



universität  
wien

# MASTERARBEIT

Titel der Masterarbeit

„Klassifizierung der bakteriellen Begleitflora in  
veterinärmedizinischen Proben“

verfasst von

Sandra Baumgardt, BSc

angestrebter akademischer Grad

Master of Science (MSc)

Wien, 2013

Studienkennzahl lt. Studienblatt:

A 066 830

Studienrichtung lt. Studienblatt:

Molekulare Mikrobiologie und Immunologie

Betreut von:

Univ.-Doz. Dr. Hans-Jürgen Busse



Mut steht am Anfang des Handelns, Glück am Ende.  
-Demokrit-



# Inhaltsverzeichnis

|         |                                                                         |    |
|---------|-------------------------------------------------------------------------|----|
| 1       | EINLEITUNG .....                                                        | 3  |
| 2       | ZIELSETZUNG .....                                                       | 11 |
| 3       | MATERIAL UND METHODEN .....                                             | 12 |
| 3.1     | MEDIEN, PUFFER UND LÖSUNGEN.....                                        | 12 |
| 3.2     | BAKTERIEN .....                                                         | 16 |
| 3.3     | KULTIVIERUNG DER BAKTERIEN .....                                        | 17 |
| 3.4     | CHEMOTAXONOMISCHE METHODEN.....                                         | 18 |
| 3.4.1   | <i>Extraktion von respiratorischen Chinonen</i> .....                   | 18 |
| 3.4.2   | <i>Extraktion von polaren Lipiden</i> .....                             | 19 |
| 3.4.3   | <i>Extraktion von Polyaminen</i> .....                                  | 20 |
| 3.4.4   | <i>Extraktion der Mykolsäuren</i> .....                                 | 21 |
| 3.5     | PHÄNOTYPISCHE METHODEN .....                                            | 22 |
| 3.5.1   | <i>Gram-Färbung und KOH-Test</i> .....                                  | 22 |
| 3.5.2   | <i>Nachweis von Enterokokken</i> .....                                  | 23 |
| 3.5.3   | <i>Nachweis für Enterobacteriaceae und Gram-negative Stäbchen</i> ..... | 23 |
| 3.5.4   | <i>Antibiogramme</i> .....                                              | 23 |
| 3.5.5   | <i>API 20 NE</i> .....                                                  | 24 |
| 3.6     | MOLEKULARBIOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN .....                               | 25 |
| 3.6.1   | <i>DNA Isolierung</i> .....                                             | 25 |
| 3.6.2   | <i>Primer design/ Polymerase Kettenreaktion (PCR)</i> .....             | 26 |
| 3.6.2.1 | <i>PCR des groEL Gens</i> .....                                         | 26 |
| 3.6.2.2 | <i>ITS PCR</i> .....                                                    | 28 |
| 3.6.2.3 | <i>ERIC PCR</i> .....                                                   | 29 |
| 3.6.2.4 | <i>REP PCR</i> .....                                                    | 30 |
| 3.6.3   | <i>Gelelektrophorese der PCR-Produkte</i> .....                         | 31 |
| 3.6.4   | <i>Aufreinigung des PCR- Produktes</i> .....                            | 31 |
| 3.6.5   | <i>Sequenzierung</i> .....                                              | 32 |

|       |                                                                               |     |
|-------|-------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 4     | ERGEBNISSE UND DISKUSSION.....                                                | 33  |
| 4.1   | ISOLAT 4284/11.....                                                           | 33  |
| 4.2   | ISOLAT 1438/12.....                                                           | 44  |
| 4.3   | ISOLATE 2385/12 UND 2673/12.....                                              | 46  |
| 4.4   | ISOLAT 2776/12.....                                                           | 46  |
| 4.5   | ISOLATE 1566/10, 1819/10, 1906/10, 2428/10, 2459/10 UND 114.....              | 50  |
| 5     | RESÜMEE.....                                                                  | 65  |
| 5.1   | ZUSAMMENFASSUNG.....                                                          | 65  |
| 5.2   | ABSTRACT .....                                                                | 66  |
| 6     | ANHANG .....                                                                  | 68  |
| 6.1   | <i>groEL</i> GENSEQUENZEN UND TRANSLATIERTE PROTEINSEQUENZEN .....            | 68  |
| 6.1.1 | <i>ClustalW Multiple Alignment 1.4 der groEL DNA-Sequenzen</i> .....          | 70  |
| 6.1.2 | <i>ClustalW Multiple Alignment 1.4 der GroEL Proteinsequenz</i> .....         | 71  |
| 6.2   | 16S/23S INTERGENISCHE SEQUENZEN .....                                         | 72  |
| 6.2.1 | <i>ClustalW Multiple Alignment 1.4 16S/23S Intergenischen Sequenzen</i> ..... | 73  |
| 7     | LITERATURVERZEICHNIS.....                                                     | 75  |
| I.    | MANUSKRIPTE.....                                                              | 86  |
| II.   | CURRICULUM VITAE .....                                                        | 105 |
| III.  | DANKSAGUNG.....                                                               | 106 |

# 1 Einleitung

Seit jeher befasst sich die Menschheit damit ihre Umgebung, die Umwelt oder auch Natur, besser zu verstehen, zu erforschen und sich Untertan zu machen. Schon im alten Griechenland schrieben die Menschen ihre Erfahrungen über diverse Krankheiten und den Tod nieder. Im Laufe der Zeit wurden die Methoden zur Untersuchung der körperlichen Leiden ausgefeilter, komplexer und zahlreicher. Die Ursachen wurden allerdings nicht immer medizinisch-biologisch erklärt, sondern den Göttern oder wie in Indien u.a. dem schlechten Karma zugeschrieben. Der Großteil der damaligen Methoden war aus heutiger Sicht jedoch mehr als fragwürdig.

Für die Mikrobiologie, und somit auch für die Diagnostik bzw. Taxonomie, war die Erfindung des Mikroskops ein entscheidender Meilenstein in der Geschichte. Das Wort Taxonomie kommt aus dem altgriechischen und setzt sich aus den zwei Wörtern *táxis* (Ordnung) und *nómos* (Gesetz) zusammen. Die Taxonomie befasst sich auf der einen Seite mit der Klassifizierung von Organismen, welche die genetischen und/oder die phänotypischen Eigenschaften zusammenfasst, auf der anderen Seite mit der Nomenklatur - der Benennung. Die Identifizierung, oder auch Diagnostik genannt, befasst sich mit der praktischen Anwendung der Taxonomie, also dem Einsatz von biochemischen und molekularbiologischen Methoden, wie die Oxidation und Fermentation von Kohlenhydraten und Sequenzanalysen. Die Taxonomie gilt als Basis jeder diagnostischen Untersuchung.

Durch die Erfindung des Mikroskops im 17. Jahrhundert durch Leewenhoek konnten Mikroorganismen erstmals genauer betrachtet und erforscht werden. Leewenhoek entdeckte sie bei der mikroskopischen Untersuchung seines Speichels und beschrieb sie als kleine Tiere (Leewenhoek, 1684). Ende des 19. Jahrhunderts studierte der Botaniker Cohn die Wasserqualität eines Breslauer Brunnens, wobei er die ersten Bakteriengenera beschrieb, sie jedoch zu den Pflanzen zählte (Cohn, 1872). 1884 beschrieb Rosengarten das Genus *Streptococcus*, dessen Ergebnisse heutzutage noch bindend sind. In dieser Zeit wurden viele der uns heute bekannten bakteriellen Pathogene beschrieben (Schleifer, 2009). Im selben Jahr entwickelt Gram die nach ihm benannte Gramfärbung. Diese ermöglichte eine bessere Betrachtung der Bakterien in Gewebeschnitten. Erst später wurde die Bedeutung für die Taxonomie entdeckt - dass die Färbung eine Einteilung der Bakterien

aufgrund ihrer Zellwandbeschaffenheit erlaubt (Schaal & Kühn, 1994). Anfang des 20. Jahrhunderts entwickelte Beijerinck Anreicherungskulturen, womit nun eine Vielzahl von Mikroorganismen aus Böden kultiviert werden konnte (Madigan & Martinko, 2006).

Im 20. Jahrhundert leitete die Entdeckung der Desoxyribonukleinsäure (DNA - „deoxyribonucleic acid“) (Watson & Crick, 1953) und der DNA-Sequenzierung (Sanger *et al.*, 1977) eine neue Ära ein, die auch die Taxonomie revolutionierte. Ebenso wie die Erkenntnisse von Woese, der in den 60er und 70er Jahren seine Arbeit auf die ribosomale Ribonukleinsäure (rRNA - „ribosomal ribonucleic acid“) fokussierte (Hecht *et al.*, 1968; Woese, 1968; Woese *et al.*, 1975) und letztendlich die 16S rRNA für phylogenetische Untersuchungen heranzog (Fox *et al.* 1977). Die 16S rRNA ist ein hochkonserviertes Molekül, welches die kleine Untereinheit von Ribosomen darstellt. Aufgrund dessen, dass dieses Molekül ubiquitär vorhanden, relativ groß und funktional konserviert ist (Woese & Fox, 1977; Fox *et al.*, 1980), ist es ideal geeignet, um Verwandtschaften auf molekularbiologischer Ebene darzustellen. Woese erklärte, dass anhand der 16S rRNA Sequenzen die lebende Welt in drei Reiche unterteilt werden kann. Die Archaea, die Eubakterien und die Eukaryonten, bei denen es analog die 18S rRNA ist (Woese & Fox, 1977). Die Möglichkeit der 16S rRNA Genanalyse hatte zur Folge, dass es zur Re-Klassifizierung von mehreren Bakterien kam.

Die Klassifizierung von Bakterien ist nicht nur für die Mikrobiologie von Vorteil, sondern auch in anderen Bereichen wie der Medizin oder der Biotechnologie. In der Medizin ist es zum Teil essenziell, zu wissen, mit welchem Bakterium man es zu tun hat. Der Pesterreger *Yersinia pestis*, zum Beispiel, verursachte drei große Pandemien. Als die dritte Pandemie 1894 Hongkong erreichte, schaffte Yersin im gleichen Jahr den Erreger zu isolieren und zwei Jahre später ein Antiserum zu entwickeln (Perry & Fetherston, 1997). Aufgrund der Identifizierung 1894 ist man heutzutage in der Lage Patienten zu behandeln und entsprechende Maßnahmen zur Eindämmung des Erregers einzuleiten, um mögliche Epidemien zu vermeiden.

Auf der anderen Seite werden Bakterien in der Biotechnologie eingesetzt. Besonders in der Lebensmittelindustrie werden unter anderem *Acetobacter* als auch *Gluconobacter* genutzt, um aus Ethanol Essigsäure herzustellen (Schmidt, 1996). Für die Joghurtherstellung sind

Milchsäurebakterien, wie die klassischen Joghurt-Bakterienstämme *Lactobacillus bulgaricus* oder *Streptococcus thermophilus* von Bedeutung. Laktobazillen sind jedoch nicht nur für die Industrie von Vorteil, sondern auch für den menschlichen Körper. Wie auch Bifidobakterien hemmen Laktobazillen durch Säurebildung Fäulnisbakterien, wodurch diese in der Mikroflora des Darms verdrängt werden und die Anzahl möglicher pathogener Bakterien sinkt (Unger, 1991). Auch hier ist wieder erkennbar, dass die Klassifizierung von Bakterien den Umgang mit diesen vereinfacht und unumgänglich macht.

Dieses Vorkommen von Nutzen und Schaden ist auch auf bzw. in menschlichen und tierischen Körpern zu finden. Die Oberfläche der Haut bzw. der Schleimhäute ist besiedelt durch zahlreiche Bakterienarten, welche in der Regel keine Krankheiten auslösen. Daher wird das Vorkommen solcher Bakterien als Normalflora bezeichnet. Beispielsweise findet man *Corynebacterium ciconiae* in der Luftröhre von Schwarzstörchen (Fernández-Garayzábal, et al., 2004) oder *Corynebacterium falsenii* und *Corynebacterium aquilae* in den Atemwegen von Adlern (Fernández-Garayzábal, et al., 2003).

Bei Patienten oder bei immunsuppressiven Menschen beispielsweise wird die Normalflora gestört und fremde, nicht wirtstypische Bakterien als auch Bakterien der Normalflora mit pathogener Wirkung können vermehrt wachsen oder in andere Gewebe abwandern und Erkrankungen verursachen (Guarner & Malagelada, 2003; Cogen et al., 2008). Abwandernde Darmbakterien sind unter anderem *Escherichia coli* und *Proteus mirabilis*, die in verschiedenen Segmenten des mesenterischen Lymphknotens nachzuweisen waren (Gauteraux et al., 1994).

Welche Bakterien in welchem Menschen/Tier und in welcher Region des Körpers zu finden sind, ist variabel (McFarland, 2000). Zwar findet man bei Mensch und Tier *Streptococcus mitis*, *Neisseria* und koagulase-negative Staphylokokken, jedoch weist die Nasen- und Rachenflora des Menschen mehr Bakterien des Genus *Haemophilus* und Pneumokokken und weniger coliforme Bakterien auf als sie beim Hund zu finden sind (Clapper & Meade, 1963).

Die Normalflora der menschlichen Haut beinhaltet *Staphylococcus epidermidis* als auch Arten des Genus *Corynebacterium*, wie *Corynebacterium diphtheriae* und *Corynebacterium jeikeium* (Cogen et al., 2008). *Staphylococcus epidermidis* bildet eine mutualistische Symbiose, das heißt, dass beide Partner, Bakterium und Wirt, einen Vorteil aus dieser

Verbindung ziehen (Cogen *et al.*, 2008). Ein Vorteil für den Wirt ist, dass *Staphylococcus epidermidis* Lantibiotika, Lanthionin-enthaltende antibakterielle Peptide, produziert, welche toxisch auf andere Gram-positive Bakterien, wie *Staphylococcus aureus*, wirken (Cogen *et al.*, 2008, Brötz & Sahl, 2000). In immunsuppressiven Patienten kann *S. epidermidis* jedoch unter Umständen auch eine Sepsis hervorrufen (Cogen *et al.*, 2008). In einer Studie von Adams *et al.* (2010) wurde die Normalflora der Haut von gesunden Pferden untersucht. Hauptsächlich wurden Bakterien der Genera *Bacillus*, koagulase-negative Staphylokokken und nicht-hämolytische Streptokokken gefunden, wobei die letzten Beiden auch in Infektionen des Stütz- und Bewegungsapparats von Pferden gefunden worden sind (Moore *et al.*, 1992). Wie auch bei der humanen Normalflora der Haut wurden bei Pferden Bakterien des Genus *Corynebacterium* gefunden (Adams *et al.*, 2010).

Kommt es nun zu einer Infektion, so nimmt der (Tier)arzt in der Regel eine Probe des infizierten Bereichs und schickt diese mit einer Diagnose in ein mikrobielles Labor. Dort werden von den eingegangenen Proben Reinkulturen angelegt und diese dann allgemein morphologisch betrachtet und entsprechend der Diagnose stoffwechselphysiologisch untersucht. Dabei kann es auch manchmal zu Fehldiagnosen kommen, wenn aufgrund eines falschen Verdachts nicht die richtigen Untersuchungen durchgeführt worden sind. Verschiedene Bakterien wurden aus Patienten mit gleichen oder sehr ähnlichen Symptomen isoliert. So verursacht *Streptococcus pneumoniae* eine Lungenentzündung (Savini *et al.*, 2008). Allerdings konnten aus Patienten mit den Symptomen einer Lungenentzündung auch Bakterien wie *Legionella nagasakiensis* (Yang *et al.*, 2012) und *Corynebacterium sputi* (Yassin & Siering, 2008) isoliert werden.

Durchaus kann es auch vorkommen, dass Erreger nur schwer zu kultivieren sind. *Mycobacterium leprae* ist derzeit nur in lebenden Zellen kultivierbar (Truman & Krahenbuhl, 2001).

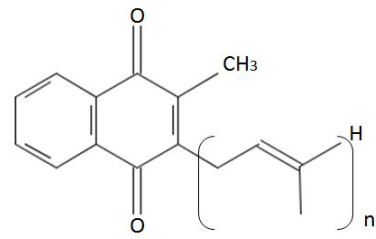
Neben den vermuteten Erregern finden sich jedoch auch Bakterien der Normalflora auf den mit den eingegangenen Proben angeimpften Agarplatten. Diesen Bakterien wird in der Regel keine Bedeutung geschenkt. Sollte dies doch einmal der Fall sein, so kommen neben der 16S

rRNA Sequenzierung auch chemotaxonomische Methoden zum Einsatz, um Bakterien der Begleitflora zu klassifizieren.

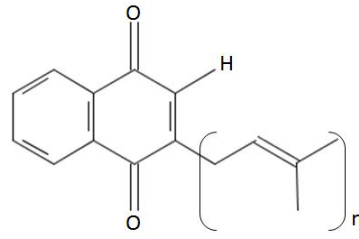
Analysiert werden dabei niedermolekulare Zellkomponenten wie Chinone, polare Lipide, Polyamine, Fettsäuren und Mykolsäuren. Diese Eigenschaften sind meist konserviert, sodass eine Einteilung der Isolate auf Genus- oder sogar auf Artebene möglich ist.

Die respiratorischen Chinone sind Teile der Elektronentransportkette und befinden sich in der Zellmembran von Bakterien als auch in den Mitochondrien. Die Einteilung der Chinone erfolgt nach ihrer chemischen Struktur. Menachinone (MK) haben einen Naphtholring, während Ubichinone (auch Benzochinone genannt, Q) einen Benzolring in ihrer Struktur aufweisen. Außerdem gibt es noch Derivate der eben genannten Chinone, wie Demethylmenachinon (DMK) und Rhodochinon (RQ), welche aber eher selten auftreten (Collins & Jones, 1981; Busse *et al.*, 1996).

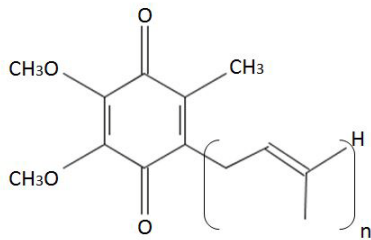
Alle vier Chinonarten besitzen eine Seitenkette, die aus 6-14 Isoprenoideinheiten besteht. Bei den Menachinonen können einzelne Isoprenoideinheiten auch gesättigt auftreten (Collins & Jones, 1981). Die Variationen der Chinonsysteme und der Isoprenoidseitenketten dienen als taxonomisches Mittel zur Klassifizierung von Bakterien (Mannheim *et al.*, 1978). Ubichinone sind beispielsweise ausschließlich in alpha-, beta- und gamma-Proteobakterien zu finden, was wiederum nicht ausschließt, dass auch Menachinone in diesen drei Gruppen gefunden werden können (Busse *et al.*, 1996).



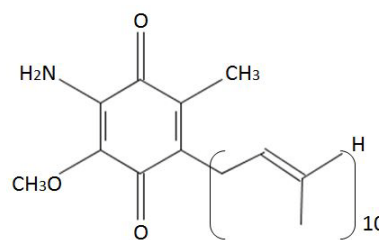
Menachinon (MK-n)



Demethylmenachinon (DMK-n)



Ubichinon (Q-n)



Rhodochinon

**Abbildung 1:** Struktur von verschiedenen Chinonarten nach Collins & Jones (1981)

Polare Lipide sind Bestandteil der Bakterienmembran und können Phosphat-, Amino- und/oder Zuckergruppen enthalten. Aufgrund ihres Aufbaus besitzen polare Lipide unterschiedliche Ladungen und zeigen daher in der Dünnschichtchromatografie ein unterschiedliches chromatisches Verhalten (Busse *et al.*, 1996). Häufig vorkommende polare Lipide sind beispielsweise Diphosphatidylglycerol, Phosphatidylglycerol, Phosphatidylethanolamin oder Phosphatidylinositol (Lechevalier & Moss, 1977). Die Zusammensetzung von verschiedenen polaren Lipiden gibt Aufschluss zu welcher Familie oder sogar Art das Isolat gehört.

