sci Technol* 96 (3), 285–295.
- [50] Masiello, SN; Martin, NH; Trmčić, A; Wiedmann, M; Boor, KJ. 2016. Identification and characterization of psychrotolerant coliform bacteria isolated from pasteurized fluid milk. *J Dairy Sci* 99 (1), 130–140.
- [51] Sharma, M; Anand, SK. 2002a. Characterization of constitutive microflora of biofilms in dairy processing lines. *Food Microbiol* 19 (6), 627–636.
- [52] Bremer, PJ; Fillery, S; McQuillan, AJ. 2006. Laboratory scale Clean-In-Place (CIP) studies on the effectiveness of different caustic and acid wash steps on the removal of dairy biofilms. *Int J Food Microbiol* 106 (3), 254–262.

- [53] Arciola, CR; Campoccia, D; Ravaoli, S; Montanaro, L. 2015. Polysaccharide intercellular adhesin in biofilm: structural and regulatory aspects. *Front Cell Infect Mi* 5, 7.
- [54] Davies, J; Davies, D. 2010. Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiol Mol Biol Rev* 74 (3), 417–433.
- [55] Capita, R; Alonso-Calleja, C. 2013. Antibiotic-resistant bacteria: a challenge for the food industry. *Crit Rev Food Sci* 53 (1), 11–48.
- [56] Heuer, H; Schmitt, H; Smalla, K. 2011. Antibiotic resistance gene spread due to manure application on agricultural fields. *Curr Opin Microbiol* 14 (3), 236–243.
- [57] Stokes, HW; Gillings, MR. 2011. Gene flow, mobile genetic elements and the recruitment of antibiotic resistance genes into Gram-negative pathogens. *FEMS Microbiol Rev* 35, 790–819.
- [58] Blair, JMA.; Webber, MA; Baylay, AJ; Ogbolu, DO; Piddock, LJV. 2015. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nat Rev Microbiol* 13 (1), 42–51.
- [59] Wintersdorff, CJH von; Penders, J; van Niekerk, JM; Mills, ND; Majumder, S *et al.* 2016. Dissemination of Antimicrobial Resistance in Microbial Ecosystems through Horizontal Gene Transfer. *Front Microbiol* 7, 173.
- [60] White, DG; McDermott, PF. 2001. Emergence and Transfer of Antibacterial Resistance. *J Dairy Sci* 84, E151-E155.
- [61] Verraes, C; van Boxstael, S; van Meervenne, E; van Coillie, E; Butaye, P *et al.* 2013. Antimicrobial resistance in the food chain: a review. *Int J Env Res Pub He* 10 (7), 2643–2669.
- [62] Hall, CW; Mah, TF. 2017. Molecular mechanisms of biofilm-based antibiotic resistance and tolerance in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 41 (3), 276–301.
- [63] Toussaint, KA; Gallagher, JC. 2015. β -lactam/ β -lactamase inhibitor combinations: from then to now. *Ann Pharmacother* 49 (1), 86–98.
- [64] Poirel, L; Naas, T; Nordmann, P. 2010. Diversity, epidemiology, and genetics of class D beta-lactamases. *Antimicrob Agents Ch* 54 (1), 24–38.
- [65] Schwarz, S; Chaslus-Dancla, E. 2001. Use of antimicrobials in veterinary medicine and mechanisms of resistance. *Vet Res* 32 (3-4), 201–225.
- [66] Roberts, MC. 2005. Update on acquired tetracycline resistance genes. *FEMS Microbiol Lett* 245 (2), 195–203.
- [67] Nguyen, F; Starosta, AL; Arenz, S; Sohmen, D; Dönhöfer, A *et al.* 2014. Tetracycline antibiotics and resistance mechanisms. *Biol Chem* 395 (5), 559–575.
- [68] Sørensen, SJ; Bailey, M; Hansen, LH; Kroer, N; Wuertz, S. 2005. Studying plasmid horizontal transfer *in situ*: a critical review. *Nat Rev Microbiol* 3 (9), 700–710.
- [69] Madsen, JS; Burmølle, M; Hansen, LH; Sørensen, SJ. 2012. The interconnection between biofilm formation and horizontal gene transfer. *FEMS Immunol Med Mic* 65, 183–195.
- [70] Winkelströter, LK; Teixeira, FBdR; Silva, EP; Alves, VF; Martinis, ECP de 2014. Unraveling microbial biofilms of importance for food microbiology. *Microb Ecol* 68 (1), 35–46.
- [71] Balcázar, JL; Subirats, J; Borrego, CM. 2015. The role of biofilms as environmental reservoirs of antibiotic resistance. *Front Microbiol* 6, 1216.
- [72] Hathroubi, S; Mekni, MA; Domenico, P; Nguyen, D; Jacques, M. 2017. Biofilms: microbial shelters against antibiotics. *Microb Drug Resist* 23 (2), 147–156.
- [73] Lim, SY; Teh, CSJ; Thong, KL. 2017b. Biofilm-Related Diseases and Omics: Global Transcriptional Profiling of *Enterococcus faecium* Reveals Different Gene Expression Patterns in the Biofilm and Planktonic Cells. *Omics* 21 (10), 592–602.

- [74] **Flemming, HC; Wingender, J; Szewzyk, U; Steinberg, P; Rice, SA et al.** 2016. Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nat Rev Microbiol* 14 (9), 563–575.
- [75] **Beloin, C; Valle, J; Latour-Lambert, P; Faure, P; Kzreminski, M et al.** 2004. Global impact of mature biofilm lifestyle on *Escherichia coli* K-12 gene expression. *Mol Microbiol* 51 (3), 659–674.
- [76] **Domka, J; Lee, J; Bansal, T; Wood, TK.** 2007. Temporal gene-expression in *Escherichia coli* K-12 biofilms. *Environ Microbiol* 9 (2), 332–346.
- [77] **La Fuente-Núñez, C de; Refluveille, F; Fernández, L; Hancock, REW.** 2013. Bacterial biofilm development as a multicellular adaptation: antibiotic resistance and new therapeutic strategies. *Curr Opin Microbiol* 16 (5), 580–589.
- [78] **Tüffers, S.** 2017. Experimente zur Bewertung der Übertragbarkeit von Antibiotikaresistenzen via horizontalem Gentransfer in Biofilmen. Masterarbeit. Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn. Landwirtschaftliche Fakultät
- [79] **Weber, M; Geißert, J; Kruse, M; Lipski, A.** 2014. Comparative analysis of bacterial community composition in bulk tank raw milk by culture-dependent and culture-independent methods using the viability dye propidium monoazide. *J Dairy Sci* 97 (11), 6761–6776.
- [80] **Azeredo, J; Azevedo, NF; Briandet, R; Cerca, N; Coenye, T et al.** 2017. Critical review on biofilm methods. *Crit Rev Microbiol* 43 (3), 313–351.
- [81] **Kocot, AM; Olszewska, MA.** 2017. Biofilm formation and microscopic analysis of biofilms formed by *Listeria monocytogenes* in a food processing context. *LWT* 84, 47–57.
- [82] **Pinto, AC; Melo-Barbosa, HP; Miyoshi, A; Silva, A; Azevedo, V.** 2011. Application of RNA-seq to reveal the transcript profile in bacteria. *Genet Mol Res* 10 (3), 1707–1718.
- [83] **Westermann, AJ; Gorski, SA; Vogel, J.** 2012. Dual RNA-seq of pathogen and host. *Nat Rev Microbiol* 10 (9), 618–630.
- [84] **Sudhagar, A; Kumar, G; El-Matbouli, M.** 2018. Transcriptome Analysis Based on RNA-Seq in Understanding Pathogenic Mechanisms of Diseases and the Immune System of Fish: A Comprehensive Review. *Int J Mol Sci* 19 (1).
- [85] **Kimbrel, JA; Di, Y; Cumbie, JS; Chang, JH.** 2011. RNA-Seq for Plant Pathogenic Bacteria. *Genes* 2 (4), 689–705.
- [86] **McClure, R; Balasubramanian, D; Sun, Y; Bobrovskyy, M; Sumby, P et al.** 2013. Computational analysis of bacterial RNA-Seq data. *Nucleic Acids Res* 41 (14), e140.
- [87] **Beloin, C; Ghigo, JM.** 2005. Finding gene-expression patterns in bacterial biofilms. *Trends Microbiol* 13 (1), 16–19.
- [88] **Lazazzera, BA.** 2005. Lessons from DNA microarray analysis: the gene expression profile of biofilms. *Curr Opin Microbiol* 8 (2), 222–227.
- [89] **Prüß, BM.** 2017. Involvement of Two-Component Signaling on Bacterial Motility and Biofilm Development. *J Bacteriol* 199 (18).
- [90] **Abec, T; Kovács, AT; Kuipers, OP; van der Veen, S.** 2011. Biofilm formation and dispersal in Gram-positive bacteria. *Curr Opin Biotech* 22 (2), 172–179.
- [91] **Castiblanco, LF; Sundin, GW.** 2016. New insights on molecular regulation of biofilm formation in plant-associated bacteria. *J Integr Plant Biol* 58 (4), 362–372.
- [92] **Harding, CM; Hennon, SW; Feldman, MF.** 2018. Uncovering the mechanisms of *Acinetobacter baumannii* virulence. *Nat Rev Microbiol* 16 (2), 91–102.
- [93] **Longo, F; Vuotto, C; Donelli, G.** 2014. Biofilm formation in *Acinetobacter baumannii*. *New Microbiol* 37 (2), 119–127.

- [94] Subhadra, B; Hwan Oh, M; Hee Choi, C. 2016. Quorum sensing in *Acinetobacter*: with special emphasis on antibiotic resistance, biofilm formation and quorum quenching. *AIMS Microbiol* 2 (1), 27–41.
- [95] Moormeier, DE; Bayles, KW. 2017. *Staphylococcus aureus* biofilm: a complex developmental organism. *Mol Microbiol* 104 (3), 365–376.
- [96] Latasa, C; Solano, C; Penadés, JR; Lasa, I. 2006. Biofilm-associated proteins. *C R Biol* 329 (11), 849–857.
- [97] Gregorio, E de; Del Franco, M; Martinucci, M; Roscetto, E; Zarrilli, R *et al.* 2015. Biofilm-associated proteins: news from *Acinetobacter*. *BMC Genomics* 16, 933.
- [98] Prigent-Combaret, C; Vidal, O; Dorel, C; Lejeune, P. 1999. Abiotic surface sensing and biofilm-dependent regulation of gene expression in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 181, 5993–6002.
- [99] Chen, R; Lv, R; Xiao, L; Wang, M; Du, Z *et al.* 2017. A1S_2811, a CheA/Y-like hybrid two-component regulator from *Acinetobacter baumannii* ATCC17978, is involved in surface motility and biofilm formation in this bacterium. *MicrobiologyOpen* 6 (5).
- [100] Giles, SK; Stroehrer, UH; Eijkelkamp, BA; Brown, MH. 2015. Identification of genes essential for pellicle formation in *Acinetobacter baumannii*. *BMC Microbiol* 15, 116.
- [101] Lombardía, E; Rovetto, AJ; Arabolaza, AL; Grau, RR. 2006. A LuxS-dependent cell-to-cell language regulates social behavior and development in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 188 (12), 4442–4452.
- [102] Duanis-Assaf, D; Steinberg, D; Chai, Y; Shemesh, M. 2015. The LuxS Based Quorum Sensing Governs Lactose Induced Biofilm Formation by *Bacillus subtilis*. *Front Microbiol* 6, 1517.
- [103] Sela, S; Frank, S; Belausov, E; Pinto, R. 2006. A Mutation in the *luxS* gene influences *Listeria monocytogenes* biofilm formation. *Appl Environ Microb* 72 (8), 5653–5658.
- [104] Riedel, CU; Monk, IR; Casey, PG; Waidmann, MS; Gahan, CGM *et al.* 2009. AgrD-dependent quorum sensing affects biofilm formation, invasion, virulence and global gene expression profiles in *Listeria monocytogenes*. *Mol Microbiol* 71 (5), 1177–1189.
- [105] Boles, BR; Horswill, AR. 2008. Agr-mediated dispersal of *Staphylococcus aureus* biofilms. *PLoS Pathog* 4 (4), e1000052.
- [106] McCarthy, H; Rudkin, JK; Black, NS; Gallagher, L; O'Neill, E *et al.* 2015. Methicillin resistance and the biofilm phenotype in *Staphylococcus aureus*. *Front Cell Infect Mi* 5, 1.
- [107] Richmond, GE; Evans, LP; Anderson, MJ; Wand, ME; Bonney, LC *et al.* 2016. The *Acinetobacter baumannii* Two-Component System AdeRS Regulates Genes Required for Multidrug Efflux, Biofilm Formation, and Virulence in a Strain-Specific Manner. *mBio* 7 (2), e00430-16.
- [108] Göpfert, B. 2015. Korrelation der Bakteriendichte mit der Abundanz von Antibiotikaresistenzen in Biofilmen einer landwirtschaftlichen Produktionsanlage. Masterarbeit. Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn. Landwirtschaftliche Fakultät.
- [109] Savin, M. 2016. Analyse der Abundanz von Antibiotikaresistenzen in Biofilmen einer Melkanlage. Masterarbeit. Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn. Landwirtschaftliche Fakultät.
- [110] Gerhardt P, Murray RGE, Costilow RN, Nester EW, Briggs Phillips G *et al.* 1981. Manual of methods for general bacteriology. American Society for Microbiology, Washington, DC.

- [111] **Sasser, M.** 1990. Identification of bacteria through fatty acid analysis. Seiten 199-204 in *Methods in Phytobacteriology*. Z. Klement; K. Rudolph and D. C. Sands, ed. Akademiai Kiado, Budapest, HU.
- [112] **Nichols, PD; Guckert, JB; White, DC.** 1986. Determination of monosaturated fatty acid double-bond position and geometry for microbial monocultures and complex consortia by capillary GC-MS of their dimethyl disulphide adducts. *J Microbiol Meth* 5 (1), 49–55.
- [113] **Muyzer, G; Teske, A; Wirsén, CO; Jannasch, HW.** 1995. Phylogenetic relationships of *Thiomicrospira* species and their identification in deep-sea hydrothermal vent samples by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rDNA fragments. *Arch Microbiol* 164, 165–172.
- [114] **Muyzer, G; Dewaal EC; Uitterlinden, AG.** 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microb* 59 (3), 695–700.
- [115] **Hall, TA.** 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acid S* 41, 95–98.
- [116] **Yoon, SH; Ha, SM; Kwon, S; Lim, J; Kim, Y et al.** 2017. Introducing EzBioCloud: a taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies. *Int J Syst Evol Micr* 67 (5), 1613–1617.
- [117] **Altschul, S.** 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25 (17), 3389–3402.
- [118] **Weber, M.** 2013. Vergleichende Charakterisierung der bakteriellen Gemeinschaft in Rohmilch durch Gegenüberstellung kultivierungsgestützter und molekularbiologischer Methoden. Masterarbeit. Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn. Landwirtschaftliche Fakultät.
- [119] **Messing, J.** 1983. New M13 vectors for cloning. *Methods Enzymol* 101, 20–78.
- [120] **Ashelford, KE; Chuzhanova, NA; Fry, JC; Jones, AJ; Weightman, AJ.** 2005. At least 1 in 20 16S rRNA sequence records currently held in public repositories is estimated to contain substantial anomalies. *Appl Environ Microb* 71 (12), 7724–7736.
- [121] **Good, IJ.** 1953. The population frequencies of species and the estimation of population parameters. *Biometrika* 40, 237–264.
- [122] **Singleton, DR; Furlong, MA; Rathbun, SL; Whitman, WB.** 2001. Quantitative Comparisons of 16S rRNA Gene Sequence Libraries from Environmental Samples. *Appl Environ Microb* 67 (9), 4374–4376.
- [123] **Kumar, S; Stecher, G; Tamura, K.** 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol Biol Evol* 33 (7), 1870–1874.
- [124] **Thompson, JD; Higgins, DG; Gibson, TJ.** 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl Acids Res* 22 (22), 4673–4680.
- [125] **Felsenstein, J.** 1985. Confidence limits on phylogenetics: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39 (4), 783–791.
- [126] **Maeda H; Fujimoto C; Haruki Y; Maeda T; Takashiba S et al.** 2003. Quantitative real-time PCR using TaqMan and SYBR Green for *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *tetQ* gene and total bacteria. *FEMS Immunol Med Mic* 39, 81-86.
- [127] **Bert F; Branger C; Lambert-Zechovsky N.** 2002. Identification of PSE and OXA β -lactamase genes in *Pseudomonas aeruginosa* using PCR–restriction fragment length polymorphism. *J Antimicrob Chemother* 50(1), 11-18.

- [128] **Pereira L; Harnett G; Hodge M; Cattell J; Speers D.** 2014. Real-time PCR assay for detection of *blaZ* genes in *Staphylococcus aureus* clinical isolates. *J Clin Microbiol* 52 (4), 1259-1261.
- [129] **Aminov R; Garrigues-Jeanjean N; Mackie R.** 2003. Molecular ecology of tetracycline resistance: Development and validation of primers for detection of tetracycline resistance genes encoding ribosomal protection proteins. *Appl Environ Microb* 67(1), 22-32.
- [130] **Hein, I; Schneeweiss, W; Stanek, C; Wagner, M.** 2007. Ethidium monoazide and propidium monoazide for elimination of unspecific DNA background in quantitative universal real-time PCR. *J Microbiol Meth* 71 (3), 336–339.
- [131] **Whelan, JA; Russell, NB; Whelan, MA.** 2003. A method for the absolute quantification of cDNA using real-time PCR. *J Immunol Methods* 278 (1-2), 261–269.
- [132] **Větrovský, T; Baldrian, P.** 2013. The variability of the 16S rRNA gene in bacterial genomes and its consequences for bacterial community analyses. *PloS one* 8 (2), e57923.
- [133] **Kolari, M; Nuutinen, J; Salkinoja-Salonen, MS.** 2001. Mechanisms of biofilm formation in paper machine by *Bacillus* species: the role of *Deinococcus geothermalis*. *J Ind Microbiol Biot* 27 (6), 343–351.
- [134] **Amann, RI; Binder, BJ; Olson, RJ; Chisholm, SW; Devereux, R et al.** 1990. Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Appl Environ Microb* 56 (6), 1919-1925.
- [135] **Man, W.; Amann, R.; Ludwig, W.; Wagner, M.; Schleifer, K.-H.** 1992. Phylogenetic Oligodeoxynucleotide Probes for the Major Subclasses of *Proteobacteria*: Problems and Solutions. *Syst Appl Microbiol* 15 (4), 593-600.
- [136] **Meier, H; Amann, R; Ludwig, W; Schleifer, KH.** 1999. Specific Oligonucleotide Probes for in situ Detection of a Major Group of Gram-positive Bacteria with low DNA G+C Content. *Syst Appl Microbiol* 22 (2), 186-196.
- [137] **Roller, C; Wagner, M; Amann, R; Ludwig, W; Schleifer, KH.** *In situ* probing of Gram-positive bacteria with high DNA G + C content using 23S rRNA-targeted oligonucleotides. *Microbiology* 140, 2849-2858.
- [138] **Dodt, M; Roehr, JT; Ahmed, R; Dieterich, C.** 2012. FLEXBAR-Flexible Barcode and Adapter Processing for Next-Generation Sequencing Platforms. *Biology* 1 (3), 895–905.
- [139] **Bankevich, A; Nurk, S; Antipov, D; Gurevich, AA; Dvorkin, M et al.** 2012. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J Comput Biol* 19 (5), 455–477.
- [140] **Gurevich, A; Saveliev, V; Vyahhi, N; Tesler, G.** 2013. QUAST: quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics* 29 (8), 1072–1075.
- [141] **Krumsiek, J; Arnold, R; Rattei, T.** 2007. Gepard: a rapid and sensitive tool for creating dotplots on genome scale. *Bioinformatics* 23 (8), 1026–1028.
- [142] **Overbeek, R; Olson, R; Pusch, GD; Olsen, GJ; Davis, JJ et al.** 2014. The SEED and the Rapid Annotation of microbial genomes using Subsystems Technology (RAST). *Nucl Acids Res* 42, D206-14.
- [143] **Latorre, AA; van Kessel, JS; Karns, JS; Zurakowski, MJ; Pradhan, AK et al.** 2010. Biofilm in milking equipment on a dairy farm as a potential source of bulk tank milk contamination with *Listeria monocytogenes*. *J Dairy Sci* 93 (6), 2792–2802.
- [144] **Whitehead, KA; Verran, J.** 2015. Formation, architecture and functionality of microbial biofilms in the food industry. *Curr Opin Food Sci* 2, 84–91.

- [145] Kwok, WK; Piciooreanu, C; Ong, SL; van Loosdrecht, MCM; Ng, WJ *et al.* 1998. Influence of biomass production and detachment forces on biofilm structures in a biofilm airlift suspension reactor. *Biotechnol Bioeng* 58 (4), 400–407.
- [146] Flach, J; Grzybowski, V; Toniazzo, G; Corção, G. 2014. Adhesion and production of degrading enzymes by bacteria isolated from biofilms in raw milk cooling tanks. *Food Sci Technol* 34 (3), 571–576.
- [147] Song, B; Wang, YZ; Wang, GY; Liu, GL; Li, WZ *et al.* 2016. The lipopeptide 6-2 produced by *Bacillus amyloliquefaciens* anti-CA has potent activity against the biofilm-forming organisms. *Mar Pollut Bulletin* 108 (1-2), 62–69.
- [148] Olde Riekerink, RGM; Barkema, HW; Scholl, DT; Poole, DE; Kelton, DF. 2010. Management practices associated with the bulk-milk prevalence of *Staphylococcus aureus* in Canadian dairy farms. *Prev Vet Med* 97 (1), 20–28.
- [149] Bush, K. 2013. Proliferation and significance of clinically relevant β -lactamases. *Ann NY Acad Sci* 1277, 84–90.
- [150] Marti, R; Schmid, M; Kulli, S; Schneeberger, K; Naskova, J *et al.* 2017. Biofilm Formation Potential of Heat-Resistant *Escherichia coli* Dairy Isolates and the Complete Genome of Multidrug-Resistant, Heat-Resistant Strain FAM21845. *Appl Environ Microb* 83 (15).
- [151] Bush, K; Jacoby, GA. 2010. Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrob Agents Ch* 54 (3), 969–976.
- [152] Kouzel, N; Oldewurtel, ER; Maier, B. 2015. Gene Transfer Efficiency in Gonococcal Biofilms: Role of Biofilm Age, Architecture, and Pilin Antigenic Variation. *J Bacteriol* 197 (14), 2422–2431.
- [153] Stackebrandt, E; Koch, C; Gvozdiak, O; Schumann, P. 1995. Taxonomic dissection of the genus *Micrococcus*: *Kocuria gen. nov.*, *Nesterenkonia gen. nov.*, *Kytococcus gen. nov.*, *Dermacoccus gen. nov.*, and *Micrococcus* Cohn 1872 *gen. emend.* *Int J Syst Bacteriol* 45 (4), 682–692.
- [154] Schubert, K; Ludwig, W; Springer, N; Kroppenstedt, RM; Accolas, JP *et al.* 1996. Two coryneform bacteria isolated from the surface of French Gruyère and Beaufort cheeses are new species of the genus *Brachybacterium*: *Brachybacterium alimentarium sp. nov.* and *Brachybacterium tyrofermentans sp. nov.* *International journal of systematic bacteriology* 46 (1), 81–87.
- [155] Xiong, ZJ; Zhang, JL; Zhang, DF; Zhou, ZL; Liu, MJ *et al.* 2013. *Rothia endophytica sp. nov.*, an actinobacterium isolated from *Dysophylla stellata* (Lour.) Benth. *Int J Syst Evol Micr* 63 (11), 3964–3969.
- [156] Purty, S; Saranathan, R; Prashanth, K; Narayanan, K; Asir, J *et al.* 2013. The expanding spectrum of human infections caused by *Kocuria* species: a case report and literature review. *Emerg Microbes Infect* 2 (10), e71.
- [157] Aleksic, D; Miletic-Drakulic, S; Boskovic-Matic, T; Simovic, S; Toncev, G. 2016. Unusual case of stroke related to *Kocuria kristinae* endocarditis treated with surgical procedure. *Hippokratia* 20 (3), 231–234.
- [158] Kimura, M; Kawai, E; Yaoita, H; Ichinoi, N; Sakamoto, O *et al.* 2017. Central Venous Catheter-Related Bloodstream Infection with *Kocuria kristinae* in a Patient with Propionic Acidemia. *Case Rep Infect Dis* 2017, 1254175.
- [159] Manzoor, MAP; Shabeena, KS; Mujeeburahiman, M; Khan, A. 2018. Indwelling J Ureteral Stents Associated Asymptomatic Bacteraemia Caused by Multidrug Resistant Strain of *Kocuria kristinae*. *J Clin Diag Res* 12 (5), PD15-PD16

- [160] Carpentier, B; Chassaing, D. 2004. Interactions in biofilms between *Listeria monocytogenes* and resident microorganisms from food industry premises. *Int J Food Microbiol* 97 (2), 111–122.
- [161] El-Baradei, G; Delacroix-Buchet, A; Ogier, JC 2007. Biodiversity of bacterial ecosystems in traditional Egyptian Domiati cheese. *App Environ Microb* 73 (4), 1248–1255.
- [162] Didienne, R; Defargues, C; Callon, C; Meylheuc, T; Hulin, S *et al.* 2012. Characteristics of microbial biofilm on wooden vats ('gerles') in PDO Salers cheese. *Int J Food Microbiol* 156 (2), 91–101.
- [163] Yunita, D; Dodd, CER. 2018. Microbial community dynamics of a blue-veined raw milk cheese from the United Kingdom. *J Dairy Sci* 101 (6), 4923–4935.
- [164] Deetae, P; Bonnarme, P; Spinnler, HE; Helinck, S. 2007. Production of volatile aroma compounds by bacterial strains isolated from different surface-ripened French cheeses. *Appl Microbiol Biot* 76 (5), 1161–1171.
- [165] Behrendt, U; Ulrich, A; Schumann, P. 2001. Description of *Microbacterium foliorum* sp. nov. and *Microbacterium phyllosphaerae* sp. nov., isolated from the phyllosphere of grasses and the surface litter after mulching the sward, and reclassification of *Aureobacterium resistens* (Funke *et al.* 1998) as *Microbacterium resistens* comb. nov. *Int J Syst Evol Micr* 51, 1267–1276.
- [166] Manaia, CM; Nogales, B; Weiss, N; Nunes, OC. 2004. *Gulosibacter molinativorax* gen. nov., sp. nov., a molinate-degrading bacterium, and classification of '*Brevibacterium helvolum*' DSM 20419 as *Pseudoclavibacter helvolus* gen. nov., sp. nov. *Int J Syst Evol Micr* 54, 783–789.
- [167] Wang, WZ; Morohoshi, T; Ikenoya, M; Someya, N; Ikeda, T. 2010. AiiM, a novel class of N-acylhomoserine lactonase from the leaf-associated bacterium *Microbacterium testaceum*. *Appl Environ Microb* 76 (8), 2524–2530.
- [168] Wang, WZ; Morohoshi, T; Someya, N; Ikeda, T. 2012. Diversity and Distribution of N-Acylhomoserine Lactone (AHL)-Degrading Activity and AHL-Lactonase (AiiM) in Genus *Microbacterium*. *Microb Environ* 27 (3), 330–333.
- [169] Deetae, P; Spinnler, HE; Bonnarme, P; Helinck, S. 2009. Growth and aroma contribution of *Microbacterium foliorum*, *Proteus vulgaris* and *Psychrobacter* sp. during ripening in a cheese model medium. *Appl Microbiol Biot* 82 (1), 169–177.
- [170] Amato, L; Ritschard, JS; Kurtz, O; Arias-Roth, E; Lacroix, C *et al.* 2012. Microbial composition of defect smear – A problem evolving during foil-prepacked storage of red-smear cheeses. *Int Dairy J* 27 (1-2), 77–85.
- [171] Yoon, JH; Kim, IG; Kang, KH; Oh, TK; Park, YH. 2003. *Bacillus marisflavi* sp. nov. and *Bacillus aquimaris* sp. nov., isolated from sea water of a tidal flat of the Yellow Sea in Korea. *Int J Syst Evol Micr* 53 (5), 1297–1303.
- [172] Satomi, M; La Duc, MT; Venkateswaran, K. 2006. *Bacillus safensis* sp. nov., isolated from spacecraft and assembly-facility surfaces. *Int J Syst Evol Micr* 56 (8), 1735–1740.
- [173] Dunlap, CA; Kwon, SW; Rooney, AP; Kim, SJ. 2015. *Bacillus paralicheniformis* sp. nov., isolated from fermented soybean paste. *Int J Syst Evol Micr* 65 (10), 3487–3492.
- [174] Kwon, M; Hussain, MS; Oh, DH. 2017. Biofilm formation of *Bacillus cereus* under food-processing-related conditions. *Food Sci Biotechnol* 26 (4), 1103–1111.
- [175] Aleti, G; Lehner, S; Bacher, M; Compant, S; Nikolic, B *et al.* 2016. Surfactin variants mediate species-specific biofilm formation and root colonization in *Bacillus*. *Environ Microbiol* 18 (8), 2634–2645.

- [176] Ceresa, C; Rinaldi, M; Chiono, V; Carmagnola, I; Allegrone, G *et al.* 2016. Lipopeptides from *Bacillus subtilis* AC7 inhibit adhesion and biofilm formation of *Candida albicans* on silicone. *A van Leeuw J Microb* 109 (10), 1375–1388.
- [177] Fagerlund, A; Smith, V; Røhr, ÅK; Lindbäck, T; Parmer, MP *et al.* 2016. Cyclic diguanylate regulation of *Bacillus cereus* group biofilm formation. *Mol Microbiol* 101, 471–494.
- [178] Gundlach, J; Rath, H; Herzberg, C; Mäder, U; Stülke, J. 2016. Second Messenger Signaling in *Bacillus subtilis*: Accumulation of Cyclic di-AMP Inhibits Biofilm Formation. *Front Microbiol* 7, 804.
- [179] Townsley, L; Yannarell, SM; Huynh, TN; Woodward, JJ; Shank, EA. 2018. Cyclic di-AMP Acts as an Extracellular Signal That Impacts *Bacillus subtilis* Biofilm Formation and Plant Attachment. *mBio* 9 (2).
- [180] Braem, G; Vliegheer, S de; Verbist, B; Piessens, V; van Coillie, E *et al.* 2013. Unraveling the microbiota of teat apices of clinically healthy lactating dairy cows, with special emphasis on coagulase-negative staphylococci. *J Dairy Sci* 96 (3), 1499–1510.
- [181] Chaffer, M; Leitner, G; Winkler, M; Glickman, A; Krifucks, O *et al.* 1999. Coagulase-negative Staphylococci and Mammary Gland Infections in Cows. *J Vet Med B* 46 (10), 707–712.
- [182] Waller, KP; Aspán, A; Nyman, A; Persson, Y; Andersson, UG. 2011. CNS species and antimicrobial resistance in clinical and subclinical bovine mastitis. *Vet Microbiol* 152, 112–116.
- [183] Piessens, V; Vliegheer, S de; Verbist, B; Braem, G; van Nuffel, A *et al.* 2012. Intra-species diversity and epidemiology varies among coagulase-negative *Staphylococcus* species causing bovine intramammary infections. *Vet Microbiol* 155 (1), 62–71.
- [184] Srednik, ME; Tremblay, YDN; Labrie, J; Archambault, M; Jacques, M *et al.* 2017. Biofilm formation and antimicrobial resistance genes of coagulase-negative staphylococci isolated from cows with mastitis in Argentina. *FEMS Microbiol Lett* 364 (8).
- [185] Bal, EBB; Bayar, S; Bal, MA. 2010. Antimicrobial susceptibilities of coagulase-negative staphylococci (CNS) and streptococci from bovine subclinical mastitis cases. *J Microbiol* 48 (3), 267–274.
- [186] Taponen, S; Pyörälä, S. 2009. Coagulase-negative staphylococci as cause of bovine mastitis- not so different from *Staphylococcus aureus*? *Vet Microbiol* 134, 29–36.
- [187] Vanderhaeghen, W; Piepers, S; Leroy, F; van Coillie, E; Haesebrouck, F *et al.* 2014. Invited review: effect, persistence, and virulence of coagulase-negative *Staphylococcus* species associated with ruminant udder health. *J Dairy Sci* 97 (9), 5275–5293.
- [188] Visscher, A de; Piepers, S; Haesebrouck, F; Supré, K; Vliegheer, S de 2017. Coagulase-negative *Staphylococcus* species in bulk milk: Prevalence, distribution, and associated subgroup- and species-specific risk factors. *J Dairy Sci* 100 (1), 629–642.
- [189] Stevens, M; Piepers, S; Supré, K; Vliegheer, S de 2018. Antimicrobial consumption on dairy herds and its association with antimicrobial inhibition zone diameters of non-aureus staphylococci and *Staphylococcus aureus* isolated from subclinical mastitis. *J Dairy Sci* 101 (4), 3311–3322.
- [190] Otto, M. 2013. Coagulase-negative staphylococci as reservoirs of genes facilitating MRSA infection: Staphylococcal commensal species such as *Staphylococcus epidermidis* are being recognized as important sources of genes promoting MRSA colonization and virulence. *Bioessays* 35 (1), 4–11.
- [191] Busch, S. 2014. Phänotypische und genotypische Untersuchungen von Euterassoziierten Koagulase-negativen Staphylokokken auf Biofilmbildung und Antibiotikaresistenz. Masterarbeit. Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn. Landwirtschaftliche Fakultät.

