

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

M. Sc. Stefanie Gieschler

Qualitätsverluste von Milch und Milchprodukten können die Folge proteolytischer Enzyme, die von *Pseudomonas* spp. in Rohmilch gebildet werden, sein.

Ein Ziel dieser Arbeit war die Analyse der Prävalenz von *Pseudomonas* spp. in norddeutscher Rohmilch hinsichtlich hofspezifischer Einflussfaktoren sowie potentieller Eintragsrouten auf den Erzeugerhöfen, um Maßnahmen zur Reduktion des Keimeintrags in Rohmilch ableiten zu können.

Hierfür wurden 521 Rohmilchproben von 38 Erzeugerhöfen hinsichtlich *Pseudomonas*- und Gesamtkeimzahlen analysiert. Im Mittel lag die *Pseudomonas*-Keimzahl in Rohmilch bei $3,4 \pm 1,3 \log \text{KbE/ml}$ und eine durchschnittliche Gesamtkeimzahl von $4,7 \pm 0,6 \log \text{KbE/ml}$ wurde ermittelt. Die Keimzahlen wurden anschließend mit den per Fragebogen ermittelten hofspezifischen Parametern in Zusammenhang gebracht. Die Analyse ergab unter anderem bei den Hofparametern „Produktionsart“, „Spülsystem“, „Rohmilch-Kühlung“ und „Tierhaltung“ signifikante Unterschiede hinsichtlich der *Pseudomonas*-Keimzahl.

Potentielle Eintragsrouten von *Pseudomonas* spp. auf den Erzeugerhöfen wurden im Rahmen von 8 Hofbegehungen mittels kultureller *Pseudomonas*- und Gesamtkeimzahlbestimmungen untersucht. Die Probenahme umfasste Bereiche des Rohmilchtanks, der Melkanlage, des Melkzeugs und verschiedene Wasserproben sowie den Luftkeimgehalt im Bereich des Melkstands. Den Analysen nach ist ein Eintrag über Luft und Wasser unwahrscheinlich. Allerdings weisen *Pseudomonas*-Keimzahlen über $4 \log \text{KbE/cm}^2$ an Dichtungen aus Gummi, z. B. des Zapfhahns, des Tankdeckels und des Melkzeug-Sammelstücks auf begünstigtes Wachstum von Biofilmen an diesen Stellen hin.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die Analyse der Fähigkeit zur Biofilmbildung von *Pseudomonas* spp. und des Verderbspotentials durch Bestimmung der Peptidaseaktivität. Zur Einschätzung des Risikos, welches von Biofilmen beim Verderb von Dauermilcherzeugnissen ausgeht, wurde das proteolytische Potential planktonischer Zellen gegenüber das der Biofilm-assoziierten Zellen gestellt. Zunächst wurde die gebildete Biofilmmasse mittels Kristallviolett-Assay von *Pseudomonas* spp. in 96-Well-Mikrotiterplatten sowie auf Edelstahl- und Gummi-Oberfläche quantifiziert und Keimzahlen in *Pseudomonas*-Mono-Biofilmen bei einer 6-tägigen Inkubation bei $6 \text{ }^\circ\text{C}$ in Milchmedium ermittelt. Die stamm- und temperaturspezifische sowie oberflächen- und mediumabhängige Biofilmbildung von Mono-Spezies- bzw. Rohmilch-assoziierten Multi-Spezies-Biofilmen wurde mittels rasterelektronenmikroskopischer Aufnahmen zur Analyse der Biofilm-Morphologie von *Pseudomonas* spp. auf Edelstahl- und Gummi-Oberfläche bestätigt.

Auch die Peptidaseaktivität von *Pseudomonas* spp. erwies sich beim Nachweis auf Magermilch-Agar sowie im Fluorescamin-Assay von *Pseudomonas*-Biofilmen als spezies- und isolatabhängig. Weiterhin wurde die Bildung von Peptidasen in *Pseudomonas*-Mono-Biofilmen mit einer erhöhten Aktivität im Vergleich zur planktonischen Wuchsform nachgewiesen. Die Ergebnisse zeigen, dass Biofilme einen weiteren Eintragsweg von *Pseudomonas* spp. in die Rohmilch darstellen und durch die erhöhte Peptidase-Bildung in dieser Wuchsform zum Milchverderb beitragen können.