Polyamine sind polykationische Verbindungen (Tabor & Tabor, 1985), die mehrere Aminogruppen besitzen. Sie kommen in lebenden Zellen, eukaryotisch als auch prokaryotisch, vor und sind in diversen biologischen Abläufen involviert, wie u.a. bei der Biosynthese von Proteinen und Nukleinsäuren (Tabor & Tabor, 1985). Das Vorkommen von Polyaminen weist auf, zu welcher Familie oder sogar zu welchem Genus das Isolat gehört (Busse *et al.*, 1996). Beispielsweise ist ein Vorkommen von ca. 90% an 1,3-Diaminopropan der Gesamtpolyamine charakteristisch für den Genus *Acinetobacter* (Busse & Auling, 1988; Auling *et al.*, 1991; Hamana & Matsuzaki, 1992).

**Tabelle 1:** Natürlich vorkommende Polyamine (Kneifel *et al.*, 1986; Busse & Auling, 1988)

| Struktur                                                                                                                       | Bezeichnung               | Abkürzung |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------|-----------|
| $\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}_2$                                                                               | 1,3-Diaminopropan         | DAP       |
| $\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2)_4-\text{NH}_2$                                                                               | Putrescin                 | PUT       |
| $\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{CHOH}-(\text{CH}_2)_2-\text{NH}_2$                                                       | 2-Hydroxyputrescin        | HPUT      |
| $\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2)_5-\text{NH}_2$                                                                               | Cadaverin                 | CAD       |
| $\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}_2$                                                     | <i>sym</i> -Norspermidin  | NSPD      |
| $\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}-(\text{CH}_2)_4-\text{NH}_2$                                                     | Spermidin                 | SPD       |
| $\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2)_4-\text{NH}-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}_2$                                                     | <i>sym</i> -Homospermidin | HSPD      |
| $\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}_2$                           | <i>sym</i> -Norspermin    | NSPM      |
| $\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}-(\text{CH}_2)_4-\text{NH}-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}_2$                           | Spermin                   | SPM       |
| $\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}-(\text{CH}_2)_4-\text{NH}_2$                           | Thermospermin             | TSPM      |
| $\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2)_4-\text{NH}-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}-(\text{CH}_2)_4-\text{NH}_2$                           | Canavalmin                | CANV      |
| $\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}_2$ | Caldopentamin             | CLPA      |
| $\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}-(\text{CH}_2)_4-\text{NH}_2$ | Homocaldopentamin         | HCPA      |

Fettsäuren sind Kohlenwasserstoffketten, die nicht nur gesättigt oder ungesättigt vorkommen können, sondern auch verzweigt bzw. unverzweigt, mit einem Cyclopropanring aber auch mit weiteren funktionellen Gruppen als sogenannte Hydroxy-Fettsäuren (Welch, 1991). Diese Hydroxy-Fettsäuren können als 2-Hydroxy- oder 3-Hydroxy-Fettsäuren in der Lipid A Komponente des Lipopolysaccharids vorkommen und werden daher als Marker für Gram-negativen Bakterien verwendet (Welch, 1991). Die Analyse der Fettsäuren erfolgt mittels Gaschromatografie, ist artspezifisch und wird zur Identifikation in diagnostischen Laboren eingesetzt, wie zum Beispiel der Nachweis von *Staphylococcus* Arten (Durham & Kloos, 1978; Wieser & Busse, 2000).

Mykolsäuren sind langkettige 3-Hydroxyfettsäuren, die an der zweiten Position verzweigt sind (Collins *et al.*, 1982). Sie kommen nur bei Bakterien der Unterordnung *Corynebacterineae* vor, mit Ausnahme einzelner Taxa (Bernard & Funke, 2012). Die Länge kann variieren von 20 bis 90 C-Atomen, wobei die Länge artspezifisch ist. So findet man bei Mykobakterien Mykolsäuren mit einer Länge von 60-90 C-Atomen, während die meisten Corynebakterien Mykolsäuren mit einer Länge von 22-36 C-Atomen besitzen (Collins *et al.*, 1982).

Zu den molekularbiologischen Methoden in der Diagnostik zählen die Untersuchungen von repetitiven Sequenzen. Repetitive Sequenzen sind hoch konservierte, nicht codierende Bereiche im Genom von Bakterien, die in einer unterschiedlichen Anzahl von Kopien vorkommen (Hulton *et al.*, 1991; Versalovic *et al.*, 1991). Die Untersuchungen werden auch als Fingerabdruckmethoden bezeichnet. Zu den repetitiven Sequenzen zählen „enterobacterial repetitive intergenic consensus“ (ERIC) Elemente und „repetitive extragenic palindromic“ (REP) Elemente. Beide Methoden lassen sich schnell und einfach einsetzen (Loncaric *et al.*, 2009), da universelle Primer benutzt werden können (Versalovic *et al.*, 1991), und die Ergebnisse leicht zu reproduzieren sind. Die Auswertung erfolgt durch das Vergleichen der Bandenmuster, die Unterschiede zwischen Bakterienarten als auch – stämmen zeigen, wie Versalovic *et al.* (1991) für den Laborstamm *E. coli* K-12 und pathogenen Stämmen von *E. coli* gezeigt hat.

## **2 Zielsetzung**

Üblicherweise wird die Begleitflora in klinischen Proben nicht näher untersucht. Um Kenntnisse zur taxonomischen Zuordnung solcher Isolate zu erlangen, war es Ziel dieser Arbeit ausgewählte Isolate der bakteriellen Begleitflora in veterinärmedizinischen Proben zu klassifizieren. Die Mehrzahl der Isolate war vorläufig mittels 16S rRNA Gensequenzanalyse klassifiziert und so als potenzielle neue Arten identifiziert worden. Diese Isolate sollten mittels weiterer geeigneter molekularbiologischer Untersuchungen, wie die Analyse eines Haushaltsgens und der 16S/23S rRNA intergenische Sequenz und genomischer Fingerabdrucktechniken, klassifiziert werden. Weiters sollte durch Analyse chemotaxonomischer Merkmale (polaren Lipide, Chinone, Polyamine) der Status dieser Isolate als neue Arten geklärt werden.

### **3 Material und Methoden**

#### **3.1 Medien, Puffer und Lösungen**

##### **Blaumarker (6x)**

0.25% Bromphenolblau (Riedel-de Haen)

40.0% Saccharoselösung (Merck)

**Columbia III** Agar mit 5% Schafsblut (BD Becton Dickinson)

##### **5-Dimethylaminonaphthalin-1-sulfonylchlorid (Dansylchloridlösung)**

0.0075 g Dansylchlorid (AppliChem)

10.0 ml Aceton (Roth)

##### **Galle Aesculin Azid Agar**

54.65 g Galle Aesculin Azid Agar (Merck 1.00072)

ad 1 L Milli-Q-Wasser (Merck Millipore) (dH<sub>2</sub>O)

##### **Gram-Färbung**

Färbeset: Gram-color (Merck 1.118855.0001)

##### **Krypuffer pH 7.4**

100.0 ml di-Kaliumdrogenphosphat (Roth) (0.5 M)

100.0 ml Kaliumdihydrogenphosphat (Roth) (0.5 M)

miteinander vermischen um einen pH von 7.4 zu bekommen

**MacConkey II Agar** (BD Becton Dickinson)

**Molybdatophosphorsäure**

5.0 g Molybdatophosphorsäure-Hydrat (Merck)

100.0 ml Ethanol p.a. (AustrAlco)

**Molybdenum Blue**

Molybdenum Blue Spray Reagent, 1.3% (Sigma)

**Müller-Hinton-Agar** (BD Becton Dickinson)

**$\alpha$ -Naphthol**

Lösung A:

150.0 ml  $\alpha$ -Naphthol (Roth)

850.0 ml Chloroform/ Methanol (25:30) (Roth/ Sigma)

10.5 ml Lösung A

40.5 ml Ethanol p.a. (AustrAlco)

4.0 ml dH<sub>2</sub>O

6.5 ml konz. Schwefelsäure (Roth)

**0.3% Natriumchlorid (NaCl)**

3.0 g Natriumchlorid (Roth)

ad 1 L dH<sub>2</sub>O

## **Ninhydrin**

0.2 g Ninhydrin (Riedel-de Haen)

100.0 ml Ethanol p.a. (AustrAlco)

**DrySlide™ Oxidase** (BD Becton Dickinson BBL Baltimore Biological Laboratory™)

## **1x Pepton-Yeast-Extract (PYE) – Medium**

3.0 g Trypton/ Pepton aus Casein (Roth)

3.0 g Hefeextrakt (Merck)

ad 1 L dH<sub>2</sub>O

pH 7.2

Für Festmedien wurde 7.5 g Agar (Bacteriological Agar Oxoid) beigelegt.

## **3.3x PYE – Medium**

9.9 g Trypton/ Pepton aus Casein (Roth)

9.9 g Hefeextrakt (Merck)

ad 1 L dH<sub>2</sub>O

pH 7.2

Für Festmedien wurde 7.5 g Agar (Bacteriological Agar Oxoid) beigelegt.

## **0.89 – 0.9% Saline**

8.9 - 9.0g Natriumchlorid (Roth)

ad 1 L dH<sub>2</sub>O

**10x TBE**

108.0 g Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris) (Roth)

55.0 g Borsäure (Roth)

9.3 g Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) (Roth)

ad 1 L dH<sub>2</sub>O

Zu autoklavierende Medien und Lösungen wurden bei 121 °C und 1.5 bar für 15 min autoklaviert.

### 3.2 Bakterien

Die in Tabelle 2 und 3 aufgeführten Bakterien, Isolate und Referenzstämme, wurden von Igor Loncaric bzw. Hans-Jürgen Busse (Institut für Bakteriologie, Mykologie und Hygiene – Veterinärmedizinische Universität Wien) bereitgestellt, mit der Ausnahme des Isolats 114, welches von Gottfried Wilharm (Robert Koch Institut, Wernigerode) zur Verfügung gestellt wurde.

**Tabelle 2:** Auflistung der zu untersuchenden Isolate der Begleitflora von diagnostischen Proben. Die Kultivierung geschah bei 28 °C.

| Isolat  | Tier            | Ursprung                            | Agartyp  |
|---------|-----------------|-------------------------------------|----------|
| 114     | unbekannt       | unbekannt                           | 1x PYE   |
| 1566/10 | Pferd           | Wundtupfer                          | 1x PYE   |
| 1819/10 | Katze           | Wundtupfer                          | 1x PYE   |
| 1906/10 | Wellensittich   | Darm                                | 1x PYE   |
| 2428/10 | Pferd           | Wundtupfer                          | 1x PYE   |
| 2459/10 | Pferd           | Tupfer Stirnhöhle                   | 1x PYE   |
| 4284/11 | Königspython    | Lufröhrentupfer                     | 1x PYE   |
| 1438/12 | Pferd           | Lavage                              | 1x PYE   |
| 2385/12 | Tapir           | Tupfer Mandeln                      | 3.3x PYE |
| 2673/12 | Hund            | Nasentupfer                         | 3.3x PYE |
| 2776/12 | Meerschweinchen | Harnblasenwand/<br>Tupfer Bauchfell | 3.3x PYE |

**Tabelle 3:** Auflistung der Referenzstämme; T-Typstamm, PYE - peptone-yeast-extract.

Die Kultivierung geschah bei 28 °C. Abkürzungen: ATCC – American Type Culture Collection, DSM – Deutsche Sammlung Mikroorganismen und CIP – Collection of Institute Pasteur

| Referenzstamm                                           | Stammnummer             | Agartyp  |
|---------------------------------------------------------|-------------------------|----------|
| <i>Acinetobacter baumannii</i>                          | ATCC 19606 <sup>T</sup> | 1x PYE   |
| <i>Acinetobacter haemolytica</i>                        | ATCC 17906 <sup>T</sup> | 1x PYE   |
| <i>Acinetobacter lwoffii</i>                            | DSM 2403 <sup>T</sup>   | 1x PYE   |
| <i>Acinetobacter johnsonii</i>                          | DSM 6963 <sup>T</sup>   | 1x PYE   |
| <i>Corynebacterium humireducens</i>                     | DSM 45392 <sup>T</sup>  | 3.3x PYE |
| <i>Corynebacterium singulare</i>                        | CIP 105491 <sup>T</sup> | 3.3x PYE |
| <i>Luteimonas aestuarii</i>                             | DSM 19680 <sup>T</sup>  | 1x PYE   |
| <i>Lysobacter enzymogenes</i> subsp. <i>enzymogenes</i> | LMG 8762 <sup>T</sup>   | 1x PYE   |
| <i>Luteimonas mephitis</i>                              | CIP 107229 <sup>T</sup> | 1x PYE   |
| <i>Streptococcus devriesei</i>                          | DSM 19639 <sup>T</sup>  | 3.3x PYE |
| <i>Streptococcus ursoris</i>                            | DSM 22768 <sup>T</sup>  | 3.3x PYE |

### 3.3 Kultivierung der Bakterien

Die verschiedenen Bakterienstämme wurden auf PYE Agar entsprechend Tabelle 2 und 3 kultiviert. Die Anzucht im entsprechenden Flüssigmedium erfolgte in 20 ml Vorkulturen und wurde solange bei 28 °C geschüttelt, bis sich eine Trübung einstellte. In Abhängigkeit der Trübung wurde ein Teil der Vorkultur in eine 300 ml Hauptkultur überführt und weiter kultiviert. Letztendlich wurde die Bakteriensuspension bei 4 °C und 8000 Umdrehung pro Minute (UPM) für 30 min zentrifugiert (Thermo Scientific Sorvall RC 6+, Rotor: F12-6x500 LEX). Im Anschluss wurde der Überstand abgegossen, das Pellet in ca. 35 ml Saline (0.89%) suspendiert und schließlich noch einmal bei 4 °C und 13000 UPM für 7 min (Rotor: F21S-8x50) zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut verworfen und das Pellet bis zur Lyophilisation bei -20 °C eingefroren. Das Gefriertrocknen erfolgte bei ca. -50 °C (Telstar Cryodos) bis das Pellet trocken war.

Zur Herstellung von Kryokulturen wurden von einem gut bewachsenen Ausstrich auf PYE Agar die Zellen geerntet, indem diese mit 1.9 ml Kryopuffer überschichtet wurden, mit der Pipettenspitze die Kultur leicht abgeschabt und schließlich durch wiederholtes Aufsaugen

resuspendiert wurden. Von der Suspension wurde 1.1 ml in ein gekühltes Kryoröhrchen pipettiert und mit 800 µl 50%igem Glycerin (Sigma) vermischt. Die Kryokultur wurde noch 30 min auf Eis stehen gelassen, damit sich die Suspension auf die Kälte einstellt und wurde schließlich bei -80 °C gelagert.

Für beide Methoden wurde ein Kontrollausstrich angefertigt, um zu überprüfen, ob die Flüssigkultur nicht kontaminiert war bzw. die Zellen für die Kryokonservierung noch lebensfähig waren.

### **3.4 Chemotaxonomische Methoden**

#### **3.4.1 Extraktion von respiratorischen Chinonen**

Für die Extraktion der Chinone (Tindall, 1990; Altenburger *et al.*, 1996) wurde lyophilisierte Biomasse der zu untersuchenden Stämme benötigt. Daher wurde von dieser in der Regel 100 mg in kleine Glasröhrchen mit Schraubverschluss und Teflondichtung (Pyrex) eingewogen. Dazu wurden 2 ml Methanol p.a. (Sigma-Aldrich) und ein Rührfisch dazu gegeben und geschüttelt. Im Anschluss daran wurde 1 ml n-Hexan (Roth) zur Mischung pipettiert und mit Stickstoff begast, um eine inerte Atmosphäre zu gewähren. Das Ganze wurde 30 min, im abgedunkelt Zustand, auf dem Magnetrührer (Heidolph 3001) gerührt. Hierbei erfolgte die eigentliche Extraktion der Chinone aus den Zellen.

Im Anschluss wurde die abgedunkelte Mischung bis zur Phasentrennung stehen gelassen. Nach erfolgter Phasentrennung wurde 1 ml eiskaltes n-Hexan dazu pipettiert und die Mischung bei 4 °C und 3000 UPM für 5 min zentrifugiert (Thermo Scientific Sorvall RC 6+, Rotor: F21S-8x50).

Die obere n-Hexanphase wurde mit einer Pasteurpipette abgehoben und in ein Glasröhrchen mit Schraubverschluss und Teflondichtung pipettiert. Zu dem restlichen Methanolgemisch wurden erneut 2 ml eiskaltes n-Hexan und 2 ml 0.3% Saline gegeben und für weitere 5 min zentrifugiert. Wiederum wurde im Anschluss die obere n-Hexanphase abgenommen und mit der Ersten vereinigt.

Die beiden Hexanfraktionen wurden sodann unter Stickstoffbegasung bis zur absoluten Trockne eingedampft und bis zur Analyse mittels „High Performance Liquid Chromatography“ (HPLC – Lauf) bei -20 °C gelagert.

Für die HPLC-Analyse wurden die Chinone im Laufmittel (1-Chlorbutan/ Methanol; (1:9) (Merck/ Sigma) gelöst. Die Detektion der Chinone erfolgte bei 269 nm. Das HPLC-System war ausgestattet mit folgenden Komponenten: JASCO LG-1580-02, JASCO PU-2080 PLUS Intelligent HPLC Pump, JASCO UV-2075 ULIS Intelligent UV/VIS Detector, CMA/260 Degaser sowie einer Hypersil ODS RP 18 Säule (250 4,6 mm, 5 µm Partikel).

### 3.4.2 Extraktion von polaren Lipiden

Das Methanolgemisch aus der Chinonextraktion wurde für die Lipidextraktion (Tindall, 1990; Altenburger *et al.*, 1996) verwendet, mit der Ausnahme des Isolats 2776/12 und dessen Referenzstämmen *S. devriesei* DSM 19639<sup>T</sup> und *S. ursoris* DSM 22768<sup>T</sup>. Hier wurde die bei -20 °C gelagerte feuchte Biomasse verwendet. Folgende Mengen wurden eingewogen: 2776/12 0.491 g, *S. ursoris* DSM 22768<sup>T</sup> 0.330 g und *S. devriesei* DSM 19639<sup>T</sup> 0.271 g.

Zu dem Methanolgemisch aus der Chinonextraktion wurden zusätzlich 3 ml Methanol und 2.5 ml Chloroform p.a. (Roth) dazu pipettiert, um ein Mischungsverhältnis von 1:2:0.8 (Chloroform, Methanol, 0.3% NaCl) zu erhalten.