- [192] **Yin, Z.** 2014. Verbreitung von Biofilmbildungsaktivität und Antibiotikaresistenz bei Kuheuter-assoziierten Isolaten der Gattung *Staphylococcus*. Masterarbeit. Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn. Landwirtschaftliche Fakultät.
- [193] **Ouattara, AS; Le Mer, J; Joseph, M; Macarie, H.** 2017. Transfer of *Pseudomonas pictorum* Gray and Thornton 1928 to genus *Stenotrophomonas* as *Stenotrophomonas pictorum comb. nov.*, and emended description of the genus *Stenotrophomonas*. *Int J Syst Evol Micr* 67 (6), 1894–1900.
- [194] **Sánchez-Castro, I; Ruiz-Fresneda, MA; Bakkali, M; Kämpfer, P; Glaeser, SP et al.** 2017. *Stenotrophomonas bentonitica* sp. nov., isolated from bentonite formations. *Int J Syst Evol Micr* 67 (8), 2779–2786.
- [195] **Weber, M; Schünemann, W; Fuß, J; Kämpfer, P; Lipski, A.** 2018. *Stenotrophomonas lactitubi* sp. nov. and *Stenotrophomonas indicatrix* sp. nov., isolated from surfaces with food contact. *Int J Syst Evol Micr* 68 (6), 1830–1838.
- [196] **Finkmann, W; Altendorf, K; Stackebrandt, E; Lipski, A.** 2000. Characterization of N₂O-producing *Xanthomonas*-like isolates from biofilters as *Stenotrophomonas nitritireducens* sp. nov., *Luteimonas mephitis* gen. nov., sp. nov. and *Pseudoxanthomonas broegbernensis* gen. nov., sp. nov. *Int J Syst Evol Micr* 50, 273–282.
- [197] **Berg, G; Roskot, N; Smalla, K.** 1999. Genotypic and Phenotypic Relationships between Clinical and Environmental Isolates of *Stenotrophomonas maltophilia*. *J Clin Microbiol* 37 (11), 3594–3600.
- [198] **Hauben, L; Vauterin, L; Moore, ER; Hoste, B; Swings, J.** 1999. Genomic diversity of the genus *Stenotrophomonas*. *Int J Syst Bacteriol* 49 (4), 1749–1760.
- [199] **Parte, AC.** 2018. LPSN – List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (bacterio.net), 20 years on. *Int J Syst Evol Micr* 68, 1825–1829.
- [200] **Sabri, A; Leroy, P; Haubruge, E; Hance, T; Frère, I et al.** 2011. Isolation, pure culture and characterization of *Serratia symbiotica* sp. nov., the R-type of secondary endosymbiont of the black bean aphid *Aphis fabae*. *Int J Syst Evol Micr* 61 (9), 2081–2088.
- [201] **Kämpfer, P; Glaeser, SP.** 2016. *Serratia aquatilis* sp. nov., isolated from drinking water systems. *Int J Syst Evol Micr* 66 (1), 407–413.
- [202] **Pagedar, A; Singh, J; Batish, VK.** 2012. Adaptation to benzalkonium chloride and ciprofloxacin affects biofilm formation potential, efflux pump and haemolysin activity of *Escherichia coli* of dairy origin. *J Dairy Res* 79 (4), 383–389.
- [203] **Rice, SA; Koh, KS; Queck, SY; Labbate, M; Lam, KW et al.** 2005. Biofilm formation and sloughing in *Serratia marcescens* are controlled by quorum sensing and nutrient cues. *J Bacteriol* 187 (10), 3477–3485.
- [204] **Labbate, M; Zhu, H; Thung, L; Bandara, R; Larsen, MR et al.** 2007. Quorum-sensing regulation of adhesion in *Serratia marcescens* MG1 is surface dependent. *J Bacteriol* 189 (7), 2702–2711.
- [205] **Shanks, RMQ; Stella, NA; Kalivoda, EJ; Doe, MR; O'Dee, DM et al.** 2007. A *Serratia marcescens* OxyR homolog mediates surface attachment and biofilm formation. *J Bacteriol* 189 (20), 7262–7272.
- [206] **Kalivoda, EJ; Stella, NA; O'Dee, DM; Nau, GJ; Shanks, RMQ.** 2008. The cyclic AMP-dependent catabolite repression system of *Serratia marcescens* mediates biofilm formation through regulation of type 1 fimbriae. *Appl Environ Micr* 74 (11), 3461–3470.

- [207] **Ranjbar, R; Safarpour Dehkordi, F; Sakhaei Shahreza, MH; Rahimi, E.** 2018. Prevalence, identification of virulence factors, O-serogroups and antibiotic resistance properties of Shiga-toxin producing *Escherichia coli* strains isolated from raw milk and traditional dairy products. *Antimicrob Resist In* 7, 53.
- [208] **Afema, JA; Ahmed, S; Besser, TE; Jones, LP; Sischo, WM et al.** 2018. Molecular Epidemiology of Dairy Cattle-Associated *Escherichia coli* Carrying blaCTX-M Genes in Washington State. *Appl Environ Micr* 84 (6).
- [209] **Lifshitz, Z; Sturlesi, N'a; Parizade, M; Blum, SE; Gordon, M et al.** 2018. Distinctiveness and Similarities Between Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing *Escherichia coli* Isolated from Cattle and the Community in Israel. *Microbial drug resistance* 24 (6), 868–875.
- [210] **Alves, TDS; Lara, GHB; Maluta, RP; Ribeiro, MG; Leite, DdS.** 2018. Carrier flies of multidrug-resistant *Escherichia coli* as potential dissemination agent in dairy farm environment. *Sci Total Environ* 633, 1345–1351.
- [211] **Olson, MA; Siebach, TW; Griffiths, JS; Wilson, E; Erickson, DL.** 2018. Genome-Wide Identification of Fitness Factors in Mastitis-Associated *Escherichia coli*. *Appl Environ Micr* 84 (2).
- [212] **Zhang, D; Zhang, Z; Huang, C; Gao, X; Wang, Z et al.** 2018. The phylogenetic group, antimicrobial susceptibility, and virulence genes of *Escherichia coli* from clinical bovine mastitis. *J Dairy Sci* 101 (1), 572–580.
- [213] **Antunes, NT; Lamoureaux, TL; Toth, M; Stewart, NK; Frase, H et al.** 2014. Class D β -lactamases: are they all carbapenemases? *Antimicrob Agents Ch* 58 (4), 2119–2125.
- [214] **Odenthal, S; Akineden, Ö; Usleber, E.** 2016. Extended-spectrum β -lactamase producing *Enterobacteriaceae* in bulk tank milk from German dairy farms. *Int J Food Microbiol* 238, 72–78.
- [215] **Geser, N; Stephan, R; Hächler, H.** 2012. Occurrence and characteristics of extended-spectrum β -lactamase (ESBL) producing *Enterobacteriaceae* in food producing animals, minced meat and raw milk. *BMC Vet Res* 8, 21.
- [216] **Dahmen, S; Métayer, V; Gay, E; Madec, JY; Haenni, M.** 2013. Characterization of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-carrying plasmids and clones of *Enterobacteriaceae* causing cattle mastitis in France. *Vet Microbiol* 162, 793–799.
- [217] **Kang, YS; Park, W.** 2010. Contribution of quorum-sensing system to hexadecane degradation and biofilm formation in *Acinetobacter sp.* strain DR1. *J Appl Microbiol* 109 (5), 1650–1659.
- [218] **Bardbari, AM; Arabestani, MR; Karami, M; Keramat, F; Alikhani, MY et al.** 2017. Correlation between ability of biofilm formation with their responsible genes and MDR patterns in clinical and environmental *Acinetobacter baumannii* isolates. *Microb Pathogenesis* 108, 122–128.
- [219] **Gori, K; Ryssel, M; Arneborg, N; Jespersen, L.** 2013. Isolation and identification of the microbiota of Danish farmhouse and industrially produced surface-ripened cheeses. *Microb Ecol* 65 (3), 602–615.
- [220] **Stellato, G; Filippis, F de; La Storia, A; Ercolini, D.** 2015. Coexistence of Lactic Acid Bacteria and Potential Spoilage Microbiota in a Dairy Processing Environment. *Appl Environ Micr* 81 (22), 7893–7904.
- [221] **Macaluso, G; Fiorenza, G; Gaglio, R; Mancuso, I; Scatassa, ML.** 2016. *In Vitro* Evaluation of Bacteriocin-Like Inhibitory Substances Produced by Lactic Acid Bacteria Isolated During Traditional Sicilian Cheese Making. *Italian J Food Safety* 5 (1), 5503.

- [222] Somers, EB; Johnson, ME; Wong, ACL. 2001. Biofilm Formation and Contamination of Cheese by Nonstarter Lactic Acid Bacteria in The Dairy Environment. *J Dairy Sci* 84 (9), 1926–1936.
- [223] Agarwal, S; Sharma, K; Swanson, BG; Yüksel, GÜ; Clark, S. 2006. Nonstarter Lactic Acid Bacteria Biofilms and Calcium Lactate Crystals in Cheddar Cheese. *J Dairy Sci* 89 (5), 1452–1466.
- [224] Blaya, J; Barzideh, Z; LaPointe, G. 2018. Symposium review: Interaction of starter cultures and nonstarter lactic acid bacteria in the cheese environment. *J Dairy Sci* 101 (4), 3611–3629.
- [225] Scatassa, ML.; Gaglio, R; Macaluso, G; Francesca, N; Randazzo, W *et al.* 2015. Transfer, composition and technological characterization of the lactic acid bacterial populations of the wooden vats used to produce traditional stretched cheeses. *Food Microbiol* 52, 31–41.
- [226] Marino, M; Innocente, N; Maifreni, M; Mounier, J; Cobo-Díaz, JF *et al.* 2017. Diversity within Italian Cheesemaking Brine-Associated Bacterial Communities Evidenced by Massive Parallel 16S rRNA Gene Tag Sequencing. *Front Microbiol* 8, 2119.
- [227] Santos Rosado Castro, M; da Silva Fernandes, M; Kabuki, DY; Kuaye, AY. 2018. Biofilm formation of *Enterococcus faecium* on stainless steel surfaces: Modeling and control by disinfection agents. *J Food Process Eng* 41 (3), e12663.
- [228] Giannino, ML; Marzotto, M; Dellaglio, F; Feligini, M. 2009. Study of microbial diversity in raw milk and fresh curd used for Fontina cheese production by culture-independent methods. *Int J Food Microbiol* 130 (3), 188–195.
- [229] Kasra-Kermanshahi, R; Mobarak-Qamsari, E. 2015. Inhibition Effect of Lactic Acid Bacteria against Food Born Pathogen, *Listeria monocytogenes*. *Appl Food Biotechnol* 2, 11–19.
- [230] Gómez, NC; Ramiro, JMP; Quecan, BXV; Melo Franco, BDG de 2016. Use of Potential Probiotic Lactic Acid Bacteria (LAB) Biofilms for the Control of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Typhimurium, and *Escherichia coli* O157:H7 Biofilms Formation. *Front Microbiol* 7, 863.
- [231] Zacharof, MP; Lovitt, RW. 2012. Bacteriocins Produced by Lactic Acid Bacteria a Review Article. *APCBEE Procedia* 2, 50–56.
- [232] Gray, JA; Chandry, PS; Kaur, M; Kocharunchitt, C; Bowman, JP *et al.* 2018. Novel Biocontrol Methods for *Listeria monocytogenes* Biofilms in Food Production Facilities. *Front Microbiol* 9, 605.
- [233] Garrido-Sanz, D; Meier-Kolthoff, JP; Göker, M; Martín, M; Rivilla, R *et al.* 2016. Genomic and Genetic Diversity within the *Pseudomonas fluorescens* Complex. *PloS one* 11 (2), e0150183.
- [234] Rossi, C; Chaves-López, C; Serio, A; Goffredo, E; Goga, BTC *et al.* 2016. Influence of Incubation Conditions on Biofilm Formation by *Pseudomonas fluorescens* Isolated from Dairy Products and Dairy Manufacturing Plants. *Italian J Food Safety* 5 (3), 5793.
- [235] Morimatsu, K; Eguchi, K; Hamanaka, D; Tanaka, F; Uchino, T. 2012. Effects of Temperature and Nutrient Conditions on Biofilm Formation of *Pseudomonas putida*. *Food Sci Technol Res* 18 (6), 879–883.
- [236] Liu, YJ; Xie, J; Zhao, LJ; Qian, YF; Zhao, Y *et al.* 2015b. Biofilm Formation Characteristics of *Pseudomonas lundensis* Isolated from Meat. *J Food Sci* 80 (12), M2904-10.
- [237] Bendinger, B; Rainey, FA; Kroppenstedt, RM; Moormann, M; Klatte, S. 1995. *Gordona hydrophobica* sp. nov., Isolated from Biofilters for Waste Gas Treatment. *Int J Syst Evol Micr* 45: 544-548.

- [238] **Carvalho, CCCR de; Wick, LY; Heipieper, HJ.** 2009. Cell wall adaptations of planktonic and biofilm *Rhodococcus erythropolis* cells to growth on C5 to C16 n-alkane hydrocarbons. *Appl Microbiol Biotechnol* 82 (2), 311–320.
- [239] **Rodrigues, CJC; Carvalho, CCCR de** 2015. *Rhodococcus erythropolis* cells adapt their fatty acid composition during biofilm formation on metallic and non-metallic surfaces. *FEMS Microbiol Ecol* 91 (12).
- [240] **Sowani, H; Kulkarni, M; Zinjarde, S.** 2018. An insight into the ecology, diversity and adaptations of *Gordonia* species. *CRC Cr Rev Microbiol* 44 (4), 393–413.
- [241] **Kuyukina, MS; Ivshina, IB; Korshunova, IO; Stukova, GI; Krivoruchko, AV.** 2016. Diverse effects of a biosurfactant from *Rhodococcus ruber* IEGM 231 on the adhesion of resting and growing bacteria to polystyrene. *AMB Express* 6 (1), 14.
- [242] **Funke, G; Osorio, CR; Frei, R; Riegel, P; Collins, MD.** 1998. *Corynebacterium confusum* sp. nov., isolated from human clinical specimens. *Int J Syst Bacteriol* 48, 1291–1296.
- [243] **Sjödén, B; Funke, G; Izquierdo, A; Akervall, E; Collins, MD.** 1998. Description of some coryneform bacteria isolated from human clinical specimens as *Corynebacterium falsenii* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* 48, 69–74.
- [244] **Hahne, J; Kloster, T; Rathmann, S; Weber, M; Lipski, A.** 2018. Isolation and characterization of *Corynebacterium* spp. from bulk tank raw cow's milk of different dairy farms in Germany. *PloS one* 13 (4), e0194365.
- [245] **Wiertz, R; Schulz, SC; Müller, U; Kämpfer, P; Lipski, A.** 2013. *Corynebacterium frankenforstense* sp. nov. and *Corynebacterium lactis* sp. nov., isolated from raw cow milk. *Int J Syst Evol Micr* 63 (12), 4495–4501.
- [246] **Shpigel, NY; Pasternak, Z; Factor, G; Gottlieb, Y.** 2015. Diversity of Bacterial Biofilm Communities on Sprinklers from Dairy Farm Cooling Systems in Israel. *PloS one* 10, e0139111.
- [247] **Dzieciol, M; Schornsteiner, E; Muhterem-Uyar, M; Stessl, B; Wagner, M et al.** 2016. Bacterial diversity of floor drain biofilms and drain waters in a *Listeria monocytogenes* contaminated food processing environment. *Int J Food Microbiol* 223, 33–40.
- [248] **Chamberland, J; Lessard, MH; Doyen, A; Labrie, S; Pouliot, Y.** 2017. A sequencing approach targeting the 16S rRNA gene unravels the biofilm composition of spiral-wound membranes used in the dairy industry. *Dairy Sci Technol* 96 (6), 827–843.
- [249] **Madhaiyan, M; Poonguzhali, S; Saravanan, VS; Kwon, SW.** 2014. *Rhodanobacter glycinis* sp. nov., a yellow-pigmented gammaproteobacterium isolated from the rhizoplane of field-grown soybean. *Int J Syst Evol Micr* 64 (6), 2023–2028.
- [250] **Ferreira, V; Wiedmann, M; Teixeira, P; Stasiewicz, MJ.** 2014. *Listeria monocytogenes* persistence in food-associated environments: epidemiology, strain characteristics, and implications for public health. *J Food Protect* 77 (1), 150–170.
- [251] **Latorre, AA; van Kessel, JAS; Karns, JS; Zurakowski, MJ; Pradhan, AK et al.** 2009. Molecular ecology of *Listeria monocytogenes*: evidence for a reservoir in milking equipment on a dairy farm. *Appl Environ Microb* 75 (5), 1315–1323.
- [252] **Heir, E; Møretrø, T; Simensen, A; Langsrud, S.** 2018. *Listeria monocytogenes* strains show large variations in competitive growth in mixed culture biofilms and suspensions with bacteria from food processing environments. *Int J Food Microbiol* 275, 46–55.
- [253] **Bayoumi, MA; Kamal, RM; Abd El Aal, SF; Awad, EI.** 2012. Assessment of a regulatory sanitization process in Egyptian dairy plants in regard to the adherence of some food-borne pathogens and their biofilms. *Int J Food Microbiol* 158 (3), 225–231.

- [254] **Amorim, AMB; Nascimento, JDS.** 2017. A Highlight for Non-*Escherichia coli* and Non-*Salmonella* sp. *Enterobacteriaceae* in Dairy Foods Contamination. *Front Microbiol* 8, 930.
- [255] **Monsallier, F; Verdier-Metz, I; Agabriel, C; Martin, B; Montel, MC.** 2012. Variability of microbial teat skin flora in relation to farming practices and individual dairy cow characteristics. *Dairy Sci Technol* 92 (3), 265–278.
- [256] **Kadam, SR; den Besten, HMW; van der Veen, S; Zwietering, MH; Moezelaar, R et al.** 2013. Diversity assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation: impact of growth condition, serotype and strain origin. *Int J Food Microbiol* 165 (3), 259–264.
- [257] **Nagar, V; Pansare Godambe, L; Bandekar, JR; Shashidhar, R.** 2017. Biofilm formation by *Aeromonas* strains under food-related environmental stress conditions. *J Food Process Pres* 41 (5), e13182.
- [258] **Norwood, DE; Gilmour, A.** 2000. The growth and resistance to sodium hypochlorite of *Listeria monocytogenes* in a steady-state multispecies biofilm. *J Appl Microbiol* 88 (3), 512–520.
- [259] **Lindsay, D; Brozel, VS; Mostert, JF; Holy, A von** 2002. Differential efficacy of a chlorine dioxide-containing sanitizer against single species and binary biofilms of a dairy-associated *Bacillus cereus* and a *Pseudomonas fluorescens* isolate. *J Appl Microbiol* 92, 352–361.
- [260] **Paz-Méndez, AM; Lamas, A; Vázquez, B; Miranda, JM; Cepeda, A et al.** 2017. Effect of Food Residues in Biofilm Formation on Stainless Steel and Polystyrene Surfaces by *Salmonella enterica* Strains Isolated from Poultry Houses. *Foods* 6 (12).
- [261] **Barnes, LM; Lo, MF; Adams, MR; Chamberlain, AHL.** 1999. Effect of milk proteins on adhesion of bacteria to stainless steel surfaces. *Appl Environ Microb* 65, 4543–4548.
- [262] **Moradi, M; Tajik, H.** 2017. Biofilm removal potential of neutral electrolysed water on pathogen and spoilage bacteria in dairy model systems. *J Appl Microbiol* 123 (6), 1429–1437.
- [263] **Nesse, LL; Sekse, C; Berg, K; Johannesen, KCS; Solheim, H et al.** 2014. Potentially pathogenic *Escherichia coli* can form a biofilm under conditions relevant to the food production chain. *Appl Environ Micr* 80 (7), 2042–2049.
- [264] **Di Ciccio, P; Vergara, A; Festino, AR; Paludi, D; Zanardi, E et al.** 2015. Biofilm formation by *Staphylococcus aureus* on food contact surfaces: Relationship with temperature and cell surface hydrophobicity. *Food Control* 50, 930–936.
- [265] **Colagiorgi, A; Bruini, I; Di Ciccio, PA; Zanardi, E; Ghidini, S et al.** 2017. *Listeria monocytogenes* Biofilms in the Wonderland of Food Industry. *Pathogens* 6 (3).
- [266] **Abdallah, M; Khelissa, O; Ibrahim, A; Benoliel, C; Heliot, L et al.** 2015. Impact of growth temperature and surface type on the resistance of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* biofilms to disinfectants. *Int J Food Microbiol* 214, 38–47.
- [267] **Zhao, X; Zhao, F; Wang, J; Zhong, N.** 2017. Biofilm formation and control strategies of foodborne pathogens: food safety perspectives. *RSC Adv* 7 (58), 36670–36683.
- [268] **Lee, SH in; Barancelli, GV; Corassin, CH; Rosim, RE; Coppa, CFSC et al.** 2017. Effect of peracetic acid on biofilms formed by *Listeria monocytogenes* strains isolated from a Brazilian cheese processing plant. *Braz J Pharm Sci* 53 (3), 816.
- [269] **Dufour, M; Simmonds, RS; Bremer, PJ.** 2004. Development of a Laboratory Scale Clean-In-Place System to Test the Effectiveness of “Natural” Antimicrobials against Dairy Biofilms. *J Food Protect* 67 (7), 1438–1443.
- [270] **Rushdy, AA; Othman, AS.** 2011. Bactericidal efficacy of some commercial disinfectants on biofilm on stainless steel surfaces of food equipment. *Ann Microbiol* 61 (3), 545–552.
- [271] **Speranza, B; Monacis, N; Sinigaglia, M; Corbo, MR.** 2017. Approaches to Removal and Killing of *Salmonella* spp. Biofilms. *J Food Process Pres* 41 (1), e12758.

- [272] Am Jang, J; Szabo, J; Hosni, AA; Coughlin, M; Bishop, PL. 2006. Measurement of chlorine dioxide penetration in dairy process pipe biofilms during disinfection. *Appl Microbiol Biot* 72 (2), 368–376.
- [273] Galié, S; García-Gutiérrez, C; Miguélez, EM; Villar, CJ; Lombó, F. 2018. Biofilms in the Food Industry: Health Aspects and Control Methods. *Front Microbiol* 9, 898.
- [274] Lee, SHI; Cappato, LP; Corassin, CH; Cruz, AG; Oliveira, CAF. 2016. Effect of peracetic acid on biofilms formed by *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* isolated from dairy plants. *J Dairy Sci* 99 (3), 2384–2390.
- [275] Cai, L; Wang, H; Liang, L; Wang, G; Xu, X *et al.* 2018. Response of Formed-Biofilm of *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella oxytoca*, and *Citrobacter freundii* to Chlorite-Based Disinfectants. *J Food Sci* 83 (5), 1326–1332.
- [276] Castro, DBA; Pereira, LB; Silva, MVME; Silva, BPd; Palermo, BRZ *et al.* 2015. High-quality draft genome sequence of *Kocuria marina* SO9-6, an actinobacterium isolated from a copper mine. *Genomics data* 5, 34–35.
- [277] Rosado de Castro, M; da Silva Fernandes, M; Kabuki, DY; Kuaye, AY 2017. Biofilm formation on stainless steel as a function of time and temperature and control through sanitizers. *Int Dairy J* 68, 9–16.
- [278] Olmedo, GM; Grillo-Puertas, M; Cerioni, L; Rapisarda, VA; Volentini, SI. 2015. Removal of pathogenic bacterial biofilms by combinations of oxidizing compounds. *Can J Microbiol* 61 (5), 351–356.
- [279] Elmoslemany, AM; Keefe, GP; Dohoo, IR; Jayarao, BM. 2009. Risk factors for bacteriological quality of bulk tank milk in Prince Edward Island dairy herds. Part 2: bacteria count-specific risk factors. *J Dairy Sci* 92 (6), 2644–2652.
- [280] Sadiq, FA; Flint, S; Li, Y; Ou, K; Yuan, L *et al.* 2017a. Phenotypic and genetic heterogeneity within biofilms with particular emphasis on persistence and antimicrobial tolerance. *Future Microbiol* 12, 1087–1107.
- [281] Moen, B; Røssvoll, E; Måge, I; Møretrø, T; Langsrud, S. 2016. Microbiota formed on attached stainless steel coupons correlates with the natural biofilm of the sink surface in domestic kitchens. *Can J Microbiol* 62 (2), 148–160.
- [282] Lim, ES; Lee, JE; Kim, JS; Koo, OK. 2017a. Isolation of indigenous bacteria from a cafeteria kitchen and their biofilm formation and disinfectant susceptibility. *LWT* 77, 376–382.
- [283] Takarada, H; Sekine, M; Kosugi, H; Matsuo, Y; Fujisawa, T *et al.* 2008. Complete genome sequence of the soil actinomycete *Kocuria rhizophila*. *J Bacteriol* 190 (12), 4139–4146.
- [284] Gundlapally, SR; Ara, S; Sisinthy, S. 2015. Draft genome of *Kocuria polaris* CMS 76or(T) isolated from cyanobacterial mats, McMurdo Dry Valley, Antarctica: an insight into CspA family of proteins from *Kocuria polaris* CMS 76or(T). *Arch Microbiol* 197 (8), 1019–1026.
- [285] Nam, YD; Seo, MJ; Lim, SI; Park, SL. 2012. Genome sequence of *Kocuria atrinae* C3-8, isolated from Jeotgal, a traditional Korean fermented seafood. *J Bacteriol* 194 (21), 5996.
- [286] Xue, T; Chen, X; Shang, F. 2014. Short communication: Effects of lactose and milk on the expression of biofilm-associated genes in *Staphylococcus aureus* strains isolated from a dairy cow with mastitis. *J Dairy Sci* 97 (10), 6129–6134.
- [287] Ojha, A; Hatfull, GF. 2007. The role of iron in *Mycobacterium smegmatis* biofilm formation: the exochelin siderophore is essential in limiting iron conditions for biofilm formation but not for planktonic growth. *Mol Microbiol* 66 (2), 468–483.

- [288] Jang, IA; Kim, J; Park, W. 2016. Endogenous hydrogen peroxide increases biofilm formation by inducing exopolysaccharide production in *Acinetobacter oleivorans* DR1. *Sci Rep-UK* 6, 21121.
- [289] Liu, D; Xu, J; Wang, Y; Chen, Y; Shen, X *et al.* 2016a. Comparative transcriptomic analysis of *Clostridium acetobutylicum* biofilm and planktonic cells. *J Biotechnol* 218, 1–12.
- [290] Liu, H; Wu, YQ; Chen, LP; Gao, X; Huang, HN *et al.* 2016b. Biofilm-Related Genes: Analyses in Multi-Antibiotic Resistant *Acinetobacter baumannii* Isolates From Mainland China. *Med Sci Monit* 22, 1801–1807.
- [291] Kenyon, JJ; Hall, RM. 2013. Variation in the complex carbohydrate biosynthesis loci of *Acinetobacter baumannii* genomes. *PloS one* 8 (4), e62160.
- [292] Chai, Y; Beauregard, PB; Vlamakis, H; Losick, R; Kolter, R. 2012. Galactose metabolism plays a crucial role in biofilm formation by *Bacillus subtilis*. *mBio* 3 (4), e00184-12.
- [293] Cabral, MP; Soares, NC; Aranda, J; Parreira, JR; Rumbo, C *et al.* 2011. Proteomic and functional analyses reveal a unique lifestyle for *Acinetobacter baumannii* biofilms and a key role for histidine metabolism. *J Proteome Res* 10 (8), 3399–3417.
- [294] Repizo, GD; Viale, AM; Borges, V; Cameranesi, MM; Taib, N *et al.* 2017. The Environmental *Acinetobacter baumannii* Isolate DSM30011 Reveals Clues into the Preantibiotic Era Genome Diversity, Virulence Potential, and Niche Range of a Predominant Nosocomial Pathogen. *Genome Biol Evol* 9 (9), 2292–2307.
- [295] Shin, JH; Lee, HW; Kim, SM; Kim, J. 2009. Proteomic analysis of *Acinetobacter baumannii* in biofilm and planktonic growth mode. *J Microbiol* 47 (6), 728–735.
- [296] Sharma, G; Sharma, S; Sharma, P; Chandola, D; Dang, S *et al.* 2016. *Escherichia coli* biofilm: development and therapeutic strategies. *J Appl Microbiol* 121 (2), 309–319.
- [297] Fernández-García, L; Fernandez-Cuenca, F; Blasco, L; López-Rojas, R; Ambroa, A *et al.* 2018. Relationship between Tolerance and Persistence Mechanisms in *Acinetobacter baumannii* Strains with AbkAB Toxin-Antitoxin System. *Antimicrob Agents Ch* 62 (5).
- [298] Jurenaite, M; Markuckas, A; Suziedeliene, E. 2013. Identification and characterization of type II toxin-antitoxin systems in the opportunistic pathogen *Acinetobacter baumannii*. *J Bacteriol* 195 (14), 3165–3172.
- [299] Kinsella, RL; Lopez, J; Palmer, LD; Salinas, ND; Skaar, EP *et al.* 2017. Defining the interaction of the protease CpaA with its type II secretion chaperone CpaB and its contribution to virulence in *Acinetobacter* species. *J Biol Chem* 292 (48), 19628–19638.
- [300] Saha, R; Saha, N; Donofrio, RS; Bestervelt, LL. 2013. Microbial siderophores: a mini review. *J Basic Microb* 53 (4), 303–317.
- [301] Upritchard, HG; Yang, J; Bremer, PJ; Lamont, IL; McQuillan, AJ. 2011. Adsorption of enterobactin to metal oxides and the role of siderophores in bacterial adhesion to metals. *ACS journal of surfaces and colloids* 27 (17), 10587–10596.
- [302] Martínez, LC; Vadyvaloo, V. 2014. Mechanisms of post-transcriptional gene regulation in bacterial biofilms. *Front Cell Infect Mi* 4, 38.
- [303] Christensen, SK; Mikkelsen, M; Pedersen, K; Gerdes, K. 2001. RelE, a global inhibitor of translation, is activated during nutritional stress. *P Natl Acad Sci USA* 98 (25), 14328–14333.
- [304] Jahreis, K; Morrison, TB; Garzón, A; Parkinson, JS. 2004. Chemotactic Signaling by an *Escherichia coli* CheA Mutant That Lacks the Binding Domain for Phosphoacceptor Partners. *J Bacteriol* 186 (9), 2664–2672.

- [305] **Choi, AHK; Slamti, L; Avci, FY; Pier, GB; Maira-Litrán, T.** 2009. The *pgaABCD* locus of *Acinetobacter baumannii* encodes the production of poly-beta-1-6-N-acetylglucosamine, which is critical for biofilm formation. *J Bacteriol* 191 (19), 5953–5963.
- [306] **Clark, ME; He, Z; Redding, AM; Joachimiak, MP; Keasling, JD et al.** 2012. Transcriptomic and proteomic analyses of *Desulfovibrio vulgaris* biofilms: carbon and energy flow contribute to the distinct biofilm growth state. *BMC Genomics* 13, 138.
- [307] **Sturgill, G; Toutain, CM; Komperda, J; O'Toole, GA; Rather, PN.** 2004. Role of CysE in production of an extracellular signaling molecule in *Providencia stuartii* and *Escherichia coli*: loss of CysE enhances biofilm formation in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 186 (22), 7610–7617.
- [308] **Wang, H; Zhang, X; Dong, Y; Xu, X; Zhou, G.** 2015. Insights into the transcriptome profile of mature biofilm of *Salmonella* Typhimurium on stainless steels surface. *Food Res Int* 77, 378–384.
- [309] **Cook, AM; Denger, K.** 2006. Metabolism of taurine in microorganisms - A primer in molecular biodiversity? *Adv Exp Med Biol* 583, 3–13.
- [310] **Dou, Y; Song, F; Guo, F; Zhou, Z; Zhu, C et al.** 2017. *Acinetobacter baumannii* quorum-sensing signalling molecule induces the expression of drug-resistance genes. *Mol Med Rep* 15 (6), 4061–4068.
- [311] **Chin, CY; Hara, Y; Ghazali, AK; Yap, SJ; Kong, C et al.** 2015. Global transcriptional analysis of *Burkholderia pseudomallei* high and low biofilm producers reveals insights into biofilm production and virulence. *BMC Genomics* 16, 471.
- [312] **Rani, A; Babu, S.** 2018. Environmental proteomic studies: closer step to understand bacterial biofilms. *World J Microb Biot* 34 (8), 120.
- [313] **Prindle, A; Liu, J; Asally, M; Ly, S; Garcia-Ojalvo, J et al.** 2015. Ion channels enable electrical communication in bacterial communities. *Nature* 527 (7576), 59–63.
- [314] **Du, Q; Wang, H; Xie, J.** 2011. Thiamin (Vitamin B₁) Biosynthesis and Regulation: A Rich Source of Antimicrobial Drug Targets? *Int J Biol Sci* 7 (1), 41–52.
- [315] **Khemiri, A; Jouenne, T; Cosette, P.** 2016. Proteomics dedicated to biofilmology: What have we learned from a decade of research? *Med Microbiol Immun* 205 (1), 1–19.
- [316] **An, D; Parsek, MR.** 2007. The promise and peril of transcriptional profiling in biofilm communities. *Curr Opin Microbiol* 10 (3), 292–296.
- [317] **Dieser, SA; Fessia, AS; Ferrari, MP; Raspanti, CG; Odierno, LM.** 2017. *Streptococcus uberis*: In vitro biofilm production in response to carbohydrates and skim milk. *Rev Argent Microbiol* 49 (4), 305–310.
- [318] **Abu Khweek, A; Amer, AO.** 2018. Factors Mediating Environmental Biofilm Formation by *Legionella pneumophila*. *Front Cellular Infect Mi* 8, 38.

7 Anhang

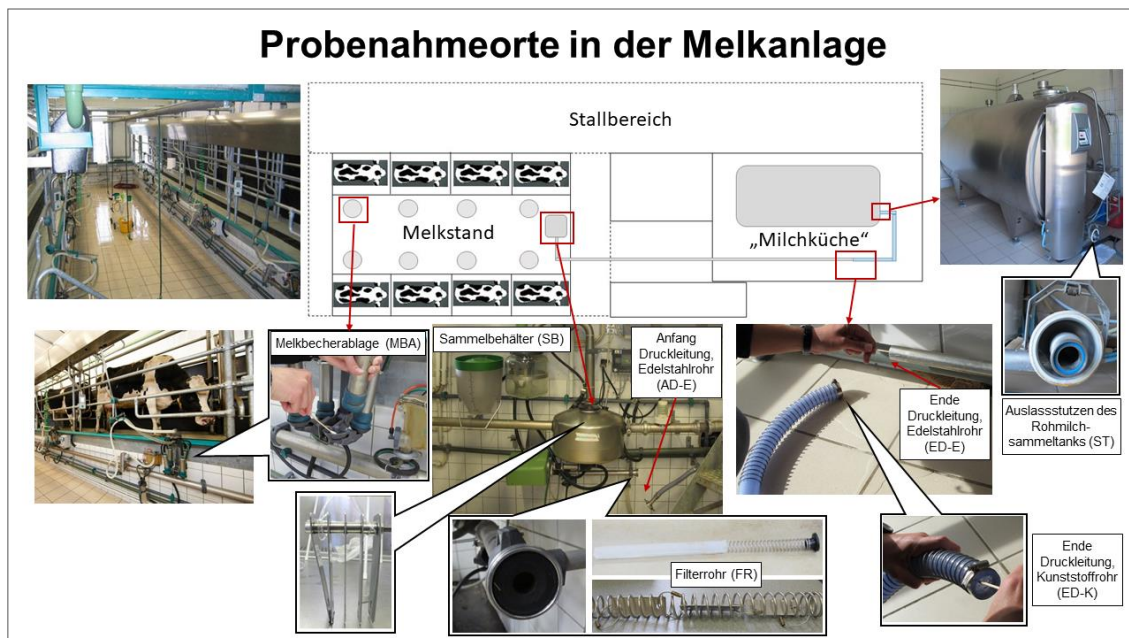


Abbildung 27: Übersicht über die Probenahmeorte in der Melkanlage mit im Weiteren verwendeten Abkürzungen.

Tabelle 31: Identifizierungsergebnisse der Isolate und Klonsequenzen, sortiert nach Phylum. Angegeben ist der nächstähnliche Typstamm mit Accession-Number seines 16S rRNA-Gens, die prozentuale Übereinstimmung der Gensequenzen sowie in Klammern die abweichenden von den insgesamt verglichenen Basenpaaren (bp). Die Bezeichnungen der im phylogenetischen Stammbaum dargestellten repräsentativen Isolate bzw. Klonsequenzen sowie die Anzahl der insgesamt den entsprechenden Spezies mit $\geq 99\%$ Sequenzübereinstimmung zugeordneten Isolat- (I) bzw. Klonsequenzen (K) sind angegeben. Außerdem sind die Fettsäuregruppen der Isolate aufgeführt.

Nächstähnlicher Typstamm	Acc.-No.	Übereinstimmung	Repräs. Vertreter	Isolate/Klone gesamt	FS-Gr.
Phylum Actinobacteria					
<i>Arthrobacter russicus</i> GTC 863 ^T	AB071950	100 % (0/708 bp)	M292	4 (I)	28A
<i>Brachybacterium nesterenkovii</i> CIP104813 ^T	FWFG01000034	100 % (0/694 bp)	M255	1 (I)	28B
<i>Brachybacterium rhamnosum</i> LMG 19848 ^T	AJ415376	98,1 % (27/1441 bp)	M261	1 (I)	1D
<i>Brevibacterium ammoniilyticum</i> A1 ^T	JF937067	99,1 % (12/1399 bp)	M192	1 (I)	28C
<i>Brevibacterium casei</i> NCDO 2048 ^T	X76564	98,8 % (8/682 bp)	M129	1 (I)	28B
<i>Brevibacterium celere</i> KMM 3637 ^T	AY228463	98,7 % (9/689 bp)			
<i>Corynebacterium confusum</i> DMMZ 2439 ^T	Y15886	100 % (0/701 bp)	M104	1 (I)	12B

Tabelle 31 Fortsetzung...

Nächstähnlicher Typstamm	Acc.-No.	Übereinstimmung	Repräs. Vertreter	Isolate/Klone gesamt	FS-Gr.
Phylum Actinobacteria Fortsetzung...					
<i>Corynebacterium faecale</i> YIM 101505 ^T	KT216265	99,7 % (5/1445 bp)	M299a	1 (I)	16
<i>Corynebacterium falsenii</i> DSM 44353 ^T	CP007156	99,9 % (1/702 bp)	M134	3 (I)	12A
<i>Corynebacterium glutamicum</i> ATCC 13032 ^T	BA000036	99,7 % (2/645 bp)	M180a	1 (I)	12C
<i>Curtobacterium oceanosedimentum</i> ATCC 31317 ^T	EF592577	99,6 % (4/1009 bp)	M17	2 (I)	28B
<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> LMG 3645 ^T	AJ312209	99,5 % (5/1011 bp)			
<i>Dermacoccus nishinomiyaensis</i> DSM 20448 ^T	X87757	99,6 % (3/699 bp)	M334	5 (I)	15
<i>Dietzia maris</i> DSM 43672 ^T	X79290	99,9 % (2/1434 bp)	M233	1 (I)	11D
<i>Dietzia schimae</i> YIM 65001 ^T	EU375845	99,8 % (3/1434 bp)			
<i>Gordonia bronchialis</i> DSM 43247 ^T	CP001802	100 % (0/699 bp)	M232	1 (I)	11A
<i>Gordonia jacobaea</i> mv1 ^T	LDTZ01000042	99,9 % (1/1444 bp)	M252	2 (I)	11C
<i>Gordonia sputi</i> NBRC 100414 ^T	BAFC01000092	99,8 % (3/1444 bp)			
<i>Gordonia paraffinivorans</i> NBRC 108238 ^T	BAOQ01000072	99,9 % (1/700 bp)	M69	1 (I)	11A
<i>Gordonia polyisoprenivorans</i> NBRC 16320 ^T	BAEI01000017	100 % (0/699 bp)	M328	3 (I)	11B
<i>Kocuria kristinae</i> NBRC 15354 ^T	BCSM01000028	100 % (0/708 bp)	M245	5 (I)	1B
<i>Kocuria salsicia</i> 104 ^T	GQ352404	99,8 % (3/1426 bp)	M239	8 (I)	1A, 2B
<i>Leifsonia soli</i> TG-S248 ^T	EU912483	99,3 % (1/1342 bp)	M246	3 (I)	29
<i>Microbacterium flavum</i> YM18-098 ^T	AB286029	99,3 % (10/1431 bp)	M301	7 (I)	2B, 2C
<i>Microbacterium lacticum</i> DSM 20427 ^T	X77441	99,2 % (12/1444 bp)			
<i>Microbacterium foliorum</i> DSM 12966 ^T	JYIU01000006	99,5 % (7/1447 bp)	O5, M110b	1 (I), 8 (K)	2A
<i>Microbacterium phyllosphaerae</i> DSM 13468 ^T	AJ277840	99,5 % (7/1445 bp)			
<i>Microbacterium maritopicum</i> DSM 12512 ^T	AJ853910	99,3 % (8/1198 bp)	M29	8 (I)	2A, 2B, 2C
<i>Microbacterium oxydans</i> DSM 20578 ^T	Y17227	99,3 % (8/1190 bp)			
<i>Microbacterium testaceum</i> DSM 20166 ^T	X77445	99,9 % (1/699 bp)	M327	2 (I)	2B
<i>Pseudoclavibacter chungangensis</i> CAU59 ^T	FJ514934	99,9 % (1/675 bp)	M291	2 (I)	2C
<i>Pseudoclavibacter helvolus</i> DSM 20419 ^T	X77440	99,9 % (2/1431 bp)	M230b	1 (I)	2D

Tabelle 31 Fortsetzung...

Nächstähnlicher Typstamm	Acc.-No.	Übereinstimmung	Repräs. Vertreter	Isolate/ Klone gesamt	FS- Gr.
Phylum Actinobacteria Fortsetzung...					
<i>Rhodococcus fascians</i> LMG 3623 ^T	JMEN01000010	100 % (0/695 bp)	M307	2 (I)	11B
<i>Rhodococcus qingshengii</i> JCM 15477 ^T	LRRJ01000016	99,9 % (1/1440 bp)	M294	3 (I)	11B, 11C
<i>Rhodococcus degradans</i> CCM 4446 ^T	JQ776649	99,9 % (1/1440 bp)			
<i>Rothia endophytica</i> YIM 67072 ^T	KC806052	99,9 % (1/710 bp)	M35a	3 (I)	1B
Phylum Bacteroidetes					
<i>Chryseobacterium bovis</i> H9 ^T	EF204446	100 % (0/706 bp)	M326	1 (I)	30C
<i>Chryseobacterium carnipullorum</i> DSM 25581 ^T	jgi.1107737	99,9 % (1/1436 bp)	M242, A3	4 (I), 18 (K)	30A
<i>Chryseobacterium shigense</i> DSM 17126 ^T	jgi.1096617	99,8 % (3/1436 bp)			
<i>Chryseobacterium haifense</i> H38 ^T	EF204450	98,8 % (17/1432 bp)	M100	1 (I)	30B
		99,7 % (2/704 bp)	A99	1 (K)	
<i>Chryseobacterium lactis</i> NCTC 11390 ^T	JX100821	97,2 % (20/712 bp)	A137	1 (K)	/
<i>Chryseobacterium soli</i> DSM 19298 ^T	JPRH01000001	99,0 % (14/1405 bp)	M2	1 (I)	30A
<i>Elizabethkingia miricola</i> DSM 14571 ^T	jgi.1048980	99,9 % (1/716 bp)	M194	1 (I)	14
<i>Empedobacter falsenii</i> NF 993 ^T	AM084341	99,9 % (1/1431 bp)	M93b	1 (I)	20
		99,0 % (14/1429 bp)	M95	1 (I)	20
<i>Sphingobacterium multivorum</i> IAM14316 ^T	AB100738	99,9 % (1/712 bp)	M244	1 (I)	19
<i>Sphingobacterium spiritivorum</i> ATCC 33861 ^T	ACHA01000008	99,4 % (4/713 bp)	M113	1 (I)	19
Phylum Firmicutes					
<i>Bacillus clausii</i> DSM 8716 ^T	X76440	99,7 % (2/651 bp)	M75	1 (I)	3C
<i>Bacillus rhizosphaerae</i> SC-N012 ^T	FJ233848	99,4 % (4/651 bp)			
<i>Bacillus marisflavi</i> JCM 11544 ^T	LGUE01000011	100 % (0/719 bp)	M25	1 (I)	3B
<i>Bacillus idriensis</i> SMC 4352-2 ^T	AY904033	99,4 % (4/687 bp)	M47	1 (I)	17B
<i>Bacillus paralicheniformis</i> KJ-16 ^T	LBMN01000156	100 % (0/1223 bp)	M33	2 (I)	3B
<i>Bacillus glycinifermentans</i> GO-13 ^T	LECW01000063	99,8 % (3/1422 bp)			
<i>Bacillus safensis</i> FO-36b ^T	ASJD01000027	100 % (0/1471 bp)	M241	4 (I)	3A
<i>Bacillus pumilus</i> ATCC 7061 ^T	ABRX01000007	99,8 % (3/1471 bp)			

Tabelle 31 Fortsetzung...

Nächstähnlicher Typstamm	Acc.-No.	Übereinstimmung	Repräs. Vertreter	Isolate/Klone gesamt	FS-Gr.
Phylum Firmicutes Fortsetzung...					
<i>Bacillus thuringiensis</i> ATCC 10792 ^T	ACNF01000156	100 %	M146	2 (I)	4
<i>Bacillus paranthracis</i> Mn5 ^T	KJ812420	(0/1470 bp)			
<i>Brevibacterium frigiditolerans</i> DSM 8801 ^T	AM747813	99,9 %	M45	1 (I)	1C
<i>Bacillus simplex</i> NBRC 15720 ^T	BCVO01000086	(2/1417 bp)			
<i>Bacillus simplex</i> NBRC 15720 ^T	BCVO01000086	99,8 %			
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 19433 ^T	ASDA01000001	(3/1417 bp)	M256, ED-Kc60	7 (I), 2 (K)	9A
<i>Kurthia gibsonii</i> NCIMB 9758 ^T	X70320	100 %	M150	1 (I)	3A
<i>Lactobacillus fermentum</i> CECT 562 ^T	AJ575812	(0/727 bp)	M68a	1 (I)	9A
<i>Lactobacillus fermentum</i> CECT 562 ^T	AJ575812	99,7 %			
<i>Lactobacillus parabuchneri</i> NBRC 107865 ^T	BCVT01000078	(2/745 bp)	M164	1 (I)	9A
<i>Lactobacillus parabuchneri</i> NBRC 107865 ^T	BCVT01000078	100 %			
<i>Lactobacillus paracasei subsp. tolerans</i> JCM 1171 ^T	D16550	(0/749 bp)	M57, ED-Kc_80	5 (I), 2 (K)	9B, 9C, 9D, 9E
<i>Lactobacillus paracasei subsp. tolerans</i> JCM 1171 ^T	D16550	99,9 %			
<i>Lactobacillus casei</i> BL23 ^T	FM177140	(2/1408 bp)			
<i>Lactobacillus casei</i> BL23 ^T	FM177140	99,8 %			
<i>Listeria monocytogenes</i> FSL F6-684 ^T	JOOX01000001	(3/1413 bp)	O12	3 (K)	/
<i>Listeria monocytogenes</i> FSL F6-684 ^T	JOOX01000001	99,7 %			
<i>Macrococcus caseolyticus</i> ATCC 13548 ^T	Y15711	(2/735 bp)	M208	1 (I)	13
<i>Macrococcus caseolyticus</i> ATCC 13548 ^T	Y15711	100 %			
<i>Paenibacillus amylolyticus</i> NRRL NRS-290 ^T	D85396	(0/1468 bp)	M247	1 (I)	17D
<i>Paenibacillus amylolyticus</i> NRRL NRS-290 ^T	D85396	100 %			
<i>Paenibacillus cineris</i> LMG 18439 ^T	AJ575658	(0/721 bp)	M137	1 (I)	17C
<i>Paenibacillus cineris</i> LMG 18439 ^T	AJ575658	100 %			
<i>Paenibacillus provencensis</i> 4401170 ^T	EF212893	(0/1467 bp)	M46	1 (I)	17A
<i>Paenibacillus provencensis</i> 4401170 ^T	EF212893	99,7 %			
<i>Pediococcus pentosaceus</i> DSM 20336 ^T	JQBF01000022	(2/647 bp)	M162	4 (I)	9A, 9F
<i>Pediococcus pentosaceus</i> DSM 20336 ^T	JQBF01000022	100 %			
<i>Staphylococcus arlettae</i> ATCC 43957 ^T	AB009933	(0/763 bp)	M243	1 (I)	5B
<i>Staphylococcus arlettae</i> ATCC 43957 ^T	AB009933	100 %			
<i>Staphylococcus chromogenes</i> ATCC 43764 ^T	D83360	(0/723 bp)	M251	2 (I)	5C
<i>Staphylococcus chromogenes</i> ATCC 43764 ^T	D83360	100 %			
<i>Staphylococcus cohnii subsp. cohnii</i> ATCC 29974 ^T	D83361	(0/724 bp)	M105	3 (I)	5A
<i>Staphylococcus cohnii subsp. cohnii</i> ATCC 29974 ^T	D83361	100 %			
<i>Staphylococcus equorum subsp. equorum</i> ATCC 43958 ^T	AB009939	(4/715 bp)	FR95	1 (K)	/
<i>Staphylococcus equorum subsp. equorum</i> ATCC 43958 ^T	AB009939	99,4 %			
<i>Staphylococcus haemolyticus</i> MTCC 3383 ^T	LILF01000056	(1/724 bp)	M89	1 (I)	5B
<i>Staphylococcus haemolyticus</i> MTCC 3383 ^T	LILF01000056	99,9 %			
<i>Staphylococcus warneri</i> ATCC 27836 ^T	L37603	(0/706 bp)	M258	1 (I)	5D
<i>Staphylococcus warneri</i> ATCC 27836 ^T	L37603	100 %			
<i>Staphylococcus xylosus</i> ATCC 29971 ^T	D83374	(1/735 bp)	O26	2 (K)	/
<i>Staphylococcus xylosus</i> ATCC 29971 ^T	D83374	99,9 %			
Phylum Proteobacteria					
<i>Acinetobacter albensis</i> ANC 4874 ^T	jgi.1102388	99,7 %	D7	8 (K)	/
<i>Acinetobacter albensis</i> ANC 4874 ^T	jgi.1102388	(2/726 bp)			
<i>Acinetobacter guillouiae</i> CIP 63.46 ^T	APOS01000028	99,5 %	M264, S8	7 (I), 5 (K)	8
<i>Acinetobacter guillouiae</i> CIP 63.46 ^T	APOS01000028	(7/1458 bp)			

Tabelle 31 Fortsetzung...

Nächstähnlicher Typstamm	Acc.-No.	Übereinstimmung	Repräs. Vertreter	Isolate/ Klone gesamt	FS- Gr.
Phylum Proteobacteria Fortsetzung...					
<i>Acinetobacter johnsonii</i> CIP 64.6 ^T	APON01000005	99,5 % (8/1453 bp)	M110a	2 (I)	8
<i>Acinetobacter modestus</i> NIPH 236 ^T	KT997474	97,2 % (20/717 bp)	A109	1 (K)	/
<i>Acinetobacter parvus</i> DSM 16617 ^T	AIEB01000124	99,4 % (4/704 bp)	A52	1 (K)	/
		99,0 % (7/713 bp)	A90	2 (K)	
<i>Agrobacterium pusense</i> NRCPB10 ^T	FJ969841	99,1 % (13/1407 bp)	M117	2 (I)	23
<i>Rhizobium radiobacter</i> SM30147 ^T	AB247615	98,8 % (17/1401 bp)			
		100 % (0/660 bp)	M186	1 (I)	23
<i>Brevundimonas vesicularis</i> NBRC 12165 ^T	BCWM01000033	100 % (0/1383 bp)	M40, A120	4 (I), 1 (K)	22A
<i>Brevundimonas nasdae</i> GTC 1043 ^T	AB071954				
<i>Diaphorobacter aerolatus</i> 8604S-37 ^T	KC352658	98,0 % (14/698 bp)	A139	1 (K)	/
<i>Enhydrobacter aerosaccus</i> LMG 21877 ^T	AJ550856	99,9 % (1/1438 bp)	M209	1 (I)	18
<i>Enterobacter hormaechei</i> subsp. <i>steigerwaltii</i> DSM 16691 ^T	CP017179	98,6 % (20/1457 bp)	M155	1 (I)	27D
<i>Escherichia hermannii</i> GTC 347 ^T	AB273738				
<i>Enterobacter xiangfangensis</i> LMG 27195 ^T	FYBF01000083	98,6 % (21/1457 bp)			
<i>Escherichia marmotae</i> HT073016 ^T	JNBP01000188	99,2 % (12/1457 bp)	M131	3 (I)	7B
<i>Escherichia coli</i> NCTC9001 ^T	LN831047	99,0 % (14/1457 bp)			
<i>Luteibacter jiangsuensis</i> JW-64-1 ^T	FJ848571	99,7 % (2/723 bp)	M325	1 (I)	/
<i>Luteimonas aestuarii</i> B9 ^T	EF660758	98,7 % (19/1409 bp)	O17	1 (K)	/
<i>Luteimonas terrae</i> THG-MD21 ^T	KJ769177	98,6 % (21/1461 bp)			
<i>Microvirgula aerodenitrificans</i> DSM 15089 ^T	JHVK01000054	100 % (0/719 bp)	M136	1 (I)	10B
<i>Microvirgula curvata</i> L6 ^T	LT545978	99,9 % (1/718 bp)			
<i>Ochrobactrum anthropi</i> ATCC 49188 ^T	CP000758	100 % (0/1404 bp)	M72	1 (I)	26A
<i>Ochrobactrum cytisi</i> ESC1 ^T	AY776289				
<i>Ochrobactrum lupini</i> LUP21 ^T	AY457038				
<i>Ochrobactrum rhizosphaerae</i> PR17 ^T	AM490632	100 % (0/649 bp)	M331	1 (I)	26B
<i>Ochrobactrum thiopenivorans</i> DSM 7216 ^T	AM490617	99,4 % (9/1383 bp)	M107	1 (I)	26A
<i>Pandoraea pnomenusa</i> DSM 16536 ^T	CP009553	99,8 % (3/1392 bp)	M55	2 (I)	27B
<i>Pantoea agglomerans</i> DSM 3493 ^T	AJ233423	99,7 % (2/704 bp)	M31	1 (I)	27A

Tabelle 31 Fortsetzung...

Nächstähnlicher Typstamm	Acc.-No.	Übereinstimmung	Repräs. Vertreter	Isolate/Klone gesamt	FS-Gr.
Phylum Proteobacteria Fortsetzung...					
<i>Paraburkholderia caledonica</i> NBRC 102488 ^T	BAYE01000050	98,9 % (8/705 bp)	D3	1 (K)	/
<i>Paracoccus yeei</i> ATCC BAA-599 ^T	JHWH01000002	98,6 % (20/1384 bp)	M177	1 (I)	16
<i>Pseudomonas congelans</i> DSM 14939 ^T	FNJH01000022	100 % (0/1399 bp)	M79	1 (I)	10A
<i>Pseudomonas gessardii</i> DSM 17152 ^T	MNPU01000117	100 % (0/1452 bp)	M152	1 (I)	10A
<i>Pseudomonas koreensis</i> Ps 9-14 ^T	AF468452	100 % (0/702 bp)	M92	1 (I)	10B
<i>Pseudomonas paralactis</i> WS4992 ^T	KP756923	100 % (0/717 bp)	O10	1 (K)	/
<i>Pseudomonas poae</i> DSM 14936 ^T	JYLI01000039	99,9 % (1/1459 bp)	M43	1 (I)	10A
<i>Pseudomonas trivialis</i> DSM 14937 ^T	JYLK01000002	99,9 % (2/1459 bp)			
<i>Raoultella terrigena</i> ATCC 33257 ^T	Y17658	99,6 % (3/722 bp)	M93a	1 (I)	27C
<i>Klebsiella aerogenes</i> KCTC 2190 ^T	CP002824	99,5 % (4/722 bp)			
<i>Rheinheimera chironomi</i> K19414 ^T	DQ298025	98,7 % (9/705 bp)	F6	1 (K)	/
<i>Rhizobium nepotum</i> 39/7 ^T	JWJH01000079	99,9 % (2/1339 bp)	M10	1 (I)	23
<i>Rhodanobacter glycinis</i> MO64 ^T	jgi.1071208	99,9 % (1/723 bp)	D10	24 (K)	/
<i>Serratia marcescens subsp. marcescens</i> ATCC 13880 ^T	JMPQ01000005	100 % (0/727 bp)	M153	2 (I)	7A
<i>Serratia nematodiphila</i> DSM 21420 ^T	JPUX01000001	99,7 % (2/727 bp)			
<i>Shinella zoogloeoides</i> ATCC 19623 ^T	X74915	98,5 % (21/1407 bp)	M127	2 (I)	25
<i>Sphingomonas olei</i> K-1-16 ^T	KX672814	99,6 % (6/1329 bp)	M39	2 (I)	24
<i>Sphingomonas panaciterrae</i> CY91 ^T	KF915801				
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> MTCC 434 ^T	JALV01000036	99,7 % (5/1467 bp)	M154	2 (I)	6A
		99,4 % (9/1400 bp)	M285	1 (I)	6B
<i>Stenotrophomonas lactitubi</i> sp. nov. M15 ^T	LT222224	/	M15	2 (I)	6A
<i>Xenophilus aerolatus</i> 5516S-2 ^T	EF660342	99,9 % (1/676 bp)	M98	2 (I)	10C

Tabelle 32: Fettsäureprofile der Untergruppen 1B-D, 2D und 3C, die im Hauptteil nicht aufgeführt sind. Angegeben ist die Anzahl der zugehörigen Isolate, deren Zellmorphologie und Gramfärbeverhalten, Fähigkeit zu Proteo- und Lipolyse sowie der Isolierungsort und das Nährmedium. Bei mehr als einem Vertreter pro Untergruppe sind die prozentualen Anteile der Fettsäuren als Mittelwert mit Standardabweichung in Klammern angegeben. Zusätzlich ist das Identifizierungsergebnis mit der Anzahl der identifizierten Vertreter in Klammern angegeben. n. b.: nicht bestimmt.

Gruppe	1			2	3
Untergruppe	1B	1C	1D	2D	3C
Anzahl Isolate	9	2	1	3	1
Zellmorphologie	Kokken	Stäbchen	Kokken	Stäbchen	Lange Stäbchen
Gramfärbung	+	+	+	+	+
Proteolyse	+ ¹⁾	-	n. b.	- ²⁾	-
Lipolyse	-	+	n. b.	-	-
Herkunft	MBA, C	SB	C	MBA, DEK	ST
Medium	TSA. BP	TSA, MPC	TSA	TSA	TSA
Fettsäuren in %					
13:0 anteiso	0,9 (0,6)				
14:0 iso	0,7 (0,7)			0,8 (0,2)	
15:0 iso		4,7 (1,0)		0,7 (0,1)	35,6
15:0 anteiso	93,1 (6,5)	94,3 (0,3)	85,3	59,4 (1,9)	32,3
15:0				0,03 (0,1)	
16:0 iso				23,1 (3,5)	0,7
16:0	2,0 (1,9)	0,6 (0,8)		2,0 (1,0)	0,4
17:0 iso					11,0
17:0 anteiso	2,5 (4,1)	0,1 (0,2)	6,0	13,9 (0,7)	20,0
17:0 <i>cyclo</i>			0,8		
19:0 <i>cyclo</i> 11-12			7,8		
Identifizierung (n)	<i>Rothia endophytica</i> (3), <i>Kocuria kristinae</i>	<i>Bacillus simplex</i>	<i>Brachybacterium rhamnosum</i>	<i>Microbacterium maritypicum/ oxydans</i> , <i>Pseudoclavibacter helvolus</i>	<i>Bacillus clausii</i>

¹⁾ Zwei von acht Isolaten sind Proteolyse-negativ.

²⁾ Eins von drei Isolaten ist Proteolyse-positiv.

Tabelle 33: Fettsäureprofile der Untergruppen 6C, 9C-F und 10C, die im Hauptteil nicht aufgeführt sind. Angegeben ist die Anzahl der zugehörigen Isolate, deren Zellmorphologie und Gramfärbverhalten, Fähigkeit zu Proteo- und Lipolyse sowie der Isolierungsort und das Nährmedium. Bei mehr als einem Vertreter pro Gruppe/Untergruppe sind die prozentualen Anteile der Fettsäuren als Mittelwert mit Standardabweichung in Klammern angegeben. Zusätzlich ist das Identifizierungsergebnis mit der Anzahl der identifizierten Vertreter in Klammern angegeben k. W., kein Wachstum; n. i., nicht identifiziert.

Gruppe	6C		9			10C
Untergruppe	9C	9D	9E	9F		
Anzahl Isolate	1	1	1	1	1	3
Zellmorphologie	Stäbchen		Stäbchen		Kokken	Dünne Stäbchen
Gramfärbung	-	+	+	+	+	-
Proteolyse	-	+	+	k. W.	-	-
Lipolyse	-	-	-	k. W.		+
Herkunft	MBA	DEE	DEK	C	ST	MBA
Medium	MPC		MRS		MRS	TSA, CFC
Fettsäuren in %						
10:0						1,3 (0,1)
10:0 3OH						0,5 (0,0)
13:0 iso	0,8					
14:0		0,3	3,3	0,2	3,7	
ECL 15,5	1,7					
15:0 iso	47,5					
15:0 anteiso	3,7					
15:0 iso 2OH	6,9					
16:1 <i>cis</i> 9		5,3	8,6	1,2		16,4 (1,3)
16:1 <i>trans</i> 9		10,9	7,1	3,0		
16:1 <i>cis</i> 11			1,7			
16:0	0,9	5,8	20,6	12,4	46,8	51,0 (1,4)
15:0 iso 3OH	1,7					
17:1 iso <i>cis</i> 9	16,6					
16:0 10-methyl		1,0				
16:0 11-methyl		15,9	2,5			
17:0 <i>cyclo</i>	0,4			1,8		8,4 (2,0)
17:0 iso	0,8					
16:0 3OH	0,2					
17:0 iso 3OH	17,5					
17:0 anteiso 3OH	1,2					
18:1 <i>cis</i> 11		59,5	43,8	79,1	7,9	21,8 (0,2)
18:0			0,5	1,1		0,6 (0,1)
19:0 <i>cyclo</i> 11-12		1,2	11,9	1,1	41,7	
Identifizierung (n)	n. i.	<i>Lactobacillus casei</i> (3)			<i>Pediococcus pentosaceus</i>	<i>Xenophilus aerolatus</i> (2)

Tabelle 34: Fettsäureprofile der Untergruppen 11D, 11E, 12B und 12C, die im Hauptteil nicht aufgeführt sind. Angegeben ist die Anzahl der zugehörigen Isolate, deren Zellmorphologie und Gramfärbverhalten, Fähigkeit zu Proteo- und Lipolyse sowie der Isolierungsort und das Nährmedium. Bei mehr als einem Vertreter pro Gruppe/Untergruppe sind die prozentualen Anteile der Fettsäuren als Mittelwert mit Standardabweichung in Klammern angegeben. Zusätzlich ist das Identifizierungsergebnis mit der Anzahl der identifizierten Vertreter in Klammern angegeben.

Gruppe	11		12	
Untergruppe	11D	11E	12B	12C
Anzahl Isolate	1	1	1	1
Zellmorphologie	Kokkoid	Stäbchen	Stäbchen	Stäbchen
Gramfärbung	+	+	+	+
Proteolyse	+	-	-	-
Lipolyse	+	+	-	-
Herkunft	ST	C	MBA	MBA
Medium	TSA	TSA	BP	BP
Fettsäuren in %				
14:0	0,3	5,2		
ECL 14,9				4,1
15:0	2,8	1,1		0,1
16:1 <i>cis</i> 9	2,4	0,5		
16:1 <i>trans</i> 9 o. <i>cis</i> 10	6,1	11,6		
16:0	25,8	66,8	16,1	39,0
17:1 <i>cis</i> 6 o. 9	7,3			
ECL 16,7			30,4	4,8
ECL 16,9	4,4		2,6	0,4
17:0	6,2			
17:0 10-methyl	0,3			
18:1 <i>cis</i> 9	27,4	11,2	46,6	51,4
ECL 17,95	5,0			
18:0			4,3	0,2
18:0 10-methyl	5,8	3,7		
19:1 <i>cis</i> 7	5,0			
19:0	1,2			
Identifizierung (n)	<i>Dietzia maris/schimae</i>	<i>Rhodococcus qingshengii/degradans</i>	<i>Corynebacterium confusum</i>	<i>Corynebacterium glutamicum</i>

Tabelle 35: Fettsäureprofile der Gruppen 13 bis 16. Angegeben ist die Anzahl der zugehörigen Isolate, deren Zellmorphologie und Gramfärbeverhalten, Fähigkeit zu Proteo- und Lipolyse sowie der Isolierungsort und das Nährmedium. Bei mehr als einem Vertreter pro Gruppe/Untergruppe sind die prozentualen Anteile der Fettsäuren als Mittelwert mit Standardabweichung in Klammern angegeben. Zusätzlich ist das Identifizierungsergebnis mit der Anzahl der identifizierten Vertreter in Klammern angegeben k. W., kein Wachstum; var, variabel.

Gruppe	13	14	15	16
Anzahl Isolate	5	1	7	2
Zellmorphologie	Kokken	Lange Stäbchen	Kokken	Stäbchen
Gramfärbung	+	-	+/-	var
Proteolyse	+	k. W.	- ¹⁾	-
Lipolyse	-	k. W.	+	-
Herkunft	ST	FR	F, C	MBA, C
Medium	TSA, MPC, BHI	MPC	TSA	TSA, MPC
Fettsäuren in %				
ECL 13,6		6,8		
14:0 iso	17,9 (1,9)			
14:1 <i>cis</i> 5	0,8 (0,2)			
14:0	14,7 (1,6)			
15:0 iso			2,8 (1,8)	
15:0 anteiso	0,5 (0,3)	80,5	0,2 (0,2)	
15:0		3,6	0,3 (0,6)	
15:0 anteiso 2OH		5,1		
16:1 iso 5	1,0 (0,4)			
16:0 iso	1,8 (0,4)		2,0 (1,9)	
16:1 <i>c/t</i> 5	19,3 (0,7)			
16:1 <i>cis</i> 9			3,3 (2,4)	
16:0	8,8 (0,7)		1,2 (1,2)	11,7 (4,7)
15:0 iso 3OH		1,3		
17:1 iso <i>cis</i> 9			5,2 (2,5)	
16:0 10-methyl			0,6 (1,0)	
16:0 11-methyl		0,5	1,4 (1,4)	
17:0 iso			21,2 (3,8)	
17:0 anteiso			11,7 (7,4)	
17:1 <i>cis</i> 6 o. 9			40,6 (7,9)	
17:0 anteiso 3OH		2,2		
17:0 10-methyl			3,2 (2,4)	
18:1 iso 5	1,7 (0,4)			
18:0 iso	0,4 (0,1)			
18:1 <i>cis</i> 9	31,8 (1,4)		1,3 (2,0)	
18:1 <i>cis</i> 11			1,8 (1,4)	85,9 (2,3)
18:0	1,3 (0,3)			1,7 (1,6)
Identifizierung (n)	<i>Macrococcus caseolyticus</i>	<i>Elisabethkingia miricola</i>	<i>Dermaococcus nishinomiyaensis</i> (5)	<i>Paracoccus spp.</i> , <i>Corynebacterium faecale</i>

¹⁾ Zwei von sechs getesteten Isolaten sind Proteolyse-positiv.

Tabelle 36: Fettsäureprofile der Gruppen 17 und 18. Angegeben ist die Anzahl der zugehörigen Isolate, deren Zellmorphologie und Gramfärbeverhalten, Fähigkeit zu Proteo- und Lipolyse sowie der Isolierungsort und das Nährmedium. Bei mehr als einem Vertreter pro Gruppe/Untergruppe sind die prozentualen Anteile der Fettsäuren als Mittelwert mit Standardabweichung in Klammern angegeben. Zusätzlich ist das Identifizierungsergebnis mit der Anzahl der identifizierten Vertreter in Klammern angegeben. k. W., kein Wachstum; var, variabel.

Gruppe	17				18
	17A	17B	17C	17D	
Untergruppe					
Anzahl Isolate	1	1	1	1	1
Zellmorphologie	Stäbchen	Stäbchen	Stäbchen	Stäbchen	Kokkoid
Gramfärbung	–	+	–	–	var
Proteolyse	–	+	–	+	–
Lipolyse	–	–	+	k. W.	+
Herkunft	MA	MA	FR	C	ST
Medium	MPC	TSA	MPC	TSA	TSA
Fettsäuren in %					
10:0					2,4
12:0 3OH					0,2
14:0 iso	1,7	3,7	1,6	17,9	
14:0			0,6	0,6	
15:0 iso 3OH				0,4	
15:0 iso	0,5	8,0	5,2		
15:0 anteiso	77,6	66,9	54,1	50,2	
15:0	1,7	0,5	1,0	0,3	
16:1 iso 5		0,9		1,9	
16:0 iso	15,6	7,7	21,5	25,0	
16:1 <i>c/t</i> 5 o. <i>cis</i> 7		0,7		1,5	0,2
16:1 <i>cis</i> 9					9,2
16:0	1,9	0,7	5,0	1,5	3,9
16:0 10-methyl		0,3			
17:0 iso		0,2	1,6		
17:0 anteiso	1,0	10,4	9,3	0,8	
18:1 <i>cis</i> 9					76,1
18:0					7,9
Identifizierung (n)	<i>Paenibacillus provencensis</i>	<i>Bacillus idriensis</i>	<i>Paenibacillus cineris</i>	<i>Paenibacillus amylolyticus</i>	<i>Enhydrobacter aerosaccus</i>

Tabelle 37: Fettsäureprofile der Gruppen 19 bis 23. Angegeben ist die Anzahl der zugehörigen Isolate, deren Zellmorphologie und Gramfärbeverhalten, Fähigkeit zu Proteo- und Lipolyse sowie der Isolierungsort und das Nährmedium. Bei mehr als einem Vertreter pro Gruppe/Untergruppe sind die prozentualen Anteile der Fettsäuren als Mittelwert mit Standardabweichung in Klammern angegeben. Zusätzlich ist das Identifizierungsergebnis mit der Anzahl der identifizierten Vertreter in Klammern angegeben. n. i., nicht identifiziert.