Die Mischung wurde mit Stickstoff begast und anschließend für 15 min auf 80 °C erhitzt (Grant Instruments). Zwischendurch wurden die Proben mehrmals geschüttelt. Nach Abkühlen der Probenmischung wurde gewartet, ob eine unerwünschte Phasentrennung durch Vorhandensein von überschüssigem Hexan erfolgte. Im Falle einer Phasentrennung wurde so viel Methanol hinzugefügt, bis keine Trennung mehr zu erkennen war. Die Suspension wurde im Anschluss für 10 min bei 4 °C und 3000 UPM zentrifugiert. Wurde noch eine Hexanphase beobachtet, so wurde solange Methanol hinzugefügt, bis die Phasentrennung aufgehoben war. Es folgte eine erneute Zentrifugation für 5 min (Pelletierung). Der Überstand wurde mit 2.5 ml Chloroform und 2.5 ml 0.3% NaCl vermischt und erneut für 5 min zentrifugiert. Die untere Chloroformphase wurde in ein Glasröhrchen mit Schraubverschluss überführt, unter Stickstoffbegasung eingedampft und schließlich in 150 µl Chloroform/ Methanol (2:1) gelöst. Bis zur nachfolgenden Dünnschichtchromatografie wurden die Proben bei -20 °C gelagert.

Die Dünnschichtchromatografie (Tindall, 1990) wurde auf Kieselgelplatten 60 (Alugram®Sil G/UV<sub>254</sub>, Macherey-Nagel), welche auf ein Format 10x10 cm zugeschnitten wurden, durchgeführt. Das Laufmittel der ersten Dimension bestand aus

Chloroform/Methanol/Wasser (65:25:4), während sich das Laufmittel der zweiten Dimension aus Chloroform/Methanol/Eisessig (Roth)/ Wasser (80:12:15:4) zusammensetzte.

Die Detektion der Lipide erfolgte mit diversen Sprühreagenzien:

Für die Detektion der Gesamtlipide wurde die Dünnschichtchromatografieplatte mit Molybdätdiphosphorsäure besprüht und bei 140 °C im Ofen (Heraeus) inkubiert. Zu erwarten waren dunkelblaue-grau Flecke auf gelbgrünem Hintergrund.

Aminolipide wurden, nach Besprühen mit Ninhydrin-Reagenz, bei 100 °C detektiert (Memmert) während Phospholipide mit Molybdenum Blue bei Raumtemperatur gefärbt wurden. Aminolipide erscheinen als pink-farbene Flecken auf einem schwach rosa Hintergrund. Phospholipide erscheinen als blaue Flecken.

Glykolipide erschienen nach besprühen mit  $\alpha$ -Naphthol im Ofen (Heraeus) bei 100 °C als violette-rötliche Flecken. Zur besseren Identifizierung wurden die Glykolipide der Dünnschichtchromatografie bei 160 °C eingebrannt.

### 3.4.3 Extraktion von Polyaminen

Für die Extraktion der Polyamine wurde die Biomasse bei ca. 70% der maximalen OD<sub>600</sub> (optische Dichte) geerntet und gefriergetrocknet.

Mit der Ausnahme von dem Isolat 4284/11 konnten alle Isolate und Referenzstämme in 100 ml PYE bzw. 3.3x PYE angezüchtet werden. Im Falle von 4284/11 wurde das Isolat in einer 300 ml Kultur angezüchtet.

Für das Isolat 2776/12 als auch für die Referenzstämme *L. mephitis* CIP 107229<sup>T</sup> und *L. aestuarii* DSM 19680<sup>T</sup> konnten keine Wachstumskurven erstellt werden, da diese Stämme in Flüssigkultur Flocken bildeten und somit keine zuverlässige OD gemessen werden konnte. Daher wurden zwei Kulturen mit unterschiedlicher Menge an Vorkultur angeimpft. Geerntet wurde in der späten exponentiellen Phase, das heißt sobald die Kultur, welche mit geringerem Inokulat angesetzt wurde, sich der anderen Kultur in der Trübung stark annähert.

Zur Analyse (Busse & Auling, 1988; Altenburger *et al.*, 1997) wurden ca. 40 mg lyophilisierte Biomasse eingewogen. Zur Einwaage wurden 1 ml Perchlorsäure (0.2 M) und pro 40 mg Biomasse 1  $\mu$ mol (Gram-negative Bakterien) und 20 nmol (Gram-positive Bakterien) des internen Standards (1,8 Diaminooctan; 20 $\mu$ mol/ml bzw. 0.4  $\mu$ mol/ml) dazu pipettiert. Die

Suspension wurde für 30 min bei 100 °C (Bioer) erhitzt, wobei erst nach 15 min das erste Mal geschüttelt wurde. Anschließend wurde die Suspension in ein 1.5 ml Reagenzgefäß überführt und für 10 min bei 12000 UPM zentrifugiert (Hermle Z 233 MK-2). Von dem Überstand wurden 200 µl in rundboden Pyrexröhrchen mit Teflondichtung pipettiert, während der Rest als Reserve bei -20 °C eingefroren wurde.

Zu dem Überstand wurden 300 µl Natriumcarbonat (100mg/ml) (Roth) und 800 µl Dansylchloridlösung dazu pipettiert, die Röhrchen fest verschlossen und für 20 min bei 60 °C (Bioer) inkubiert. Nachdem die Lösung auf Raumtemperatur abgekühlt war, wurden 100 µl Prolinlösung (50 µg/ml H<sub>2</sub>O) dazu gegeben und für weitere 10 min bei 60 °C inkubiert. Sobald das Reaktionsgemisch auf 4 °C abgekühlt war, wurden 100 µl Toluol (AppliChem) dazugegeben und kräftig geschüttelt (Extraktion der dansylierten Polyamine).

Von der Toluolphase wurden ca. 20 µl in die HPLC zur Analyse injiziert. Die Elution erfolgte mit einem linearen Gradient (Acetonitril (Roth)/ H<sub>2</sub>O von 40/60-100/0 in 50 min) und einer Flußrate von 1 ml/ min bei 40 °C. Die dansylierten Polyamine wurden mit einer Wellenlänge von 360 nm angeregt, während bei einer Wellenlänge von 520 nm die Fluoreszenz gemessen wurde.

Die Identifizierung der Polyamine erfolgte über die Retentionszeit und die tatsächliche Menge errechnete sich aus der Fläche unter dem Peak und dem Verhältnis zum internen Standard. Zusätzlich musste für einige Polyamine ein konkreter Korrekturfaktor hinzugerechnet werden. Die Korrekturfaktoren lauten: 1.3-Diaminopropan x1.8; Putrescin x1.4; Cadaverin x1.2; und Spermin x0.8.

#### **3.4.4 Extraktion der Mykolsäuren**

Für die Isolate 2385/12, 2673/12, die Referenzstämme *C. singulare* CIP 105491<sup>T</sup> und *C. humireducens* DSM 45392<sup>T</sup> sowie je eine positiv und negativ Kontrolle wurden Mykolsäuren extrahiert.

Für die Extraktion (Frischmann *et al.*, 2012) wurde jeweils ca. 50 mg lyophilisierte Biomasse benötigt, die für 16 Std. bei 75 °C in einer Mischung aus 2.5 ml Methanol, 2.5 ml Toluol und 0.1 ml konzentrierter Schwefelsäure (Roth) inkubiert wurde. Im Anschluss wurden die Proben auf 4 °C abgekühlt und 1 ml n-Hexan dazu gegeben. Nach kräftigem Schütteln erfolgte rasch eine Phasentrennung. Die obere Hexanphase wurde abgehoben und über eine

Säule aus Ammoniumhydrogencarbonat (Fluka) gereinigt. Der Durchfluss wurde unter Stickstoff bis zur Trockne eingedampft, in 100 µl n-Hexan resuspendiert und schließlich wurden 50 µl auf eine Kieselgelplatte 60 (Alugram®Sil G/UV<sub>254</sub>, Macherey-Nagel) aufgetragen (10 cm x 20 cm). Die Dünnschichtchromatografie lief in einem Laufmittel aus Petroleumether (35-60 °C)/ Aceton (95:5) (Sigma/ Roth) bis die Laufront das obere Viertel erreicht hatte.

Die Detektion der Kieselgelplatte, welche mit Molybdätdiphosphorsäure besprüht wurde, erfolgte bei 160 °C für ungefähr 15 min.

### **3.5 Phänotypische Methoden**

#### **3.5.1 Gram-Färbung und KOH-Test**

Die Gram-Färbung erfolgte mit dem Färbeset Gram-color (Merck 1.118855.0001) und dient der schnellen Unterscheidung zwischen Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien.

Auf einem Objektträger wurde ein Tropfen Saline gegeben und etwas Zellmaterial bis zur Homogenität darin verrieben. Der Objektträger trocknete bei Raumtemperatur und wurde anschließend zur Hitze-fixierung dreimal durch die Brennerflamme gezogen. Der fixierte Ausstrich wurde zunächst 1 min mit Kristallviolett gefärbt. Die Kristallviolettlösung wurde kurz mit der Lugol'schen Lösung abgespült und mit selbiger für 1 min gefärbt. Nach kurzem Spülen mit Wasser, wurde der Ausstrich für 15 s entfärbt und wieder kurz mit Wasser gespült. Die aufgetropfte Safraninlösung wurde nach 1 min mit Wasser abgespült und der Objektträger trocknete bei Raumtemperatur. Der gefärbte Ausstrich wurde unter einem Leitz, Dialux 20 Mikroskop mit einer 1000x Vergrößerung ausgewertet.

Auf einen Objektträger wurde ein Tropfen 3%ige Kaliumhydroxid-Lösung (KOH-Lösung) aufgetragen und etwas Zellmaterial darin verrieben. Beim langsamen Anheben der Impföse zeigte sich, ob die Suspension viskos geworden war. Bei einem positiven Ergebnis, deutet dies auf Gram-negative Bakterien hin. Aufgrund dessen, dass die Zellhülle lysierte, wurde DNA freigesetzt, was die Suspension viskos erscheinen lässt. Bei Gram-positiven Bakterien bleibt die Zellhülle intakt und die Suspension wird nicht viskos.

### 3.5.2 Nachweis von Enterokokken

Der Galle Aesculin Azid Agar (Merck 1.00072) ist ein Selektivagar, der als vorläufiger Nachweis von Enterokokken und für einige Arten des Genus *Streptococcus* verwendet wird. Im Agar enthaltene Gallesalze und Natriumazid hemmen das Wachstum der bakteriellen Begleitflora bzw. das Wachstum von Gram-negativen Bakterien. Enterokokken bzw. Streptokokken wachsen auf diesem Agar. Des Weiteren beinhaltet der Agar das Glykosid Aesculin. Die Hydrolyse dieses Glykosid wird als zuverlässiges Merkmal von Enterokokken gesehen. Es entstehen Glucose und Äsculetin, welches anschließend mit Eisen(III)-Ionen einen Komplex bildet und letztendlich für eine oliv-grüne bis schwarze Verfärbung des Agars bewirkt. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C für max. 48 Std.

### 3.5.3 Nachweis für Enterobacteriaceae und Gram-negative Stäbchen

Der MacConkey II Agar (BD Becton Dickinson) ist selektiv für Gram-negative Bakterien, da Gram-positive Bakterien durch die im Agar enthaltenen Gallesalze, sowie das enthaltende Kristallviolett, gehemmt werden. Desweiteren erlaubt das vorhanden sein von Laktose eine Differenzierung von Laktose-fermentierenden und nicht Laktose-fermentierenden Bakterien. In Kombination mit dem Kristallviolett färben sich Kolonien, dessen Bakterien Laktose fermentieren können, rosa bis rot.

Die beimpften Agarplatten werden für 24h bei 28°C inkubiert.

### 3.5.4 Antibiogramme

Für das Anlegen von standardisierten Antibiogrammen dürfen die verwendeten Kulturen nicht älter als 24 Std. sein. Von den zu untersuchenden Isolaten wurde eine oder mehrere kleine Kolonien in 0.9% Saline resuspendiert und auf 0.5 McFarland eingestellt. Die Bakteriensuspension wurde auf Müller-Hinton-Agar (BD Becton Dickinson) ausplattiert, und dann kommerzielle Antibiotika-Plättchen (BD Becton Dickinson) auf der Agarplatte platziert und für 24 Std. bei 37 °C bebrütet.

Für die Auswertung wurde der Hemmhof um die einzelnen Antibiotika-Plättchen gemessen und mit Standardlisten (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012) für *Acinetobacter* verglichen.

**Tabelle 4:** Auflistung der verwendeten Antibiotika für die Antibiogramme der Isolate 1566/10, 1819/10, 1906/10, 2428/10 und 2459/10 sowie des Isolats 114.

| <b>Antibiotika</b>          | <b>Abkürzung</b> | <b>Antibiotika-Klasse</b> | <b>Konzentration/Plättchen</b> |
|-----------------------------|------------------|---------------------------|--------------------------------|
| Marbofloxacin               | MAR5             | Fluoroquinolone           | 5 µg                           |
| Piperacilin                 | PIP              | Penicilline               | 100 µg                         |
| Meropenem                   | MEM              | Carbapeneme               | 10 µg                          |
| Imipenem                    | IPM              | Carbapeneme               | 10 µg                          |
| Cefepim                     | FEP              | Cephalosporine            | 30 µg                          |
| Ceftazidim                  | CAZ              | Cephalosporine            | 30 µg                          |
| Ampicillin/<br>Sulbactam    | SAM              | Penicilline               | 10/ 10 µg                      |
| Sulfonamid/<br>Trimethoprim | SXT              | Sulfonamide               | 1.25/ 23.75 µg                 |
| Ciprofloxacin               | CIP              | Fluoroquinolone           | 5 µg                           |
| Levofloxacin                | LVX              | Fluoroquinolone           | 5 µg                           |
| Enrofloxacin                | ENO              | Fluoroquinolone           | 5 µg                           |

### 3.5.5 API 20 NE

Die Beimpfung der API 20 NE Teststreifen erfolgte nach dem Arbeitsprotokoll von Biomérieux. Verwendete Bakterienkulturen sollten dafür nicht älter als 18 bis 24 Stunden sein. Dabei wurde eine Bakteriensuspension in 0.9% Saline auf McFarland 0.5 eingestellt und davon 200 µl in das mitgelieferte API AUX-Medium pipettiert und gut gemischt. Die Kammern der ersten Hälfte (Enzymtests) des Streifens wurden zur Hälfte mit der Bakteriensuspension in Saline befüllt, während die zweite Hälfte voll mit AUX-Medium befüllt wurde. Dabei sollte darauf geachtet werden, dass die Kammern ohne Luftblasen gefüllt wurden und die Oberfläche der Kammern der zweiten Hälfte des APIs konvex gewölbt waren. Die Auswertung der API 20 NE Teststreifen erfolgt nach 24 und 48 Std. Inkubation bei 28 °C.

Zusätzlich wurde separat ein Oxidase-Test gemacht (DrySlide™ Oxidase, BD Becton Dickinson BBL Baltimore Biological Laboratory™). Der Oxidase-Test wird als Nachweis für die Aktivität von Cytochrom-C-Oxidase genutzt. Mit einem sterilen Zahnstocher wurde etwas Probenmaterial einer Kolonie auf einem DrySlide™ Oxidase Plättchen aufgetragen. Oxidasepositive Bakterien zeigen auf dem Testplättchen innerhalb von 20 s einen Farbumschlag zu blau-violett. Oxidasenegative Bakterien zeigen keinen Farbumschläge oder einen zu grau. Einen Farbumschlag nach 20 s zu blau-violett gilt ebenfalls als negativ.

## **3.6 Molekularbiologische Untersuchungen**

### **3.6.1 DNA Isolierung**

Die DNA Isolierung wurde nach dem Protokoll von MoBio Laboratories, Inc durchgeführt. Dazu wurde wahlweise eine Impföse voll bakterieller Biomasse von einer Agarplatte genommen und in 50 µl steriles Wasser gegeben und bei -20 °C eingefroren bzw. gleich in 300 µl MicroBead Lösung resuspendiert. Die gesamten 300 µl bzw. 350 µl wurden in ein MicroBead Reaktionsgefäß überführt und mit 50 µl MD1 Lösung versetzt. Das Ganze wurde dann für 20 min (für Gram-negative Bakterien) bei 65 °C und 750 UPM geschüttelt (Thermo Shaker/Kisker). Im Anschluss wurde für 10 min stark geschüttelt unter Verwendung von Vortex-Genie 2 (Scientific Industries). Nach einer Zentrifugation (Eppendorf 5418) für 1 min bei 10000 UPM wurde der Überstand in ein neues 1.5 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 100 µl MD2 Lösung versetzt. Nach 5 s starkem Schütteln, wurde die Mischung erneut für 1 min bei 10000 UPM zentrifugiert (Pelletierung). Der gesamte Überstand wurde mit 900 µl MD3 Lösung gemischt und erneut für 5 s stark gemischt. Ungefähr 600 µl der Suspension wurden auf eine im Kit mitgelieferte Säule aufgetragen und für 30 s bei 10000 UPM zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und die restlichen 750 µl wurden auf die Säule pipettiert, abermals zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Zum Waschen wurden 300 µl MD4 Lösung auf die Säule gegeben und bei 10000 UPM für 30 s zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und die Säule 1 min trocken zentrifugiert. Letztendlich wurde diese in einem im Kit enthaltenen 2 ml Reaktionsgefäß gegeben und die DNA mit 50 µl MD5 Lösung und 1 min bei 10000 UPM von der Säulenmembran eluiert. Von dem Eluat wurde eine 1:5 Verdünnung mit sterilem Wasser hergestellt und, wie auch das konzentrierte Eluat, bei -20 °C gelagert.

### 3.6.2 Primer design/ Polymerase Kettenreaktion (PCR)

#### 3.6.2.1 PCR des *groEL* Gens

Für diese PCR wurden selbst entwickelte Primer verwendet. Hierzu wurden die entsprechenden Gensequenzen von verwandten Genera herangezogen. Die Gensequenzen des „heatshock“ Proteins GroEL sind frei zugänglich unter <http://www.ebi.ac.uk/>. Die Sequenzen der acht Arten aus drei verschiedenen Genera (Tab. 5) der Familie *Xanthomonadaceae* wurden in BioEdit miteinander ausgerichtet und Bereiche gesucht, in denen die Sequenzen sich möglichst ähnlich sind, der GC-Gehalt möglichst nicht 60% übersteigt und die Primerhybridisierungstemperatur des Primer mit der DNA-Bindestelle unter 72 °C (Synthesetemperatur der verwendeten Polymerase) liegt. Die verwendeten Primersequenzen sind im Anschluss an Tabelle 6 aufgelistet.