Gruppe	19	20	21	22		23
				22A	22B	
Untergruppe						
Anzahl Isolate	2	3	1	7	1	12
Zellmorphologie	Stäbchen	Stäbchen	Stäbchen	Lange Stäbchen	Stäbchen	Stäbchen
Gramfärbung	–	–	+	–	–	–
Proteolyse	–	– ¹⁾	+	–	–	–
Lipolyse	–	– ²⁾	–	– ³⁾	–	– ⁴⁾
Herkunft	MBA, C	MBA	MBA	MBA	MBA	MBA
Medium	TSA, MPC	TSA, CCA, VRBD	MRS	MPC, TSA	MPC	MPC, CCA, VRBD, CFC
Fettsäuren in %						
ECL 10,85					1,3	0,6 (0,6)
12:0 3OH				0,3 (0,2)	0,2	
ECL 12,85					0,6	0,3 (0,4)
ECL 13,5	4,0 (3,6)	3,2 (0,9)				
14:0	0,8 (0,6)	0,7 (0,3)	2,6	1,3 (0,4)		
15:0 iso	44,8 (0,4)	31,8 (8,5)		0,1 (0,1)		
15:0 anteiso	2,0 (0,9)					
15:1 B	0,1 (0,2)	0,4 (0,3)				
15:0	0,2 (0,1)	1,3 (0,3)		0,7 (1,0)		
14:0 3OH						1,0 (0,7)
16:1 <i>c/t</i> 5			0,8			
16:1 <i>cis</i> 9	35,0 (1,0)	16,9 (0,8)	0,8	3,4 (1,1)	0,4	0,5 (0,3)
16:1 <i>cis</i> 11	1,0 (1,4)	10,9 (3,0)				
16:0	4,8 (1,8)	18,2 (5,6)	58,2	20,2 (1,9)	9,0	8,0 (2,3)
15:0 iso 3OH	1,7 (1,1)	2,2 (0,3)				
17:1 iso <i>cis</i> 9	0,7 (0,5)	0,2 (0,2)				
17:1 (iso?) 11	0,5 (0,7)	3,9 (0,2)				
17:0 iso		1,5 (0,1)				
17:0 <i>cyclo</i>	0,3 (0,2)	0,3 (0,1)				
16:0 3OH	0,5 (0,6)	1,0 (0,3)				0,2 (0,2)
18:1 <i>cis</i> 9			3,4			
18:1 <i>cis</i> 11			17,7	71,6 (3,4)	86,3	88,4 (3,2)
18:0			16,7	0,1 (0,2)	2,3	0,4 (0,4)
18:1 <i>cis</i> 11				1,3 (0,5)		0,1 (0,2)
11-methyl						
17:0 iso 3OH	3,6 (4,3)	7,6 (2,3)				
Identifizierung (n)	<i>Sphingobacterium spiritivorum</i> , <i>Sphingobacterium multivorum</i>	<i>Empedobacter falsenii</i> (2)	n. i.	<i>Brevundimonas vesicularis/nasdae</i> (4)	n. i.	<i>Agrobacterium pusense</i> (2), <i>Rhizobium nepotum</i> , <i>Rhizobium radiobacter</i>

¹⁾ Eins von drei Isolaten ist Proteolyse-positiv.

²⁾ Eins von drei Isolaten ist Lipolyse-positiv.

³⁾ Ein Isolat ist Lipolyse-positiv, zwei Isolate zeigten kein Wachstum auf Lipolyse-Agar.

⁴⁾ Drei von zwölf Isolaten sind Lipolyse-positiv.

Tabelle 38: Fettsäureprofile der Gruppen 24 bis 26. Angegeben ist die Anzahl der zugehörigen Isolate, deren Zellmorphologie und Gramfärbeverhalten, Fähigkeit zu Proteo- und Lipolyse sowie der Isolierungsort und das Nährmedium. Bei mehr als einem Vertreter pro Gruppe/Untergruppe sind die prozentualen Anteile der Fettsäuren als Mittelwert mit Standardabweichung in Klammern angegeben. Zusätzlich ist das Identifizierungsergebnis mit der Anzahl der identifizierten Vertreter in Klammern angegeben.

Gruppe			26	
	24	25	26A	26B
Untergruppe				
Anzahl Isolate	3	3	2	1
Zellmorphologie	Stäbchen	Stäbchen	Stäbchen	Stäbchen
Gramfärbung	–	+	+	+
Proteolyse	–	–	–	–
Lipolyse	+ ¹⁾	–	–	–
Herkunft	MBA	MBA	MBA, DAE	C
Medium	TSA, MPC	TSA, VRBD	VRBD	TSA
Fettsäuren in %				
ECL 10,85		0,6 (0,7)		
14:0	0,3 (0,1)			
14:0 2OH	2,7 (1,2)			
14:0 3OH		0,6 (0,4)		
16:1 <i>cis</i> 9	15,0 (3,5)	0,1 (0,1)	0,3 (0,3)	
16:1 <i>cis</i> 11	3,7 (1,6)			
16:0	10,1 (4,1)	7,0 (0,5)	3,5 (1,7)	1,9
17:0			0,3 (0,0)	
18:1 <i>cis</i> 11	67,7 (2,6)	79,8 (2,9)	85,3 (2,9)	77,1
18:0		2,6 (0,2)	7,5 (0,2)	16,2
18:1 <i>cis</i> 11 11-methyl	0,2 (0,4)	7,8 (2,1)		
19:0 <i>cyclo</i> 11-12		1,4 (1,5)	2,9 (1,3)	4,8
Identifizierung (n)	<i>Sphingomonas olei/panaciterrae</i>	<i>Shinella zoogloeoides</i> (2)	<i>Ochrobactrum anthropi/cytisi/lupini, Ochrobactrum thiophenivorans</i>	<i>Ochrobactrum rhizosphaerae</i>

¹⁾ Eins von drei Isolaten ist Lipolyse-negativ.

Tabelle 39: Fettsäureprofile der Gruppe 27. Angegeben ist die Anzahl der zugehörigen Isolate, deren Zellmorphologie und Gramfärbeverhalten, Fähigkeit zu Proteo- und Lipolyse sowie der Isolierungsort und das Nährmedium. Bei mehr als einem Vertreter pro Gruppe/Untergruppe sind die prozentualen Anteile der Fettsäuren als Mittelwert mit Standardabweichung in Klammern angegeben. Zusätzlich ist das Identifizierungsergebnis mit der Anzahl der identifizierten Vertreter in Klammern angegeben.

Gruppe	27			
Untergruppe	27A	27B	27C	27D
Anzahl Isolate	3	2	1	1
Zellmorphologie	Kurze Stäbchen	Kurze Stäbchen	Kurze Stäbchen	Kurze Stäbchen
Gramfärbung	–	–	–	–
Proteolyse	–	–	+	+
Lipolyse	–	–	–	–
Herkunft	MBA	FR	MBA	ST
Medium	MPC, VRBD	CFC	VRBD	VRBD
Fettsäuren in %				
ECL 10,85	0,8 (0,9)	0,6 (0,9)	0,7	0,2
12:0	1,6 (0,3)	1,2 (0,1)	0,8	2,3
ECL 12,88		1,0 (1,4)		
14:0	3,9 (0,5)	0,1 (0,0)	2,5	3,4
14:0 3OH	2,7 (0,7)	0,6 (0,4)	1,1	4,5
15:0				1,9
16:1 <i>cis</i> 9	33,3 (0,0)	20,6 (2,2)	27,5	30,0
16:0	47,2 (3,2)	35,3 (2,1)	46,3	30,4
17:0 <i>cyclo</i>	2,4 (0,5)	7,1 (0,5)	3,9	1,1
16:0 3OH		0,8 (0,9)		
17:0		0,1 (0,2)	0,3	2,3
18:1 <i>cis</i> 11	8,0 (1,2)	31,3 (0,6)	16,9	23,6
18:0	0,1 (0,1)	0,6 (0,1)		0,1
19:0 <i>cyclo</i> 11-12		0,8 (0,0)		
Identifizierung (n)	<i>Pantoea agglomerans</i>	<i>Pandoraea pnomenua</i> (2)	<i>Raoultella terrigena</i> / <i>Klebsiella aerogenes</i>	<i>Enterobacter hormaechei</i> / <i>Escherichia hermannii</i>

Tabelle 40: Fettsäureprofile der Gruppen 28 und 29. Angegeben ist die Anzahl der zugehörigen Isolate, deren Zellmorphologie und Gramfärbeverhalten, Fähigkeit zu Proteo- und Lipolyse sowie der Isolierungsort und das Nährmedium. Bei mehr als einem Vertreter pro Gruppe/Untergruppe sind die prozentualen Anteile der Fettsäuren als Mittelwert mit Standardabweichung in Klammern angegeben. Zusätzlich ist das Identifizierungsergebnis mit der Anzahl der identifizierten Vertreter in Klammern angegeben.

Gruppe	28			29
	28A	28B	28C	
Untergruppe				
Anzahl Isolate	8	3	1	5
Zellmorphologie	Stäbchen	Stäbchen	Stäbchen	Dünne Stäbchen
Gramfärbung	+	+	+	-
Proteolyse	+	+	-	-
Lipolyse	+ ¹⁾	- ²⁾	-	+ ³⁾
Herkunft	MBA, ST, C	MB, FR, C	FR	FR, MA, C
Medium	TSA	TSA, MPC	TSA	TSA
Fettsäuren in %				
15:0 iso	0,3 (0,2)	2,3 (1,7)	8,0	0,6 (0,1)
15:0 anteiso	54,7 (6,1)	65,2 (2,4)	47,0	29,6 (2,9)
16:0 iso	1,2 (1,1)	2,2 (2,0)	2,5	9,3 (2,2)
17:0 iso		0,1 (0,2)	1,2	0,4 (0,1)
17:0 anteiso	43,6 (5,8)	29,7 (3,0)	41,3	60,1 (3,7)
Identifizierung (n)	<i>Arthrobacter russicus</i> (4), <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> , <i>Brevibacterium casei</i> , <i>Brachybacterium nesterenkovii</i>	<i>Brevibacterium ammoniilyticum</i>	<i>Leifsonia soli</i> (3)

¹⁾ Zwei von acht Isolaten sind Lipolyse-negativ.

²⁾ Eins von drei Isolaten ist Lipolyse-positiv.

³⁾ Zwei von fünf Isolaten sind Lipolyse-negativ.

Tabelle 41: Fettsäureprofil der Gruppe 30. Angegeben ist die Anzahl der zugehörigen Isolate, deren Zellmorphologie und Gramfärbeverhalten, Fähigkeit zu Proteo- und Lipolyse sowie der Isolierungsort und das Nährmedium. Bei mehr als einem Vertreter pro Gruppe/Untergruppe sind die prozentualen Anteile der Fettsäuren als Mittelwert mit Standardabweichung in Klammern angegeben. Zusätzlich ist das Identifizierungsergebnis mit der Anzahl der identifizierten Vertreter in Klammern angegeben.

Gruppe	30				
	30A	30B	30C	30D	30E
Untergruppe					
Anzahl Isolate	9	1	1	1	1
Zellmorphologie	Stäbchen	Stäbchen	Stäbchen	Stäbchen	Stäbchen
Gramfärbung	-	-	-	-	-
Proteolyse	- ¹⁾	-	-	-	-
Lipolyse	- ¹⁾	+	+	+	-
Herkunft	MBA, ST, C	MBA	C	MBA	FR
Medium	MPC, TSA	MPC	TSA	TSA	MPC
Fettsäuren in %					
13:0 iso	0,4 (0,3)	0,2	0,6	0,8	
ECL 13,5	9,6 (4,6)	2,3		9,0	
ECL 13,6	0,3 (0,5)	1,5		1,7	
15:0 iso	60,0 (7,2)	25,0	63,1	38,2	47,5
15:0 anteiso	5,2 (3,6)	21,2	28,8	8,2	3,7
15:0		0,2			
ECL 15,5					1,7
15:0 iso 2OH	2,0 (1,5)	1,7	1,5	3,4	6,9
15:0 anteiso 2OH		0,5			
16:0 iso		0,5			
15:0 iso 3OH		1,5	0,5	0,5	1,7
16:0	0,4 (0,3)		0,8	0,8	0,9
15:0 anteiso 3OH		0,9			
17:1 iso <i>cis</i> 9	16,6 (3,9)	26,8	0,9	31,4	16,6
16:0 11-methyl		1,8			
17:0 iso		0,6		2,6	0,8
17:0 anteiso		0,6			
17:0 <i>cyclo</i>	0,1 (0,3)	0,6		0,6	0,4
16:0 3OH					0,2
16:0 iso 3OH	0,02 (0,1)	0,9			
17:0 iso 3OH	4,4 (3,9)	7,6	3,8	3,7	17,5
17:0 anteiso 3OH		5,4			1,2
Identifizierung (n)	<i>Chryseobacterium carnipullorum</i> (4), <i>Chryseobacterium soli</i>	<i>Chryseobacterium haifense</i>	<i>Chryseobacterium bovis</i>	n. i.	n. i.

¹⁾ Zwei Isolate wiesen sowohl Proteolyse- als auch Lipolyse-Vermögen auf.






	Sehr starke Biofilmbildung (Abs. 550 nm \geq 2,0)
	Starke Biofilmbildung ($1,0 \leq$ Abs. 550 nm $<$ 2,0)
	Moderate Biofilmbildung ($0,5 \leq$ Abs. 550 nm $<$ 1,0)
	Schwache Biofilmbildung ($0,1 \leq$ Abs. 550 nm $<$ 0,5)
	Keine Biofilmbildung (Abs. 550 nm $<$ 0,1)

Abbildung 28: Farbschema zur Bewertung des Ausmaßes der Biofilmbildung der Isolate in den Tabellen 45 und 46.

Tabelle 42: Biofilmbildungsfähigkeit der Isolate in Polystyrol-Mikrotiterplatten bei 30 °C und 4 °C in Trypton-Soja-Bouillon (TSB) und TSB mit derselben Zusammensetzung unter Austausch von Glucose gegen Lactose (Lac-TSB). Angegeben ist der Mittelwert (MW) der Absorption bei 550 nm nach Abzug des Blanks und die Standardabweichung (σ) bei vier Parallelen. Bei 4 °C ist zusätzlich das Ausmaß des Wachstums (W) angegeben: ++ sehr stark ($OD_{625\text{ nm}} \geq 0,2$); + schwach bis moderat ($0,08 \leq OD_{625\text{ nm}} < 0,2$); - kein Wachstum ($OD_{625\text{ nm}} < 0,08$). k. W.: kein Wachstum; n. d.: nicht durchgeführt. Das Ausmaß der Biofilmbildung ist nach dem in Abb. 28 dargestellten Farbschema gekennzeichnet.

Isolat	Biofilmbildung (Absorption 550 nm)									
	30 °C, 24 h					4 °C, 7 d				
	TSB		Lac-TSB		TSB			Lac-TSB		
	MW	σ	MW	σ	W	MW	σ	W	MW	σ
<i>Acinetobacter guillouiae</i> M9	3,217	0,357	3,005	0,364	++	2,868	0,180	++	1,695	0,112
<i>A. guillouiae</i> M176	3,555	0,084	3,524	0,040	++	2,796	0,340	++	1,843	0,021
<i>A. guillouiae</i> M188	3,461	0,056	0,215	0,089	++	0,691	0,114	++	0,262	0,010
<i>A. guillouiae</i> M207	2,024	0,273	1,898	0,550	++	2,845	0,445	++	1,823	0,850
<i>A. guillouiae</i> M226	0,844	0,473	0,491	0,133	++	2,137	0,632	++	0,752	0,686
<i>A. guillouiae</i> M228	2,100	0,701	2,409	0,825	++	2,689	0,264	++	1,491	0,311
<i>A. guillouiae</i> M264	0,155	0,032	0,002	0,008	++	0,098	0,070	++	0,196	0,060
<i>Acinetobacter johnsonii</i> M110a	1,249	0,870	0,025	0,035	++	0,052	0,130	++	< 0	0,009
<i>A. johnsonii</i> M147	2,433	0,515	1,081	0,276	++	< 0	0,010	++	0,038	0,018
<i>Agrobacterium pusense</i> M117	0,641	0,855	0,321	0,554	-	/	/	+	0,006	0,047
<i>A. pusense</i> M128	0,879	0,832	0,403	0,745	-	/	/	+	0,087	0,102
<i>Arthrobacter ruscicus</i> M12	0,127	0,095	0,114	0,039	++	0,233	0,020	++	0,505	0,123
<i>A. ruscicus</i> M253	0,159	0,296	0,296	0,296	++	0,142	0,070	++	0,000	0,036
<i>A. ruscicus</i> M288	0,404	0,168	0,169	0,032	+	0,133	0,049	-	/	/
<i>A. ruscicus</i> M292	0,232	0,085	0,162	0,045	+	0,213	0,111	+	0,089	0,024
<i>Bacillus clausii</i> M75	0,119	0,230	0,045	0,040	-	/	/	-	/	/
<i>Bacillus idriensis</i> M47	0,611	0,109	0,038	0,022	+	0,133	0,123	-	/	/
<i>Bacillus marisflavi</i> M25	0,094	0,093	0,100	0,112	+	0,054	0,127	-	/	/
<i>Bacillus paralicheniformis</i> M14	3,696	0,075	n. d.	n. d.	-	/	/	n. d.	n. d.	n. d.
<i>B. paralicheniformis</i> M33	3,749	0,0 ¹⁾	3,575	0,119	-	/	/	-	/	/
<i>Bacillus safensis</i> M11	3,435	0,056	0,110	0,023	+	< 0	0,031	-	/	/
<i>B. safensis</i> M102	1,758	1,164	0,925	0,901	-	/	/	-	/	/
<i>B. safensis</i> M241	0,027	0,101	0,188	0,201	-	/	/	-	/	/
<i>B. safensis</i> M266	0,553	0,054	1,761	0,090	+	0,046	0,068	+	0,112	0,054
<i>Bacillus simplex</i> M45	0,082	0,039	0,013	0,019	-	/	/	-	/	/
<i>Bacillus thuringiensis/paranthracis</i> M97	0,017	0,046	0,008	0,025	-	/	/	-	/	/
<i>B. thuringiensis/paranthracis</i> M146	0,239	0,199	0,271	0,246	-	/	/	-	/	/
<i>Brevibacterium spp.</i> M129	2,714	1,177	2,110	0,734	-	/	/	-	/	/
<i>Brevibacterium ammoniilyticum</i> M192	0,179	0,043	0,300	0,172	-	/	/	-	/	/
<i>Brevundimonas vesicularis/nasdae</i> M40	0,452	0,113	0,289	0,108	+	0,371	0,275	-	/	/
<i>B. vesicularis/nasdae</i> M111	1,153	0,067	0,988	0,288	-	/	/	-	/	/
<i>B. vesicularis/nasdae</i> M175	0,024	0,048	0,020	0,028	-	/	/	-	/	/
<i>B. vesicularis/nasdae</i> M235	1,768	0,295	2,552	0,272	+	0,309	0,055	+	0,344	0,074
<i>Chryseobacterium bovis</i> M326	0,220	0,171	1,197	0,487	+	0,001	0,026	+	< 0	0,077
<i>Chryseobacterium carnipullorum</i> M169	0,010	0,063	0,007	0,106	++	0,022	0,100	++	< 0	0,009

¹⁾ Überschreitung des maximalen Messbereichs der Absorption bei 550 nm von 4,0. Von diesem Wert wurde der Blank abgezogen daher ist n = 1 und somit die Angabe einer Standardabweichung nicht möglich

Tabelle 42 Fortsetzung...

Isolat	Biofilmbildung (Absorption 550 nm)									
	30 °C, 24 h					4 °C, 7 d				
	TSB		Lac-TSB		W	TSB		W	Lac-TSB	
	MW	σ	MW	σ		MW	σ		MW	σ
<i>C. carnipullorum</i> M171	0,071	0,097	0,020	0,089	++	< 0	0,027	++	0,028	0,042
<i>C. carnipullorum</i> M296	0,012	0,015	< 0	0,010	++	0,067	0,063	++	0,028	0,037
<i>Chryseobacterium haifense</i> M100	0,288	0,373	0,499	1,131	+	< 0	0,074	++	< 0	0,021
<i>Chryseobacterium soli</i> M2	0,006	0,021	0,082	0,123	++	0,008	0,033	++	0,047	0,025
<i>Corynebacterium confusum</i> M104	1,840	0,432	1,231	0,336	-	/		-	/	
<i>Corynebacterium falsenii</i> M50	0,034	0,029	0,072	0,067	-	/		-	/	
<i>C. falsenii</i> M53	0,034	0,015	0,011	0,057	-	/		-	/	
<i>C. falsenii</i> M134	0,045	0,106	0,090	0,106	-	/		-	/	
<i>Corynebacterium glutamicum</i> M180a	1,407	1,396	0,581	0,138	++	0,001	0,023	++	0,007	0,006
<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> M17	0,005	0,008	< 0	0,008	++	0,002	0,021	-	/	
<i>C. flaccumfaciens</i> M76	0,159	0,160	0,033	0,046	++	0,031	0,021	++	< 0	0,005
<i>Dermacoccus nishinomiyaensis</i> M263	0,402	0,075	0,223	0,101	+	0,021	0,035	+	< 0	0,060
<i>D. nishinomiyaensis</i> M293a	0,718	0,086	0,901	0,108	+	0,100	0,031	-	/	
<i>D. nishinomiyaensis</i> M329	0,519	0,075	0,001	0,091	-	/		-	/	
<i>D. nishinomiyaensis</i> M333	< 0	0,007	0,020	0,050	-	/		-	/	
<i>D.s nishinomiyaensis</i> M334	0,092	0,079	0,001	0,017	-	/		-	/	
<i>Dietzia maris</i> M233	0,020	0,024	< 0	0,009	++	0,011	0,014	+	0,011	0,022
<i>Elizabethkingia miricola</i> M194	< 0	0,034	< 0	0,015	-	/		-	/	
<i>Empedobacter falsenii</i> M93b	3,321	0,147	1,579	0,375	-	/		-	/	
<i>E. falsenii</i> M95	0,039	0,080	0,041	0,066	-	/		-	/	
<i>Enhydrobacter aerosaccus</i> M209	0,053	0,100	0,002	0,011	-	/		-	/	
<i>Enterobacter</i> spp. M155	0,113	0,239	0,019	0,090	++	0,012	0,020	++	0,039	0,062
<i>Enterococcus faecalis</i> M60	0,177	0,071	0,055	0,069	++	0,054	0,060	++	0,002	0,003
<i>E. faecalis</i> M66	< 0	0,013	0,094	0,076	++	0,024	0,029	++	0,011	0,020
<i>E. faecalis</i> M198	0,095	0,053	0,029	0,010	++	< 0	0,012	++	< 0	0,016
<i>E. faecalis</i> M225	0,113	0,052	0,062	0,016	++	0,003	0,016	++	< 0	0,024
<i>E. faecalis</i> M249	0,186	0,068	0,184	0,067	++	0,000	0,024	++	0,014	0,050
<i>E. faecalis</i> M298b	0,187	0,029	0,159	0,022	++	< 0	0,017	++	0,032	0,028
<i>Escherichia coli</i> M122	2,258	0,656	1,879	0,610	+	0,001	0,007	+	< 0	0,009
<i>E. coli</i> M131	1,516	1,002	1,439	0,933	+	< 0	0,027	+	0,010	0,078
<i>E. coli</i> M159	1,023	0,689	2,169	1,005	+	0,022	0,027	-	/	
<i>Gordonia bronchialis</i> M232	0,055	0,042	0,215	0,123	+	0,001	0,012	++	0,009	0,008
<i>Gordonia jacobaea</i> M170	0,032	0,040	0,029	0,023	+	0,008	0,024	-	/	
<i>G. jacobaea</i> M252	0,051	0,185	0,051	0,183	-	/		-	/	
<i>Gordonia paraffinivorans</i> M69	0,323	0,157	1,082	0,274	-	/		-	/	
<i>G. polyisoprenivorans</i> M231	< 0	0,012	< 0	0,013	-	/		-	/	
<i>G. polyisoprenivorans</i> M308	0,033	0,018	< 0	0,013	-	/		-	/	
<i>G. polyisoprenivorans</i> M328	0,055	0,024	0,666	0,169	+	0,050	0,028	+	0,114	0,056
<i>Kocuria kristinae</i> M62	0,586	0,515	0,069	0,046	-	/		-	/	
<i>K. kristinae</i> M140	0,405	0,928	0,134	0,380	-	/		-	/	
<i>K. kristinae</i> M230a	3,213	0,167	2,939	0,446	-	/		-	/	
<i>K. kristinae</i> M245	3,543	0,024	2,821	0,405	-	/		-	/	
<i>K. kristinae</i> M337	0,563	0,339	0,882	0,193	-	/		-	/	
<i>Kocuria salsicia</i> M74	0,065	0,097	0,444	0,156	++	0,047	0,013	+	< 0	0,013
<i>K. salsicia</i> M130	0,175	0,283	2,337	0,829	+	0,075	0,094	+	0,038	0,047
<i>K. salsicia</i> M196	0,130	0,054	2,882	0,489	+	0,026	0,069	-	/	
<i>K. salsicia</i> M239	0,107	0,095	1,971	0,249	+	0,082	0,087	+	0,014	0,037
<i>K. salsicia</i> M250	0,893	0,205	0,893	0,174	-	/		-	/	
<i>K. salsicia</i> M300	0,624	0,062	0,620	0,057	+	< 0	0,031	+	0,144	0,061
<i>K. salsicia</i> M309	2,966	0,431	2,821	0,293	-	/		-	/	
<i>K. salsicia</i> M320	0,014	0,018	0,489	0,319	++	0,020	0,035	++	< 0	0,020

Tabelle 42 Fortsetzung...

Isolat	Biofilmbildung (Absorption 550 nm)									
	30 °C, 24 h					4 °C, 7 d				
	TSB		Lac-TSB		TSB			Lac-TSB		
	MW	σ	MW	σ	W	MW	σ	W	MW	σ
<i>Kurthia gibsonii</i> M150	0,280	0,183	0,516	0,227	+	< 0	0,033	+	0,000	0,016
<i>Lactobacillus casei</i> M57	0,584	0,035	0,266	0,083	-	/		-	/	
<i>L. casei</i> M64	k. W.		k. W.		-	/		-	/	
<i>L. casei</i> M165	0,129	0,026	0,004	0,031	-	/		-	/	
<i>L. casei</i> M313	0,142	0,146	0,033	0,040	+	0,087	0,055	+	< 0	0,046
<i>Lactobacillus fermentum</i> M68a	0,055	0,030	0,001	0,007	-	/		-	/	
<i>Lactobacillus parabuchneri</i> M164	0,083	0,025	0,030	0,022	-	/		-	/	
<i>Leifsonia soli</i> M59	0,155	0,083	n. d.		-	/		n. d.		
<i>L. soli</i> M81	0,217	0,127	n. d.		-	/		n. d.		
<i>L. soli</i> M246	0,160	0,229	0,163	0,233	-	/		-	/	
<i>Luteibacter jiangsuensis</i> M325	0,057	0,016	< 0	0,077	-	/		-	/	
<i>Macrococcus caseolyticus</i> M208	1,069	0,516	2,208	0,851	-	/		-	/	
<i>Microbacterium foliorum</i> M110b	0,059	0,090	0,111	0,162	++	0,057	0,063	++	0,060	0,042
<i>Microbacterium flavum/lacticum</i> M51	0,036	0,068	0,048	0,007	+	< 0	0,068	-	/	
<i>M. flavum/lacticum</i> M254	0,012	0,021	0,011	0,022	++	< 0	0,009	++	< 0	0,035
<i>M. flavum/lacticum</i> M301	0,500	0,116	0,500	0,120	+	0,032	0,021	+	0,130	0,274
<i>M. flavum/lacticum</i> M310	3,097	0,233	3,213	0,103	-	/		-	/	
<i>M. flavum/lacticum</i> M321	0,051	0,036	0,211	0,035	-	/		-	/	
<i>M. flavum/lacticum</i> M322	1,022	0,177	2,851	0,426	-	/		-	/	
<i>M. flavum/lacticum</i> M336a	0,201	0,154	< 0	0,025	-	/		-	/	
<i>M. flavum/lacticum</i> M336b	< 0	0,050	0,027	0,016	-	/		-	/	
<i>Microbacterium maritypicum/oxydans</i> M29	0,520	0,076	0,660	0,101	++	0,327	0,061	-	/	
<i>M. maritypicum/oxydans</i> M58	0,186	0,069	0,153	0,079	++	0,034	0,021	++	0,014	0,011
<i>M. maritypicum/oxydans</i> M172	0,647	0,289	0,481	0,259	++	< 0	0,014	++	0,003	0,011
<i>M. maritypicum/oxydans</i> M193	1,213	1,417	0,871	0,294	++	0,050	0,082	+	0,297	0,034
<i>M. maritypicum/oxydans</i> M303	< 0	0,072	< 0	0,071	++	0,023	0,023	++	0,045	0,049
<i>M. maritypicum/oxydans</i> M323	0,729	0,375	0,520	0,362	++	0,061	0,250	++	0,079	0,018
<i>M. maritypicum/oxydans</i> M324	0,431	0,208	0,521	0,316	++	0,066	0,051	++	0,079	0,042
<i>M. maritypicum/oxydans</i> M335	0,512	0,169	0,326	0,106	++	< 0	0,012	++	0,047	0,017
<i>Microbacterium testaceum</i> M115	0,089	0,202	0,158	0,183	+	0,013	0,081	+	0,014	0,014
<i>M. testaceum</i> M327	< 0	0,023	< 0	0,022	++	< 0	0,032	+	< 0	0,028
<i>Microvirgula aerodenitrificans</i> M136	0,226	0,180	0,116	0,087	-	/		-	/	
<i>Ochrobactrum anthropi</i> M72	2,293	0,342	1,483	0,583	-	/		-	/	
<i>Ochrobactrum rhizosphaerae</i> M331	0,314	0,133	0,331	0,089	++	< 0	0,023	++	0,047	0,104
<i>Ochrobactrum thiophenivorans</i> M107	0,676	0,903	0,234	0,174	++	0,008	0,029	++	0,001	0,033
<i>Paenibacillus amylolyticus</i> M247	0,146	0,093	0,146	0,095	-	/		-	/	
<i>Paenibacillus cineris</i> M137	0,167	0,220	0,496	0,278	-	/		-	/	
<i>Paenibacillus provencensis</i> M46	0,058	0,067	0,188	0,139	-	/		-	/	
<i>Pandoraea pnomenusa</i> M55	0,149	0,090	0,181	0,030	-	/		-	/	
<i>P. pnomenusa</i> M135	0,043	0,069	0,053	0,121	-	/		-	/	
<i>Pantoea agglomerans</i> M31	0,269	0,111	0,970	0,629	++	3,036	0,631	++	3,664	0,029
<i>Paracoccus</i> spp. M177	1,869	0,197	1,940	0,989	-	/		-	/	
<i>Pediococcus pentosaceus</i> M37	0,044	0,023	n. d.		+	< 0	0,007	n. d.		
<i>P. pentosaceus</i> M162	< 0	0,011	< 0	0,007	+	0,000	0,015	-	/	
<i>P. pentosaceus</i> M163	0,021	0,014	0,020	0,038	-	/		-	/	
<i>P. pentosaceus</i> M167	0,020	0,038	< 0	0,021	+	< 0	0,070	+	< 0	0,007
<i>Pseudoclavibacter chungangensis</i> M291	< 0	0,011	< 0	0,013	+	< 0	0,044	-	/	
<i>Pseudoclavibacter helvolus</i> M230b	0,157	0,203	0,032	0,033	++	0,052	0,085	++	< 0	0,010
<i>Pseudomonas congelans</i> M79	0,028	0,024	0,125	0,101	++	0,071	0,018	++	0,035	0,007

Tabelle 42 Fortsetzung...

Isolat	Biofilmbildung (Absorption 550 nm)									
	30 °C, 24 h					4 °C, 7 d				
	TSB		Lac-TSB		W	TSB		W	Lac-TSB	
	MW	σ	MW	σ		MW	σ		MW	σ
<i>Pseudomonas gessardii</i> M152	3,507	0,035	1,712	0,589	++	1,218	0,254	++	0,310	0,061
<i>Pseudomonas koreensis</i> M92	2,032	1,303	0,757	0,605	++	3,556	0,017	++	3,656	0,016
<i>Pseudomonas poae/trivialis</i> M43	0,455	0,214	0,006	0,019	++	1,693	0,534	++	1,012	0,136
<i>Raoultella terrigena</i> M93a	3,368	0,301	2,251	1,664	++	< 0	0,033	++	< 0	0,031
<i>Rhizobium nepotum</i> M10	0,878	0,815	0,634	0,314	-	/		-	/	
<i>Rhizobium radiobacter</i> M186	3,605	0,052	2,430	0,787	-	/		-	/	
<i>Rhodococcus degradans/qingshengii</i> M330	0,015	0,007	0,246	0,084	++	0,043	0,045	++	0,137	0,029
<i>R. degradans/qingshengii</i> M338	0,498	0,405	0,345	0,463	++	0,045	0,033	++	0,062	0,029
<i>Rhodococcus fascians</i> M132a	0,053	0,331	0,098	0,221	-	/		-	/	
<i>R. fascians</i> M307	0,069	0,125	0,071	0,125	-	/		-	/	
<i>Rothia endophytica</i> M35a	0,024	0,036	< 0	0,029	+	0,010	0,006	+	0,020	0,040
<i>R. endophytica</i> M182	< 0	0,050	< 0	0,025	+	0,000	0,016	+	0,001	0,008
<i>Serratia marcescens</i> M27	2,283	0,186	2,223	0,209	+	0,217	0,025	-	/	
<i>S. marcescens</i> M153	3,496	0,081	3,517	0,175	+	0,264	0,182	+	0,187	0,113
<i>Shinella zoogloeoides</i> M99	0,209	0,311	0,044	0,102	+	< 0	0,032	-	/	
<i>S. zoogloeoides</i> M127	0,276	0,466	0,166	0,209	-	/		-	/	
<i>Sphingobacterium multivorum</i> M244	0,291	0,867	0,542	0,715	-	/		-	/	
<i>Sphingobacterium spiritivorum</i> M113	2,566	0,443	2,361	0,324	+	< 0	0,007	+	0,013	0,013
<i>Sphingomonas olei/panaciterrae</i> M39	1,075	0,492	n. d.		-	/			n. d.	
<i>S. olei/panaciterrae</i> M238	0,722	0,406	1,605	0,636	++	< 0	0,011	+	< 0	0,007
<i>Staphylococcus arlettae</i> M243	0,145	0,142	0,448	0,344	-	/		-	/	
<i>Staphylococcus chromogenes</i> M179	0,193	0,165	0,003	0,025	+	0,006	0,018	-	/	
<i>S. chromogenes</i> M251	0,069	0,057	0,069	0,056	-	/		-	/	
<i>Staphylococcus cohnii</i> M34	0,131	0,151	0,559	0,266	-	/		-	/	
<i>S. cohnii</i> M105	0,516	0,871	0,153	0,177	+	0,036	0,055	-	/	
<i>S. cohnii</i> M178	0,191	0,176	0,090	0,223	++	0,027	0,077	+	< 0	0,005
<i>Staphylococcus heamoliticus</i> M89	0,128	0,130	0,112	0,068	-	/		-	/	
<i>Stenotrophomonas lactitubi</i> M15	1,292	0,161	3,243	0,410	++	1,788	0,323	++	1,184	0,321
<i>S. lactitubi</i> M183	2,553	0,633	1,557	0,250	++	1,004	0,127	++	1,569	0,080
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> M154	3,191	0,278	2,995	0,361	-	/		-	/	
<i>S. maltophilia</i> M158a	3,043	0,292	2,864	0,352	-	/		-	/	
<i>Xenophilus aerolatus</i> M16	0,111	0,145	0,075	0,075	-	/		-	/	
<i>X. aerolatus</i> M98	0,008	0,021	0,023	0,028	-	/		-	/	

Tabelle 43: Einfluss der Behandlung mit destilliertem Wasser (A. dest.) und den zur Reinigung und Desinfektion der Melkanlage verwendeten Mitteln auf die Biofilmentensität der Isolate in Polystyrol-Mikrotiterplatten bei 30 °C in Trypton-Soja-Bouillon (TSB). Angegeben ist der Mittelwert (MW) der Absorption bei 550 nm nach Abzug des Blanks und die Standardabweichung (σ) bei vier Parallelen. Die Reinigungs- und Desinfektionsmittel (DM) Circo Super SFM (sauer) und Circo Super AFM (alkalisch) wurden jeweils in der vom Hersteller empfohlenen Konzentration von 0,4 % (v/v) eingesetzt. Die Einwirkzeit betrug 15 min. Anschließend wurde, wenn angegeben, 2-mal mit 1x PBS-Puffer gespült. Die Biofilmentensität ist nach dem in Abb. 28 dargestellten Farbschema gekennzeichnet.

Isolat	Biofilmentensität (Absorption 550 nm)									
	Unbehandelt		A. dest. ohne Spülen		A. dest mit Spülen		Saares DM mit Spülen		Alkal. DM mit Spülen	
	MW	σ	MW	σ	MW	σ	MW	σ	MW	σ
<i>Acinetobacter guillouiae</i> M9	3,217	0,357	3,307	0,253	3,072	0,064	3,348	0,093	2,757	0,680
<i>A. guillouiae</i> M176	3,652	0,012	3,084	0,359	3,187	0,382	1,607	1,123	3,558	0,106
<i>A. guillouiae</i> M188	0,608	0,047	0,317	0,027	0,190	0,032	0,037	0,012	0,013	0,013
<i>Acinetobacter johnsonii</i> M147	2,232	0,074	1,726	0,349	1,144	0,078	1,547	0,069	1,569	0,432
<i>Arthrobacter russicus</i> M292	0,232	0,085	0,042	0,015	0,037	0,008	0,361	0,026	0,010	0,007
<i>Bacillus idriensis</i> M47	0,611	0,109	0,036	0,120	< 0	0,046	0,064	0,144	0,068	0,132
<i>Bacillus paralicheniformis</i> M14	3,696	0,075	0,080	0,098	0,057	0,114	3,229	0,329	0,697	0,846
<i>B. paralicheniformis</i> M33	3,749	0,000	3,491	0,045	2,863	1,384	3,474	0,028	3,797	0,022
<i>Bacillus safensis</i> M11	3,435	0,056	0,015	0,033	0,219	0,103	0,418	0,099	0,435	0,193
<i>B. safensis</i> M102	1,685	0,336	0,309	0,192	0,788	0,100	0,045	0,058	0,956	0,161
<i>B. safensis</i> M266	0,553	0,054	0,030	0,033	0,004	0,010	0,068	0,014	< 0	0,008
<i>Brevibacterium spp.</i> M129	3,563	0,072	1,497	0,421	1,404	0,392	0,163	0,040	2,818	0,481
<i>Brevundimonas vesicularis/nasdae</i> M40	0,452	0,113	0,962	0,388	0,469	0,075	0,354	0,163	0,495	0,091
<i>Chryseobacterium haifense</i> M100	0,288	0,373	< 0	0,120	< 0	0,055	0,386	0,321	< 0	0,105
<i>Corynebacterium confusum</i> M104	0,249	0,055	0,299	0,069	0,156	0,107	0,092	0,046	0,179	0,066
<i>Corynebacterium glutamicum</i> M180a	1,454	1,122	0,616	0,302	0,096	0,060	0,136	0,094	0,082	0,073
<i>Dermacoccus nishinomiyaensis</i> M263	0,402	0,075	0,044	0,050	0,064	0,066	0,068	0,077	< 0	0,022
<i>D. nishinomiyaensis</i> M293a	0,718	0,086	0,515	0,117	0,777	0,011	0,590	0,076	0,644	0,137
<i>Empedobacter falsenii</i> M93b	2,427	0,767	1,045	0,752	< 0	0,056	0,004	0,003	0,683	0,956
<i>Escherichia coli</i> M131	1,340	1,441	0,565	0,270	0,815	0,504	0,706	1,372	0,489	0,398
<i>E. coli</i> M159	1,771	0,395	0,524	0,304	0,493	0,181	0,921	0,346	0,710	0,313
<i>Kocuria kristinae</i> M62	0,586	0,515	0,142	0,140	< 0	0,026	0,064	0,045	0,088	0,128
<i>K. kristinae</i> M245	3,607	0,020	3,520	0,126	2,324	0,495	1,902	0,469	2,702	0,173
<i>Kocuria salsicia</i> M309	2,966	0,431	2,352	0,402	1,681	0,970	1,670	0,068	0,544	0,212
<i>Macrocococcus caseolyticus</i> M208	1,942	0,298	0,372	0,016	0,084	0,023	0,087	0,024	0,475	0,074
<i>Microbacterium flavum/lacticum</i> M301	1,481	0,568	0,644	0,259	0,549	0,126	1,125	0,152	0,390	0,097
<i>M. flavum/lacticum</i> M310	3,097	0,233	1,201	0,126	1,125	0,143	1,518	0,181	0,377	0,099
<i>Microbacterium maritypicum/oxydans</i> M29	0,520	0,076	0,185	0,125	0,042	0,083	0,173	0,121	0,586	0,225
<i>M. maritypicum/oxydans</i> M172	0,829	0,335	0,278	0,047	0,046	0,009	0,519	0,298	0,659	0,125
<i>Ochrobactrum anthropi</i> M72	1,904	0,971	1,034	0,850	0,966	0,539	1,406	0,455	1,275	0,642
<i>Pseudomonas gessardii</i> M152	0,914	1,497	0,088	0,090	0,013	0,017	0,276	0,393	0,372	0,347
<i>Pseudomonas koreensis</i> M92	1,793	0,653	0,071	0,047	0,058	0,039	< 0	0,004	0,376	0,052
<i>Pseudomonas poae/trivialis</i> M43	0,455	0,214	< 0	0,028	< 0	0,014	0,081	0,066	< 0	0,011

Tabelle 43 Fortsetzung...

Isolat	Biofilmentensität (Absorption 550 nm)									
	Unbehandelt		A. dest. ohne Spülen		A. dest mit Spülen		Saures DM mit Spülen		Alkal. DM mit Spülen	
	MW	σ	MW	σ	MW	σ	MW	σ	MW	σ
<i>Raoultella terrigena</i> M93a	1,906	1,158	0,165	0,083	0,116	0,083	0,077	0,058	1,721	1,116
<i>Rhizobium nepotum</i> M10	0,878	0,815	0,011	0,029	0,030	0,079	0,191	0,137	0,232	0,052
<i>Rhizobium radiobacter</i> M186	3,706	0,033	2,273	0,793	2,190	0,367	2,821	0,560	2,191	0,699
<i>Serratia marcescens</i> M27	2,283	0,186	1,112	0,071	0,585	0,069	0,796	0,145	1,000	0,093
<i>S. marcescens</i> M153	2,670	0,544	0,976	0,126	0,567	0,103	1,767	0,178	1,550	0,170
<i>Sphingobacterium spiritivorum</i> M113	2,670	0,385	1,155	0,061	0,770	0,108	0,995	0,144	0,913	0,026
<i>Sphingomonas olei/panaciterrae</i> M39	1,075	0,492	0,957	0,249	0,595	0,179	0,284	0,094	0,750	0,202
<i>Stenotrophomonas lactitubi</i> M15	1,292	0,161	0,764	0,165	0,437	0,221	0,765	0,059	1,301	0,240
<i>Stenotrophomonas maltophila</i> M154	3,451	0,125	2,128	0,212	2,043	0,337	1,811	0,239	1,794	0,514

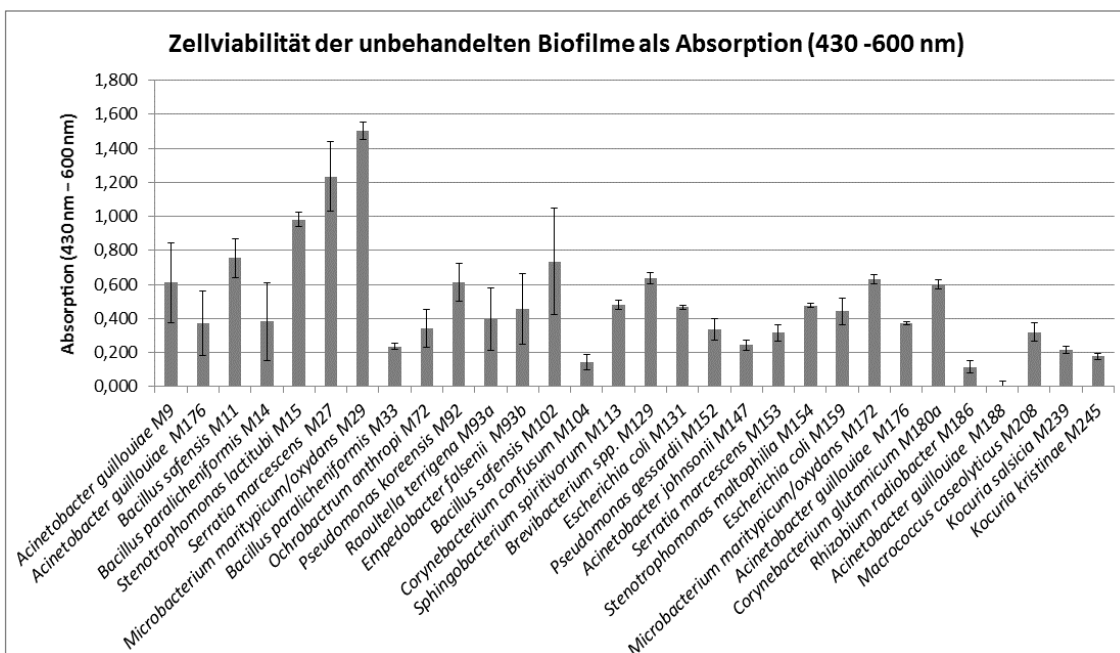


Abbildung 29: Zellviabilität als Absorption des reduzierten WST-1 (430 nm – 600 nm) der unbehandelten Biofilme. Die dargestellten Werte dienen als Ausgangswerte zur Berechnung der prozentualen Zellviabilität nach Behandlung mit Leitungswasser bzw. Reinigungs- und Desinfektionsmitteln.

Tabelle 44: Prozentuale Zellviabilität der Biofilme in Reinkultur nach Behandlung mit sterilem Leitungswasser bzw. mit dem sauren oder alkalischen Reinigungs- und Desinfektionsmittel (DM). Angegeben ist der Mittelwert (MW) der prozentualen Zellviabilität nach Abzug des Blanks und die Standardabweichung (σ) bei vier Parallelen. Die Reinigungs- und Desinfektionsmittel Circo Super SFM (sauer) und Circo Super AFM (alkalisch) wurden jeweils in der vom Hersteller empfohlenen Konzentration von 0,4 % (v/v) eingesetzt. Als Ausgangswerte zur Berechnung der prozentualen Zellviabilität dienten die Absorptionen (430 nm – 600 nm) nach Inkubation von WST-1 mit den unbehandelten Biofilmen (s. Abb. 2).

Isolat	Zellviabilität (% im Vergleich zur unbehandelten Probe)							
	Wasser ohne Spülen		Wasser mit Spülen		Saures DM		Alkal. DM	
	MW	σ	MW	σ	MW	σ	MW	σ
<i>Acinetobacter guillouiae</i> M9	38,2	4,1	12,2	5,6	7,2	4,8	9,9	3,3
<i>A. guillouiae</i> M176	23,0	4,8	14,5	5,1	1,7	1,6	10,5	6,1
<i>A. guillouiae</i> M188	kein Signal in unbehandelter Probe							
<i>Acinetobacter johnsonii</i> M147	44,9	14,9	22,1	6,8	<0	7,9	1,3	0,8
<i>Bacillus paralicheniformis</i> M14	<0	13,7	7,8	11,4	<0	3,6	3,4	2,8
<i>B. paralicheniformis</i> M33	2,6	1,1	1,3	0,6	0,3	3,1	1,9	1,7
<i>Bacillus safensis</i> M11	0,8	0,6	0,5	1,0	<0	0,2	1,7	3,8
<i>B. safensis</i> M102	6,7	3,2	0,4	0,2	4,9	7,6	7,9	8,3
<i>Brevibacterium spp.</i> M129	10,5	4,5	0,8	0,3	<0	0,3	<0	0,1
<i>Corynebacterium confusum</i> M104	61,3	94,5	10,8	14,0	<0	1,0	<0	20,2
<i>Corynebacterium glutamicum</i> M180a	25,7	2,3	0,7	1,1	<0	0,1	<0	0,8
<i>Empedobacter falsenii</i> M93b	14,9	11,7	0,4	0,1	14,0	34,0	<0	0,3
<i>Escherichia coli</i> M131	54,9	3,7	11,4	23,0	5,4	20,2	1,0	1,1
<i>E. coli</i> M159	15,2	3,2	0,8	0,8	<0	0,3	0,3	0,5
<i>K. kristinae</i> M245	86,5	56,4	13,2	7,9	32,1	14,2	9,4	3,6
<i>Kocuria salsicia</i> M239	90,6	7,0	<0	0,8	7,9	14,8	<0	0,3
<i>Macrococcus caseolyticus</i> M208	44,0	4,4	47,5	6,1	<0	0,2	0,2	0,8
<i>Microbacterium maritypicum/oxydans</i> M29	16,1	1,1	0,0	0,1	0,1	0,2	0,0	0,1
<i>M. maritypicum/oxydans</i> M172	16,9	5,4	20,1	2,2	4,0	4,0	0,0	0,3
<i>Ochrobactrum anthropi</i> M72	60,3	5,7	2,4	0,9	2,6	0,5	1,5	0,7
<i>Pseudomonas gessardii</i> M152	15,0	7,9	<0	0,1	0,1	0,4	22,9	42,8
<i>Pseudomonas koreensis</i> M92	53,8	3,5	36,7	8,9	<0	2,5	1,1	2,4
<i>Raoultella terrigena</i> M93a	4,2	1,2	0,8	0,4	14,1	16,4	0,1	0,3
<i>Rhizobium radiobacter</i> M186	34,4	10,7	6,1	0,8	<0	3,1	2,4	1,8
<i>Serratia marcescens</i> M27	20,8	2,9	0,2	0,2	2,1	2,2	1,5	1,1
<i>S. marcescens</i> M153	16,6	9,3	3,2	1,2	<0	0,4	0,2	0,3
<i>Sphingobacterium spiritivorum</i> M113	34,6	7,1	7,3	3,2	0,2	0,4	1,0	2,4
<i>Stenotrophomonas lactitubi</i> M15	15,5	6,6	0,3	0,2	2,7	0,8	<0	0,1
<i>Stenotrophomonas maltophila</i> M154	45,5	13,1	12,5	3,0	10,0	5,8	12,3	24,6

Tabelle 45: Biofilmbildung ausgewählter Isolate der Probenahme vom März 2014 in Mischkultur zu je zwei Isolaten. Das Biofilmbildungspotential der Isolate in Reinkultur ist als Absorption bei 550 nm mit Standardabweichung in Klammern blau unterlegt dargestellt. In der Matrix ist die prozentuale Zu- bzw. Abnahme der Biofilmbildung im Vergleich zur höchsten (bei Zunahme) bzw. niedrigsten (bei Abnahme) Absorption der beiden Reinkulturen angegeben. Die Prozentangaben beziehen sich auch die Mittelwerte der Absorptionen. Die Speziesbezeichnungen der Isolate befinden sich in Tabelle 47. n. d.: nicht durchgeführt; k. Ä.: keine Änderung (Absorption lag im Bereich zwischen den beiden Reinkulturen).

	M12	M17	M25	M31	M34	M40	M43	M51	M55	M58	M59	M69	M75	M76	M81
M12	0,075 (0,056)	+79,5%	-24,2%	n. d.	+225,8%	+79,1%	k. Ä.	+117,8%	-15,8%	-21,5%	k. Ä.	k. Ä.	+18,5%	k. Ä.	k. Ä.
M17	+79,5%	0,005 (0,008)	n. d.	n. d.	+95,4%	+69,4%	n. d.	+1670,0%	n. d.	k. Ä.	n. d.	+235,9%	+11,7%	n. d.	k. Ä.
M25	-24,2%	n. d.	0,095 (0,107)	+157,7%	+358,5%	k. Ä.	+179,4%	k. Ä.	k. Ä.	k. Ä.	-53,0%	+24,8%	+21,7%	-0,8%	-15,9%
M31	n. d.	n. d.	+157,7%	0,114 (0,049)	+442,7%	+17,9%	k. Ä.	+76,9%	+127,0%	k. Ä.	+13,9%	+119,9%	n. d.	+49,8%	+13,8%
M34	+225,8%	+95,4%	+358,5%	+442,7%	0,044 (0,027)	+17,0%	n. d.	+140,6%	n. d.	k. Ä.	k. Ä.	+294,1%	+21,7%	+8,9%	+16,3%
M40	+79,1%	+69,4%	k. Ä.	+17,9%	17,0%	0,400 (0,129)	-2,6%	+27,2%	k. Ä.	-29,9%	+36,9%	+55,3%	+21,7%	k. Ä.	+144,6%
M43	k. Ä.	n. d.	+179,4%	k. Ä.	n. d.	-2,6%	0,550 (0,220)	+17,7%	-22,0%	k. Ä.	k. Ä.	+62,9%	n. d.	+154,7%	+80,3%
M51	+117,8%	+1670,0%	k. Ä.	+76,9%	+140,6%	+27,2%	+17,7%	-0,027 (0,016)	+176,1%	k. Ä.	k. Ä.	k. Ä.	+236,5%	+89,9%	+45,4%
M55	-15,8%	n. d.	k. Ä.	+127,0%	n. d.	k. Ä.	-22,0%	+176,1%	0,194 (0,150)	+107,2%	+168,7%	k. Ä.	n. d.	+21,4%	+61,2%
M58	-21,5%	k. Ä.	k. Ä.	k. Ä.	k. Ä.	-29,9%	k. Ä.	k. Ä.	+107,2%	0,244 (0,028)	+154,9%	-78,6%	k. Ä.	+147,7%	-61,7%
M59	k. Ä.	n. d.	-53,0%	+13,9%	k. Ä.	+36,9%	k. Ä.	k. Ä.	+168,7%	+154,9%	0,207 (0,055)	+36,1%	n. d.	+23,7%	+91,6%
M69	k. Ä.	+235,9%	+24,8%	+313,7%	+294,1%	+55,3%	+62,9%	k. Ä.	k. Ä.	-78,6%	+36,1%	0,214 (0,108)	+228,0%	+8,7%	+0,6%
M75	+18,5%	+11,7%	+21,7%	n. d.	+2645,1%	k. Ä.	n. d.	+236,5%	n. d.	k. Ä.	n. d.	+228,0%	0,056 (0,042)	n. d.	k. Ä.
M76	+14,8%	n. d.	-0,8%	+49,8%	+8,9%	k. Ä.	+154,7%	+89,9%	+21,4%	+147,7%	+23,7%	+8,7%	n. d.	0,090 (0,034)	k. Ä.
M81	k. Ä.	k. Ä.	-15,9%	+13,8%	+16,3%	+144,6%	k. Ä.	+45,4%	+61,2%	-61,7%	+91,6%	+0,6%	k. Ä.	k. Ä.	0,254 (0,108)

Tabelle 46: Biofilmbildung ausgewählter Isolate der Probenahme vom August 2014 in Mischkultur zu je zwei Isolaten. Das Biofilmbildungspotential der Isolate in Reinkultur ist als Absorption bei 550 nm mit Standardabweichung in Klammern blau unterlegt dargestellt. In der Matrix ist die prozentuale Zu- bzw. Abnahme der Biofilmbildung im Vergleich zur höchsten (bei Zunahme) bzw. niedrigsten (bei Abnahme) Absorption der beiden Reinkulturen angegeben. Die Prozentangaben beziehen sich auch die Mittelwerte der Absorptionen. Die Speziesbezeichnungen der Isolate befinden sich in Tabelle 47. n. d.: nicht durchgeführt; k. Ä.: keine Änderung (Absorption lag im Bereich zwischen den beiden Reinkulturen).

	M99	M100	M105	M115	M117	M127	M128	M130	M136	M137	M146	M150
M99	0,054 (0,138)	+242,8%	+52,3%	+189,3%	+252,6%	+128,8%	+42,1%	+129,8%	k. Ä.	+163,0%	+418,5%	+44,1%
M100	+242,8%	0,189 (0,193)	-74,5%	+199,7%	+310,7%	k. Ä.	106,6%	k. Ä.	2,4%	47,9%	+7,4%	+35,4%
M105	+52,3%	-74,5%	0,172 (0,214)	+8,0%	k. Ä.	k. Ä.	-24,9%	+10,6%	+122,3%	36,2%	+358,0%	+139,8%
M115	+189,3%	+199,7%	8,0%	0,018 (0,017)	k. Ä.	+170,5%	+15,8%	+89,2%	k. Ä.	2,0%	+349,6%	+13,6%
M117	+252,6%	+310,7%	k. Ä.	k. Ä.	0,562 (0,501)	k. Ä.	+71,0%	+61,0%	+39,4%	k. Ä.	+51,2%	k. Ä.
M127	+128,8%	k. Ä.	k. Ä.	+170,5%	k. Ä.	0,020 (0,047)	+20,0%	+579,9%	k. Ä.	+48,7%	+652,5%	k. Ä.
M128	+42,1%	+106,6%	k. Ä.	+15,8%	+71,0%	+20,0%	0,687 (0,366)	+186,0%	+28,7%	k. Ä.	+68,5%	k. Ä.
M130	+129,8%	k. Ä.	+10,6%	+89,2%	+61,0%	+579,9%	+186,0%	0,035 (0,029)	+70,3%	+8,7%	+451,7%	k. Ä.
M136	k. Ä.	+1,5%	+122,3%	k. Ä.	+39,4%	k. Ä.	+28,7%	+70,3%	0,187 (0,157)	+569,8%	+458,7%	+146,0%
M137	+163,0%	+47,9%	+36,2%	+2,0%	k. Ä.	+48,7%	k. Ä.	+8,7%	+569,8%	0,113 (0,084)	-95,1%	+28,8%
M146	+418,5%	+7,4%	+358,0%	+349,6%	+51,2%	+652,5%	+68,5%	+451,7%	+458,7%	-95,1%	0,097 (0,062)	-53,0%
M150	+44,1%	+35,4%	+139,8%	+13,6%	k. Ä.	k. Ä.	k. Ä.	k. Ä.	+146,0%	+28,8%	-53,0%	0,174 (0,086)

Tabelle 47: Zusammensetzung der Mischkulturen.

Mischkulturen der Isolate der ersten Probenahme (März 2014, Tabelle 5)		Mischkulturen der Isolate der zweiten Probenahme (August 2014, Tabelle 6)	
Isolat	Spezies	Isolat	Spezies
M12	<i>Arthrobacter rusicus</i>	M99	<i>Shinella zoogloeoides</i>
M17	<i>Curtobacterium oceanosedimentum</i>	M100	<i>Chryseobacterium haifense</i>
M25	<i>Bacillus marisflavi</i>	M105	<i>Staphylococcus cohnii</i>
M31	<i>Pantoea agglomerans</i>	M115	<i>Microbacterium testaceum</i>
M34	<i>Staphylococcus cohnii</i>	M117	<i>Agrobacterium pusense</i>
M40	<i>Brevundimonas vesicularis/nasdae</i>	M127	<i>Shinella zoogloeoides</i>
M43	<i>Pseudomonas poae/trivialis</i>	M128	<i>Agrobacterium pusense</i>
M51	<i>Microbacterium flavum/lacticum</i>	M130	<i>Kocuria salsicia</i>
M55	<i>Pandoraea pnomenus</i>	M136	<i>Microvirgula aerodenitrificans</i>
M58	<i>Microbacterium maritypicum/oxydans</i>	M137	<i>Paenibacillus cineris</i>
M59	<i>Leifsonia soli</i>	M146	<i>Bacillus thuringiensis/paranthracis</i>
M69	<i>Gordonia paraffinivorans</i>	M150	<i>Kurthia gibsonii</i>
M75	<i>Bacillus clausii</i>		
M76	<i>Curtobacterium oceanosedimentum</i>		
M81	<i>Leifsonia soli</i>		

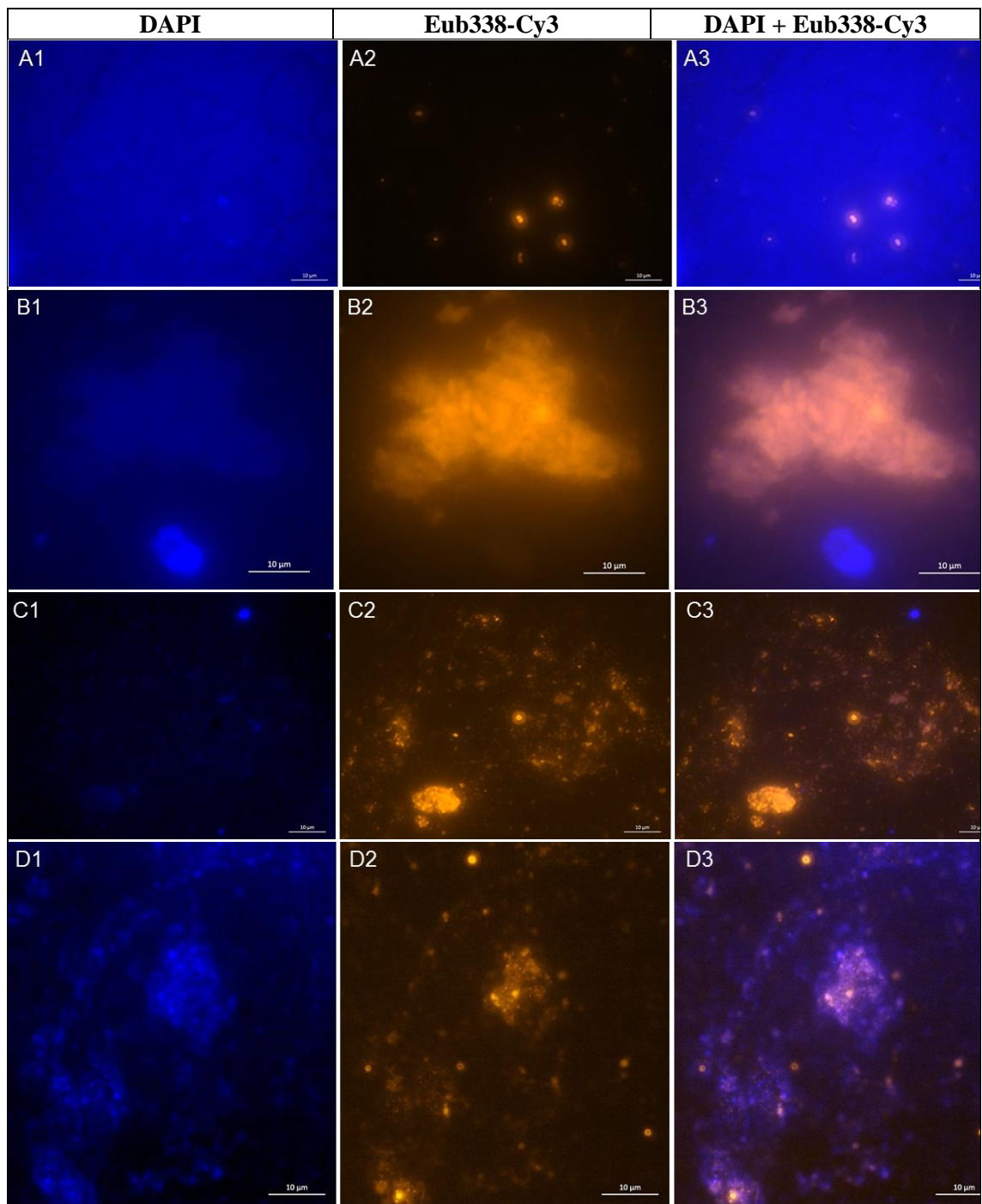


Abbildung 30: Probleme bei der Auswertung von Mikroskopaufnahmen nach Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung von in die Melkanlage verbrachten Edelstahlcoupons. Auf der linken Seite sind die Aufnahmen im DAPI-Kanal dargestellt, in der Mitte dasselbe Bild im Cy3-Kanal und rechts die zusammengeführten Bilder aus beiden Kanälen. Gleiche Buchstaben kennzeichnen zusammengehörige Bilder, die Zahlen dahinter verschiedene Kanäle. Der dargestellte Maßstabsbalken auf jedem Bild entspricht einer Länge von 10 µm. Alle Aufnahmen wurden mit 1.000-facher Vergrößerung angefertigt.

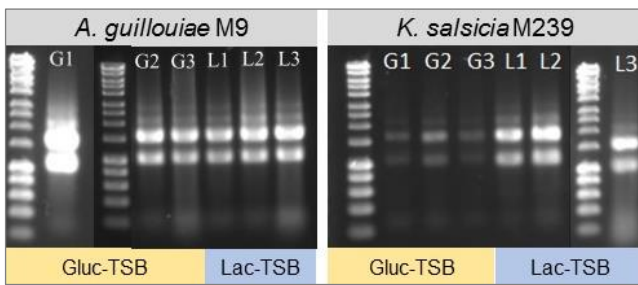


Abbildung 31: 1 %-Agarosegel mit RNA-Extrakten der auf einheitliche $OD_{625\text{ nm}}$ gebrachten Kulturüberstände und auf Edelstahlcoupons gebildeten Biofilme der Isolate *A. guillouiae* M9 und *K. salscicia* M239 nach Inkubation in Glucose-haltiger TSB bzw. Lactose-TSB im Dreifachansatz.

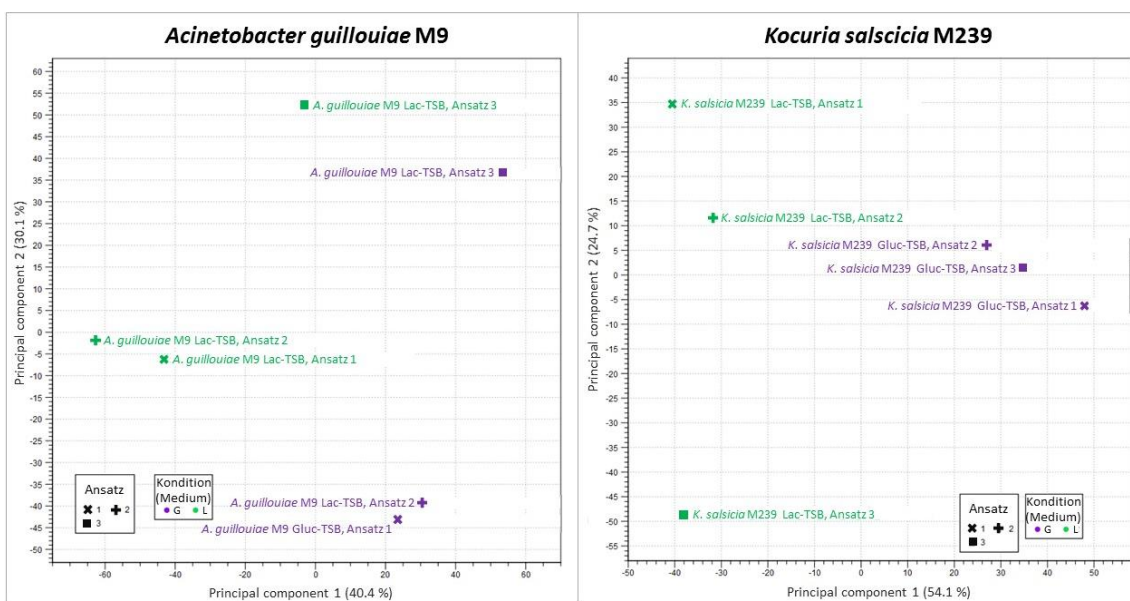


Abbildung 32: Principal Component Analyse (PCA) der differentiellen Transkriptomanalyse mit RNA-Seq-Daten der Isolate *A. guillouiae* M9 und *K. salscicia* M239. Für jede Kondition wurden drei biologische Parallelen (Ansatz 1-3) durchgeführt. Bei den gegenübergestellten Konditionen handelte es sich um die Biofilmbildung in Glucose-TSB (G, violett) und Lactose-TSB (L, grün).

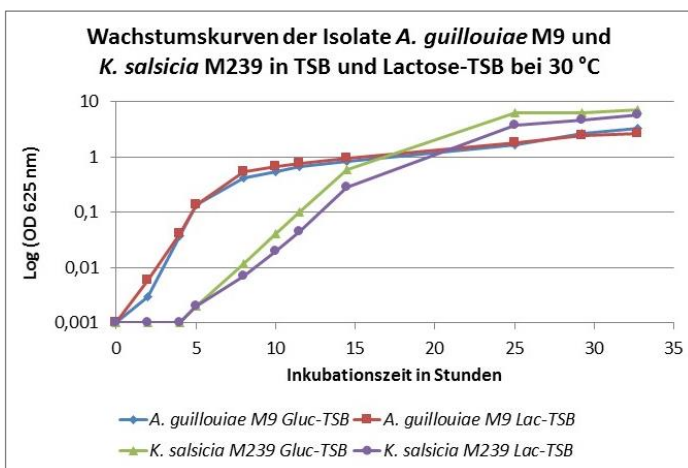


Abbildung 33: Wachstumskurven der Isolate *Acinetobacter guillouiae* M9 und *Kocuria salscicia* M239 bei Inkubation in Glucose- und Lactose-haltiger TSB bei 30 °C unter leichtem Schütteln (120 rpm).