**Tabelle 5:** Verwendete Bakterienarten für die Entwicklung der Primer zur Amplifizierung des *groEL* Gens für *Luteimonas* und *Lysobacter*

| EMBL-EBI Nummer         | Art                                                                   |
|-------------------------|-----------------------------------------------------------------------|
| ENA AEO40837 AEO40837.1 | <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citrumelo</i> F1                 |
| ENA AAL74150 AAL74150.1 | <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>phaseoli</i>                     |
| ENA ADT80820 ADT80820.1 | <i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>                           |
| ENA CAJ22202 CAJ22202.1 | <i>Xanthomonas euvesicatoria</i>                                      |
| ENA EFF44439 EFF44439.1 | <i>Xanthomonas fuscans</i> subsp. <i>aurantifolii</i> str. ICPB 11122 |
| ENA AAB42013 AAB42013.1 | <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>                                   |
| ENA ADV26273 ADV26273.1 | <i>Pseudoxanthomonas suwonensis</i> 11-1                              |
| ENA AER57466 AER57466.1 | <i>Pseudoxanthomonas spadix</i> BD-a59                                |

**Tabelle 6:** PCR-Reaktionsansatz für die Amplifikation des *groEL* Gens

| <b>Ansatz</b>                                                             | <b>25.0 µl</b> |
|---------------------------------------------------------------------------|----------------|
| Wasser                                                                    | 10.5 µl        |
| REDTaq ReadyMix - PCR Reaktions Mix mit MgCl <sub>2</sub> (Sigma-Aldrich) | 12.5 µl        |
| Lut-groELf 10 µM (Sigma-Aldrich)                                          | 0.5 µl         |
| Lut-groELr 10 µM (Sigma-Aldrich)                                          | 0.5 µl         |
| DNA                                                                       | 1.0 µl         |

Denaturierung:            94 °C                    5:00 min

Denaturierung:            94 °C                    1:00 min

Primerhybridisierung: 65,6 °C - 70 °C            0:30 min

Elongation:                72 °C                    1:30 min

Elongation (final):       72 °C                    5:00 min

Zyklen:                    30

Primer:

Lut-groELf:    5' GAA CCC GAT GGA YCT SAA RCG 3'

Lut-groELr:    5' CCA TGY CRC CCA TRC CRC C 3'

Y = Cytosin (C) oder Thymin (T)

S = Guanin (G) oder Cytosin

R = Adenin (A) oder Guanin

### 3.6.2.2 ITS PCR

**Tabelle 7:** PCR-Reaktionsansatz für die Amplifikation der Intergenischen Sequenz

| Ansatz                                                                    | 25.0 µl |
|---------------------------------------------------------------------------|---------|
| Wasser                                                                    | 10.5 µl |
| REDTaq ReadyMix - PCR Reaktions Mix mit MgCl <sub>2</sub> (Sigma-Aldrich) | 12.5 µl |
| Lut-ITSf 10 µM (Sigma-Aldrich)                                            | 0.5 µl  |
| Lut-ITSr 10 µM (Sigma-Aldrich)                                            | 0.5 µl  |
| DNA                                                                       | 1.0 µl  |

Denaturierung: 94 °C 5:00 min

Denaturierung: 94 °C 1:00 min

Primerhybridisierung: 60 °C 0:30 min

Elongation: 72 °C 1:00 min

Elongation (final): 72 °C 5:00 min

Zyklen: 30

Primer: (Honeycutt *et al.*, 1995; Quatrini *et al.*, 2002 (modifiziert))

Lut-ITSf: 5' GTT CCC GGG CCT TGT ACA 3'

Lut-ITSr: 5' GGG TTY CCC CAT TCR GA 3'

Y = C oder T

R = A oder G

### 3.6.2.3 ERIC PCR

**Tabelle 8:** PCR-Reaktionsansatz für die Amplifikation der ERIC-Sequenz; Desoxyribonukleosidtriphosphat (dNTP)

| Ansatz                                                               | 30.00 µl |
|----------------------------------------------------------------------|----------|
| Wasser                                                               | 17.10 µl |
| DreamTag 5 u/µl (Thermo Scientific)                                  | 0.20 µl  |
| 10x Green Buffer (Thermo Scientific) enthält 20 mM MgCl <sub>2</sub> | 3.00 µl  |
| dNTP Mix 2 mM (Thermo Scientific)                                    | 3.00 µl  |
| ERIC1R 25 µM (Invitrogen)                                            | 1.80 µl  |
| ERIC2 25 µM (Invitrogen)                                             | 1.80 µl  |
| MgCl <sub>2</sub> 25 mM (Promega)                                    | 0.60 µl  |
| DNA                                                                  | 2.50 µl  |

Denaturierung: 95 °C 7:00 min  
Denaturierung: 94 °C 1:00 min  
Primerhybridisierung: 52 °C 1:00 min  
Elongation: 65 °C 8:00 min  
Elongation (final): 65 °C 15:00 min  
Zyklen: 30

Primer: (Versalovic *et al.*, 1991)

ERIC1R: 5' ATG TAA GCT CCT GGG GAT TCA C 3'

ERIC2: 5' AAG TAA GTG ACT GGG GTG AGC G 3'

### 3.6.2.4 REP PCR

**Tabelle 9:** PCR-Reaktionsansatz für die Amplifikation der REP-Sequenz

| Ansatz                                                               | 30.00 µl |
|----------------------------------------------------------------------|----------|
| Wasser                                                               | 17.10 µl |
| DreamTag 5 u/µl (Thermo Scientific)                                  | 0.20 µl  |
| 10x Green Buffer (Thermo Scientific) enthält 20 mM MgCl <sub>2</sub> | 3.00 µl  |
| dNTP Mix 2 mM (Thermo Scientific)                                    | 3.00 µl  |
| ERIC1R 25 µM (Invitrogen)                                            | 1.80 µl  |
| ERIC2 25 µM (Invitrogen)                                             | 1.80 µl  |
| MgCl <sub>2</sub> 25 mM (Promega)                                    | 0.60 µl  |
| DNA                                                                  | 2.50 µl  |

Denaturierung: 95 °C 7:00 min  
Denaturierung: 94 °C 1:00 min  
Primerhybridisierung: 44 °C 1:00 min  
Elongation: 65 °C 8:00 min  
Elongation (final): 65 °C 16:00 min  
Zyklen: 30

Primer: (Versalovic *et al.*, 1991)

Rep 1Rl: 5' III ICG ICG ICA TCI GGC 3'

Rep 2l: 5' ICG ICT TAT CIG GCC TAC 3'

Das Nukleosid I Inosin enthält die Base Hypoxanthin und kann eine Watson-Crick-Basenpaarung mit Adenin, Guanin, Cytosin und Thymin eingehen, welche jedoch schwächer sind als die gewöhnlichen Paarungen (Versalovic *et al.*, 1991).

### **3.6.3 Gelelektrophorese der PCR-Produkte**

Der Erfolg der jeweiligen PCR-Amplifizierung wurde in 2.0%igen Agarose-Gelen (Roth, in 1x TBE) mit 5 µl der PCR-Produkte überprüft. Nach einer Laufzeit von ca. 60 min bei 200 Volt (V) wurden die Gele für 15 min in einem Ethidiumbromid-Bad (2.5 µg/ ml) gefärbt und 10 min im Wasser entfärbt.

Die Dokumentation erfolgt mit dem ChemiDoc XRS-Gerät von BioRad und der Software Quality One Basic.

In den Fällen, in denen das gewünschte PCR-Produkt von unspezifischen Banden gereinigt werden sollte, wurde das gesamte Produkt auf ein 1.5%iges Agarose-Gel geladen und bei 100V laufen gelassen, bis die Lauffront des Farbmarkers den unteren Rand des Gels erreicht hatte.

### **3.6.4 Aufreinigung des PCR- Produktes**

Die Aufreinigung der PCR-Produkte erfolgte nach dem Protokoll des Promega Kits: Wizard® SV Gel und PCR Clean-Up System. Dazu wurden die PCR-Produkte entweder aus einem Agarose-Gel ausgeschnitten oder direkt das PCR-Produkt verwendet.

Wurden die PCR-Produkte aus einem Gel heraus geschnitten, so wurden diese gewogen und pro 10 mg Gel 10 µl Membran-Bindungs-Lösung dazu gegeben. Nach kurzem schütteln wurde das Gel bei 55 °C für ca. 10 min geschmolzen und anschließend auf die im Kit mitgelieferte Säule pipettiert. Bei Raumtemperatur wurde die Lösung für 1 min auf der Säule inkubiert und diese schließlich bei 13000 UPM zentrifugiert.

Wurde das PCR-Produkt direkt verwendet, so wurde dies sofort auf die Säule pipettiert sowie 10 µl Membran-Bindungs-Lösung pro 10 µl PCR-Produkt. Ebenfalls wurde die Lösung für 1 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend zentrifugiert.

In beiden Fällen wurde der Durchfluss verworfen und auf die Säule 700 µl Waschlösung gegeben. Nach 1 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde bei 13000 UPM für 1 min zentrifugiert und der Durchfluss erneut verworfen. Für den zweiten Waschschrift wurden 500 µl Waschlösung auf die Säule pipettiert und ohne Inkubation bei 13000 UPM für 5 min zentrifugiert. Im Anschluss daran wurde für 1 min bei 130000 UPM trocken zentrifugiert. Um sicher zu gehen, dass das gesamte Ethanol aus der Waschlösung verdampft war, wurde die beladene Säule noch für weitere 2.5 min bei Raumtemperatur stehen gelassen.

Das PCR-Produkt wurde dann in zwei Schritten mit je 15 µl Wasser eluiert, wobei nach dem ersten Elutionsschritt für 1 min bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Zentrifugiert wurde jeweils bei 13000 UPM für 1 min und das Eluat in einem neuen 1.5 ml Reaktionsgefäß aufgefangen und dann bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

### **3.6.5 Sequenzierung**

Für die Sequenzierung wurden 10.0 µl des Eluats mit 2.5 µl Primer und 1.5 µl Wasser zusammen pipettiert und von der Firma LGC Genomics sequenziert. Die digitalen Ergebnisse wurden mit der Software Chromas LITE Version 2.0 und BioEdit Version 7.0.9.0 (Hall, 1999) analysiert und gegebenenfalls bearbeitet.

Die Sequenzen des *groEL* Gens und die der Intergenischen Sequenz wurden mit ClustalW Multiple Alignment 1.4 (in BioEdit inkludiert) angepasst und verglichen.

Ebenfalls in BioEdit wurde die Nukleotidsequenz der Gens *groEL* in die Aminosäuresequenz translatiert.

## 4 Ergebnisse und Diskussion

### 4.1 Isolat 4284/11

Die Analyse des 16S rRNA kodierenden Gens ergab für das Isolat 4284/11 eine Fragmentlänge von 1447 Nukleotiden. Der Sequenzvergleich zeigte, dass *Luteimonas aestuarii* DSM 19680<sup>T</sup> mit 96.99% die nächste verwandte Art ist und mit 95.72% *Lysobacter enzymogenes* subsp. *enzymogenes* LMG 8762<sup>T</sup>, die Typspezies des Genus *Lysobacter*. Die Typspezies für den Genus *Luteimonas* ist *Luteimonas mephitis*. Mit dem Stamm CIP 107229<sup>T</sup> zeigte Isolat 4284/11 jedoch nur 93.27% Sequenzähnlichkeit.

Basierend auf der 16S rRNA Gensequenz ist das Isolat mit der Typspezies des Genus *Lysobacter* näher verwandt als mit der des Genus *Luteimonas*. Das wirft die Frage auf, ob das Isolat tatsächlich zum Genus *Luteimonas* gehört oder zu dem Genus *Lysobacter*. Des Weiteren wurde in Betracht gezogen, ob die nächste verwandte Art des Isolats, *L. aestuarii* DSM 19680<sup>T</sup>, eventuell falsch klassifiziert wurde und tatsächlich dem Genus *Lysobacter* oder einem neuen Genus zugeordnet werden sollte. Roh *et al.* (2008) zeigten, dass *L. aestuarii* DSM 19680<sup>T</sup> aufgrund einer 16S rRNA Analyse näher mit dem Genus *Lysobacter* verwandt ist (97.2% *Lysobacter gummosus* UASM 402<sup>T</sup>) als mit *Luteimonas composti* CCYY255<sup>T</sup> (96.0%) und *Luteimonas mephitis* B1953/27.1<sup>T</sup> (95.5%), jedoch sich bei verschiedenen phylogenetischen Analysen im Genus *Luteimonas* gruppiert. Die Typspezies des Genus *Lysobacter*, *L. enzymogenes* subsp. *enzymogenes* LMG 8762<sup>T</sup>, wurde in ihren Untersuchung jedoch nicht mit einbezogen.

Sollte *L. aestuarii* einem neuen Genus zugeordnet werden, könnte das Isolat 4284/11 diesem neuen Genus ebenfalls zugeordnet werden, da *L. aestuarii* DSM 19680<sup>T</sup> die nächste verwandte Art ist.

Um weitere Erkenntnisse bezüglich der Taxonomie der Genera *Lysobacter* und *Luteimonas* unter Einbeziehung des Isolats 4284/11 zu erlangen, wurde das Isolat sowie die Referenzstämme *L. mephitis* CIP 107229<sup>T</sup>, *L. aestuarii* DSM 19680<sup>T</sup> und *L. enzymogenes* subsp. *enzymogenes* LMG 8762<sup>T</sup> weiter charakterisiert.

Die Chinonanalyse des Isolats 4284/11 ergab, dass Ubichinon 8 (Q-8) die Hauptkomponente (98.8%) darstellt und geringe Anteile an Q-7 (0.7%) und Q-9 (0.6%) besitzt. Diese Ergebnisse

stehen in Übereinstimmung mit den Chinonsystemen der Vertreter der Ordnung *Xanthomonadales* (Saddler & Bradbury, 2005) einschließlich *L. mephitis* CIP 107229<sup>T</sup> und *L. enzymogenes* subsp. *enzymogenes* LMG 8762<sup>T</sup> (Finkmann *et al.*, 2000; Qian *et al.*, 2009).

Die Analyse der polaren Lipide ergab für das Isolat 4284/11 Diphosphatidylglycerol und Phosphatidylethanolamin als Hauptkomponenten sowie in geringen Anteilen Phosphatidylglycerol, ein Aminolipid (AL1), je zwei Phospholipide (PL1, PL2), Pigmente (Pig2, Pig3) und Lipide (L1, L2) und ein Aminophospholipid (APL1). Bei den Referenzstämmen konnte neben Diphosphatidylglycerol und Phosphatidylethanolamin als Hauptkomponenten ebenfalls Phosphatidylglycerol detektiert werden.

Während *L. enzymogenes* subsp. *enzymogenes* LMG 8762<sup>T</sup> Phosphatidylmonomethylethanolamin und *L. mephitis* CIP 107229<sup>T</sup> ein Glykolipid (GL1) aufweisen, sind beide Lipide im Isolat 4284/11 und in *L. aestuarii* DSM 19680<sup>T</sup> nicht zu finden. Vergleicht man weiters das Isolat mit *Pseudoxanthomonas broegbernensis* (unveröffentlichte Daten A. Frischmann) so lassen sich bei *P. broegbernensis* Ähnlichkeiten in Bezug auf das Aminophospholipid APL1, das Phospholipid PL1 und das Lipid L1 des Isolats feststellen, wobei es sich bei *P. broegbernensis* nicht um ein Phospholipid handelt, sondern nur um ein Lipid. Das Muster der polaren Lipide dieser beiden Stämme zeigt eine größere Ähnlichkeit untereinander als dies der Fall bei dem Isolat und seinen Referenzstämmen ist.

Bei *L. aestuarii* DSM 19680<sup>T</sup> als auch bei dem Isolat 4284/11 wurde vor dem Färben der Dünnschichtchromatografieplatte in der Mitte der jeweiligen Platte ein gelber Fleck beobachtet. Nach dem Besprühen mit Molybdatophosphorsäure färbten sich diese gelben Flecke in der gleichen Art und Weise wie die polaren Lipide. Aufgrund der Gelbfärbung dieser Pigmente wurde postuliert, dass es sich um Carotinoide handelt, welche mit Molybdatophosphorsäure nachweisbar sind (Falbe & Regitz, 1998). Diese sind in den Farben von gelb bis tiefrot vorzufinden (Meyer, 2002), u.a. sind solche Carotinoide auch in Mikroorganismen enthalten.

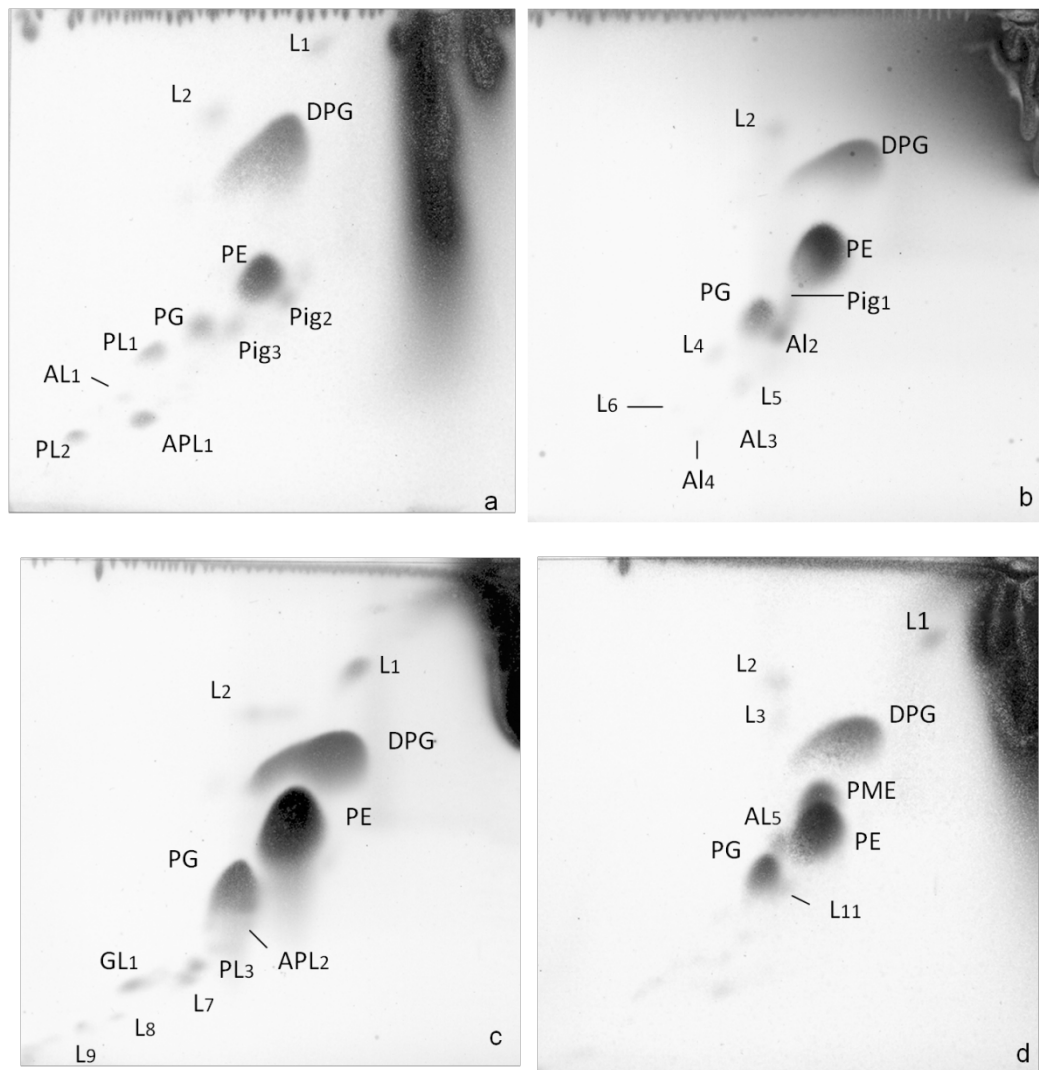


**Abbildung 2:** Profile der polaren Lipide. Isolat 4284/11 (a), *L. aestuarii* DSM 19680<sup>T</sup> (b), *L. mephitis* CIP 107229<sup>T</sup> (c) und *L. enzymogenes* subsp. *enzymogenes* LMG 8762<sup>T</sup> (d). Die polaren Lipide wurden unter Verwendung von Molybdatophosphorsäure detektiert. Abkürzungen: DPG (Diphosphatidylglycerol), PE (Phosphatidylethanolamin), PG (Phosphatidylglycerol), PME (Phosphatidylmonomethylethanolamin), APLx (nicht identifizierte Amino-phospholipide), ALx (nicht identifizierte Aminolipide), PLx (nicht identifizierte Phospholipide), GL (nicht identifiziertes Glykolipid), Lx (nicht identifizierte Lipide, die weder eine Phosphat-, eine Aminogruppe oder einen Zucker enthalten), Pigx (Pigmente)

Carotinoide gehören zu der Klasse der Lipide, wie auch Phospholipide und Glykolipide (Latscha *et al.*, 2008). Bei dem Pigment Pig3, welches Ninhydrin positiv färbte, scheint es sich jedoch nicht um ein Carotinoid zu handeln, da diese keine Aminogruppen aufweisen.

Das Isolat 4284/11, als auch die Referenzstämme, besitzen als Hauptkomponente Spermidin und in geringen Anteilen Spermin sowie Spuren von Putrescin (Tab. 10). Während Cadaverin bei *L. aestuarii* DSM 19680<sup>T</sup> zur Gänze fehlt, besitzt *L. enzymogenes* subs. *enzymogenes* LMG 8762<sup>T</sup> kein 1,3-Diaminopropan. Aufgrund dieser Daten ist keine Einordnung des Isolats bzw. *L. aestuarii* DSM 19680<sup>T</sup> zu dem Genus *Luteimonas* oder *Lysobacter* möglich.

**Tabelle 10:** Polyaminmuster der Stämme 4284/11, *L. aestuarii* DSM 19680<sup>T</sup>, *L. mephitis* CIP 107229<sup>T</sup> und *L. enzymogenes* subsp. *enzymogenes* LMG 8762<sup>T</sup>;

Angaben in µmol/g (Trockenmasse), DAP (1,3-Diaminopropan), PUT (Putrescin), CAD (Cadaverin), SPD (Spermidin), SPM (Spermin) und t (in Spuren, <0.1 µmol/g Trockengewicht).

| Stamm                                                                 | DAP | PUT | CAD | SPD  | SPM |
|-----------------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|------|-----|
| 4284/11                                                               | t   | t   | t   | 49.2 | 2.4 |
| <i>L. aestuarii</i> DSM 19680 <sup>T</sup>                            | t   | t   | -   | 32.1 | 4.1 |
| <i>L. mephitis</i> CIP 107229 <sup>T</sup>                            | 2.7 | t   | t   | 36.6 | 1.7 |
| <i>L. enzymogenes</i> subsp. <i>enzymogenes</i> LMG 8762 <sup>T</sup> | -   | t   | t   | 63.0 | 2.8 |

Aufgrund der chemotaxonomischen Ergebnisse lässt sich keine Aussage treffen, welchem Genus das Isolat 4284/11 angehört. Es kann nur mit Sicherheit gesagt werden, dass es sich aufgrund der bisherigen chemotaxonomischen Daten, also auch der 16S rRNA Sequenz, um eine neue Art handelt. Daher wurden zusätzliche molekularbiologische Untersuchungen durchgeführt.

Für die Analyse des „heatshock“-Gens *groEL* wurden Primer entwickelt, welche am 5'- Ende bzw. am 3'- Ende des 1650 Bp langen Gens lagen. Dieses Gen kodiert für ein Chaperon, welches nicht nur neu synthetisierte Proteine faltet, sondern auch solche, die aufgrund von Hitze denaturiert worden sind (Madigan & Martinko, 2006). Derartige Chaperone werden auch als Hitzeschockproteine bezeichnet. Sie sind ubiquitär vorhanden und relativ konserviert (Madigan & Martinko, 2006), weshalb sie neben der 16S rRNA häufig geeignet sind, um Verwandtschaftsverhältnisse zu untersuchen.

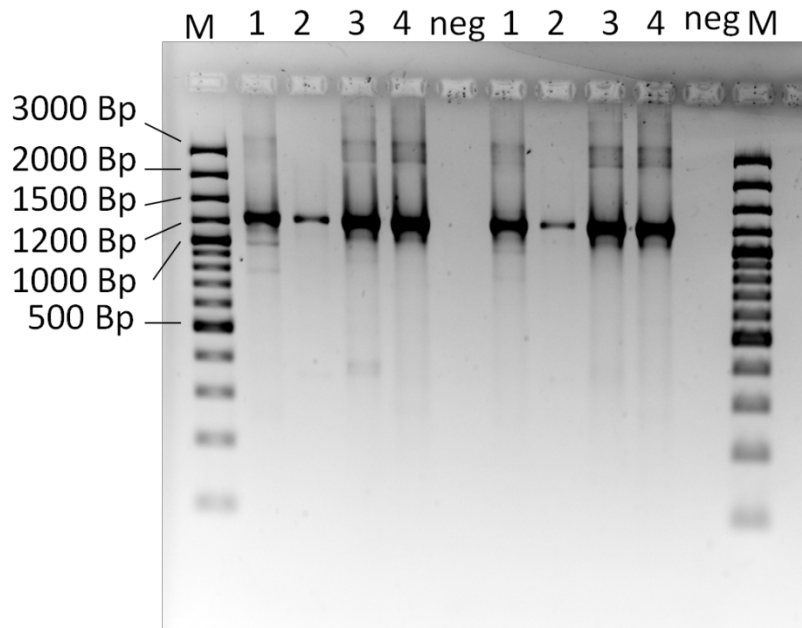


**Abbildung 3:** Ergebnisse der Amplifikation des *groEL*-Gens. Links mit einer Hybridisierungstemperatur von 55 °C und rechts mit einer von 53 °C. Untersuchte Stämme: *L. mephitis* CIP 107229<sup>T</sup> (1), *L. enzymogenes* subsp. *enzymogenes* LMG 8762<sup>T</sup> (2), *L. aestuarii* DSM 19680<sup>T</sup> (3), Isolat 4284/11 (4), GeneRuler™ 100 Bp Plus DNA Ladder (M) und negativ Kontrolle (neg).

Nach Amplifikation und Sequenzierung des Gens konnte mit dem Programm BioEdit ein Sequenzvergleich durchgeführt und der Leserahmen bestimmt werden. Die nun 813 nt langen Sequenzen wurden auch in Aminosäuresequenzen (s. Anhang) translatiert, entsprechend des Leserahmens der *groEL* Sequenz des Stammes *Stenotrophomonas maltophilia* D457 (NCBI Referenz: NC\_017671.1). Diese Art gehört ebenfalls zur Familie der *Xanthomonadaceae* (Euzéby, 1997). Im Anschluss wurden die Sequenzen mithilfe einer Ähnlichkeitsmatrix (Tab. 11) ausgewertet.

Das Isolat 4284/11 zeigte in der *groEL* Gensequenz eine Ähnlichkeit von 90.5% zu *L. mephitis* CIP 107229<sup>T</sup>, 89.1% zu *L. aestuarii* DSM 19680<sup>T</sup> und 87.6% zu *L. enzymogenes* subsp. *enzymogenes* LMG 8762<sup>T</sup>. Die Referenzstämme *L. aestuarii* DSM 19680<sup>T</sup> und *L. mephitis* CIP 107229<sup>T</sup> wiesen mit 93.6% eine höhere Ähnlichkeit untereinander auf, als zu dem Isolat. Ebenfalls wies *L. enzymogenes* subsp. *enzymogenes* LMG 8762<sup>T</sup> eine höhere Sequenzähnlichkeit zu den anderen beiden Referenzstämmen auf, *L. aestuarii* DSM 19680<sup>T</sup> und *L. mephitis* CIP 107229<sup>T</sup>, als zu dem Isolat 4284/11. Der Vergleich der *groEL* Gensequenz

zwischen dem Isolat 4284/11 und den Referenzstämmen zeigte keinen signifikanten Unterschied und es konnte keine Genuszugehörigkeit bezüglich des Isolats getroffen werden.

**Tabelle 11:** Ähnlichkeitsmatrix der Nukleotid- bzw. Proteinsequenz des Gens *groEL* von dem Isolat 4284/11, *L. aestuarii* DSM 19680<sup>T</sup>, *L. mephitis* CIP 107229<sup>T</sup> und *L. enzymogenes* subsp. *enzymogenes* LMG 8762<sup>T</sup>.

Die oberen Triangel zeigen die Ähnlichkeiten der Nukleotidsequenzen zwischen den Stämmen, während die unteren Triangel die Ähnlichkeiten der Proteinsequenzen darstellen. Angaben in Prozent.

|                       | 4284/11 | <i>L. aestuarii</i> | <i>L. mephiti</i> | <i>L. enzymogenes</i> |
|-----------------------|---------|---------------------|-------------------|-----------------------|
| 4284/11               | 100     | 89.1<br>94.8        | 90.5<br>95.9      | 87.6<br>90.7          |
| <i>L. aestuarii</i>   |         | 100                 | 93.6<br>97.7      | 90.6<br>91.8          |
| <i>L. mephitis</i>    |         |                     | 100               | 90.8<br>91.5          |
| <i>L. enzymogenes</i> |         |                     |                   | 100                   |

Die Aminosäureteilstsequenz des GroEL Proteins des Isolates 4284/11 war signifikant ähnlicher den entsprechenden Sequenzen von *L. aestuarii* DSM 19680<sup>T</sup> und *L. mephitis* CIP 107229<sup>T</sup> (94.8% und 95.9%) als der von *L. enzymogenes* subsp. *enzymogenes* LMG 8762<sup>T</sup>. Daher deutet dieses Ergebnis auf eine enge Verwandtschaft des Isolats 4284/11 zum Genus *Luteimonas* hin. Ebenfalls wird eine engere Verwandtschaft von *L. aestuarii* DSM 19680<sup>T</sup> zu *L. mephitis* CIP 107229<sup>T</sup> als zu *L. enzymogenes* subsp. *enzymogenes* LMG 8762<sup>T</sup> deutlich.

Der Unterschied der Proteinsequenz zur Nukleotidsequenz ist damit zu erklären, dass verschiedene Basentriplets dieselbe Aminosäure kodieren können. Des Weiteren kann der Unterschied der beiden Sequenzen mit der Wobble-Theorie erklärt werden, welche besagt, dass die dritte Base eines Triplets in ihrer Basenpaarung flexibel ist.

Die Proteinsequenzen wurden mit Einträgen in Gendatenbanken unter Verwendung des Programms FASTA (Pearson & Lipman, 1988) verglichen. In der Regel waren die höchsten Treffer *Pseudoxanthomonas spadix* und *Pseudoxanthomonas suwonensis*, mit 90.2% bzw. 89.7% Ähnlichkeit zur GroEL Aminosäuresequenz des Isolats 4284/11. Dies kann damit erklärt werden, dass bis zum jetzigen Zeitpunkt keine entsprechenden Sequenzeinträge für *Luteimonas* und *Lysobacter* Stämme vorhanden sind.

Yakoubou und Côté (2010) untersuchten in 23 *Xanthomonas*-Arten ein 224 Bp langes DNA-Fragment, welches 157 Bp am 3' Ende des 16S rRNA Gens und 67 Bp am 5' Ende der 16S-23S ITS Sequenz beinhaltet. Ihre Untersuchungen zeigten, dass diese kurze Sequenz als Marker ausreichend ist, um nahe verwandte Arten desselben Genus zu unterscheiden.

Um weitere Daten zur Klärung der Gattungszugehörigkeit zu erhalten, wurde eine Analyse der Intergenischen Sequenz (ITS) des Isolats 4284/11 sowie der Referenzstämmen durchgeführt.

Die Primer wurden so gewählt, dass sie am Ende der 16S rRNA (Position 2896-2913) bzw. Anfang der 23S rRNA (Position 3713-3729) binden. Die Positionen korrespondieren zu der *E. coli* Nummerierung (Brosius *et al.*, 1981). Bei 60 °C Primerhybridisierungstemperatur konnten zwei Banden mit einer Größe von ungefähr 800 Bp bzw. 700 Bp nachgewiesen werden. Daraufhin wurden sowohl bei *L. mephitis* CIP 107229<sup>T</sup> als auch bei dem Isolat die unteren, kleinen Banden ebenfalls sequenziert. Da Gonçalves und Rosato (2002) zeigten, dass die Intergenische Sequenz in Xanthomonaden auch für zwei tRNAs kodiert, tRNA-Ala und tRNA-Ile, wurde vermutet, dass in der größeren Bande zwei tRNAs kodierende Sequenzen zu finden sind, während in den unteren Banden dies nicht vermutet wurde. Die Sequenzierungen ergaben, dass in beiden Banden tRNAs kodierende Sequenzen zu finden waren und es sich bei den unteren Banden um unvollständige PCR-Produkte handelte.

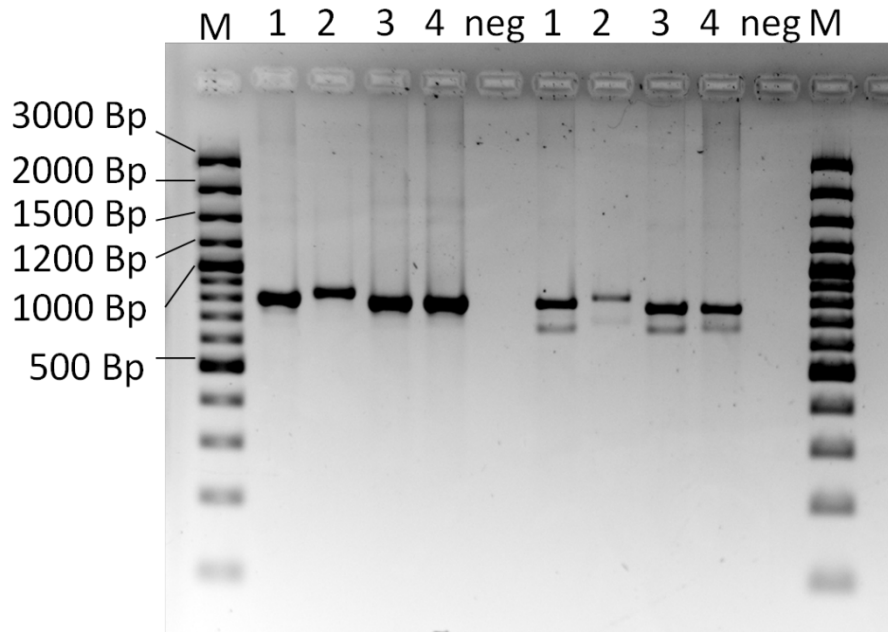


**Abbildung 4:** Ergebnisse der Amplifikation der Intergenischen Sequenz (ITS). Untersuchte Stämme: *L. mephitis* CIP 107229<sup>T</sup> (1), *L. enzymogenes* subsp. *enzymogenes* LMG 8762<sup>T</sup> (2), *L. aestuarii* DSM 19680<sup>T</sup> (3), Isolat 4284/11 (4), GeneRuler™ 100 Bp Plus DNA Ladder (M) und negativ Kontrolle (neg).

Die Sequenzen wurden auf 544 Basen gekürzt, was der Länge der Intergenischen Sequenz entspricht. In der ITS Region aller vier Stämme wurden Sequenzen gefunden, die für zwei tRNAs kodieren, tRNA-Ala und tRNA-Ile.

Die Ergebnisse (Tab. 12) zeigen, dass sich das Isolat stark von *L. aestuarii* DSM 19680<sup>T</sup> unterscheidet. Geringe Unterschiede gibt es zwischen *L. mephitis* CIP 107229<sup>T</sup> und *L. enzymogenes* subsp. *enzymogenes* LMG 8762<sup>T</sup>.

**Tabelle 12:** Ähnlichkeitsmatrix der DNA-Sequenz der Intergenischen Sequenz von dem Isolat 4284/11, *L. aestuarii* DSM 19680<sup>T</sup>, *L. mephitis* CIP 107229<sup>T</sup> und *L. enzymogenes* subsp. *enzymogenes* LMG 8762<sup>T</sup>. Angaben in Prozent.

|                       | 4284/11 | <i>L. aestuarii</i> | <i>L. mephitis</i> | <i>L. enzymogenes</i> |
|-----------------------|---------|---------------------|--------------------|-----------------------|
| 4284/11               | 100     | 57.2                | 71.5               | 71.6                  |
| <i>L. aestuarii</i>   |         | 100                 | 59.2               | 63.6                  |
| <i>L. mephitis</i>    |         |                     | 100                | 72.1                  |
| <i>L. enzymogenes</i> |         |                     |                    | 100                   |

Da dieses Ergebnis widererwartend war, wurden die tRNA kodierenden Gene einzeln miteinander verglichen. Beim Ausrichten und Vergleichen der Sequenzen im Programm BioEdit entstanden Lücken, sogenannte „gaps“. Diese „gaps“ sollen eine bestmögliche Ausrichtung der Sequenzen schaffen. Es stellte sich nach dem Vergleich heraus, dass bei *L. aestuarii* DSM 19680<sup>T</sup> die Reihenfolge der zwei tRNA kodierenden Gene vertauscht ist, jedoch ihre Sequenz sehr große Ähnlichkeit zu den anderen drei Arten aufweist. Zu dem Isolat 4284/11 zeigten beide tRNA Sequenzen von *L. aestuarii* DSM 19680<sup>T</sup> eine Sequenzähnlichkeit von 100%, während das Isolat zu *L. mephitis* CIP 107229<sup>T</sup> und *L. enzymogenes* subsp. *enzymogenes* LMG 8762<sup>T</sup> eine Ähnlichkeit von 98.6% aufweist (Daten nicht dargestellt). Aus den unterschiedlichen Vergleichen der tRNA kodierenden Genen allein, der gesamten ITS-Sequenz, mit und ohne Lücken in der Sequenz, dem Austausch der tRNA kodierenden Genen bei *L. aestuarii* DSM 19680<sup>T</sup>, konnte letztendlich keine klärende Erkenntnis gewonnen werden (Daten nicht dargestellt).

Die in Tabelle 13 aufgelisteten Daten deuten darauf hin, dass das Isolat mit 81.6% Sequenzähnlichkeit zu *L. mephitis* CIP 107229<sup>T</sup> dem Genus *Luteimonas* angehört. Stattdessen zeigt *L. aestuarii* DSM 19680<sup>T</sup> mit 84.1% eine engere Verwandtschaft mit dem Genus *Lysobacter* auf als mit dem Isolat und *L. mephitis* CIP 107229<sup>T</sup>. Dies widerspricht dem Ergebnis der *groEL* Analyse, die die Zugehörigkeit von *L. aestuarii* DSM 19680<sup>T</sup> zum Genus *Luteimonas* bestätigte.