Tabelle 48: Ausgewählte differentiell stärker in Glucose exprimierte Gene von *Acinetobacter guillouiae* M9. Die Gene sind jeweils repräsentativ für einen übergeordneten Funktionsbereich angegeben. Die den Genen zugewiesenen GO-Term-Funktionen sowie der \log_2 fold-change der Genexpression und die statistischen Kenngrößen p-Wert, False Discovery Rate (FDR) und Bonferroni-Wert sind ebenfalls aufgeführt. Zusätzlich ist, falls möglich, die Gesamtanzahl ähnlicher Gene angegeben. Folgende Kriterien gelten für statistisch signifikante Ergebnisse: $p \leq 0,05$; $FDR \leq 0,05$; $Bonferroni \leq 0,1$.

Ausgewählte differentiell <u>positiv</u> exprimierte Gene, d. h. Glucose > Lactose						
Genbezeichnung/ Protein	GO-Term-Funktionen	\log_2 fold-change	p-Wert	FDR	Bonferroni	# ähnl. Gene
Translation						
LSU ribosomales Protein L36p	Bestandteil von Ribosomen, Translation	8,8	$1,3 \cdot 10^{-4}$	0,001	0,55	23
Folsäure-Metabolismus						
Dihydrofolat-Synthase/ Folylpolyglutamat-Synthase	Folsäure-Biosynthese, Cofaktor-Biosynthese	5,3	$5,6 \cdot 10^{-16}$	$1,5 \cdot 10^{-14}$	$2,4 \cdot 10^{-12}$	/
Pilus/Adhäsion/Biofilmbildung						
fimA (Typ I Fimbrien-Untereinheit A)	Pilus-Assembly, Adhäsion	2,6	0	0	0	26
fimD (Typ I Fimbrien-Verankerungsprotein)		1,9	0	0	0	
CsuA (Typ I Pilus-Protein)	Pilus	1,8	0,009	0,04	1,0	
SfmH (Fimbriae-like-Adhäsion)	Pilus, Adhäsion	1,3	$4,3 \cdot 10^{-5}$	$4,1 \cdot 10^{-4}$	0,19	
PilH (Twitching motility-Protein)	Phosphorelay Signal-Transduktionssystem	0,6	0,03	0,1	1,0	
PilN (Typ IV Pilus-Biogenese-Protein)	Pilus-Biogenese, Beweglichkeit	0,8	0,003	0,02	1,0	
PilP (Typ IV Pilus Biogenese-Protein)	Pilus-Biogenese, Beweglichkeit	1,2	0,02	0,07	1,0	
Outer membrane usher Protein	Pilus-Assembly	1,1	$1,5 \cdot 10^{-6}$	$1,9 \cdot 10^{-5}$	0,006	
SfmC (Fimbrien-Chaperon)	Pilus-Organisation, Chaperon-vermittelte Proteinfaltung, Zellwandorganisation	2,2	$1,2 \cdot 10^{-12}$	$2,6 \cdot 10^{-11}$	$5,0 \cdot 10^{-9}$	
FlgJ (Flagellenprotein, Peptidoglycan-Hydrolase)	Flagellum-Assembly, Zellwandorganisation	0,9	$3,9 \cdot 10^{-7}$	$5,4 \cdot 10^{-6}$	0,002	
Pathogenitätsfaktoren						
T1SS sekretiertes Agglutinin RTX	u.a. Pathogenese, Adhäsion; Bindung von Ca^{2+} -Ionen	2,3	0	0	0	/
Phagen-assoziierte Proteine						
Phagen-Protein		2,5	$1,5 \cdot 10^{-7}$	$2,1 \cdot 10^{-6}$	$6,3 \cdot 10^{-4}$	47
Reaktion auf Stimulus/Stress						
Bakteriolytisches Lipoprotein Entericidin B	Antwort auf toxische Substanz, membranassoziiert	5,6	0,01	0,06	1,0	/
RNA-Polymerase Sigma-70-Faktor, ECF-Superfamilie	Reaktion auf div. Stressoren, Regulation der Transkription	1,2	0,14	0,30	1,0	3
TerD (Tellurium-Resistenzprotein)	Antwort auf Stress/Telluriumion	1,1	$1,8 \cdot 10^{-10}$	$3,4 \cdot 10^{-9}$	$7,7 \cdot 10^{-7}$	5
Endonuklease V	DNA-Reparatur	1,1	0,005	0,03	1,0	/

Tabelle 48 Fortsetzung...

Ausgewählte differentiell positiv exprimierte Gene, d. h. Glucose > Lactose						
Genbezeichnung/ Protein	GO-Term-Funktionen	log ₂ fold-change	P-Wert	FDR	Bonferroni	# ähnl. Gene
Oxidoreduktasen						
Mangansuperoxiddismutase	Antioxidative Aktivität, Entfernung von Superoxidionen, Antwort auf div. Stressoren	1,9	1,9 · 10 ⁻⁶	2,3 · 10 ⁻⁵	8,0 · 10 ⁻³	3
CueO-Vorläufer (Kupfer-Oxidase)	Detoxifizierung von Kupfer-Ionen	1,5	0,09	0,22	1,0	/
Transmembran-Transport						75
adeT (RND Multidrug-Efflux-Transporter)	Wirkstoff-Transmembrantransport, Efflux	2,3	0,10	0,24	1,0	6
LapE (Typ I-Sekretionssystem, Komponente in äußerer Membran)	Efflux-Transmembrantransport	1,4	7,8 · 10 ⁻⁴	0,005	1,0	4
gspD (Genereller Sekretionsweg Protein D)	Proteinsekretion über den Typ II-Sekretionsweg	0,9	1,5 · 10 ⁻⁷	2,1 · 10 ⁻⁶	6,3 · 10 ⁻⁴	/
VgrG (Typ VI-Sekretionssystem)		1,0	3,3 · 10 ⁻⁸	5,0 · 10 ⁻⁷	1,4 · 10 ⁻⁴	
VirB6 (Inneres Membranprotein des Typ IV-Sekretionssystems des T-DNA-Komplexes)	Proteinsekretion durch Typ IV-Sekretionssystem	0,8	1,3 · 10 ⁻⁵	1,4 · 10 ⁻⁴	0,06	11
VirB11 (ATPase benötigt für Assembly des Typ IV-Sekretionskomplexes und Sekretion des T-DNA-Komplexes)	Sekretion durch Typ IV-Sekretionssystem	1,1	1,1 · 10 ⁻¹²	2,5 · 10 ⁻¹¹	4,8 · 10 ⁻⁹	
TatA (Twin-Arginin-Translokationsprotein)	Proteinsekretion, Proteintransport über den Tat-Komplex	1,5	0,02	0,06	1,0	3
Aerober C4-Dicarboxylat-Transporter (für Fumarat, Malat, Succinat)	Transmembrantransport (Periplasma → innere Membran)	2,2	0	0	0	/
EcbD/TolR (Biopolymer-Transportprotein)	Protein-Transmembrantransport, Bacteriocin-Transport	1,4	0	0	0	
Ferrichrom-Eisen-Rezeptor (stellvertretend)	Siderophor-Transport, Rezeptor-Aktivität, Eisen-Bindung	1,7	7,8 · 10 ⁻¹⁵	2,1 · 10 ⁻¹³	3,4 · 10 ⁻¹¹	
TonB-abhängiger Rezeptor, Rezeptor für Ferrienterochelin und Colicine	Siderophor-Transport	1,3	6,7 · 10 ⁻¹⁰	1,2 · 10 ⁻⁸	2,9 · 10 ⁻⁶	21
TonB-Protein	(Rezeptor-vermittelter) Proteintransport, Colicin-Transport, Siderophor-Transport	0,8	8,4 · 10 ⁻⁴	0,006	1,0	
Fe ²⁺ -Transportprotein	Eisen-Transmembrantransport, Eisenionen-Homöostase	1,5	3,6 · 10 ⁻¹³	8,5 · 10 ⁻¹²	1,6 · 10 ⁻⁹	/
FecA (Fe ³⁺ -Dicitrat-Transportprotein)	Eisenion-Transport, Eisen-Homöostase, Siderophor-Transport	0,8	6,2 · 10 ⁻⁶	6,8 · 10 ⁻⁵	0,03	/

Tabelle 48 Fortsetzung...

Ausgewählte differentiell positiv exprimierte Gene, d. h. Glucose > Lactose						
Genbezeichnung/ Protein	GO-Term-Funktionen	log ₂ fold-change	p-Wert	FDR	Bonferroni	# ähnl. Gene
Transmembran-Transport Fortsetzung...						75
Putatives Co/Zn/Cd Efflux-System, Membran-Fusions-Protein	Transmembrantransport von Metallionen/Kationen	1,2	8,2 · 10 ⁻⁴	0,005	1,0	
CzcC-Familie (Schwermetall-RND-Efflux Protein)	Efflux-Transmembrantransport	1,0	2,4 · 10 ⁻⁶	2,9 · 10 ⁻⁵	0,01	9
CzcD (Cobalt-Zink-Cadmium-Resistenzprotein)	Transmembrantransport von Metallionen/Kationen	1,0	7,4 · 10 ⁻⁵	6,8 · 10 ⁻⁴	0,32	
DcaP (Porin)	Porin	1,2	0,003	0,02	1,0	2
MotA/TolQ/ExbB (Protonenkanal-Familie)	Transmembrantransport von Proteinen	1,1	1,9 · 10 ⁻¹¹	3,9 · 10 ⁻¹⁰	8,2 · 10 ⁻⁸	2
TolA (Membran-Integritätsprotein)	Bacteriocin-Transport, Zellteilung, Eintritt von Viren in die Zelle	1,1	9,3 · 10 ⁻¹⁰	1,7 · 10 ⁻⁸	4,0 · 10 ⁻⁶	/
DppB (Dipeptid-Transportsystem, Permease-Protein)	Transmembrantransport	0,9	7,6 · 10 ⁻⁴	0,005	1,0	
DppD (Dipeptid-Transportsystem, ATP-bindendes-Protein)	Peptid-Transport	0,8	8,1 · 10 ⁻⁸	7,2 · 10 ⁻⁴	0,35	3
GltJ (Glutamat-/Aspartat-Transport, Permeaseprotein)	Transmembrantransport von Aminosäuren (Glutamat/Aspartat)	0,8	4,9 · 10 ⁻⁷	6,7 · 10 ⁻⁶	0,002	
GltL (Glutamat-/Aspartat-Transport, ATP-bindendes Protein)	Transmembrantransport von Aminosäuren (Glutamat/Aspartat)	0,9	1,6 · 10 ⁻⁶	2,0 · 10 ⁻⁵	0,007	4
OppB (Oligopeptid-Transportsystem, Permeaseprotein)	Protein-Transmembrantransport	0,8	4,7 · 10 ⁻⁴	0,003	1,0	5
PcaT (Dicarboxylsäure-Transporter)	Transmembrantransport	0,8	2,5 · 10 ⁻⁷	3,5 · 10 ⁻⁶	0,001	/
PstA (Phosphat-Transportsystem, Permease-Protein)	Transmembrantransport von Phosphationen	0,6	3,8 · 10 ⁻⁴	0,003	1,0	3
BetT (hochaffines Cholin-Uptake-Protein)	Glycinbetain-Synthese aus Cholin, Aufnahme stickstoffhaltiger Verbindungen	0,6	3,5 · 10 ⁻⁴	0,003	1,0	/
Natrium/Glutamat-Symportsystem	Aspartat-/Glutamat-Transmembrantransport	0,6	2,5 · 10 ⁻⁴	0,002	1,0	/
Aminosäure-Metabolismus						
Ornithin-Cyclodeaminase	L-Prolin-Biosynthese	2,0	1,2 · 10 ⁻⁴	0,001	0,52	
NAD-spezifische Glutamat-Dehydrogenase	Glutamat-Katabolismus zu 2-Oxoglutarat	0,6	4,5 · 10 ⁻⁴	0,003	1,0	
L-Lactat-Permease	Lactat-Transmembrantransport, Antwort auf DNA-Schädigung	1,7	0	0	0	
D-Lactat-Dehydrogenase	Lactat-Oxidation, Atmungskette	1,3	5,6 · 10 ⁻¹⁴	1,4 · 10 ⁻¹²	2,4 · 10 ⁻¹⁰	
LldR (Lactat-abhängiger Regulator)	Transkription	1,3	5,0 · 10 ⁻⁹	8,3 · 10 ⁻⁸	2,1 · 10 ⁻⁵	

Tabelle 48 Fortsetzung...

Ausgewählte differentiell positiv exprimierte Gene, d. h. Glucose > Lactose					
Genbezeichnung/ Protein	GO-Term-Funktionen	log ₂ fold-change	p-Wert	FDR	Bonferroni
Propionat-Metabolismus					
Methylisocitrat-Lyase	Propionat-Katabolismus, 2-Methylcitrat-Zyklus	0,9	8,1 · 10 ⁻⁷	1,1 · 10 ⁻⁵	0,004
2-Methyloaconitat- <i>cis-trans</i> -Isomerase	Propionat-Katabolismus, 2-Methylcitrat-Zyklus	1,0	5,9 · 10 ⁻⁹	9,8 · 10 ⁻⁸	2,5 · 10 ⁻⁵
Lipid-Metabolismus					
3-Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase	Fettsäure-beta-Oxidation	1,6	1,7 · 10 ⁻⁹	3,0 · 10 ⁻⁸	7,3 · 10 ⁻⁶
Mittelkettige-Fettsäure-CoA-Ligase	Fettsäure-beta-Oxidation	0,8	1,9 · 10 ⁻⁴	0,002	0,84
Biotin-Carboxyl-Carrier Protein der Acetyl-CoA-Carboxylase	Fettsäurebiosynthese, Malonyl-CoA-Biosynthese	0,8	4,1 · 10 ⁻⁶	4,6 · 10 ⁻⁵	0,02
Fettsäure-Desaturase	Biosynthese ungesättigter Fettsäuren	1,5	1,1 · 10 ⁻⁴	9,6 · 10 ⁻⁴	0,48
Horizontaler Gentransfer (HGT)					
TraA (Konjugatives Transferprotein/ Relaxase)	Konjugation	1,5	4,5 · 10 ⁻¹³	1,1 · 10 ⁻¹¹	2,0 · 10 ⁻⁹
TraC (Konjugatives Transferprotein)	Konjugation	1,3	9,8 · 10 ⁻⁴	0,006	1,0
TraD (Konjugatives Transferprotein)	Konjugation	1,5	8,9 · 10 ⁻¹⁶	2,5 · 10 ⁻¹⁴	8,3 · 10 ⁻¹²
TraE (Konjugatives Transferprotein/ Pilus-Assembly)	Konjugation	1,2	2,1 · 10 ⁻⁴	0,002	0,89
TraH (Konjugatives Transferprotein/ Pilus-Assembly)	Konjugation	0,9	7,5 · 10 ⁻⁵	6,8 · 10 ⁻⁴	0,32
TraU (IncF-Plasmid konjugatives Transferprotein/ Pilus-Assembly)	Konjugation	1,2	1,3 · 10 ⁻⁴	0,001	0,56
TrbI (Konjugatives Transferprotein)	Konjugation	1,0	3,3 · 10 ⁻⁹	5,6 · 10 ⁻⁸	1,4 · 10 ⁻⁵
Resolvase	DNA-Rekombination, DNA-Reparatur	0,8	0,002	0,01	1,0
Metabolismus aromatischer Verbindungen					
Aromatischer Ring-hydroxylierende Dioxygenase	Katabolismus aromatischer Verbindungen	1,1	0,09	0,22	1,0
Catechol-1,2-Dioxygenase	beta-Ketoadipat-Weg, Metabolismus catechin-haltiger Verbindungen	0,9	0,004	0,02	1,0
Nukleotid-Metabolismus					
MazG (Nukleosidtriphosphat-Pyrophosphohydrolase)	Antwort auf Nährstoffmangel; Katabolismus von dATP, dGTP, dTTP, dUTP, TTP und UTP	1,1	0,005	0,02	1,0
YhgH (Verstoffwechselung von DNA als einzige Energiequelle), Kompetenzprotein F-Homolog	DNA-Katabolismus, Nukleosid-Metabolismus	0,9	0,29	0,50	1,0
Enoyl-(Acyl-Carrier-Protein)-Reduktase [FMN]	'de novo'-Pyrimidin-Nukleobasen-Biosynthese	0,8	0,003	0,02	1,0
Thymidylat-Kinase	dTDP-, dTTP, dUDP-Biosynthese, Pyrimidin-Metabolismus	0,6	7,1 · 10 ⁻⁴	0,005	1,0

Tabelle 48 Fortsetzung...

Ausgewählte differentiell positiv exprimierte Gene, d. h. Glucose > Lactose						
Genbezeichnung/ Protein	GO-Term-Funktionen	log ₂ fold-change	p-Wert	FDR	Bonferroni	# ähnl. Gene
Zellwandorganisation/Peptidoglykan-Biosynthese						
(Peptidoglykan-) Glykosyl-Transferase	Peptidoglykan-Biosynthese, Zellwandorganisation; Transfer von Pentosyl-Resten	1,0	4,0 · 10 ⁻⁶	4,5 · 10 ⁻⁵	0,02	
Lösliche lytische Murein-Transglycosylase, Vorläufer	Peptidoglykan-Biosynthese, Zellwandorganisation	0,6	2,1 · 10 ⁻⁴	0,002	0,92	
Poly-(Glycerol-Phosphat)-alpha-Glucosyltransferase	Teichonsäure-Biosynthese, Zellwandorganisation	0,9	9,8 · 10 ⁻⁷	1,3 · 10 ⁻⁵	0,004	
Phospholipid-Metabolismus						
Phosphatidat-Cytidylyl-Transferase	CDP-Diacylglycerol, Phospholipid-Biosynthese	0,6	0,002	0,01	1,0	
CDP-Diacylglycerol-glycerol-3-phosphat-3-phosphatidyltransferase	Phospholipid-Biosynthese	0,8	0,004	0,02	1,0	
Glycerol-3-phosphat-Acyltransferase	Phospholipid-Biosynthese	0,7	7,8 · 10 ⁻⁴	0,005	1,0	
Citrat-Zyklus/Tricarboxylsäure (TCA)-Zyklus						
NAD-abhängiges Malic-Enzym	Malat-Dehydrogenase, Oxalacetat-Decarboxylase	1,1	6,6 · 10 ⁻¹²	1,4 · 10 ⁻¹⁰	2,9 · 10 ⁻⁸	
Citrat-Lyase	Acetyl-CoA-Metabolismus	1,0	1,9 · 10 ⁻⁸	3,0 · 10 ⁻⁷	8,3 · 10 ⁻⁵	
Aspartat-Ammoniak-Lyase	Aspartat-Metabolismus, Tricarboxylsäurezyklus	0,7	5,2 · 10 ⁻⁴	0,004	1,0	
Phosphoenolpyruvat-Carboxylase	Tricarboxylsäurezyklus, Oxalacetat-Metabolismus, Kohlenstoffixierung	0,6	7,6 · 10 ⁻⁵	6,9 · 10 ⁻⁴	0,33	
Succinyl-CoA-Ligase [ADP-bildend], Alpha-Kette	Tricarboxylsäurezyklus	0,6	3,9 · 10 ⁻⁵	3,7 · 10 ⁻⁴	0,17	
2-Methylcitrat-Synthase	Tricarboxylsäurezyklus	0,6	3,4 · 10 ⁻⁴	0,003	1,0	
Regulation der Genexpression						
RelE	Toxin-Antitoxin-System	1,0	4,4 · 10 ⁻⁴	3,2 · 10 ⁻³	1,0	2
Diguanylat-Cyclase/Phosphodiesterase	c-di-GMP-Synthese/Hydrolyse	0,9	0,03	0,1	1,0	
CheA (Histidin-Kinase)	Zwei-Komponenten-System	0,7	7,0 · 10 ⁻⁵	6,4 · 10 ⁻⁴	0,3	
Diverse Gene						
OmpA (Äußeres Membranprotein A)	Konjugation, Eintritt von Viren in die Zelle, Porin-Aktivität, Ionen-Transport	1,0	4,6 · 10 ⁻⁵	4,3 · 10 ⁻⁴	0,2	
Ferredoxin, 2Fe-2S	Eisen-Schwefel-Cluster-Assembly, Elektronentransfer	2,3	0,03	0,11	1,0	
PiuB (Eisen-Uptake-Faktor)	Oxidoreduktase-Aktivität, FMN-Bindung	1,3	2,1 · 10 ⁻¹⁵	5,7 · 10 ⁻¹⁴	9,1 · 10 ⁻¹²	
Zeta-Toxin		1,0	1,8 · 10 ⁻⁹	3,3 · 10 ⁻⁸	8,0 · 10 ⁻⁶	

Tabelle 49: Ausgewählte differentiell schwächer in Glucose exprimierte Gene von *Acinetobacter guillouiae* M9. Die Gene sind jeweils repräsentativ für einen übergeordneten Funktionsbereich angegeben. Die den Genen zugewiesenen GO-Term-Funktionen sowie der \log_2 fold-change der Genexpression und die statistischen Kenngrößen p-Wert, False Discovery Rate (FDR) und Bonferroni-Wert sind ebenfalls aufgeführt. Zusätzlich ist, falls möglich, die Gesamtanzahl ähnlicher Gene angegeben. Folgende Kriterien gelten für statistisch signifikante Ergebnisse: $p \leq 0,05$; $FDR \leq 0,05$; $Bonferroni \leq 0,1$.

Ausgewählte differentiell negativ exprimierte Gene, d. h. Glucose < Lactose						
Genbezeichnung/ Protein	GO-Term-Funktionen	\log_2 fold-change	p-Wert	FDR	Bonferroni	# ähnl. Gene
Oxidoreduktasen						
Coenzym F420-abhängige N5, N10-methylen-Tetrahydromethanopterin-reduktase u. verwandte Flavin-abhängige Oxidoreduktasen	Monooxygenase	- 7,2	0	0	0	4
Alkylhydroperoxid-Reduktase, Untereinheit C-ähnliches Protein	Zell-Redoxhomöostase	- 5,1	0	0	0	
Alkyl Hydroperoxid-Reduktase Protein F	Zell-Redoxhomöostase, Reaktion auf ROS	- 2,8	0	0	0	4
Alkyl-Hydroperoxid-Reduktase Protein C	Peroxidase-Aktivität	- 1,2	0,003	0,008	1,0	
Thioredoxin	Zell-Redox-Homöostase	- 3,3	0	0	0	2
Alkansulfonat-Metabolismus						
SsuB (Alkansulfonat-ABC-Transporter, ATP-bindendes Protein)	Transmembrantransport	- 6,0	0	0	0	
Alkansulfonat-bindendes Protein	Transmembrantransport, Regulation der Transkription	- 6,3	0	0	0	
Alkansulfonat-Transportsystem, Permease-Protein	Transmembrantransport	- 6,1	0	0	0	12
CbI (Alkansulfonat-Verwertungs-Operon LysR-Familien Regulator)	Transkriptionsfaktor-Aktivität	- 5,4	0	0	0	
Alkansulfonat-Monooxygenase	Monooxygenase	- 6,8	0	0	0	
Schwefel-Metabolismus						
CysA (Sulfat- und Thiosulfat-Import, ATP-bindendes Protein)	Sulfat- und Thiosulfat-Transmembrantransport	- 6,0	0	0	0	
CysP (Sulfat- und Thiosulfat-bindendes Protein)	Sulfat- und Thiosulfat-Transmembrantransport	- 6,6	0	0	0	
CysT (Sulfat-Transportsystem, Permease-Protein)	Sulfat-Transmembrantransport	- 6,0	0	0	0	9
CysW (Sulfat-Transportsystem, Permease-Protein)	Sulfat-Transmembrantransport, ATP-abhängig	- 6,0	0	0	0	
Sbp (Sulfat-bindendes Protein)	Sulfat-Transport, Metabolismus schwefelhaltiger Verbindungen	- 4,0	0	0	0	
Sulfit-Reduktase [NADPH] Häm-Protein beta-Komponente	Sulfit-Reduktion zu Sulfat	- 3,5	0	0	0	
Sulfat-Adenylyltransferase, Untereinheit 1	Sulfat-Assimilation, Schwefelwasserstoff-Biosynthese	- 1,9	0	0	0	5
Phosphoadenylyl-Sulfat-Reduktase [Thioredoxin]/Adenylyl-Sulfat-Reduktase [Thioredoxin]	Sulfat-Assimilation, Schwefelwasserstoff-Biosynthese, Cystein-Metabolismus	- 1,5	0	0	0	

Tabelle 49 Fortsetzung...

Ausgewählte differentiell negativ exprimierte Gene, d. h. Glucose < Lactose						
Genbezeichnung/ Protein	GO-Term-Funktionen	log ₂ fold-change	P-Wert	FDR	Bonferroni	# ähnl. Gene
Schwefel-Metabolismus Fortsetzung...						
Acyl-CoA-Dehydrogenase; wahrsch. Dibenzothiophen-Entschwefelungsenzym	Oxidoreduktase, Metabolismus schwefelhaltiger Verbindungen	- 7,1	0	0	0	6
Dibenzothiophen-Entschwefelungsenzym B	Dibenzothiophen-Katabolismus	- 1,5	0,02	0,05	1,0	
Eisen-Metabolismus						
Bacterioferritin	Eisenion-Transport, Eisenhomöostase, Eisenspeicher	- 1,1	1,1 · 10 ⁻¹⁶	3,2 · 10 ⁻¹⁵	4,8 · 10 ⁻¹³	2
Transport						89
ABC-Typ Nitrat-/ Sulfonat-/ Bicarbonat-Transportsysteme, periplasmatische Komponenten	ATP-gekoppelter Transmembrantransport	- 5,8	0	0	0	19
Methionin-ABC-Transporter, substratbindendes Protein	Transmembrantransport	- 5,7	0	0	0	
Aminosäure-ABC-Transporter, ATP-bindendes Protein	Transmembrantransport von Aminosäuren	- 3,8	0	0	0	
Lysin-Arginin-Ornithin-bindendes periplasmatisches Protein, Vorläufer	Transport von Stickstoffverbindungen/Aminosäuren	- 3,5	0	0	0	
LysE Familie (Transporter)	Aminosäure-Transport	- 3,5	0	0	0	2
AroP (Aromatische Aminosäuren-Transportprotein)	Aminosäure-Transport	- 1,2	1,3 · 10 ⁻⁵	1,4 · 10 ⁻⁴	0,06	3
AzIC (Transport verzweigt-kettiger Aminosäuren)	Aminosäure-Transport	- 1,1	3,6 · 10 ⁻⁶	4,1 · 10 ⁻⁵	0,02	/
CmaU	Aminosäure-Transport	- 0,8	8,5 · 10 ⁻⁶	9,1 · 10 ⁻⁵	0,04	/
Uracil-Permease	Transmembrantransport	- 0,8	6,3 · 10 ⁻⁶	6,9 · 10 ⁻⁵	0,03	3
TcyP (L-Cystin Uptakeprotein)	Symporter-Aktivität	- 1,9	0	0	0	/
ActP (Acetat-Permease)	Acetat-Transport	- 1,9	0	0	0	2
Alpha-Ketoglutarat-Permease	Transmembrantransport	- 1,8	2,8 · 10 ⁻⁹	4,9 · 10 ⁻⁸	1,2 · 10 ⁻⁵	/
ChrA (Chromat-Transportprotein)	Chromat Transmembrantransport, Reaktion auf Chromat	- 4,7	0	0	0	4
ChrB (Chromat Resistenzprotein)	Chromat Transmembrantransport, Reaktion auf Chromat	- 5,3	0	0	0	
TatA (Twin-Arginin-Translokationsprotein)	Proteinsekretion	- 4,5	2,0 · 10 ⁻⁵	2,0 · 10 ⁻⁴	0,09	3
TatB (Twin-Arginin-Translokationsprotein)	Proteinsekretion	- 3,6	3,5 · 10 ⁻⁹	5,9 · 10 ⁻⁸	1,5 · 10 ⁻⁵	
TatC (Twin-Arginin-Translokationsprotein)	Proteinsekretion	- 2,4	6,1 · 10 ⁻⁷	8,2 · 10 ⁻⁶	0,003	
Membran-Fusionskomponente eines dreiteiligen Multidrug-Resistenzsystems	Proteinsekretion	- 0,9	1,1 · 10 ⁻⁷	1,7 · 10 ⁻⁶	4,9 · 10 ⁻⁴	7
Innere Membrankomponente eines dreiteiligen Multidrug-Resistenzsystems	Proteinsekretion	- 0,8	2,7 · 10 ⁻⁶	3,2 · 10 ⁻⁵	0,01	

Tabelle 49 Fortsetzung...

Ausgewählte differentiell <u>negativ</u> exprimierte Gene, d. h. Glucose < Lactose						
Genbezeichnung/ Protein	GO-Term-Funktionen	log ₂ fold-change	p-Wert	FDR	Bonferroni	# ähnl. Gene
Transport Fortsetzung...						89
Biopolymer-Transportprotein ExbD/TolR	Proteintransport	- 2,0	1,9 · 10 ⁻⁶	2,3 · 10 ⁻⁵	0,008	3
MotA/TolQ/ExbB Protonenkanal Proteinfamilie	Proteintransport	- 1,4	3,1 · 10 ⁻⁶	3,6 · 10 ⁻⁵	0,01	2
Permease der Wirkstoff-/ Metabolitentransporter-Superfamilie DMT	Transmembrantransport	- 3,7	0	0	0	8
TonB-abhängiger Rezeptor, Rezeptor für Ferrierterochelin und Colicine	Siderophor-Transport	- 3,7	0	0	0	6
TonB (Eisen-Siderophor-Transportsystem, periplasmatisches Bindeprotein)	Siderophor-Transport	- 3,1	3,9 · 10 ⁻⁶	4,4 · 10 ⁻⁵	0,02	
Rezeptor-Proteine auf äußerer Membran, überwiegend Eisentransport	Eisentransport	- 2,1	1,6 · 10 ⁻¹⁴	4,2 · 10 ⁻¹³	7,2 · 10 ⁻¹¹	/
ZnuA (Zink-ABC-Transporter, periplasmatisches Bindeprotein)	Metallionen-Transport	- 1,3	8,1 · 10 ⁻¹⁴	6,9 · 10 ⁻¹³	3,5 · 10 ⁻¹⁰	3
Taurin-Metabolismus						
TauA (Taurin-bindendes periplasmatisches Protein)	Transmembrantransport, Taurin-Transport, Antwort auf Schwefelmangel	- 5,7	0	0	0	6
TauB (Taurin-Transport, ATP-bindendes Protein)	Transmembrantransport, Taurin-Transport,	- 4,0	0	0	0	
Alpha-Ketoglutarat-abhängige Taurin-Dioxygenase	Metabolismus-/ Katabolismus schwefelhaltiger Verbindungen	- 4,3	0	0	0	
Lipid-Metabolismus						
Protein der Acyl-CoA-Dehydrogenase Familie	Acyl-CoA-Dehydrogenase-Aktivität	- 4,9	0	0	0	6
3-Ketoacyl-CoA Thiolase @ Acetyl-CoA Acetyltransferase	Fettsäure-beta-Oxidation	- 3,0	0	0	0	
2,4-Dienoyl-CoA Reduktase [NADPH]	Fettsäure-beta-Oxidation	- 2,7	0	0	0	
Malonyl-CoA Acyl Carrier Protein Transacylase	Fettsäure-Biosynthese	- 2,2	3,0 · 10 ⁻⁶	3,5 · 10 ⁻⁵	0,01	6
Biotin-Carboxylase der Acetyl-CoA-Carboxylase	Fettsäure-Biosynthese	- 1,5	1,7 · 10 ⁻¹⁵	4,5 · 10 ⁻¹⁴	7,2 · 10 ⁻¹²	
Delta-9-Fettsäure-Desaturase	Biosynthese ungesättigter Fettsäuren	- 0,8	6,9 · 10 ⁻⁶	7,4 · 10 ⁻⁵	0,03	
Aminosäure-Metabolismus						
Fumarylacetoacetase	Metabolismus aromat. Aminosäuren	- 4,2	0	0	0	6
Maleylacetoacetat-Isomerase @ Glutathion-S-Transferase	Metabolismus aromat. Aminosäuren	- 4,1	0	0	0	
4-Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase	Metabolismus aromat. Aminosäuren	- 3,3	0	0	0	
O-Acetylhomoserin-Sulfhydrolase/O-Succinylhomoserin-Sulfhydrolase	Aminosäure-Metabolismus	- 2,5	0	0	0	6

Tabelle 49 Fortsetzung...

Ausgewählte differentiell <u>negativ</u> exprimierte Gene, d. h. Glucose < Lactose						
Genbezeichnung/ Protein	GO-Term-Funktionen	log ₂ fold-change	p-Wert	FDR	Bonferroni	# ähnl. Gene
Aminosäure-Metabolismus Fortsetzung...						
Serin-Acetyltransferase	Cystein-Biosynthese aus Serin	- 1,8	0	0	0	
Cystein-Synthase B	Cystein-Biosynthese aus Serin	- 1,2	5,8 · 10 ⁻¹³	1,3 · 10 ⁻¹¹	2,5 · 10 ⁻⁹	
Homoserin-O-Acetyltransferase	Methionin-Biosynthese	- 1,2	2,3 · 10 ⁻¹²	5,1 · 10 ⁻¹¹	1,0 · 10 ⁻⁸	
S-Adenosylmethionin-Synthetase	S-Adenosylmethionin-Biosynthese	- 0,8	2,0 · 10 ⁻⁶	2,4 · 10 ⁻⁵	0,009	
Glycin-Cleavage-System, H-Protein	Glycin-Decarboxylierung	- 1,2	9,1 · 10 ⁻⁸	1,3 · 10 ⁻⁶	3,9 · 10 ⁻⁴	
Ferredoxin-abhängige Glutamat-Synthase	Glutamat-Biosynthese	- 1,1	3,0 · 10 ⁻¹⁰	5,7 · 10 ⁻⁹	1,3 · 10 ⁻⁶	
Aspartat-Semialdehyd-Dehydrogenase	<i>de novo</i> L-Methionin-Biosynthese, Diaminopimelat-, Leucin-/Isoleucin-, Threonin-Biosynthese	- 0,9	1,3 · 10 ⁻⁷	1,9 · 10 ⁻⁶	5,5 · 10 ⁻⁴	
Phosphoserin-Aminotransferase	L-Serin-Biosynthese, Pyridoxin-Biosynthese	- 0,9	4,7 · 10 ⁻⁷	6,5 · 10 ⁻⁶	0,002	
D-3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase	L-Serin-Biosynthese	- 0,7	5,4 · 10 ⁻⁵	5,1 · 10 ⁻⁴	0,24	
N-Succinyl-L,L-Diaminopimelat-Aminotransferase	Lysin-Biosynthese aus Diaminopimelat	- 0,8	1,1 · 10 ⁻⁶	1,4 · 10 ⁻⁵	0,005	
D-Alanin-Racemase	D-Alanin-Biosynthese	- 0,8	2,4 · 10 ⁻⁶	2,8 · 10 ⁻⁵	0,01	
Indol-3-Glycerolphosphat-Synthase	Tryptophan-Biosynthese	- 0,7	8,6 · 10 ⁻⁵	7,6 · 10 ⁻⁴	0,37	
3-Hydroxyisobutyrat-Dehydrogenase	Valin-Katabolismus	- 1,0	4,0 · 10 ⁻⁹	6,7 · 10 ⁻⁸	1,7 · 10 ⁻⁵	
Histidin-Verwertungsrepressor	Histidin-Metabolismus, Negative Regulation der Transkription	- 1,0	6,8 · 10 ⁻⁹	1,1 · 10 ⁻⁷	3,0 · 10 ⁻⁵	
GMP-Synthase [Glutamin-hydrolysierend]	Glutamin-Metabolismus, GMP-Biosynthese	- 1,0	0,001	0,007	1,0	
Kohlenhydrat-Metabolismus						
Malonat-Decarboxylase, Beta Untereinheit	Kohlenhydrat-Metabolismus	- 2,1	5,4 · 10 ⁻⁷	7,3 · 10 ⁻⁶	0,002	
Malonat-Decarboxylase, Delta Untereinheit	Kohlenhydrat-Metabolismus	- 1,9	0,001	0,006	1,0	
Malonat-Decarboxylase, Gamma Untereinheit	Kohlenhydrat-Metabolismus	- 2,4	1,7 · 10 ⁻¹⁰	3,4 · 10 ⁻⁹	7,6 · 10 ⁻⁷	
Trehalose-6-phosphat-Phosphatase	Trehalose-Biosynthese, Glykan-Biosynthese	- 1,1	0,02	0,06	1,0	
WlaX (Polysaccharid-Biosynthese-Protein)		- 1,0	9,4 · 10 ⁻¹⁰	1,7 · 10 ⁻⁸	4,1 · 10 ⁻⁶	
Cofaktor-Metabolismus						
Methylglyoxal-Reduktase, Aceton-erzeugend; 2,5-diketo-D-Gluconsäure-Reduktase B	L-Ascorbinsäure-Biosynthese, Methylglyoxal-Katabolismus	- 5,1	0	0	0	
Cystein-Desulfurase	[2Fe-2S] Cluster-Assembly, Cofaktor-Biosynthese	- 4,3	0	0	0	

Tabelle 49 Fortsetzung...