**Tabelle 13:** Ähnlichkeitsmatrix der DNA-Sequenz der Intergenischen Sequenz von dem Isolat 4284/11, *L. aestuarii* DSM 19680<sup>T</sup>, *L. mephitis* CIP 107229<sup>T</sup> und *L. enzymogenes* subsp. *enzymogenes* LMG 8762<sup>T</sup>. Bei *L. aestuarii* DSM 19680<sup>T</sup> wurde das Gen der tRNA-Ala mit dem der tRNA-Ile vertauscht, alle Lücken wurden gelöscht. Angaben in Prozent.

|                       | 4284/11 | <i>L. aestuarii</i> | <i>L. mephitis</i> | <i>L. enzymogenes</i> |
|-----------------------|---------|---------------------|--------------------|-----------------------|
| 4284/11               | 100     | 77.0                | 81.6               | 77.9                  |
| <i>L. aestuarii</i>   |         | 100                 | 77.9               | 84.1                  |
| <i>L. mephitis</i>    |         |                     | 100                | 78.4                  |
| <i>L. enzymogenes</i> |         |                     |                    | 100                   |

Yakoubou und Côté (2010) zeigten, dass für Xanthomonaden eine 224 Bp langes Fragment, bestehend aus einem Teil der 16S rRNA und einem Teil der ITS Region, ausreicht, um Xanthomonaden innerhalb des Genus zu unterscheiden. Ihre Untersuchungen zeigten ca. 96% Sequenzähnlichkeiten zwischen verschiedenen Xanthomonaden. Bei dem untersuchten Isolat 4284/11 und dessen Referenzen zeigte sich, dass das Isolat 91.2% Ähnlichkeit zu *L. mephitis* CIP 107229<sup>T</sup>, aber nur 87.7% bzw. 88.9% zu *L. aestuarii* DSM 19680<sup>T</sup> bzw. *L. enzymogenes* subsp. *enzymogenes* LMG 8762<sup>T</sup> aufweist. Während *L. aestuarii* DSM 19680<sup>T</sup> zu *L. mephitis* CIP 107229<sup>T</sup> und *L. enzymogenes* subsp. *enzymogenes* LMG 8762<sup>T</sup> 89.3% bzw. 89.9% Sequenzähnlichkeit aufweist, zeigen *L. mephitis* CIP 107229<sup>T</sup> und *L. enzymogenes* subsp. *enzymogenes* LMG 8762<sup>T</sup> untereinander eine Sequenzähnlichkeit von 91.6% (Daten nicht dargestellt). Die Sequenzähnlichkeiten liegen signifikant unter den Ergebnissen von Yakoubou und Côté (2010). Erneut kann keine eindeutige Aussage bezüglich der Genuszugehörigkeit getroffen werden. Es lässt sich nur vermuten, dass das Isolat 4284/11 dem Genus *Luteimonas* angehört und eventuell mit dem Genus *Lysobacter* kombiniert werden könnte, während *L. aestuarii* DSM 19680<sup>T</sup> eventuell in ein neues Genus transferiert werden sollte.

Gonçalves & Rosato (2002) untersuchten ebenfalls in Xanthomonaden die Intergenische Sequenz. Dabei stellten sie fest, dass die Länge dieser Region variiert. Die zwei enthaltenen Gene der tRNAs unterteilen die ITS in drei Regionen. Region Nummer eins (ITS1) liegt vor den tRNA kodierenden Genen, Region Nummer zwei (ITS2) ist zwischen diesen Genen zu finden und Region Nummer drei (ITS3) befindet sich nach den beiden tRNA kodierenden Genen. Diese drei Regionen weisen eine unterschiedliche Länge auf. Die Gesamtlänge des ITS von *L. enzymogenes* subsp. *enzymogenes* LMG 8762<sup>T</sup> ist mit 526 Bp länger als die von den anderen drei Stämmen ( $480 \pm 4$  Bp). Einen signifikanten Unterschied der Längen der ITS Regionen zwischen *L. aestuarii* DSM 19680<sup>T</sup>, *L. mephitis* CIP 107229<sup>T</sup> und dem Isolat ist nicht zu erkennen (Daten nicht dargestellt).

Schließlich wurden die ITS-Sequenzen mittels FASTA auch mit Genbankeinträgen verglichen. Dabei zeigte sich, dass bei dem Genus *Fratureia*, ebenfalls zugehörig zur Familie der *Xanthomonadaceae* (Euzéby, 1997), die Reihenfolge der tRNA-kodierenden Gene gleich ist, wie bei *L. aestuarii* DSM 19680<sup>T</sup>. Diese Reihenfolge findet sich ebenfalls bei Vertretern des

Genus *Rhodanobacter*. Allerdings liegen die Unterschiede in den tRNA Sequenzen signifikant höher. Entsprechende Sequenzen von *Xanthomonas* Arten wurden jedoch bei diesem Vergleich nicht gefunden.

Bei der Auswertung der ITS Region war auffällig, dass sich das Nukleotid 5 der ITS Region ausgehend vom 5'-Ende bei *Xanthomonas* Arten und *Xylella fastidiosa* unterscheidet. *Xanthomonas* Arten haben an der Position das Nukleotid Cytosin, während *X. fastidiosa* an dieser Stelle Thymin besitzt. Interessanterweise unterscheiden sich die beiden Genera *Luteimonas* und *Lysobacter* nicht nur im Nukleotid Nummer 5 von den oben genannten Genera, sondern auch in dem ersten Nukleotid. Beide Genera haben an der Position 1 Adenin anstatt Thymin und an der Position 5 ebenfalls Adenin statt einem Cytosin oder Thymin wie bei *Xanthomonas* bzw. *Xylella*. Auch in weiteren Genera der Familie *Xanthomonadaceae* gibt es an diesen beiden Nukleotidpositionen Unterschiede. Interessant wären weitere Untersuchungen zu der Thematik, ob sich Aussagen über die Genuszugehörigkeit basierend auf diesen beiden Nukleotidpositionen treffen lassen. Diese Erkenntnis könnte dann ein Argument dafür sein, dass die beiden Genera *Luteimonas* und *Lysobacter* eventuell zusammengeführt werden sollten. Dafür müssten aber alle Arten der zwei Genera auf dieses Merkmal hin untersucht werden, ebenso weitere Vertreter der *Xanthomonadaceae*, um sicher zu stellen, dass dieses Merkmal der zwei Nukleotide genuspezifisch in der Familie der *Xanthomonadaceae* ist. Weitere Untersuchungen bezüglich anderer Haushaltsgene und/oder zusätzliche Analysen der Intergenischen Sequenz in anderen *Xanthomonadaceae* wären ebenfalls zu überlegen.

Abschließend ist zu sagen, dass es sich, aufgrund der vorliegenden Daten, bei dem Isolat 4284/11 um den Vertreter einer neuen Art handelt. Die chemotaxonomischen Analysen (Chinonsystem, polaren Lipide, Polyaminmuster) ergaben keinen eindeutigen Hinweis zu welchem Genus das Isolat 4284/11 gehört und ob der Stamm *L. aestuarii* DSM 19680<sup>T</sup> in ein neues Genus transferiert werden sollte oder nicht. Die Untersuchung des Hitzeschockgens *groEL* zeigte für das Isolat 4284/11 nur in der Proteinsequenz eine Tendenz zum Genus *Luteimonas*. Die Daten weisen auch daraufhin, dass *L. aestuarii* DSM 19680<sup>T</sup> dem Genus *Luteimonas* angehört. Die Analysen der Intergenischen Sequenz konnte die Genuszugehörigkeit nicht klären. Betrachtet man die ITS Region inklusive aller Lücken und der

Reihenfolge der kodierenden Gene für die tRNAs, gehört das Isolat in ein Genus mit *L. mephitis* CIP 107229<sup>T</sup> und *L. enzymogenes* subsp. *enzymogenes* LMG 8762<sup>T</sup> jedoch *L. aestuarii* DSM 19680<sup>T</sup> in ein eigenes Genus. Löscht man jedoch bei allen vier Stämmen die Lücken und vertauscht die Reihenfolge der tRNA-kodierenden Gene bei *L. aestuarii* DSM 19680<sup>T</sup>, gehört das Isolat zum Genus *Luteimonas* und *L. aestuarii* DSM 19680<sup>T</sup> zum Genus *Lysobacter*. Beim Vergleich der 224 Bp von der 16S rRNA und dem ITS deuten die Daten daraufhin, dass, wie weiter oben schon erwähnt, das Isolat als auch *L. enzymogenes* subsp. *enzymogenes* LMG 8762<sup>T</sup> und *L. mephitis* CIP 107229<sup>T</sup> in ein Genus zusammengeführt werden könnten und *L. aestuarii* DSM 19680<sup>T</sup> eventuell in ein neues Genus reklassifiziert werden sollte.

Daher ist aufgrund aller bisher zur Verfügung stehenden Daten zu vermuten, dass das Isolat dem Genus *Luteimonas* zugeordnet werden sollte, jedoch für *L. aestuarii* DSM 19680<sup>T</sup> keine Aussage zum jetzigen Zeitpunkt zu treffen ist. Um dies zu klären, sollten weitere Arten der Genera *Luteimonas* und *Lysobacter* diesbezüglich untersucht werden und mit den hier erhaltenen Ergebnissen verglichen werden.

## 4.2 Isolat 1438/12

Die Sequenzierung des 16S rRNA kodierenden Gens des Isolats 1438/12 ergab ein 997 Nukleotid langes Fragment ausgehend vom 5'-Ende. Über Sequenzvergleiche wurde als nächster Verwandter *Chryseobacterium ginsenosidimutans* THG 15<sup>T</sup> mit 96.08% Sequenzähnlichkeit identifiziert. Die Sequenzähnlichkeit zur Typspezies *Chryseobacterium gleum* ATCC 35910<sup>T</sup> liegt nur geringfügig niedriger mit 95.88%.

Als respiratorisches Chinon wurde nur Menachinon 6 detektiert, was für dieses Genus charakteristisch ist (Vandamme *et al.*, 1994).

Das polare Lipidmuster vom Isolat 1438/12 zeigte Phosphatidylethanolamin als Hauptkomponente sowie vier nicht identifizierte Aminolipide (AL1, AL3, AL5, AL6) und acht Lipide (L1, L3, L6, L7, L10, L12, L13, L14) in geringen Mengen oder sogar nur in Spuren. Neben Phosphatidylethanolamin konnte ein zweites Aminophospholipid APL detektiert werden. Wie auch bei *C. gleum*, wurden keine Phospho- und Glykolipide detektiert.

Die Zuordnung der Beschriftung der Lipide erfolgte im visuellen Vergleich mit *C. gleum* NCTC 11432<sup>T</sup> (Typspezies, unveröffentlichtes Material). Gemeinsamkeiten zwischen *C. gleum* NCTC 11432<sup>T</sup> und dem Isolat gibt es bei Phosphatidylethanolamin, bei drei Lipiden (L7, L10 und L12) und vier Aminolipiden (AL1, AL3, AL5 und AL6). Das Isolat unterscheidet sich durch das Vorkommen von vier Lipiden (L1, L6, L13 und L14) von *C. gleum* NCTC 11432<sup>T</sup>.

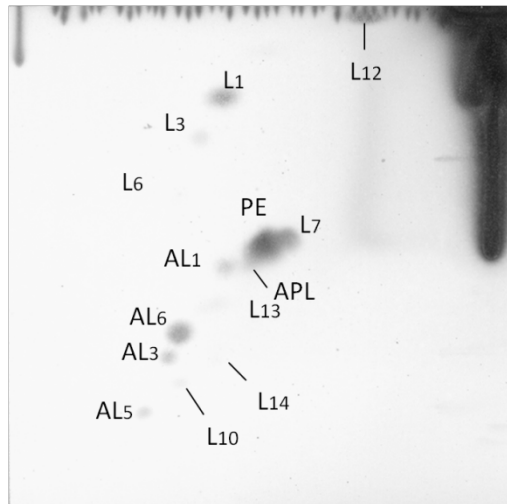


**Abbildung 5:** Polares Lipidmuster des Isolats 1438/12. Die polaren Lipide wurden unter Verwendung von Molybdätdi-phosphorsäure detektiert. Abkürzungen: PE (Phosphatidylethanolamin); APL (nicht identifiziertes Aminophospholipid), ALx (nicht identifizierte Aminolipide), Lx (nicht identifizierte Lipide, die weder eine Phosphat-, eine Aminogruppe oder einen Zucker enthalten).

Die Analyse der Polyamine ergab *sym*-Homospermidin als Hauptkomponente mit 41.6 µmol/g Trockenmasse. In geringen Mengen konnten Spermidin [6.4 µmol/g] und Spermin [3.4 µmol/g] detektiert werden sowie in Spuren *sym*-Norspermidin [0.20 µmol/g] und Putrescin [0.07 µmol/g]. Die Ergebnisse decken sich sehr gut mit den bisher gefundenen Daten in der Literatur (Kämpfer *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2013).

Aufgrund der 16S rRNA Vergleiche als auch der vorliegenden chemotaxonomischen Daten, wie die Analyse der respiratorischen Chinone, der polaren Lipiden und des Polyaminmusters, ist die Zugehörigkeit zum Genus *Chryseobacterium* zweifelsfrei nachgewiesen. Um aber den Nachweis für eine neue Art zu erbringen, sollte die 16S rRNA Gensequenz vollständig analysiert werden. Erst eine Sequenzähnlichkeit von <97% mit den nächsten Verwandten

wäre ein Beweis dafür, dass es sich bei dem Isolat 1438/12 um eine neue Art des Genus *Chryseobacterium* handelt.

### 4.3 Isolate 2385/12 und 2673/12

Die Sequenzanalyse des 16S rRNA kodierenden Gens ergab für das Isolat 2385/12 ein Fragment mit der Länge von 1423 bzw. 1382 Nukleotiden für das Isolat 2673/12. Beide Isolate gehören dem Genus *Corynebacterium* an.

Mit 96.34%iger 16S rRNA Gensequenzähnlichkeit ist der nächste Verwandte des Isolats 2385/12 *Corynebacterium singulare* CIP 105491<sup>T</sup>. Im Falle des Isolats 2673/12 lag eine 98.71%ige Übereinstimmung mit *Corynebacterium humireducens* DSM 45392<sup>T</sup> vor. Für beide Isolate wurde von der Arbeitsgruppe von Prof. Peter Kämpfer, Justus-Liebig-Universität Gießen, eine DNA-DNA Hybridisierung durchgeführt. Die Ergebnisse zwischen 2385/12 und *C. singulare* CIP 105491<sup>T</sup> (43.5%; reziprok 28,0%) und 2673/12 und *C. humireducens* DSM 45392<sup>T</sup> (30.5%; reziprok 21.4%) ergaben, dass beide Isolate eine neue Art repräsentieren.

Am Ende dieser Arbeit ist die vollständige Charakterisierung und die Beschreibung als neue Art von *Corynebacterium tapiri* (2385/12) und *Corynebacterium nasicanis* (2673/12) in Form eines Manuskripts angefügt. Dieses soll im 'International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology' eingereicht werden.

### 4.4 Isolat 2776/12

Das Isolat 2776/12 wurde mittels 16S rRNA Sequenzierung als *Streptococcus* identifiziert. Die Sequenzlänge betrug 1451 Nukleotide. Die nächsten Verwandten sind *S. devriesei* DSM 19639<sup>T</sup> mit 95.69%iger und *S. ursoris* DSM 22768<sup>T</sup> mit 95.66%iger Sequenzähnlichkeit.

Sowohl das Isolat als auch beide Referenzstämme sind auf Columbia III Agar (Becton-Dickinson) mit 5% Schafsblut  $\alpha$ -hämolytisch. Das Isolat 2776/12 wuchs auf Galle Aesculin Azid Agar, welcher sich nach Inkubation über 2 Tage verdunkelte bzw. schwarz färbte. Dies deutet daraufhin, dass das Isolat in der Lage ist Aesculin in Glucose und Äsculetin zu hydrolysieren.

Der Genus *Streptococcus*, erstmals beschrieben 1884 von Rosenbach, verfügt über einen fermentativen Metabolismus (Whiley & Hardie, 2009) und besitzt keine Chinone, weshalb dieses Analyseverfahren nicht durchgeführt wurde.

Die Analyse der polaren Lipide der untersuchten Streptokokken brachte ein sehr homogenes Muster hervor. Der Großteil der polaren Lipide ist in allen drei Stämmen zu finden. Auffallend war die hohe Anzahl von Glykolipiden. Als Hauptkomponenten wurden Diphosphatidylglycerol, die Glykolipide GL1 bis 6 sowie die Phosphoglykolipide PGL1 und 2 nachgewiesen. Des Weiteren wurden zwei Phospholipide detektiert. Obwohl beide Phospholipide bei der Färbung mit Molybdätophosphorsäure mit gleicher Intensität erschienen, konnte dieses Ergebnis bei der Molybdenum Blue Färbung nicht erreicht werden. Dabei war das zweite Phospholipid um einiges schwächer als das Phospholipid PL1. In der zweiten Dimension war die chromatische Auftrennung zwischen dem zweiten Phospholipid und Diphosphatidylglycerol geringer als zwischen dem Phospholipid PL1 und Diphosphatidylglycerol. Aufgrund des chromatografischen Verhaltens vom zweiten Phospholipid und Diphosphatidylglycerol bestand die Vermutung, dass es sich um Phosphatidylglycerol handelt.

Ferner wurden bei dem Isolat 2776/12 zwei Phosphoglykolipide (PGL1, PGL2), zwei Aminolipide (AL1, AL2), zwei Lipide (L2, L5) und insgesamt neun Glykolipide (GL1-9) detektiert.

$\beta$ -Gentiobiosyldiacylglycerol findet man sowohl bei Staphylokokken (Nahaie *et al.*, 1984) als auch bei Corynebakterien (Isolate 2385/12, 2673/12 und deren Referenzen *C. singulare* CIP 105491<sup>T</sup> und *C. humireducens* DSM 45392<sup>T</sup>). Dieses Glykolipid verhält sich im Laufverhalten der Dünnschichtchromatografie in der Regel so, dass es in der ersten Dimension zwar einen höheren Retentionsfaktor ( $R_f$ -Wert) besitzt, aber in der zweiten Dimension einen niedrigeren als Phosphatidylglycerol aufweist. Im Vergleich mit dem Isolat 2673/12 handelt es sich bei dem Glykolipid GL5 des Isolats 2776/12 nicht um  $\beta$ -Gentiobiosyldiacylglycerol, da das Glykolipid GL5 in der zweiten Dimension einen höheren  $R_f$ -Wert als Phosphatidylglycerol besitzt. Im Vergleich mit dem Isolat 2673/12 kommen beide Phospholipide als Phosphatidylglycerol infrage.

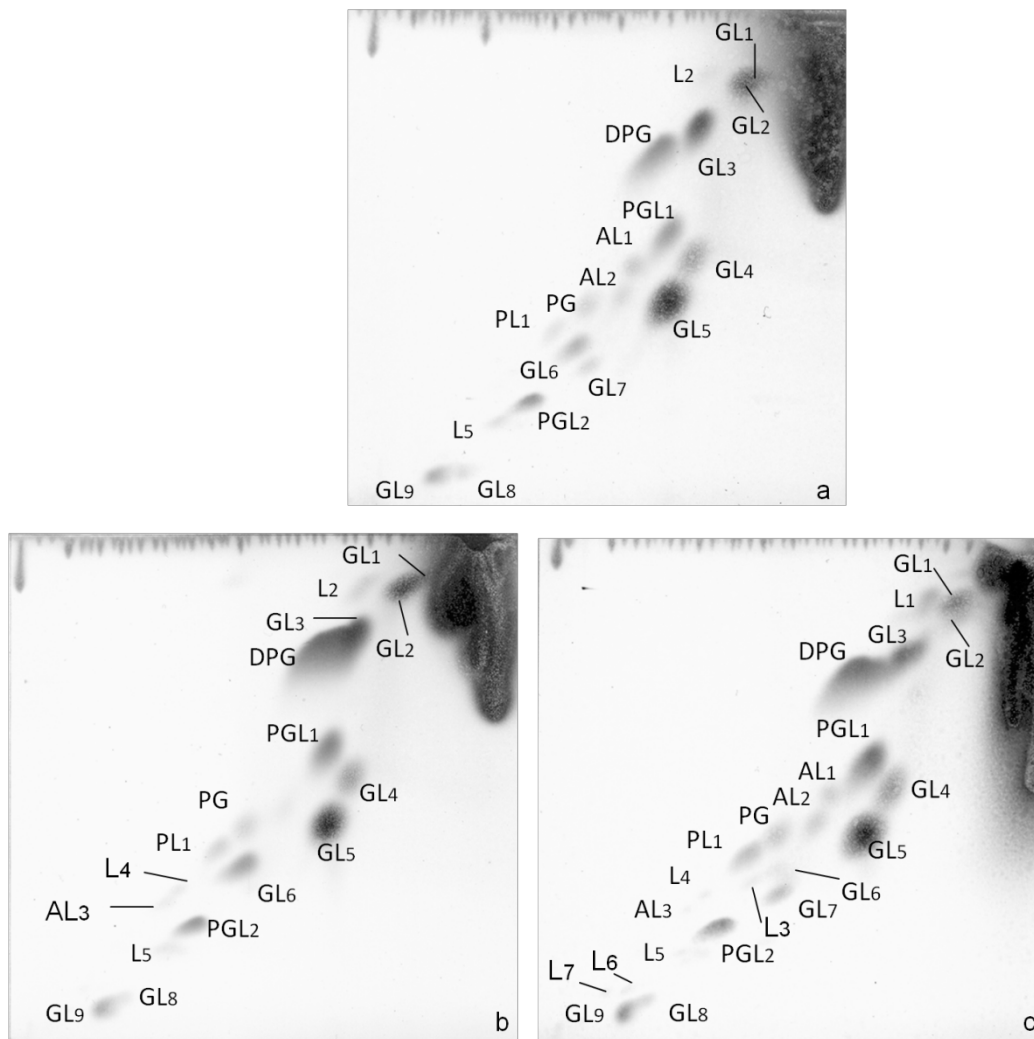


**Abbildung 6:** Profile der polaren Lipide. Isolat 2776/12 (a), *S. devriesei* DSM 19639<sup>T</sup> (b), *S. ursoris* DSM 22768<sup>T</sup> (c). Die polaren Lipide wurden unter Verwendung von Molybdato-phosphorsäure detektiert. Abkürzungen: DPG (Diphosphatidylglycerol), PG (Phosphatidyl-glycerol), ALx (nicht identifizierte Aminolipide), GLx (nicht identifizierte Glykolipide), PGLx (nicht identifizierte Phosphoglykolipide), PL (nicht identifiziertes Phospholipid), Lx (nicht identifizierte Lipide, die weder eine Phosphat-, eine Aminogruppe oder einen Zucker enthalten).

Bei Staphylokokken findet man zusätzlich noch Gentiotriosyldiacylglycerol (Nahaie *et al.*, 1984). Dieses Glykolipid zeigt ein Laufverhalten, welches in der ersten Dimension einen ähnlichen, aber in der zweiten einen niedrigeren  $R_f$ -Wert als Phosphatidylglycerol besitzt. Keines der Glykolipide der untersuchten Streptokokken zeigt ein solches Laufverhalten und somit konnte das Vorhandensein von Gentiotriosyldiacylglycerol nicht bestätigt werden.

Im visuellen Vergleich mit *S. downei* könnte es sich bei den Glykolipiden GL1 und GL2 um Monoglycosyldiglycerole handeln (Whiley *et al.*, 1988). Ein zusätzlicher visueller Vergleich der Glykolipide GL1 und GL2 mit *E. faecalis* (Fischer, 1977) lässt ebenfalls vermuten, dass es sich bei beiden Glykolipiden um Monoglycosyldiglycerole handelt. Wenn man davon ausgeht, dass es sich bei dem zweiten Phospholipid um Phosphatidylglycerol handelt, kann es sich bei dem Glykolipid GL5 um ein Diglycosyldiglycerid handeln (Whiley *et al.*; 1988).

Da durch die vorhergehenden Untersuchungen nicht eindeutig geklärt werden konnte, welcher Lipidfleck Phosphatidylglycerol repräsentiert, wurde eine Kombinationsplatte mit dem Lipidextrakten des Isolats 2776/12 und *L. enzymogenes* subsp. *enzymogenes* LMG 8762<sup>T</sup> angefertigt. Es konnte eine Verstärkung der Intensität des zweiten Phospholipids nachgewiesen und damit bestätigt werden, dass es sich um Phosphatidylglycerol handelt.

Fischer (1977) untersuchte das polare Lipidmuster von *Streptococcus faecalis*. Inzwischen wurde *Streptococcus faecalis* als Typspezies in das wiederbelebte Genus *Enterococcus* überführt (Schleifer & Kilpper-Bälz, 1984).

Desweiteren wurde das Isolat nicht nur mit publizierten Lipiddaten für *Enterococcus faecalis* verglichen, sondern auch mit denen für *Bavariicoccus seileri* und *Vagococcus fluvialis*. Die Genera *Bavariicoccus*, *Enterococcus* und *Vagococcus* gehören, wie das Genus *Streptococcus*, in die Ordnung *Lactobacillales*.

Die von Fischer untersuchten Glykolipide von *E. faecalis* konnten nicht eindeutig zu dem Isolat 2776/12 zugeordnet werden, da zum Zeitpunkt des Verfassens dieser Arbeit keine weiteren Abbildungen vom Muster der polaren Lipide von Enterokokken zu finden waren.

Der visuelle Vergleich mit dem polaren Lipidmuster von *B. seileri* (Schmidt *et al.*, 2009) ergab keine Gemeinsamkeiten.

Im Vergleich mit *V. fluvialis* (Fischer & Arneth-Seifert, 1998) wurden Übereinstimmungen bei Phosphatidylglycerol, dem Phospholipid PL2 und Diphosphatidylglycerol sowie den Glykolipiden GL8 und GL9 gefunden. Bei diesen beiden Glykolipiden soll es sich bei *V. fluvialis* um  $\alpha$ -D-Glc-cardiolipin bzw. sn-Gro-1-P-6Gal( $\alpha$ 1-2)Glc( $\alpha$ 1-3)acyl<sub>2</sub>Gro handeln (Fischer & Arneth-Seifert, 1998). Die Glykolipide GL8 und GL9 zeigten jedoch keine Färbung nach Detektion mit Molybdenum Blue, sodass keine Phosphatgruppen nachgewiesen werden konnten.

Das polare Lipidmuster des Isolats 2776/12 kann dem Genus *Streptococcus* zugeordnet werden, es zeigt eine sehr hohe Übereinstimmung mit den beiden Referenzstämmen *S. devriesei* DSM 19639<sup>T</sup> und *S. ursoris* DSM 22768<sup>T</sup>. Die Zugehörigkeit zu den Genera *Bavariicoccus*, *Enterococcus* und *Vagococcus* kann ausgeschlossen werden, da die Übereinstimmung im Lipidmuster zu gering bzw. nicht vorhanden ist. Eine genaue Identifizierung der polaren Lipide ließ sich im visuellen Vergleich mit den Genera *Bavariicoccus*, *Enterococcus* und *Vagococcus* nicht erreichen.

Die Analyse der Polyamine des Isolats 2776/12 ergab als Hauptkomponenten Spermidin [8.2 µmol/g] und Spermin [8.0 µmol/g]. Außerdem wurde Putrescin [0.5 µmol/g] und Cadaverin [0.1 µmol/g] gefunden, während in Spuren noch 1,3-Diaminopropan [0.07 µmol/g] und sym-Homospermidin [0.04 µmol/g] detektiert werden konnten. Hamana und Matsuzaki (1992) gaben an, dass Gram-positive Bakterien wie *Lactobacillus*, *Streptococcus* (*S. thermophilus*) und *Enterococcus* (*E. faecalis*) Putrescin und in geringen Mengen Spermidin besitzen.

Mit Abweichung des Mengenverhältnisses, stimmen die Ergebnisse mit den Daten von Haman und Matsuzaki überein.

Aufgrund der Analyse des 16S rRNA kodierenden Gens und dem Vergleich der polaren Lipiden mit den Referenzstämmen *S. devriesei* DSM 19639<sup>T</sup> und *S. ursoris* DSM 22768<sup>T</sup> konnte gezeigt werden, dass es sich um eine neue *Streptococcus* Art handelt. Eine genaue Identifizierung der polaren Lipide konnte trotz verschiedener Vergleiche nicht erbracht werden.

#### **4.5 Isolate 1566/10, 1819/10, 1906/10, 2428/10, 2459/10 und 114**

Die Isolate 1566/10, 1819/10, 1906/10, 2428/10 und 2459/10 wurden in der Routinediagnostik isoliert und als *Acinetobacter* spp. identifiziert. Von keinem dieser Isolate wurden die 16S rRNA kodierenden Gene analysiert.

Das Isolat 114 wurde als neue *Acinetobacter*-Spezies von Gottfried Wilharm (Robert Koch Institut, Wernigerode) bereitgestellt und parallel zu den anderen Isolaten untersucht. Dieses

Isolat weist die höchste 16S rRNA Sequenzähnlichkeit zu *Acinetobacter lwoffii* NCTC 5866<sup>T</sup> (97.9%) auf (Wilharm, pers. Mitteilung).

Als weitere phänotypische Charakterisierung und Identifizierung wurde das Identifizierungskits API 20 NE (Biomérieux) verwendet. Bei diesem Kit handelt es sich um ein standardisiertes Identifikationssystem für nicht fermentierende anspruchslose, Gram-negative Bakterien, welche nicht zur Familie der *Enterobacteriaceae* gehören. Die Auswertung erfolgte mithilfe von apiweb™ (<https://apiweb.biomerieux.com>). Dabei wurde der Teststreifen optisch mit einer Online-Farbüberprüfung verglichen und die Ergebnisse in Tab. 14 zusammengefasst.

Alle untersuchten *Acinetobacter*-Isolate waren Oxidase negativ. Die Auswertung des Isolats 114 fand nach 24 Std. und 48 Std. statt, um auszuschließen, dass es sich um *Comamonas testosteroni*/*Pseudomonas alcaligenes* handelt, was mit niedriger Wahrscheinlichkeit (8.2%) vom Auswertungssystem als mögliche Identifizierung angegeben worden war. Der Ausgabe-Code für das Isolat 114 lautete nach 24 Std. 1000030, was auf *A. lwoffii* mit 62.4%iger Wahrscheinlichkeit hindeutete. Nach 48 Std. wurde eine schwache Flockenbildung in den Kammern zur Verwertung von Apfelsäure und Natriumcitrat beobachtet, was zur Veränderung des Codes (1000071) führte. Die Wahrscheinlichkeit von *Comamonas testosteroni*/*Pseudomonas alcaligenes* stieg somit auf 52.8%, während die Wahrscheinlichkeit von *Acinetobacter* spp. gesunken war. Da jedoch der Oxidase Test gegen *Comamonas testosteroni*/*Pseudomonas alcaligenes* spricht und es sich bei dem Isolat 114 um eine neue *Acinetobacter*-Art handelt, war durchaus mit einem nicht eindeutigen Ergebnis zu rechnen, da diese natürlich noch nicht in der API Datenbank enthalten sein kann.

Für die anderen *Acinetobacter*-Isolate lautete der Ausgabe-Code 0041473 bzw. 00-1073 für 1906/10 mit einer Wahrscheinlichkeit von 99.4% bzw. 99.9% um *A. baumannii*/*A. calcoaceticus*. Da für das Isolat 1906/10 die Verwertung von D-Glucose nicht eindeutig und daher der Ausgabe-Code (00-1073) unvollständig war, wurde dieser API wiederholt. Die Auswertung der Wiederholung erfolgte nach 24 und 48 Stunden. Nach 24 Std. ergab der Ausgabe-Code *A. baumannii* (0041473) mit 99.4% Wahrscheinlichkeit an, jedoch nach 48 Std. *Burkholderia cepacia* (0047773), eine Art die im Gegensatz zu *Acinetobacter* zu Klasse *Betaproteobacteria* gehört. Eine Identifikation als *Burkholderia cepacia* widersprach jedoch

den Analyseergebnissen der Chinone und der polaren Lipide. Bei *Burkholderia* Arten wurde Q-8 als Chinonhauptkomponente angegeben (Urakami *et al.*, 1994; Lu *et al.*, 2012; Sheu *et al.*, 2013). Dagegen war bei dem Isolat 1906/10 die Hauptkomponente Q-9 detektiert worden. Bei den polaren Lipiden wurde bei verschiedenen *Burkholderia*-Arten ein Aminophospholipid festgestellt (Sheu *et al.*, 2012), welches bei dem Isolat 1906/10 nicht detektiert werden konnte. Das Aminophospholipid der *Acinetobacter*-Isolate zeigt ein eindeutig anderes chromatografisches Verhalten. Auch die Ergebnisse der ERIC- und REP-PCR (siehe Abb. 8 und 9) sprachen gegen *Burkholderia cepacia*, da die Isolate 1566/10, 1819/10, 1906/10, 2428/10 und 2459/10 dem Bandenmuster des Referenzstamms *A. baumannii* ATCC 19606<sup>T</sup> entsprechen.

**Tabelle 14:** Physiologische Tests der *Acinetobacter*-Isolate; durchgeführt mit API 20 NE

| Isolat \ Test                     | 114            | 1566/10 | 1819/10 | 1906/10        | 2428/10 | 2459/10 |
|-----------------------------------|----------------|---------|---------|----------------|---------|---------|
| Kaliumnitrat                      | +              | -       | -       | -              | -       | -       |
| L-Tryptophan                      | -              | -       | -       | -              | -       | -       |
| D-Glucose                         | -              | -       | -       | -              | -       | -       |
| L-Arginin                         | -              | -       | -       | -              | -       | -       |
| Urea                              | -              | -       | -       | -              | -       | -       |
| Äsculin/ Eisencitrat              | -              | -       | -       | -              | -       | -       |
| Gelatine                          | -              | -       | -       | -              | -       | -       |
| 4-Nitrophenyl-βD-Galactopyranosid | -              | -       | -       | -              | -       | -       |
| D-Glucose                         | -              | +       | +       | +              | +       | +       |
| L-Arabinose                       | -              | +       | +       | +              | +       | +       |
| D-Mannose                         | -              | -       | -       | - <sup>1</sup> | -       | -       |
| D-Mannitol                        | -              | -       | -       | - <sup>1</sup> | -       | -       |
| N-Acetyl-Glucosamin               | -              | -       | -       | - <sup>1</sup> | -       | -       |
| D-Maltose                         | -              | -       | -       | - <sup>1</sup> | -       | -       |
| Kaliumgluconat                    | -              | +       | +       | +              | +       | +       |
| Caprinsäure                       | +              | +       | +       | +              | +       | +       |
| Adipinsäure                       | +              | +       | +       | +              | +       | +       |
| Apfelsäure                        | - <sup>2</sup> | +       | +       | +              | +       | +       |
| Natriumcitrat                     | - <sup>2</sup> | +       | +       | +              | +       | +       |
| Phenyllessigsäure                 | -              | +       | +       | +              | +       | +       |

+ positive Reaktion

- negative Reaktion

<sup>1</sup> nach 48 Std. positiv

<sup>2</sup> nach 48 Std. schwach positiv

**Tabelle 15:** Test auf Antibiotika-Empfindlichkeit der *Acinetobacter*-Isolate. Die Auswertung erfolgte nach CLSI-Standard (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012).

1 sensibel, 0 resistent. Intermediäre Ergebnisse wurden als resistent bewertet, da nur unter bestimmten Bedingungen eine Wirkung zu erwarten ist. Abkürzungen der Antibiotika: Piperacilin (PIP) (100µg), Meropenem (MEM) (10 µg), Imipenem (IPM) (10 µg), Cefepim (FEP) (30 µg), Ceftazidim (CAZ) (30 µg), Ampicillin/ Sulbactam (SAM) (10/10 µg), Sulfonamid/ Trimethoprim (SXT) (1.25/23.75 µg), Ciprofloxacin (CIP) (5 µg), Levofloxacin (LVX) (5 µg), Enrofloxacin (ENO) (5 µg) und Marbofloxacin (MAR5) (5 µg)

| Antibiotika<br>Isolat | PIP         | SAM | MEM         | IPM | FEP            | CAZ | SXT         | CIP            | LVX | ENO | MAR5 |
|-----------------------|-------------|-----|-------------|-----|----------------|-----|-------------|----------------|-----|-----|------|
|                       | Penicilline |     | Carbapeneme |     | Cephalosporine |     | Sulfonamide | Fluorquinolone |     |     |      |
| <b>114</b>            | 1           | 1   | 0           | 1   | 1              | 1   | 1           | 1              | 1   | 1   | 1    |
| <b>1566/10</b>        | 0           | 1   | 1           | 1   | 1              | 0   | 0           | 0              | 0   | 0   | 0    |
| <b>1819/10</b>        | 0           | 0   | 0           | 1   | 0              | 0   | 0           | 0              | 0   | 0   | 0    |
| <b>1906/10</b>        | 0           | 0   | 1           | 1   | 0              | 1   | 0           | 0              | 0   | 0   | 0    |
| <b>2428/10</b>        | 0           | 0   | 0           | 1   | 0              | 0   | 0           | 0              | 0   | 0   | 0    |
| <b>2459/10</b>        | 0           | 0   | 0           | 1   | 0              | 1   | 0           | 0              | 0   | 0   | 0    |

Eine einheitliche Definition multiresistenter Bakterien gibt es derzeit nicht (Schwarz *et al.*, 2010). Allein in Deutschland existieren unterschiedliche Definitionen (Mattner *et al.*, 2012). Eine mögliche Definition von Vonberg *et al.* (2008) besagt, dass aerobe Gram-negative Stäbchen, wie auch *A. baumannii*, dann multiresistent sind, wenn sie auf weniger als zwei Gruppen von bakteriziden Antibiotika sensibel getestet wurden. Zu diesen Gruppen gehören Penicilline, Cephalosporine, Carbapeneme und Fluorquinolone (Vonberg *et al.*, 2008). Schwarz *et al.* (2010) gibt als „Guideline“ an, dass ein Bakterium dann als multiresistent angesehen werden kann, wenn es gegen mindestens 3 Wirkstoffklassen resistent ist. Alle *Acinetobacter*-Isolate wurden auf fünf Wirkstoffklassen getestet: Penicilline, Cephalosporine, Carbapeneme, Fluorquinolone und Sulfonamide.

Aufgrund der genannten Definitionen sind die Isolate 1819/10 und 2428/10 multiresistent. Nach der Definition von Schwarz *et al.* (2010) gelten die Isolate 1906/10 und 2459/10 ebenfalls als multiresistent. Die Isolate 1566/10 und 114 sind demnach nicht multiresistent (Tab. 15).

Die für die Resistenzen verantwortlichen Gene liegen nicht nur auf Plasmiden, welche durch Konjugation zwischen Bakterien gewonnen werden können (Madigan & Martinko, 2006; Schroeter & Käsbohrer, 2010), sie können auch durch Aufnahme von Transposons (Devaud *et al.*, 1982) oder Intergrons (Segal *et al.*, 2003) erlangt werden.