Ausgewählte differentiell negativ exprimierte Gene, d. h. Glucose < Lactose						
Genbezeichnung/ Protein	GO-Term-Funktionen	log ₂ fold-change	P-Wert	FDR	Bonferroni	# ähnl. Gene
Cofaktor-Metabolismus Fortsetzung...						
Nfu (Fe-S Proteinreifung)	Eisen-Schwefel-Cluster-Assembly, Proteinreifung	- 1,4	5,1 · 10 ⁻¹⁴	1,3 · 10 ⁻¹²	2,2 · 10 ⁻¹⁰	
Flavodoxin-Reduktase (Ferredoxin-NADPH-Reduktase)	Eisen-Schwefel-Cluster-Assembly, Reaktion auf Superoxid	- 1,3	6,2 · 10 ⁻¹⁰	1,2 · 10 ⁻⁸	2,7 · 10 ⁻⁶	
Dihydropteroat-Synthase	Folsäure-Biosynthese, Tetrahydrofolat-Biosynthese	- 1,2	7,8 · 10 ⁻⁷	1,0 · 10 ⁻⁵	0,003	8
GTP-Cyclohydrolase I	Tetrahydrofolat-Biosynthese	- 0,9	7,0 · 10 ⁻⁸	1,1 · 10 ⁻⁶	3,0 · 10 ⁻⁴	
3,4-Dihydroxy-2-butanon 4-phosphat-Synthase	Riboflavin-Biosynthese	- 3,3	0	0	0	
Riboflavin-Synthase	Riboflavin-Synthase	- 0,8	1,2 · 10 ⁻⁴	0,001	0,53	
Phagen-assoziierte Proteine						
Phagen-Protein		- 3,6	0	0	0	27
DNA-Rekombination/HGT						
Putative Transposase	DNA-Integration, DNA-vermittelte Integration	- 3,5	0,17	0,35	1,0	/
Metabolismus aromatischer Verbindungen						
Beta-Ketoadipat Enol-Lacton-Hydrolase	Beta-Ketoadipat-Stoffwechselweg	- 2,5	2,7 · 10 ⁻¹¹	5,4 · 10 ⁻¹⁰	1,2 · 10 ⁻⁷	
3-Carboxy- <i>cis,cis</i> -muconat-Cycloisomerase	3,4-Dihydroxybenzoat-Katabolismus, Beta-Ketoadipat-Weg	- 3,4	0	0	0	
Acetyl-CoA-Acetyltransferase @ Beta-ketoadipyl-CoA-Thiolase	3,4-Dihydroxybenzoat-Katabolismus	- 3,0	0,002	0,01	1,0	
3-Oxo adipat-CoA-Transferase	Beta-Ketoadipat-Stoffwechselweg	- 3,0	0	0	0	
Protocatechuat-3,4-Dioxygenase, Beta-Untereinheit	3,4-Dihydroxybenzoat-Katabolismus, Beta-Ketoadipat-Weg	- 2,2	2,3 · 10 ⁻¹²	5,2 · 10 ⁻¹¹	1,0 · 10 ⁻⁸	
4-Carboxymuconolacton-Decarboxylase	Beta-Ketoadipat-Stoffwechselweg	- 2,0	1,4 · 10 ⁻⁶	1,7 · 10 ⁻⁵	0,006	
Quinat/Shikimat-Dehydrogenase [Pyrroloquinolin-Chinon]	3,4-Dihydroxybenzoat-Biosynthese, Quinat-Metabolismus	- 1,2	5,5 · 10 ⁻¹⁰	1,0 · 10 ⁻⁸	2,4 · 10 ⁻⁶	
Protein der Glyoxalase-Familie		- 3,5	0	0	0	
Protein der Glyoxalase-Familie		- 0,9	4,7 · 10 ⁻⁴	0,003	1,0	/
Cyclohexanon-Monooxygenase	Katabolismus aromat. Verbindungen	- 2,2	5,6 · 10 ⁻¹⁶	1,5 · 10 ⁻¹⁴	2,4 · 10 ⁻¹²	
P-Hydroxybenzoat-Hydroxylase	Katabolismus aromat. Verbindungen, 3,4-Dihydroxybenzoat-Katabolismus, Positive Regulation d. Transkription	- 2,5	3,0 · 10 ⁻⁸	4,7 · 10 ⁻⁷	1,3 · 10 ⁻⁴	
Chaperone/ Reaktion auf Stress						27
ClpB (Chaperon-Protein)	Protein-Neufaltung, Reaktion auf Hitzestress	- 4,0	0	0	0	

Tabelle 49 Fortsetzung...

Ausgewählte differentiell <u>negativ</u> exprimierte Gene, d. h. Glucose < Lactose					
Genbezeichnung/ Protein	GO-Term-Funktionen	log ₂ fold-chang e	p-Wert	FDR	Bonferroni # ähnl. Gene
Chaperone/ Reaktion auf Stress Fortsetzung...					27
DnaJ (Chaperon-Protein)	Proteinfaltung, Reaktion auf Hitzestress, DNA-Replikation	- 2,4	0	0	0
DnaK (Chaperon-Protein)	Proteinfaltung, Bindung ungefalteter Proteine	- 3,3	0	0	0
HtpG (Chaperon-Protein)	Proteinfaltung, Reaktion auf Stress	- 3,2	0	0	0
GrpE (Hitzeschock-Protein)	Proteinfaltung, Chaperon-Bindung	- 3,1	0	0	0
HSP33 (33 kDa Chaperonin/ Hitzeschock-Protein 33)	Proteinfaltung	- 2,6	0	0	0
GroEL (Hitzeschockprotein 60 Familie Chaperon)	Proteinfaltung	- 2,5	0	0	0
Ribosomen-assoziiertes Hitzeschockprotein		- 1,5	4,6 · 10 ⁻¹³	1,1 · 10 ⁻¹¹	2,0 · 10 ⁻⁹
Putativer Stress-responsiver Transkriptionsregulator		- 2,0	1,2 · 10 ⁻⁸	1,9 · 10 ⁻⁷	5,0 · 10 ⁻⁵
UmuD (Fehleranfälliges DNA-Reparaturprotein)	DNA-Reparatur, Regulation der Transkription, SOS-Response	- 1,3	0,04	0,12	1,0
Carbon starvation protein A (CsrA)	Reaktion auf Nährstoffmangel	- 0,9	4,2 · 10 ⁻⁸	6,5 · 10 ⁻⁷	1,8 · 10 ⁻⁴
Universelles Stressprotein	Reaktion auf Stress	- 0,7	5,2 · 10 ⁻⁴	0,004	1,0
Nukleotid-Metabolismus					
Amidophosphoribosyltransferase	Nukleosid-Metabolismus, Purin-Nukleobase-Biosynthese, <i>de novo</i> UMP-Biosynthese, Glutamin-Metabolismus	- 1,1	6,7 · 10 ⁻¹²	1,4 · 10 ⁻¹⁰	2,9 · 10 ⁻⁸
dTDP-Glucose 4,6-Dehydratase	Nucleotidzucker-Metabolismus	- 0,9	8,7 · 10 ⁻⁸	1,3 · 10 ⁻⁶	3,8 · 10 ⁻⁴
Aspartat-Carbamoyl-Transferase	<i>de novo</i> Pyrimidin-Nukleobasen-Biosynthese, <i>de novo</i> UMP-Biosynthese	- 0,8	2,1 · 10 ⁻⁶	2,6 · 10 ⁻⁵	0,009
Dihydroorotase	<i>de novo</i> Pyrimidin-Nukleobasen-Biosynthese, <i>de novo</i> UMP-Biosynthese	- 0,8	9,4 · 10 ⁻⁶	1,4 · 10 ⁻⁴	0,04
Uracil-Phosphoribosyltransferase	UMP-Wiedergewinnung, Uracil-Wiedergewinnung	- 0,8	1,6 · 10 ⁻⁶	2,0 · 10 ⁻⁵	0,007
Deoxycytidintriphosphat-Deaminase	dUTP-, dUMP-Biosynthese	- 0,7	1,2 · 10 ⁻⁵	1,2 · 10 ⁻⁴	0,05
GTP-Pyrophosphokinase	Guanosin-Tetraphosphat-Metabolismus	- 0,7	5,1 · 10 ⁻⁶	5,7 · 10 ⁻⁵	0,02
Adhäsion/Pilus/Biofilmbildung					
PapD (Pilus-Assembly Protein, Chaperon)	Pilus-Organisation, Chaperon-vermittelte Proteinfaltung	- 0,9	1,9 · 10 ⁻⁶	2,4 · 10 ⁻⁵	0,008
PgaB (Biofilm PGA Synthese, Deacetylase)		- 0,7	5,6 · 10 ⁻⁶	6,2 · 10 ⁻⁵	0,02

Tabelle 49 Fortsetzung...

Ausgewählte differentiell <u>negativ</u> exprimierte Gene, d. h. Glucose > Lactose					
Genbezeichnung/ Protein	GO-Term-Funktionen	log ₂ fold-change	p-Wert	FDR	Bonferroni
Adhäsion/Pilus/Biofilmbildung Fortsetzung...					
PgaC (Biofilm-PGA-Synthese, N-Glycosyltransferase)		- 0,8	5,3 · 10 ⁻⁷	7,2 · 10 ⁻⁶	0,002
PgaD (Biofilm-PGA-Synthese, Helferprotein)		- 0,7	9,4 · 10 ⁻⁴	0,006	1,0
Fimbrien-Protein-Vorläufer		- 0,8	1,3 · 10 ⁻⁶	1,7 · 10 ⁻⁵	0,006
Diverse Gene					
FMN-Reduktase	Stickstoff-Verwertung, Uracil-Katabolismus, Alkylsulfonat-Katabolismus, Antwort auf Schwefelmangel	- 6,1	0	0	0
Isocitrat-Lyase	Glyoxylat-Zyklus, Tricarboxylsäurezyklus	- 2,5	0	0	0
2-Oxoglutarat-Dehydrogenase, E1 Komponente	Tricarboxylsäurezyklus	- 0,9	1,5 · 10 ⁻⁶	1,9 · 10 ⁻⁵	0,006
Beta-Lactamase Klasse C u. a. Penicillin-bindende Proteine		- 1,7	1,8 · 10 ⁻⁵	1,8 · 10 ⁻⁴	0,08
DcapP (Porin)	Porin	- 1,2	3,8 · 10 ⁻¹⁵	1,0 · 10 ⁻¹³	1,6 · 10 ⁻¹¹
Acetoin-Dehydrogenase E1, Beta Untereinheit	Metabolischer Prozess, Oxidoreduktase	- 1,2	1,3 · 10 ⁻⁹	2,4 · 10 ⁻⁸	5,7 · 10 ⁻⁶
Diacylglucosamin-Hydrolase-ähnlich	Lipid A-Biosynthese	- 1,2	7,6 · 10 ⁻¹²	1,6 · 10 ⁻¹⁰	3,3 · 10 ⁻⁸
Acetat-Kinase	Acetyl-CoA-Biosynthese, Metabolismus organischer Verbindungen	- 1,2	1,1 · 10 ⁻¹¹	2,3 · 10 ⁻¹⁰	4,7 · 10 ⁻⁸
Kupfer-Resistenzprotein B	Kupferionen-Homöostase	- 1,1	4,2 · 10 ⁻⁸	6,4 · 10 ⁻⁷	1,8 · 10 ⁻⁴
Multikupfer-Oxidase		- 1,0	2,6 · 10 ⁻⁸	4,1 · 10 ⁻⁷	1,1 · 10 ⁻⁴
UbiB (Ubichinon-Biosynthese, Monooxygenase)		- 1,0	1,3 · 10 ⁻⁹	2,3 · 10 ⁻⁸	5,5 · 10 ⁻⁶
Succinat-Semialdehyd-Dehydrogenase [NAD(P)+]	Gamma-Aminobuttersäure-Katabolismus	- 0,8	1,1 · 10 ⁻⁵	1,1 · 10 ⁻⁴	0,05

Tabelle 50: Ausgewählte differentiell stärker in Glucose exprimierte Gene von *Kocuria salsicia* M239. Die Gene sind jeweils repräsentativ für einen übergeordneten Funktionsbereich angegeben. Die den Genen zugewiesenen GO-Term-Funktionen sowie der \log_2 fold-change der Genexpression und die statistischen Kenngrößen p-Wert, False Discovery Rate (FDR) und Bonferroni-Wert sind ebenfalls aufgeführt. Zusätzlich ist, falls möglich, die Gesamtanzahl ähnlicher Gene angegeben. Folgende Kriterien gelten für statistisch signifikante Ergebnisse: $p \leq 0,05$; $FDR \leq 0,05$; Bonferroni $\leq 0,1$.

Ausgewählte differentiell <u>positiv</u> exprimierte Gene, d. h. Glucose > Lactose						
Genbezeichnung/ Protein	GO-Term-Funktionen	\log_2 fold-change	p-Wert	FDR	Bonferroni	# ähnl. Gene
Stickstoff-Metabolismus						
Nitrat-/Nitrit-Transporter	Transmembrantransport	3,1	0	0	0	/
Nitrat-Reduktase der Atmungskette, Alpha-Kette	Nitrat-Metabolismus	2,0	0	0	0	/
Nitrat-Reduktase der Atmungskette, Beta-Kette	Nitrat-Metabolismus	2,4	0	0	0	
Nitrat-Reduktase der Atmungskette, Delta-Kette	Nitrat-Metabolismus	2,7	0	0	0	/
Nitrat-Reduktase der Atmungskette, Gamma-Kette	Nitrat-Metabolismus	2,2	$\cdot 10^{-15}$	$\cdot 10^{-14}$	$\cdot 10^{-12}$	
Nitrit-Reduktase [NAD(P)H], kleine Untereinheit	Nitrat-Assimilation	2,5	0	0	0	/
Nitrit-Reduktase [NAD(P)H], große Untereinheit	Nitrat-Assimilation	0,8	$\cdot 10^{-5}$	$\cdot 10^{-4}$	0,1	
Flavohämoprotein (Hämoglobin-like Protein) (Flavohämoglobin) (Stickoxid-Dioxygenase)	Reaktion auf nitrosativen Stress, Reaktion auf toxische Substanzen	2,5	0	0	0	/
UreD (Urease akzessorisches-Protein)	Metabolismus stickstoffhaltiger Verb.	1,1	$\cdot 10^{-6}$	$\cdot 10^{-5}$	0,006	2
AmiE (Aliphatische Amidase)	Metabolismus stickstoffhaltiger Verb.	1,0	$\cdot 10^{-6}$	$\cdot 10^{-5}$	0,007	2
Stickstoff-regulatorisches Protein P-II	Regulation der Stickstoff-verwertung, Regulation der Transkription	0,8	$\cdot 10^{-5}$	$\cdot 10^{-4}$	0,04	/
Transport						55
OppB (Oligopeptid-Transport-System, Permease-Protein)	Transmembrantransport	1,8	0	0	0	3
OppC (Oligopeptid-Transport-System, Permease-Protein)	Transmembrantransport	1,3	$\cdot 10^{-7}$	$\cdot 10^{-6}$	0,0003	
EmrB/QacA (Wirkstoff-resistenz-Transporter)	Transmembrantransport	1,5	$\cdot 10^{-12}$	$\cdot 10^{-10}$	$\cdot 10^{-8}$	2
TagH (Teichonsäure-Export, ATP-bindendes Protein)	Teichonsäure-Export	1,4	$\cdot 10^{-5}$	0,0001	0,04	/
Format-Effluxtransporter	Format-Transmembrantransport	1,1	$\cdot 10^{-8}$	$\cdot 10^{-7}$	$\cdot 10^{-5}$	/
Methionin-ABC-Transporter, ATP-bindendes Protein	Methionin-Transport	1,0	$\cdot 10^{-6}$	$\cdot 10^{-5}$	0,02	4
Kupfer-Resistenzprotein D	Kupferionen-Transport	0,8	$\cdot 10^{-5}$	$\cdot 10^{-4}$	0,20	2
Effluxprotein der LysE-Familie	Aminosäure-Transport	0,8	$\cdot 10^{-4}$	0,003	1,0	/

Tabelle 50 Fortsetzung...

Ausgewählte differentiell positiv exprimierte Gene, d. h. Glucose > Lactose					
Genbezeichnung/ Protein	GO-Term-Funktionen	log ₂ fold-change	p-Wert	FDR	Bonferroni
Nukleotid-Metabolismus					
Dihydroorotase	<i>de novo</i> UMP-Biosynthese, Pyrimidin-Nukleobasen-Biosynthese	1,7	2,4 · 10 ⁻⁸	3,3 · 10 ⁻⁷	6,3 · 10 ⁻⁵
Dihydroorotat-Dehydrogenase	<i>de novo</i> UMP-Biosynthese, Pyrimidin-Nukleobasen-Biosynthese	0,8	5,4 · 10 ⁻⁶	4,5 · 10 ⁻⁵	0,01
Aspartat-Carbamoyltransferase	<i>de novo</i> UMP-Biosynthese, Pyrimidin-Nukleobasen-Biosynthese, Aminosäure-Metabolismus	1,6	1,3 · 10 ⁻⁸	1,9 · 10 ⁻⁷	3,4 · 10 ⁻⁵
Deoxyuridin-5'-triphosphat-Nucleotidhydrolase	dUMP-Biosynthese, dUTP-Metabolismus	1,4	2,4 · 10 ⁻¹²	7,0 · 10 ⁻¹¹	6,3 · 10 ⁻⁹
Thymidylat-Kinase	dTDP-, dTTP-Biosynthese	1,1	2,6 · 10 ⁻⁷	2,9 · 10 ⁻⁶	0,0007
Carbamoylphosphat-Synthase	<i>de novo</i> Pyrimidin-Nukleobasen-Biosynthese, <i>de novo</i> UMP-Biosynthese, Arginin/ Glutamin-Biosynthese	1,1	6,3 · 10 ⁻⁷	6,5 · 10 ⁻⁶	0,002
Cytidin-Deaminase	UMP-Biosynthese	0,9	0,01	0,04	1,0
Aminosäure-Metabolismus					
N-Succinyl-L,L-Diaminopimelat-Aminotransferase	Lysin-Biosynthese via Diaminopimelat	1,1	2,2 · 10 ⁻⁸	2,5 · 10 ⁻⁷	4,6 · 10 ⁻⁵
Phosphoserin-Phosphatase	L-Serin-Biosynthese	1,1	5,8 · 10 ⁻⁴	0,003	1,0
D-3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase	L-Serin-Biosynthese, Lysin-Biosynthese via Diaminopimelat	1,0	3,5 · 10 ⁻⁶	3,0 · 10 ⁻⁵	0,009
Prephenat-Dehydratase	L-Phenylalanin-Biosynthese	0,8	1,5 · 10 ⁻⁴	8,4 · 10 ⁻⁴	0,40
Kohlenhydrat-Metabolismus					
6-Phosphogluconolactonase	Kohlenhydrat-Metabolismus, Pentosephosphatweg	1,6	0	0	0
OpcA (Allosterischer Effektor der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase)	Kohlenhydrat-Metabolismus, Pentosephosphatweg	1,2	2,7 · 10 ⁻⁸	3,6 · 10 ⁻⁷	7,0 · 10 ⁻⁵
Undecaprenyl-Phosphat-Galactosephosphotransferase	Polysaccharid-Biosynthese	1,1	6,1 · 10 ⁻⁷	6,4 · 10 ⁻⁶	0,002
Glycosyl-Transferase	Polysaccharid-Biosynthese	1,0	0,001	0,03	1,0
Phosphoglycerol-Transferase	Glucan-Biosynthese, Oligosaccharid-Lipid-Intermediat-Biosynthese	1,1	1,7 · 10 ⁻⁸	2,4 · 10 ⁻⁷	4,3 · 10 ⁻⁵
Galactokinase	Galactose-Metabolismus	0,6	5,7 · 10 ⁻⁴	0,003	1,0
Lipid-Metabolismus					
Triacylglycerol-Lipase-Vorläufer	Lipid-Katabolismus	0,9	4,2 · 10 ⁻⁴	0,002	1,0
4'-Phosphopantetheinyl-Transferase	Fettsäure-Biosynthese	0,8	1,2 · 10 ⁻⁶	1,1 · 10 ⁻⁵	0,003

Tabelle 50 Fortsetzung...

Ausgewählte differentiell positiv exprimierte Gene, d. h. Glucose > Lactose					
Genbezeichnung/ Protein	GO-Term-Funktionen	log ₂ fold-change	p-Wert	FDR	Bonferroni
Metabolismus porphyrinhaltiger Verbindungen					
Porphobilinogen-Synthase	Peptidyl-Pyromethan-Cofaktor-Verbindung, Protoporphyrinogen IX-Biosynthese	1,3	5,0 · 10 ⁻¹¹	1,2 · 10 ⁻⁹	1,3 · 10 ⁻⁷
Porphobilinogen-Deaminase	Peptidyl-Pyromethan-Cofaktor-Verbindung, Protoporphyrinogen IX-Biosynthese	0,8	1,8 · 10 ⁻⁴	9,7 · 10 ⁻⁴	0,46
Glutamat-1-Semialdehyd-Aminotransferase	Protoporphyrinogen IX-Biosynthese	1,1	8,7 · 10 ⁻⁸	1,0 · 10 ⁻⁶	2,2 · 10 ⁻⁴
Cofaktor-Metabolismus					
5-Formyltetrahydrofolat-Cyclo-Ligase	Metabolismus folsäurehaltiger Verb., Tetrahydrofolat-Interkonversion, Dormanzprozess	1,2	1,2 · 10 ⁻¹⁰	2,7 · 10 ⁻⁹	3,7 · 10 ⁻⁷
Para-Aminobenzoat-Synthase, Aminase-Komponente	Metabolismus folsäurehaltiger Verbindungen	1,2	6,1 · 10 ⁻⁸	7,5 · 10 ⁻⁷	2,0 · 10 ⁻⁴
2-Amino-4-Hydroxy-6-Hydroxymethyldihydropteridin-Pyrophosphokinase	Metabolismus folsäurehaltiger Verbindungen	1,2	3,0 · 10 ⁻⁶	2,6 · 10 ⁻⁵	0,008
Dephospho-CoA-Kinase	Coenzym A-Biosynthese	0,9	2,4 · 10 ⁻⁵	1,7 · 10 ⁻⁴	0,06
2-Succinyl-5-enolpyruvyl-6-hydroxy-3-cyclohexen-1-carboxylsäure-Synthase	Menachinon-Biosynthese	0,9	4,1 · 10 ⁻⁵	2,6 · 10 ⁻⁴	0,10
Thiamin-Monophosphat-Kinase	Thiamin-Biosynthese, Thiamindiphosphat-Biosynthese	0,8	5,7 · 10 ⁻⁵	3,5 · 10 ⁻⁴	0,15
3-Methyl-2-Oxobutanoat-Hydroxymethyltransferase	Pantothenat-Biosynthese	0,8	1,1 · 10 ⁻⁵	8,2 · 10 ⁻⁵	0,03
MoeA (Molybdopterin-Biosyntheseprotein)	Molybdopterin-Cofaktor-Biosynthese	0,8	2,8 · 10 ⁻⁵	1,9 · 10 ⁻⁴	0,07
DNA-/RNA-Modifikation, Transkription/Translation					
FtsJ-like (RNA-bindende Methyltransferase)	RNA-Methylierung, rRNA-Prozessierung	1,7	0	0	0
PrmC (Protein-N(5)-Glutamin-Methyltransferase)	Methyliert Polypeptidketten-Release-Faktoren RF1 und RF2	1,6	4,4 · 10 ⁻¹⁵	1,8 · 10 ⁻¹³	1,1 · 10 ⁻¹¹
A/G-spezifische Adenin-Glycosylase	Basenexzisionsreparatur	1,3	4,4 · 10 ⁻¹²	1,2 · 10 ⁻¹⁰	1,1 · 10 ⁻⁸
GidB (rRNA kl. UE 7-Methyl-guanosin-Methyltransferase)	Methylierung der 16S rRNA	1,3	5,0 · 10 ⁻⁹	7,8 · 10 ⁻⁸	1,3 · 10 ⁻⁵
MraZ (Zellteilungs-Protein)	Negative Regulation der Transkription	1,3	9,3 · 10 ⁻¹⁰	1,8 · 10 ⁻⁸	2,4 · 10 ⁻⁶
CspC (Kälteschock-Protein)	Negative Regulation der Transkription	1,0	2,1 · 10 ⁻⁶	2,0 · 10 ⁻⁵	0,005
GlnR (Transkriptions-Regulations-Protein)	Negative Regulation der Transkription	1,0	3,9 · 10 ⁻⁸	5,0 · 10 ⁻⁷	9,9 · 10 ⁻⁵
TsaB (Threonylcarbamoyl-adenosin-(t(6)A)-Bildung in tRNA)	tRNA-Modifikation	1,1	1,8 · 10 ⁻⁹	3,2 · 10 ⁻⁸	4,6 · 10 ⁻⁶
TrmA (RNA-Methyltransferase)	tRNA-Methylierung	1,1	1,6 · 10 ⁻⁸	2,3 · 10 ⁻⁷	4,0 · 10 ⁻⁵
AlkB (Alkylierte DNA Reparaturprotein)	DNA-Reparatur	1,0	1,3 · 10 ⁻⁴	7,2 · 10 ⁻⁴	0,33

Tabelle 50 Fortsetzung...

Ausgewählte differentiell positiv exprimierte Gene, d. h. Glucose > Lactose						
Genbezeichnung/ Protein	GO-Term-Funktionen	log ₂ fold-change	p-Wert	FDR	Bonferroni	# ähnl. Gene
DNA-/RNA-Modifikation, Transkription/Translation Fortsetzung...						
Formamidopyrimidin-DNA-Glycosylase	Basen-Exzisionsreparatur, Reaktion auf DNA-Schädigung	1,0	1,4 · 10 ⁻⁵	1,0 · 10 ⁻⁴	0,04	
RNA 3'-terminales Phosphat-Cyclase	RNA-Prozessierung	1,0	2,0 · 10 ⁻⁶	1,9 · 10 ⁻⁵	0,005	
DNA-3-Methyladenin-Glycosylase	Basen-Exzisionsreparatur, Transkription	1,0	1,3 · 10 ⁻⁸	1,9 · 10 ⁻⁷	3,3 · 10 ⁻⁵	
RuvB (Holliday Junction DNA-Helicase)	SOS-Antwort, DNA-Reparatur, DNA-Rekombination	0,9	2,1 · 10 ⁻⁶	1,9 · 10 ⁻⁵	0,005	
RuvC (Crossover Junction Endodeoxyribonuclease)	DNA-Reparatur, DNA-Rekombination	0,9	3,5 · 10 ⁻⁵	5,3 · 10 ⁻⁴	0,09	
ChrS (Histidin-Kinase)	Zwei-Komponenten-System	0,6	0,002	0,008	1,0	
MtrA (Transkriptions-Regulator)	Zwei-Komponenten-System	0,5	0,005	0,02	1,0	4
Oxidoreduktasen						
Redoxin	Redoxhomöostase	1,1	5,7 · 10 ⁻⁷	6,0 · 10 ⁻⁶	0,001	
Thioredoxin-Reduktase	Entfernung von Superoxidradikalen	1,0	4,6 · 10 ⁻⁸	5,9 · 10 ⁻⁷	1,2 · 10 ⁻⁴	
HGT: Konjugation/Transformation						
Mobiles Element Protein		1,4	3,8 · 10 ⁻¹³	1,2 · 10 ⁻¹¹	9,9 · 10 ⁻¹⁰	12
ComE Operon Protein 1	Kompetenzentwicklung zur Transformation	1,0	9,2 · 10 ⁻⁴	0,004	1,0	
RecO (DNA Rekombinations- und Reparaturprotein)	DNA-Reparatur, DNA-Rekombination	0,8	2,4 · 10 ⁻⁵	1,7 · 10 ⁻⁴	0,06	
Peptidoglykan-Synthese, Zellteilung						
Segregations- und Kondensationsprotein A	Zellteilung, Zellzyklus, Chromosomen-Segregation	1,0	8,0 · 10 ⁻⁷	8,2 · 10 ⁻⁶	0,002	
XerD (Tyrosin-Rekombinase)	Zellteilung, Zellzyklus, Chromosomen-Segregation	0,8	2,7 · 10 ⁻⁵	1,9 · 10 ⁻⁴	0,07	
D-Alanin-D-Alanin-Ligase	Peptidoglykan-Biosynthese	0,9	2,6 · 10 ⁻⁵	1,8 · 10 ⁻⁴	0,07	
UDP-N-Acetylglucosamin-N-Acetylmuramyl-(Pentapeptid) Pyrophosphoryl-Undecaprenol N-Acetylglucosamin-Transferase	Zellteilung, Zellzyklus, Peptidoglykan-Biosynthese	0,9	1,2 · 10 ⁻⁵	8,8 · 10 ⁻⁵	0,03	
UDP-N-Acetylmuramoyl-alanyl-D-Glutamat--2,6-Diaminopimelat-Ligase	Zellteilung, Zellzyklus, Peptidoglykan-Biosynthese, Regulierung der Zellform	0,8	7,8 · 10 ⁻⁵	4,7 · 10 ⁻⁴	0,20	
Isoprenoid-Biosynthese						
Geranyl-Pyrophosphat-Synthetase	Isoprenoid-Biosynthese	1,1	4,4 · 10 ⁻⁹	7,0 · 10 ⁻⁸	4,3 · 10 ⁻⁵	
2-C-Methyl-D-Eythritol 2,4-Cyclodiphosphat-Synthase	Isopentenyl-Diphosphat-Biosynthese, Terpenoid-Biosynthese	0,8	3,7 · 10 ⁻⁷	3,9 · 10 ⁻⁶	9,4 · 10 ⁻⁴	

Tabelle 50 Fortsetzung...

Ausgewählte differentiell positiv exprimierte Gene, d. h. Glucose > Lactose					
Genbezeichnung/ Protein	GO-Term-Funktionen	log ₂ fold- change	p- Wert	FDR	Bon- ferroni
Biofilmassoziierte Gene					
Exopolyphosphatase	Antwort auf Stickstoff- und Phosphatmangel, Glykolipid-Biosynthese, Pathogenese, Polyphosphat-Katabolismus, Quorum-Sensing, Einzelspezies-Biofilmbildung	0,7	3,2 · 10 ⁻⁴	0,002	0,82
Sonstiges					
Multikupfer-Oxidase	Nitrit-Reduktase-Aktivität (NO-bildend)	1,4	7,5 · 10 ⁻¹⁴	7,2 · 10 ⁻¹²	1,9 · 10 ⁻¹⁰
Protein der CaiB/BaiF-Familie	Formyl-CoA-Transferase-Aktivität	1,2	7,1 · 10 ⁻¹⁰	1,4 · 10 ⁻⁸	1,8 · 10 ⁻⁶
Format-Dehydrogenase O, Beta Untereinheit	Atmung, Reaktion auf DNA-Schädigung, Format-Oxidation	1,0	2,9 · 10 ⁻⁶	2,6 · 10 ⁻⁵	0,007
3-Dehydroquinat-Synthase	Biosynthese von aromat. Aminosäuren	0,9	6,6 · 10 ⁻⁶	5,4 · 10 ⁻⁵	0,02
Sekretiertes Protein		0,9	9,5 · 10 ⁻⁵	5,6 · 10 ⁻⁴	0,25

Tabelle 51: Ausgewählte differentiell schwächer in Glucose exprimierte Gene von *Kocuria salcia* M239. Die Gene sind jeweils repräsentativ für einen übergeordneten Funktionsbereich angegeben. Die den Genen zugewiesenen GO-Term-Funktionen sowie der log₂ fold-change der Genexpression und die statistischen Kenngrößen p-Wert, False Discovery Rate (FDR) und Bonferroni-Wert sind ebenfalls aufgeführt. Zusätzlich ist, falls möglich, die Gesamtanzahl ähnlicher Gene angegeben. Folgende Kriterien gelten für statistisch signifikante Ergebnisse: $p \leq 0,05$; $FDR \leq 0,05$; $Bonferroni \leq 0,1$.

Ausgewählte differentiell negativ exprimierte Gene, d. h. Glucose < Lactose						
Genbezeichnung/ Protein	GO-Term-Funktionen	log ₂ fold- change	p-Wert	FDR	Bon- ferroni	# ähnl. Gene
Oxidoreduktasen						44
Monoamin-Oxidase	Oxidase-Aktivität	- 2,3	0	0	0	
Superoxid-Dismutase [Mn]	Oxidase-Aktivität	- 1,2	1,8 · 10 ⁻⁸	2,5 · 10 ⁻⁷	4,6 · 10 ⁻⁵	
YncB (Putative Oxidoreduktase)	Oxidoreduktase-Aktivität	- 1,2	4,9 · 10 ⁻⁸	6,2 · 10 ⁻⁷	1,3 · 10 ⁻⁴	
Schwefel-Metabolismus						
Sulfat-Adenylyltransferase, Untereinheit 1	Schwefelwasserstoff-Biosynthese	- 1,2	2,6 · 10 ⁻⁸	3,4 · 10 ⁻⁷	6,6 · 10 ⁻⁵	/
Sulfat-Adenylyltransferase, Untereinheit 2	Schwefelwasserstoff-Biosynthese	- 1,6	7,1 · 10 ⁻¹⁰	1,4 · 10 ⁻⁸	1,8 · 10 ⁻⁶	/
Phosphoadenylyl-Sulfat-Reduktase [Thioredoxin]/ Adenylyl-Sulfat-Reduktase [Thioredoxin]	Schwefelwasserstoff-Biosynthese, Sulfatassimilation	- 0,9	5,8 · 10 ⁻⁴	0,003	1,0	/

Tabelle 51 Fortsetzung...

Ausgewählte differentiell negativ exprimierte Gene, d. h. Glucose < Lactose						
Genbezeichnung/ Protein	GO-Term-Funktionen	log ₂ fold-change	p-Wert	FDR	Bonferroni	# ähnl. Gene
Transport						93
Bindeprotein-abhängiges Transportsystem, innere Membran-Komponente	Transmembrantransport	- 4,7	0,002	0,009	1,0	/
ProP (L-Prolin/Glycinbetain-Transporter)	Transmembrantransport	- 3,0	0	0	0	3
ABC-Typ Fe ³⁺ Siderophor-Transportsystem, Permease-Komponente	Transmembrantransport	- 2,0	0,04	0,09	1,0	5
Methionin-ABC-Transporter, ATP-bindendes Protein	Methionin-Transport	- 1,7	$3,8 \cdot 10^{-13}$	$1,2 \cdot 10^{-11}$	$9,8 \cdot 10^{-10}$	3
N-Acetyl-D-Glucosamin ABC-Transportsystem, Zucker-bindendes Protein	Transmembrantransport	- 1,2	0,01	0,04	1,0	2
MalF (Maltose/Maltodextrin-ABC-Transporter, Permease-protein)	Maltose/Maltodextrin-Transport	- 2,3	$6,4 \cdot 10^{-6}$	$5,2 \cdot 10^{-5}$	0,02	2
TRAP Transporter, Solut-Rezeptor, TAXI Familie, unbekanntes Substrat	Transmembrantransport	- 2,3	0,011	0,005	1,0	/
TRAP Transporter, 4TM/12TM Fusionsprotein, unbekanntes Substrat	Transmembrantransport	- 2,0	$2,4 \cdot 10^{-12}$	$6,9 \cdot 10^{-11}$	$6,1 \cdot 10^{-9}$	/
Serin-Transporter	Aminosäure-Transmembrantransport	- 2,3	$6,8 \cdot 10^{-6}$	$5,5 \cdot 10^{-5}$	0,02	/
Aminosäure-Transporter	Aminosäure-Transmembrantransport	- 2,0	$1,2 \cdot 10^{-13}$	$4,1 \cdot 10^{-12}$	$3,1 \cdot 10^{-10}$	div.
GlyP (Natrium/Glycin-Symporter)	Symport von Natrium und Glycin/Alanin	- 1,4	$2,0 \cdot 10^{-7}$	$2,2 \cdot 10^{-6}$	$5,4 \cdot 10^{-4}$	/
DppB (Dipeptid-Transportsystem, Permease-Protein)	Transmembrantransport	- 1,7	$3,9 \cdot 10^{-10}$	$7,9 \cdot 10^{-9}$	$1,0 \cdot 10^{-6}$	/
OppA (Oligopeptid ABC-Transporter, periplasmat. Oligopeptid-Bindeprotein)	Transmembrantransport	- 1,9	$2,5 \cdot 10^{-12}$	$7,2 \cdot 10^{-11}$	$6,5 \cdot 10^{-9}$	/
OppB (Oligopeptid-Transportsystem, Permease-protein)	Transmembrantransport	- 1,1	$2,2 \cdot 10^{-5}$	$1,4 \cdot 10^{-4}$	0,06	4
OppC (Oligopeptid Transportsystem, Permease-protein)	Transmembrantransport	- 0,9	$9,3 \cdot 10^{-4}$	0,004	1,0	/
Xanthin-Permease	Xanthin-Transmembrantransport	- 2,3	$7,8 \cdot 10^{-11}$	$1,8 \cdot 10^{-9}$	$2,0 \cdot 10^{-7}$	/
Kalium-transportierende ATPase, A Kette	Kalium-Transport	- 2,3	$1,4 \cdot 10^{-6}$	$1,3 \cdot 10^{-5}$	0,004	4
Kalium-transportierende ATPase, B Kette	Kalium-Transport	- 2,1	$3,1 \cdot 10^{-5}$	$2,1 \cdot 10^{-4}$	0,08	/
TctA (Tricarboxylat-transport, Membranprotein)	Tricarboxylat-Transmembrantransport	- 2,2	0	0	0	/
TctB (Tricarboxylat-Transportprotein)	Tricarboxylat-Transmembrantransport	- 2,2	0	0	0	/
TctC (Tricarboxylat-Transportprotein)	Tricarboxylat-Transmembrantransport	- 1,9	$3,3 \cdot 10^{-16}$	$1,5 \cdot 10^{-14}$	$8,6 \cdot 10^{-13}$	/

Tabelle 51 Fortsetzung...

Ausgewählte differentiell negativ exprimierte Gene, d. h. Glucose < Lactose						
Genbezeichnung/ Protein	GO-Term-Funktionen	log ₂ fold-change	p-Wert	FDR	Bonferroni	# ähnl. Gene
Transport Fortsetzung...						93
Di- und Tricarboxylat-transporter	Transmembrantransport	- 1,3	1,3 · 10 ⁻⁷	1,5 · 10 ⁻⁶	3,4 · 10 ⁻⁴	/
L-Lactat-Permease	Lactat-Transmembrantransport	- 2,2	0	0	0	/
Ammonium-Transporter	Ammonium-Transmembrantransport	- 1,4	1,3 · 10 ⁻¹⁰	2,8 · 10 ⁻⁹	3,2 · 10 ⁻⁷	/
PstC (Phosphat-Transportsystem, ATP-bindendes Protein)	Phosphationentransport	- 1,2	1,2 · 10 ⁻⁸	1,8 · 10 ⁻⁷	3,2 · 10 ⁻⁵	
PstC (Phosphat-Transportsystem, Permease-Protein)	Phosphationentransport	- 1,2	4,6 · 10 ⁻¹⁰	9,3 · 10 ⁻⁹	1,2 · 10 ⁻⁶	5
PhoU (Phosphat-Transportsystem, regulatorisches Protein)	Negative Regulation des Phosphattransports und Phosphat-metabol. Prozesse, Pathogenese	- 1,2	3,1 · 10 ⁻⁹	5,3 · 10 ⁻⁸	8,0 · 10 ⁻⁶	
Aminobenzoyl-Glutamat-Transportprotein	Aminobenzoyl-Glutamat-Transmembrantransport	- 1,2	1,3 · 10 ⁻⁵	9,3 · 10 ⁻⁵	0,03	2
PutP (Prolin/Natrium-Symporter)	Prolin-Transport	- 1,1	4,9 · 10 ⁻⁵	3,1 · 10 ⁻⁴	0,13	/
Cholin-Metabolismus						
Cholin-Dehydrogenase		- 2,4	3,4 · 10 ⁻⁹	5,6 · 10 ⁻⁸	8,7 · 10 ⁻⁶	
Lipid-Metabolismus						
Acetoacetyl-CoA-Synthetase	Lipidmetabolismus	- 3,5	0,007	0,02	1,0	
Acetoacetyl-CoA-Synthetase/langkettige Fettsäure-CoA-Ligase	Lipidmetabolismus	- 1,8	4,8 · 10 ⁻¹⁴	1,8 · 10 ⁻¹²	1,2 · 10 ⁻¹⁰	3
3-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydrogenase	Fettsäuremetabolismus, Butyrat-Metabolismus	- 1,6	5,9 · 10 ⁻¹¹	1,4 · 10 ⁻⁹	1,5 · 10 ⁻⁷	3
Enoyl-CoA-Hydratase/3-Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase/3-Hydroxybutyryl-CoA-Epimerase	Fettsäuremetabolismus	- 1,4	5,6 · 10 ⁻⁵	3,5 · 10 ⁻⁴	0,14	5
Acyl-Coenzym A-Oxidase 1	Fettsäure-beta-Oxidation	- 1,5	1,2 · 10 ⁻⁵	9,0 · 10 ⁻⁵	0,03	
3-Ketoacyl-CoA-Thiolase @ Acetyl-CoA-Acetyltransferase	Fettsäure-beta-Oxidation	- 2,4	7,2 · 10 ⁻¹¹	1,7 · 10 ⁻⁹	1,8 · 10 ⁻⁷	2
2,4-Dienoyl-CoA-Reduktase [NADPH]	Fettsäure-beta-Oxidation	- 1,0	4,4 · 10 ⁻⁵	2,8 · 10 ⁻⁴	0,11	/
Aminosäure-Metabolismus						
3-Hydroxyisobutyryl-Dehydrogenase	Valin-Katabolismus	- 3,5	0,02	0,04	1,0	
Methylmalonat-Semialdehyd-Dehydrogenase	Valin-Katabolismus	- 1,4	3,5 · 10 ⁻⁴	0,002	0,89	
O-Acetylhomoserin-/O-Succinylhomoserin-Sulphydrolase	Aminosäure-metabolismus	- 2,5	0,01	0,03	1,0	

Tabelle 51 Fortsetzung...

Ausgewählte differentiell negativ exprimierte Gene, d. h. Glucose < Lactose					
Genbezeichnung/ Protein	GO-Term-Funktionen	log ₂ fold-change	p-Wert	FDR	Bonferroni
Aminosäure-Metabolismus Fortsetzung...					
Urocanat-Hydratase	Histidin-Katabolismus zu Glutamat und Formamid bzw. Glutamat und Format	- 2,4	1,7 · 10 ⁻¹³	5,8 · 10 ⁻¹²	4,4 · 10 ⁻¹⁰
Histidin-Ammoniak-Lyase		- 1,4	1,0 · 10 ⁻⁵	7,9 · 10 ⁻⁵	0,03
Imidazolnpropionase	Histidin-Katabolismus zu Glutamat und Formamid bzw. Glutamat und Format	- 1,0	2,5 · 10 ⁻⁴	0,001	0,67
Aromatische Aminosäure-Aminotransferase Beta	Aspartat-, Leucin-Biosynthese, L-Phenylalanin-Biosynthese aus Chorismat via Phenylpyruvat, Tyrosin-Biosynthese aus Chorismat via 4-Hydroxyphenylpyruvat	- 2,2	5,8 · 10 ⁻¹³	1,8 · 10 ⁻¹¹	1,5 · 10 ⁻⁹
Lysin-Decarboxylase	Aminosäuremetabolismus	- 2,0	2,2 · 10 ⁻¹⁶	1,0 · 10 ⁻¹⁴	5,7 · 10 ⁻¹³
5-Methyltetrahydropteroyl-triglutamat-Homocystein-Methyltransferase	Methionin-Biosynthese, Umwandlung von Tetrahydrofolat	- 1,8	0,002	0,008	1,0
Acetolactat-Synthase, große Untereinheit	Valin-, Isoleucin-Biosynthese	- 1,1	1,8 · 10 ⁻¹¹	4,6 · 10 ⁻¹⁰	4,5 · 10 ⁻⁸
D-3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase	L-Serin-Biosynthese, Lysin-Biosynthese über Diaminopimelat	- 1,1	5,0 · 10 ⁻⁶	4,2 · 10 ⁻⁵	0,01
Proteolyse					
ATP-abhängige Clp-Protease, proteolytische Untereinheit	Serin-Typ-Endopeptidase-Aktivität	- 1,9	0	0	0
Galactonat-Metabolismus					
D-Galactonat-Transporter	Transmembrantransport, Anionentransport	- 4,5	0	0	0
Galactonat-Dehydratase	Aminosäure-Katabolismus, D-Galactonat-Katabolismus	- 5,1	0	0	0
2-Dehydro-3-deoxy-Galactonokinase	D-Galactonat-Katabolismus	- 3,0	0	0	0
Kohlenhydrat-Metabolismus					
Putative Aldose-1-Epimerase	Galactose-Katabolismus via UDP-Galactose, Glucose-Metabolismus	- 3,5	0	0	0
Galactose-1-phosphat-Uridyltransferase	Galactose-Katabolismus via UDP-Galactose	- 2,4	0	0	0
Galactokinase	Galactose-Metabolismus	- 1,6	3,1 · 10 ⁻¹⁰	6,4 · 10 ⁻⁹	8,0 · 10 ⁻⁷
Beta-Galactosidase	Galactose-Metabolismus	- 1,0	4,7 · 10 ⁻⁶	4,0 · 10 ⁻⁵	0,01
Succinat-Dehydrogenase, Fe-S-Protein	Tricarboxylsäurezyklus	- 2,5	0	0	0
Succinat-Dehydrogenase, Flavoprotein-Untereinheit	Elektronentransportkette, Tricarboxylsäurezyklus	- 2,4	0	0	0
Malat-Dehydrogenase	Malat-Metabolismus, Tricarboxylsäurezyklus	- 1,9	4,0 · 10 ⁻¹³	1,3 · 10 ⁻¹¹	1,0 · 10 ⁻⁹
2-Methylcitrat-Dehydratase	Propionat-Katabolismus, Tricarboxylsäurezyklus	- 1,4	2,0 · 10 ⁻¹⁰	4,4 · 10 ⁻⁹	5,1 · 10 ⁻⁷

Tabelle 51 Fortsetzung...

Ausgewählte differentiell negativ exprimierte Gene, d. h. Glucose < Lactose					
Genbezeichnung/ Protein	GO-Term-Funktionen	log ₂ fold-change	p-Wert	FDR	Bonferroni
Kohlenhydrat-Metabolismus Fortsetzung...					
Fumarat-Hydratase Klasse II	Fumarat-Metabolismus, Tricarboxylsäurezyklus	- 1,0	9,0 · 10 ⁻⁶	7,0 · 10 ⁻⁵	0,02
Succinyl-Co-Ligase [ADP-bildend]	Tricarboxylsäurezyklus	- 1,0	6,0 · 10 ⁻⁵	3,7 · 10 ⁻⁴	0,15
NADP-abhängiges Malic-Enzym	Malat-Metabolismus	- 1,6	3,0 · 10 ⁻¹²	8,4 · 10 ⁻¹¹	7,8 · 10 ⁻⁹
Trehalose-Synthase	Kohlenhydrat-Metabolismus	- 1,7	6,7 · 10 ⁻¹²	1,8 · 10 ⁻¹⁰	1,7 · 10 ⁻⁸
Malto-Oligosyltrehalose-Trehalohydrolase	Trehalose-Synthese, Glykan-Biosynthese	- 1,2	4,1 · 10 ⁻⁹	6,6 · 10 ⁻⁸	1,1 · 10 ⁻⁵
Phosphoglyceratkinase	Glykolyse	- 1,3	4,0 · 10 ⁻¹¹	9,9 · 10 ⁻¹⁰	1,0 · 10 ⁻⁷
NAD-abhängige Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase	Glucosemetabolismus, Glykolyse	- 1,3	7,9 · 10 ⁻¹⁰	1,5 · 10 ⁻⁸	2,0 · 10 ⁻⁶
Fructosebisphosphat-Aldolase Klasse II	Glykolyse	- 1,2	1,1 · 10 ⁻⁸	1,6 · 10 ⁻⁷	2,7 · 10 ⁻⁵
6-Phosphofruktokinase	Glykolyse	- 1,1	2,2 · 10 ⁻⁶	2,0 · 10 ⁻⁵	0,006
Triosephosphat-Isomerase	Glykolyse, Gluconeogenese, Pentosephosphatweg	- 0,9	6,8 · 10 ⁻⁶	5,5 · 10 ⁻⁵	0,02
Phosphoglucosamin-Mutase	Kohlenhydratmetabolismus	- 1,1	2,1 · 10 ⁻⁹	3,7 · 10 ⁻⁸	5,4 · 10 ⁻⁶
Alpha-Amylase	Kohlenhydratmetabolismus	- 1,1	2,1 · 10 ⁻⁷	2,3 · 10 ⁻⁶	5,4 · 10 ⁻⁴
Vermutlich Glycogen-Synthase, ADP-Glucose-Transglucosylase	Glucan-Biosynthese	- 1,0	1,1 · 10 ⁻⁵	8,6 · 10 ⁻⁵	0,03
Pyruvat-Carboxylase	Pyruvat-Metabolismus, Gluconeogenese	- 1,0	1,6 · 10 ⁻⁶	1,5 · 10 ⁻⁵	0,004
Stickstoffstoffwechsel					
Formamidase	Metabolismus stickstoffhaltiger Verbindungen	- 2,6	4,3 · 10 ⁻¹⁵	1,8 · 10 ⁻¹³	1,1 · 10 ⁻¹¹
Cofaktor-Metabolismus					
Acetyl-CoA-Synthetase	Acetyl-CoA-Synthese aus Acetat	- 1,7	8,2 · 10 ⁻¹³	2,5 · 10 ⁻¹¹	2,1 · 10 ⁻⁹
Quinolinat-Synthetase	NAD-Biosynthese	- 1,0	1,2 · 10 ⁻⁵	8,7 · 10 ⁻⁵	0,03
SufB (Fe-S-Cluster Assembly-Protein)	Fe-S-Cluster-Assembly	- 1,0	9,8 · 10 ⁻⁶	7,6 · 10 ⁻⁵	0,03
DNA-Rekombination/HGT					
Putatives TraA-ähnliches Konjugatives Transfer-Protein	Konjugation	- 1,4	0,007	0,02	1,0
Metabolismus aromatischer Verbindungen					
Phenylacetat-Coenzym A-Ligase	Phenylacetat-Katabolismus	- 3,7	0	0	0
PaaD (Phenyllessigsäure abbauendes Protein)	Phenylacetat-Katabolismus	- 3,3	0	0	0
PaaG (Phenylacetat-CoA-Oxygenase)	Phenylacetat-Katabolismus	- 2,9	0	0	0
PaaH (Phenylacetat-CoA-Oxygenase)	Phenylacetat-Katabolismus	- 2,2	9,8 · 10 ⁻¹⁵	3,8 · 10 ⁻¹³	2,5 · 10 ⁻¹¹
PaaI (Phenylacetat-CoA-Oxygenase)	Phenylacetat-Katabolismus	- 2,8	0	0	0

Tabelle 51 Fortsetzung...

Ausgewählte differentiell negativ exprimierte Gene, d. h. Glucose < Lactose						
Genbezeichnung/ Protein	GO-Term-Funktionen	log ₂ fold-change	p-Wert	FDR	Bonferroni	# ähnl. Gene
Metabolismus aromatischer Verbindungen Fortsetzung...						
PaaJ (Phenylacetat-CoA-Oxygenase)	Phenylacetat-Katabolismus	- 2,3	1,1 · 10 ⁻¹⁶	5,3 · 10 ⁻¹⁵	2,9 · 10 ⁻¹³	
PaaK (Phenylacetat-CoA-Oxygenase)	Phenylacetat-Katabolismus	- 1,8	1,3 · 10 ⁻⁷	1,5 · 10 ⁻⁶	3,3 · 10 ⁻⁴	
PaaZ (Aldehyd-Dehydrogenase)	Phenylacetat-Katabolismus	- 2,7	0	0	0	
Protocatechuat-3,4-Dioxygenase, Beta Kette	3,4-Dihydroxybenzoat-Katabolismus	- 2,0	1,3 · 10 ⁻⁴	7,3 · 10 ⁻⁴	0,34	
Protocatechuat-3,4-Dioxygenase, Alpha Kette	Katabolismus aromatischer Verbindungen	- 1,5	2,2 · 10 ⁻⁴	0,001	0,58	
5-Carboxymethyl-2-Hydroxyumuconat-delta-Isomerase	Katabolismus aromatischer Verbindungen	- 1,3	6,1 · 10 ⁻⁴	0,003	1,0	
Aldehyd-Metabolismus						
Aldehyd-Dehydrogenase	Aldehyd-Metabolismus	- 2,0	3,2 · 10 ⁻¹²	1,1 · 10 ⁻¹¹	8,3 · 10 ⁻¹⁰	6
Chaperone/Reaktion auf Stress						
Kohlenstoffmangelprotein A	Antwort auf Nährstoffmangel	- 1,9	0	0	0	
DnaJ (Chaperon-Protein)	DNA-Replikation, Proteinfaltung, Reaktion auf Hitze	- 1,6	0	0	0	
DnaK (Chaperon-Protein)	DNA-Replikation, Proteinfaltung, Reaktion auf Hitze	- 1,65	1,2 · 10 ⁻¹²	3,5 · 10 ⁻¹¹	3,0 · 10 ⁻⁹	
GroEL (Hitzeschockprotein 60 Familie Chaperon)	Proteinfaltung	- 1,2	9,2 · 10 ⁻¹⁰	1,7 · 10 ⁻⁸	2,4 · 10 ⁻⁶	
GroES (Hitzeschockprotein 60 Familie Chaperon)	Proteinfaltung	- 1,5	2,8 · 10 ⁻¹¹	7,0 · 10 ⁻¹⁰	7,1 · 10 ⁻⁸	
Peptidyl-Prolyl <i>cis-trans</i> -Isomerase	Proteinfaltung	- 1,4	6,6 · 10 ⁻¹⁴	2,4 · 10 ⁻¹²	1,7 · 10 ⁻¹⁰	
UpsA (Universelles Stressprotein)	Reaktion auf Stress	- 1,4	6,9 · 10 ⁻⁷	7,1 · 10 ⁻⁶	0,002	
PspA (Phage Shock Protein A)	Reaktion auf Hitze, Neg. Regulation d. Transkription	- 1,3	2,3 · 10 ⁻⁸	3,1 · 10 ⁻⁷	5,8 · 10 ⁻⁵	
ClpB Protein (Chaperon)	Protein-Prozessierung, Protein-Neufaltung, Reaktion auf Hitze	- 1,1	6,9 · 10 ⁻⁸	8,4 · 10 ⁻⁷	1,8 · 10 ⁻⁴	
GrpE (Hitzeschockprotein)	Proteinfaltung	- 1,1	9,8 · 10 ⁻⁹	1,5 · 10 ⁻⁷	2,5 · 10 ⁻⁵	
Nukleotid-Metabolismus						
5-Hydroxyisourat-Hydrolase (HIUase)	Purin-Nukleobasen-Metabolismus	- 3,0	0,002	0,009	1,0	
Uricase (Urat-Oxidase)	Purin-Nukleobasen-Metabolismus, Urat-Katabolismus	- 2,5	4,3 · 10 ⁻⁸	5,6 · 10 ⁻⁷	1,1 · 10 ⁻⁴	
Ribonucleotid-Reduktase der Klasse Ib (aerob)	Deoxyribonucleotid-Biosynthese	- 1,8	3,3 · 10 ⁻¹⁶	1,5 · 10 ⁻¹⁴	8,6 · 10 ⁻¹³	
RraA (Ribonuklease E Inhibitor)	Regulation des RNA-Metabolismus	- 1,3	3,5 · 10 ⁻⁷	3,8 · 10 ⁻⁶	9,1 · 10 ⁻⁴	
Dihydroorotase	<i>de novo</i> UMP-Biosynthese	- 1,0	4,2 · 10 ⁻⁶	3,5 · 10 ⁻⁵	0,01	

Tabelle 51 Fortsetzung...

Ausgewählte differentiell negativ exprimierte Gene, d. h. Glucose < Lactose						
Genbezeichnung/ Protein	GO-Term-Funktionen	log ₂ fold-change	p-Wert	FDR	Bonferroni	# ähnl. Gene
Adhäsion/Pilus/Biofilmbildung						
Protein der TatE-Familie	Typ IV-Pilus-assoziiert	- 2,3	0,08	0,17	1,0	
mögliche Etk-ähnliche Tyrosinkinase, involviert in EPS-Biosynthese	EPS-Biosynthese, Lipopolysaccharid-Biosynthese	- 1,2	0,18	0,31	1,0	
EpsD (Tyrosin-Protein-Kinase)	EPS-Biosynthese, Lipopolysaccharid-Biosynthese	- 0,7	0,05	0,11	1,0	
EpsF (Exopolysaccharid-biosynthese, Glycosyl-transferase)	Polysaccharid-Biosynthese	- 0,7	0,26	0,39	1,0	
Zellteilung						
Zellteilungs-Inhibitor	Zellteilung	- 1,0	$8,6 \cdot 10^{-7}$	$8,8 \cdot 10^{-6}$	0,002	
FtsH (Zellteilungsprotein)	Zellteilung, Proteinkatabolismus	- 0,9	$1,1 \cdot 10^{-5}$	$8,3 \cdot 10^{-5}$	0,03	
Regulation der Genexpression						
Sensor-Protein eines TCS	Zwei-Komponenten-System	- 0,6	0,002	0,006	1,0	2
RelE/StbE Replicon-stabilisierendes Toxin	Toxin-Antitoxin-System	- 1,3	0,2	0,4	1,0	/
Diverse Gene						
2-Dehydro-3-Deoxy-phosphogalactonat-Aldolase	Metabolischer Prozess	- 4,6	0	0	0	
Polyphosphat-Kinase	Polyphosphat-Biosynthese	- 2,7	0	0	0	
Arsen-Resistenzprotein ACR3	Antiporter-Aktivität	- 2,4	0,05	0,11	1,0	
Amin-Oxidase	Amin-Metabolismus	- 2,1	$8,9 \cdot 10^{-5}$	$5,3 \cdot 10^{-4}$	0,23	
Enoyl-CoA-Hydratase	Metabolischer Prozess	- 2,0	$8,5 \cdot 10^{-15}$	$3,4 \cdot 10^{-13}$	$2,2 \cdot 10^{-11}$	
4-Aminobutyraldehyd-Dehydrogenase		- 1,7	$1,9 \cdot 10^{-8}$	$2,6 \cdot 10^{-7}$	$4,8 \cdot 10^{-5}$	
ATP-Synthase F0 Sektor, Untereinheit A	ATP-Synthese gekoppelt mit Protonentransport	- 1,0	$5,0 \cdot 10^{-7}$	$5,3 \cdot 10^{-6}$	0,001	
D-Lactat-Dehydrogenase	Lactat-Oxidation	- 0,9	$3,1 \cdot 10^{-5}$	$2,1 \cdot 10^{-4}$	0,08	

Kurzfassung

Die bakterielle Zusammensetzung von Biofilmen in Melkanlagen wurde mit einer Kombination aus kultivierungsgestützten und molekularbiologischen Methoden ermittelt. Bereits in der Melkanlage etablierte Biofilme wurden mit Tupfern beprobt. Zusätzlich wurde die Biofilmbildung auf in die Melkanlage eingebrachten Edelstahlcoupons nachvollzogen, die nach mehreren Melkintervallen entnommen und untersucht wurden. Aus den Tupferproben und von den Edelstahlcoupons wurde sowohl die DNA extrahiert als auch Isolate gewonnen. Für die kultivierungsunabhängige Diversitätsanalyse wurden die 16S rRNA-Gene mittels PCR amplifiziert, kloniert und sequenziert. Die Identifizierung der Isolate erfolgte mit einer Kombination aus chemotaxonomischen Methoden und 16S rRNA-Gensequenzierung. Zur Beurteilung ihres Verderbnispotentials wurden die Isolate auf ihre Fähigkeit zur Biofilmbildung, Wachstum bei Kühltemperaturen und Zersetzung von Milchbestandteilen durch Proteolyse und Lipolyse getestet.

Das Vorhandensein von Biofilmen auf verschiedenen Materialien wie Edelstahl, Gummi und Kunststoff wurde über mehrere Probenahmen hinweg nachgewiesen. Besonders hohe Keimzahlen wurden auf den Melkbecherablagen, einem Kunststoffrohr am Ende der Druckleitung sowie auf dem Auslassstutzen des Rohmilchsammeltanks detektiert. Anhand von hohen Anteilen cloxacillinresistenter Mikroorganismen konnte ein Zusammenhang zwischen dem präventiven Einsatz dieses Wirkstoffs beim Trockenstellen der Milchkühe und erhöhtem Auftreten von Antibiotikaresistenzen nachgewiesen werden.

Alle Isolat- und Klonsequenzen gehörten den typischen milchassoziierten Phyla *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes* und *Proteobacteria* an. Die Ergebnisse aus der vorliegenden Arbeit lassen darauf schließen, dass verschiedene Gattungen des Phylums *Actinobacteria* eine wichtige Rolle als Primärbesiedler von Edelstahloberflächen spielen, während ihr Anteil in reifen Biofilmen abnimmt. Der Nachweis von *Listeria monocytogenes* als Klonsequenz auf mehreren Edelstahlcoupons weist auf die Fähigkeit dieses Pathogens hin, sich schon in frühen Phasen der Biofilmbildung in den Biofilm in geringen Anteilen zu integrieren. Milchsäurebakterien sowie die Gattungen *Kocuria*, *Micrococcus*, *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Chryseobacterium* und *Acinetobacter* scheinen aufgrund ihrer hohen Speziesvielfalt, ihres Produktverderbnispotentials, psychrophilen Eigenschaften, ihres Biofilmbildungspotentials und Resistenz gegenüber den in der Melkanlage eingesetzten Reinigungs- und Desinfektionsmitteln eine bedeutende Rolle in Melkanlagen-Biofilmen zu spielen. Viele der genannten Gattungen wiesen zusätzlich Antibiotikaresistenzen auf, was eine Gefahr für die Eutergesundheit im Falle einer Mastitisinfektion darstellt.

Verstärkte Biofilmbildung in Lactose-haltigem Nährmedium zeigte deutlich die Adaption vieler Isolate an Milch als ihr natürliches Habitat. Differentielle Genexpressionsanalysen von zwei Isolaten der Spezies *Acinetobacter guillouiae* und *Kocuria salsicia* deuteten auf eine Induktion von EPS-assoziierten Genen durch Lactose hin.

Abstract

The bacterial community composition of biofilms in a milking machine was assessed by a combination of cultivation and molecular methods. Already established biofilms were investigated by swab sampling of different parts of the milking machine. Biofilm formation was also traced on stainless steel coupons that were placed into the piping system of the milking machine and were removed after several milking intervals. Swab samples and exposed stainless steel coupons were used for the isolation of DNA followed by analysis of target genes and also for the isolation of bacterial strains. Isolates were differentiated and identified by a combination of chemotaxonomical methods and 16S rRNA sequencing. The culture-independent diversity analyses involved PCR-amplification, cloning and sequencing of the 16S rRNA genes. Isolates were characterized for their milk spoilage potential by lipolysis and proteolysis as well as growth and biofilm formation at refrigeration temperature.

The presence of biofilms was demonstrated on several surface materials including stainless steel, rubber and plastic. High microbial loads were detected on the milking equipment retainers, a plastic pipe at the end of the pressure line and the outlet of the raw milk bulk tank. The relation between the preventive use of cloxacillin at drying off and the extent of resistant bacterial populations within the existing biofilms was clearly shown. However, no correlation was found between biofilm microbial cell density and abundance of tetracycline resistance genes. That means there is no evidence for a substantial contribution of horizontal gene transfer for the dissemination of antibiotic resistance genes in this habitat.

All isolate and clone sequences belonged to the typical milk associated phyla *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes* and *Proteobacteria*. The results indicate that different genera of the phylum *Actinobacteria* play a role as primary colonizers of stainless steel surfaces while their proportion decreased in mature biofilms. The detection of *Listeria monocytogenes* as clone sequence from different stainless steel coupons indicates that this pathogen can integrate already in early stages of biofilm formation in small proportions, as it was not detected by cultivation. Lactic acid bacteria as well as the genera *Kocuria*, *Micrococcus*, *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Chryseobacterium* and *Acinetobacter* played a prominent role in milking machine biofilms due to their high species richness, milk spoilage potential, psychrotrophic adaptation, biofilm formation and/or resistance against the cleaning and disinfection agents used in the milking machine. Most of these genera were also resistant against β -lactam antibiotics or tetracycline, which threatens udder health in case of mastitis infection. The cleaning and disinfection agents were able to kill the majority of biofilm cells in most cases but failed to eradicate the biofilm matrix.

Enhanced biofilm formation by many isolates in lactose-containing medium clearly indicated their adaptation to milk as their natural habitat. Differential gene expression analysis of two isolates of the species *Acinetobacter guillouiae* and *Kocuria salsicia* indicated the induction of EPS-associated genes by the presence of lactose.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. André Lipski für die spannende Themenstellung und das entgegengebrachte Vertrauen. Herzlichen Dank für die zahlreichen anregenden Diskussionen, Ratschläge und Denkanstöße, die mich stets motivierten. Außerdem danke ich Dir für die Möglichkeit, meine Arbeit auf verschiedenen Konferenzen vorstellen zu können.

Prof. Dr. Andreas Schieber möchte ich herzlich für die freundliche Übernahme des Korreferats dieser Arbeit danken.

Der Arbeitsgruppe von Dr. Richard Reinhardt des Max Planck Genome Centers (MPGC) in Köln, insbesondere Dr. Janina Fuß und Kurt Stüber, danke ich für die Kooperation bei der Generierung und Auswertung der differentiellen Genexpressionsdaten und die geduldige Beantwortung meiner zahlreichen Fragen. Matthias Mail vom INRES-Gartenbauwissenschaften danke ich für die Anfertigung der beeindruckenden elektronenmikroskopischen Aufnahmen meiner Isolate.

Ganz besonders möchte ich allen meinen Kollegen für die gute Arbeitsatmosphäre danken! Dazu zählen Bettina Becker, Julia Hahne, Paula Nöthen, Waldemar Seel, Alexander Flegler und auch die Bachelor- und Masterstudenten, die ich über die Jahre hinweg betreut habe. Auch möchte ich mich bei meiner ehemaligen Kollegin und Freundin Julia Derichs bedanken! Ein herzliches Dankeschön an euch alle für die vielen witzigen aber auch ernsthaften Pausengespräche!

Mein besonderer Dank gilt an dieser Stelle Eva Meyer! Deine helfenden Hände, die jahrzehntelange Erfahrung im Labor und Dein präzises Arbeiten haben mir enorm geholfen und zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen! Danke für Dein offenes Ohr und deinen Humor, die mich jederzeit mit Freude ins Büro/Labor haben gehen lassen! Ich wünsche Dir einen erholsamen, aber keineswegs langweiligen Ruhestand und werde dich sehr vermissen!

Zuletzt möchte ich mich bei meinem Freund Marcel, seiner Mutter Monika und meinen Eltern Rainer und Ulrike von ganzem Herzen bedanken! Ihr habt mich jederzeit unterstützt, sei es moralisch, durch die Pferdeversorgung während der Schreibphase meiner Arbeit, aber einfach auch durch den starken Rückhalt, den ich jederzeit gespürt habe! Danke, dass ihr immer an mich glaubt!