**Tabelle 16:** Zusammensetzung der respiratorischen Chinone der sechs *Acinetobacter*-Isolate und des Referenzstamm *A. baumannii* ATCC 19606<sup>T</sup>. Angaben in Prozent.

| Ubichinon<br>Isolat | Q-10 | Q-9  | Q-8  | Q-7  |
|---------------------|------|------|------|------|
| <i>A. baumannii</i> | 7.1  | 87.9 | 5.0  | -    |
| 114                 | 2.9  | 83.3 | 13.3 | -    |
| 1566/10             | -    | 89.5 | 8.8  | 1.8  |
| 1819/10             | n.d. | 90.7 | 9.1  | 0.2  |
| 1906/10             | n.d. | 93.4 | 6.6  | 0.01 |
| 2428/10             | n.d. | 92.0 | 7.8  | 0.2  |
| 2459/10             | n.d. | 92.1 | 7.7  | 0.2  |

Das Isolat 114 und der Referenzstamm *A. baumannii* ATCC 19606<sup>T</sup> weisen Q-9 als Hauptkomponente mit 83.3% bzw. 87.9% auf. In geringen Anteilen wurden auch Q-8 und Q-10 detektiert, während Q-7 nicht nachgewiesen werden konnte.

Weitere Chinonanaysen zeigten, dass alle untersuchten *Acinetobacter*-Isolate ebenfalls Q-9 als Hauptkomponente aufweisen und in geringen Anteilen Q-8 und Q-7. Bei den Isolaten 1819/10 bis 2459/10 wurde Q-10 nicht detektiert. Auffallend ist, dass der Referenzstamm *A. baumannii* ATCC 19606<sup>T</sup> Q-10 aufweist, aber kein Q-7, wie die Isolate. Ebenfalls lässt sich eine geringe Abweichung in der Zusammensetzung der Chinone, speziell Q-7, bei 1566/10 und 1906/10 innerhalb der Isolate erkennen. Inwiefern das Vorkommen bzw. nicht Vorkommen von Q-10 auf unterschiedliche *Acinetobacter baumannii* Stämme schließen lässt oder ob es sich nur um eine natürliche Schwankung handelt oder nur nicht detektiert werden konnte, kann aus diesen Daten nicht geklärt werden. Allerdings, unter Betrachtung aller hier gesammelten Daten, scheint es sich um eine natürliche Schwankung zu handeln. Um dies zu bestätigen sind weitere Experimente nötig, bei denen die Anzahl der *Acinetobacter baumannii* Stämme erhöht werden und von allen auch Biomasse aus

verschiedenen Wachstumsphasen geerntet und analysiert werden sollte, um festzustellen, ob sich das Verhältnis der detektierten Chinone in den verschiedenen Wachstumsphasen prozentual unterscheidet.

Die Analyse der polaren Lipide der *Acinetobacter*-Isolate ergab ein identisches Muster für fünf der sechs Isolate, wobei sich die geringen Unterschiede in der Intensität der polaren Lipide auf den Extraktionsprozess zurückführen lassen, da nicht exakt bei allen fünf Isolaten die gleiche Menge an Biomasse eingewogen wurde.

Als Hauptkomponenten im Lipidprofil waren Diphosphatidylglycerol, Phosphatidylethanolamin und Phosphatidylglycerol zu erwarten, wie für *A. indicus* DSM 25388<sup>T</sup> (Malhotra *et al.*, 2012) und *A. kyonggiensis* JCM 17071<sup>T</sup> (Lee & Lee, 2010) beschrieben. Die Hauptkomponenten der Isolate 1566/10 – 2459/10 sind Phosphatidylethanolamin, Phosphatidylglycerol und ein Aminophospholipid (APL1), während in moderaten Mengen Diphosphatidylglycerol, Phosphatidylserin und ein nicht identifiziertes Phospholipid (PL1) vorkommen. In geringen Mengen wurden weitere acht Lipide (L1-8) nachgewiesen.

Lee & Lee (2010) wiesen bei *A. kyonggiensis* moderate Mengen an Phosphatidylcholin und Phosphatidylserin nach. Die Form des Lipidflecks von Phosphatidylcholin ist prägnant und kann als „liegender Tropfen“ bezeichnet werden. Desweiteren färbt Phosphatidylcholin nicht Ninhydrin-positiv und besitzt einen signifikanten niedrigeren  $R_f$ -Wert als Phosphatidylglycerol. Aufgrund dessen wurde nur auf Phosphatidylserin getestet. Es war anzunehmen, dass es sich bei dem Aminophospholipid mit dem höheren  $R_f$ -Wert in der zweiten Dimension um Phosphatidylserin handelt. Anhand einer Kombinationsplatte des Isolats 1906/10 mit Phosphatidylserin (P6641, Sigma-Aldrich) wurden jedoch zwei sehr nahe beieinanderliegende Lipide detektiert, von denen eines die Referenz Phosphatidylserin repräsentierte. Daher besteht weiterhin der Verdacht, dass es sich bei dem zweiten Aminophospholipid eventuell um Phosphatidylserin handelt könnte, jedoch sich die Fettsäuren der Referenzsubstanz Phosphatidylserin von denen des Isolats 1906/10, bezüglich ihrer Geradkettigkeit bzw. Verzweigtheit, unterscheiden. Bei *Acinetobacter* kommen geradkettige Fettsäuren vor (Lee & Lee, 2010), wobei die Firma Sigma-Aldrich in der Produktbeschreibung keine Angaben bezüglich der Fettsäuren bei Phosphatidylserin angegeben hat.

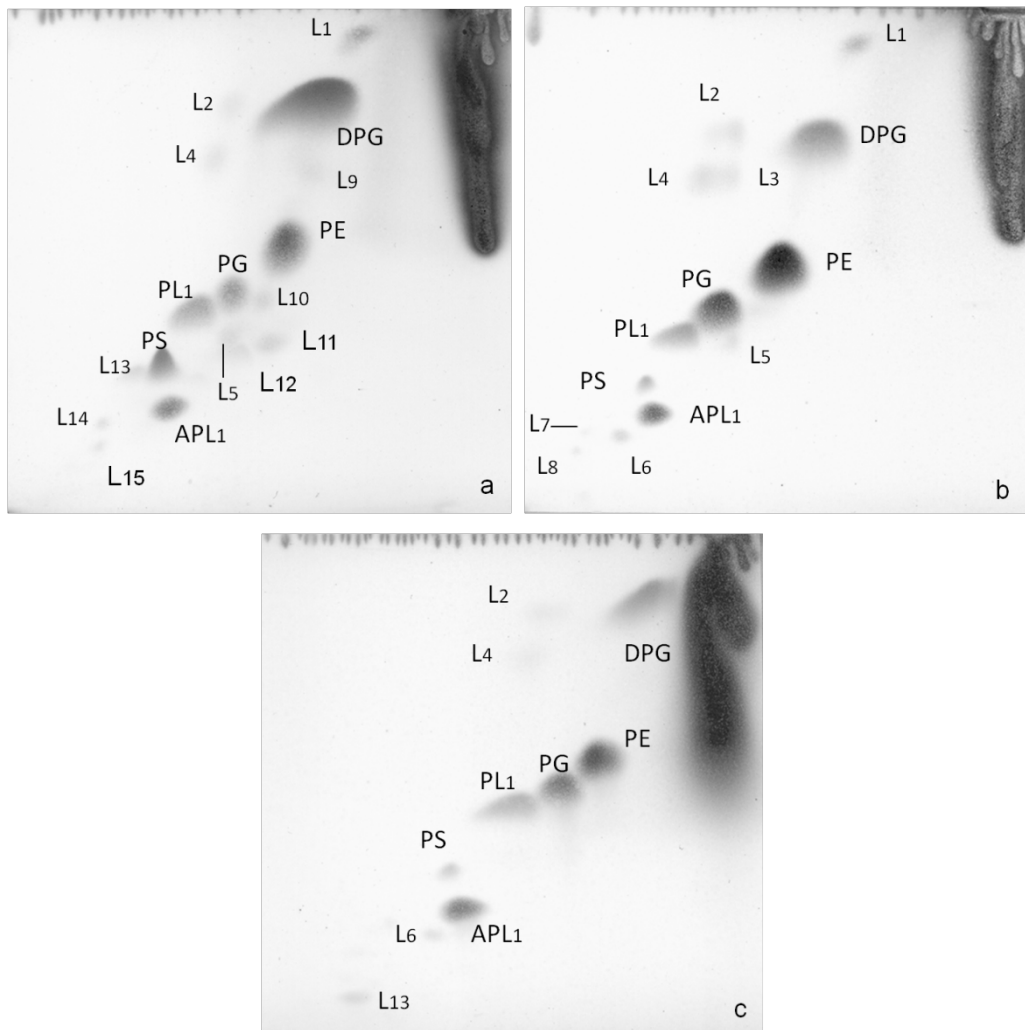


**Abbildung 7:** Profile der polaren Lipide. Isolat 114 (a), 2459/10 (b), *A. baumannii* ATCC 19606<sup>T</sup> (c). Die polaren Lipide wurden unter Verwendung von Molybdatophosphorsäure detektiert. Abkürzungen: DPG (Diphosphatidylglycerol), PE (Phosphatidylethanolamin), PG (Phosphatidylglycerol), PS (Phosphatidylserin), PL (nicht identifiziertes Phospholipid), APL (nicht identifiziertes Aminophospholipid), Lx (nicht identifizierte Lipide, die weder eine Phosphat-, eine Aminogruppe oder einen Zucker enthalten).

Das Muster der polaren Lipide wurde des Weiteren mit denen von *A. lwoffii* DSM 2403<sup>T</sup> aus der Diplomarbeit von Steinbrugger (1998) und von *A. johnsonii* DSM 6963<sup>T</sup> und dem Isolat 886 aus der Diplomarbeit von Frischmann (2011) verglichen. Die Dünnschichtchromatografie weist im Fall von *A. lwoffii* DSM 2403<sup>T</sup> weniger polare Lipide auf, Diphosphatidylglycerol, Phosphatidylethanolamin, Phosphatidylglycerol und ein nicht identifiziertes Phospholipid.

Die geringe Anzahl an polaren Lipiden könnte auf eine geringe Menge an eingesetztem Extrakt in der Analyse zurückzuführen sein.

Das polare Lipidmuster von *A. johnsonii* DSM 6963<sup>T</sup> weist mehr Flecken auf und ähnelt den zu untersuchenden Isolaten eher. Das Isolat 2459/10 zeigt neben Diphosphatidylglycerol, Phosphatidylethanolamin und Phosphatidylglycerol noch Übereinstimmungen bezüglich Lipid L2, Phospholipid PL1, Aminophospholipid APL1 und Phosphatidylserin. Der Vergleich mit *A. baumannii* ATCC 19606<sup>T</sup> zeigt ebenfalls ein sehr ähnliches Muster der polaren Lipide. Da die Daten des API 20 NE als auch die Fingerabdruckanalysen auf *A. baumannii* deuten, ist anzunehmen, dass es sich bei den Isolaten um *A. baumannii* Stämme handelt anstatt *A. johnsonii*.

Das Isolat 114 besaß als Hauptkomponenten Diphosphatidylglycerol, Phosphatidylethanolamin, Phosphatidylserin und ein nicht identifiziertes Aminophospholipid sowie in moderaten Mengen Phosphatidylglycerol und ein nicht identifiziertes Phospholipid. In Spuren konnten weitere nicht identifizierte polare Lipide nachgewiesen werden, durch welche sich das Isolat von den anderen Isolaten und den Referenzstämmen *A. baumannii* ATCC 19606<sup>T</sup>, *A. lwoffii* DSM 2403<sup>T</sup> und *A. johnsonii* DSM 6963<sup>T</sup> unterscheidet.

Für das Isolat 114 wurde zusätzlich eine Polyaminanalyse durchgeführt. Die Hauptkomponente im Polyaminmuster war 1,3-Diaminopropan mit 100.6 µmol/g Trockenmasse. In geringen Mengen wurden auch noch Spermidin [2.6 µmol/g], Spermin [2.2 µmol/g] und Putrescin [1.3 µmol/g] detektiert, sowie in Spuren Cadaverin [0.3 µmol/g]. Die Polyaminergebnisse entsprachen den Erwartungen (Malhotra *et al.*, 2012). 1,3-Diaminopropan gilt mit einem Anteil von ungefähr 90% der Gesamtpolyamine als charakteristisches Merkmal für den Genus *Acinetobacter* (Busse & Auling, 1988; Auling *et al.* 1991; Hamana & Matsuzaki, 1992).

Die Analyseergebnisse der Chinone, der polaren Lipide und der Polyamine bestätigen, dass es sich bei dem Isolat 114 um den Vertreter einer *Acinetobacter* Art handelt.

Zur weiteren Differenzierung der *Acinetobacter* Isolate wurde eine ERIC-PCR durchgeführt. Das Muster der ERIC-Fingerabdrücke des Isolats 114 ähnelt entfernt dem von *A. haemolyticus* ATCC 17906<sup>T</sup>, was dadurch begründet wird, dass beide Stämme wenige

Banden aufweisen. Beide Muster zeigen bei ca. 250 Bp und ca. 500 Bp jeweils eine Bande. Ähnlichkeiten zu den anderen Referenzstämmen wies das Isolat 114 nicht auf.

Das Bandenmuster ergab im visuellen Vergleich, dass sich das Isolat 1906/10 von den anderen Isolaten geringfügig unterscheidet. Die Bande zwischen 500 und 600 Bp ist wesentlich stärker als bei den anderen Isolaten, während die Doppelbande bei ca. 2000 Bp und die Bande bei ca. 3000 Bp schwächer ausfällt. Alle fünf Isolate zeigen zusätzlich markante Banden bei 1500 Bp, 900 Bp und 300 Bp. Der Referenzstamm *A. baumannii* ATCC 19606<sup>T</sup> weist ebenfalls Banden bei 3000 Bp, 2000 Bp, 1500 Bp, ca. 550 Bp und 300 Bp auf, jedoch anstelle der 900 Bp-Bande zeigte er eine Bande bei ca. 800 Bp. Da die Isolate 1566/10, 1819/10, 1906/10, 2428/10 und 2459/10 insgesamt eine große Ähnlichkeit zu *A. baumannii* ATCC 19606<sup>T</sup> aufwiesen, lag eine Zugehörigkeit zur Art *A. baumannii* nahe. Zur weiteren Bestätigung dieser Annahme wurde zusätzlich eine REP-PCR durchgeführt.

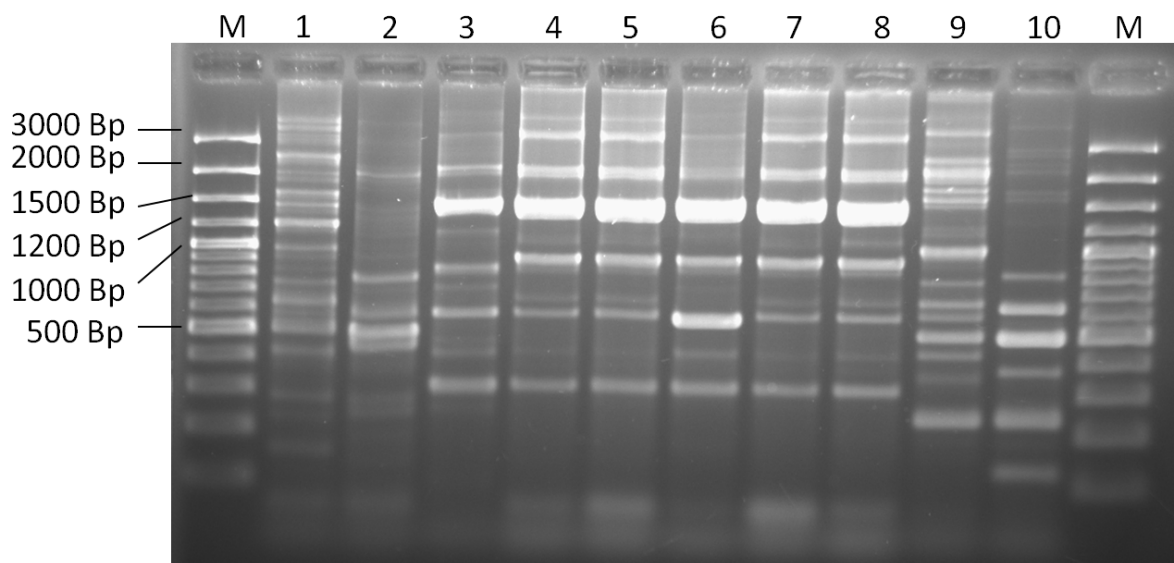


**Abbildung 8:** Genomische Fingerabdrücke nach ERIC-PCR der *Acinetobacter*-Isolate und deren Referenzen. *A. lwoffii* DSM 2403<sup>T</sup> (1), 114 (2), *A. baumannii* ATCC 19606<sup>T</sup> (3), 1566/10 (4), 1819/10 (5), 1906/10 (6), 2428/10 (7), 2459/10 (8), *A. johnsonii* DSM 6963<sup>T</sup> (9), *A. haemolyticus* ATCC 17906<sup>T</sup> (10), GeneRuler™ 100 Bp Plus DNA Ladder (M).

Die genomischen Fingerabdrücke nach der REP-PCR (Abb. 9) zeigen eine Doppelbande bei  $\geq 3000$  Bp, die sowohl bei *A. baumannii* ATCC 19606<sup>T</sup> als auch bei den Isolaten 1566/10, 1819/10, 1906/10, 2428/10 und 2459/10 zu erkennen ist. Während die Bande bei  $\leq 2000$  Bp

bei *A. baumannii* ATCC 19606<sup>T</sup> schwächer ausfällt als bei den eben genannten Isolaten, zeigt die Bande bei ca. 800 Bp eine stärkere Ausprägung. Das auffälligste Unterscheidungsmerkmal zwischen *A. baumannii* ATCC 19606<sup>T</sup> und den Isolaten war das Vorhandensein bzw. Fehlen der Bande bei ca. 350 Bp.

Insgesamt stehen die Ergebnisse der beiden genomischen Fingerabdruckanalysen in ausgezeichneter Übereinstimmung miteinander (Abb. 8 und 9). Beide Ansätze zeigten, dass sich das Isolat 1906/10 von den anderen Isolaten etwas unterscheidet. Aufgrund der identischen genomischen Fingerabdrücke der Isolate 1566/10, 1819/10, 2428/10 und 2459/10 lässt sich die Schlussfolgerung ziehen, dass es sich bei diesen möglicherweise um klonale Verwandte handelt. Die Ergebnisse zeigen deutlich, dass es sich bei den fünf Isolaten, trotz der geringen Unterschiede, mit größter Wahrscheinlichkeit um *A. baumannii* Stämme handelt.

Das Isolat 114 und *A. haemolyticus* ATCC 17906<sup>T</sup> weisen in ihrem Muster der REP-Fingerabdrücke sehr wenige Banden auf. *A. haemolyticus* ATCC 17906<sup>T</sup> besitzt drei schwache Banden zwischen 2000 Bp und 3000 Bp und eine markante Bande bei 1500 Bp, während das Isolat 114 eine markante Bande bei 1200 Bp und 2500 Bp, sowie zwei schwache Banden bei 1000 Bp und 900 Bp aufweist. Die Gemeinsamkeiten der beiden Stämme beruht auf der geringen Anzahl der Banden. Die geringen Ähnlichkeiten der ERIC-Fingerabdrücke konnten nicht reproduziert werden. Das Isolat 114 zeigt in den REP-Fingerabdrücken auch keine Gemeinsamkeit zu den anderen Referenzstämmen.

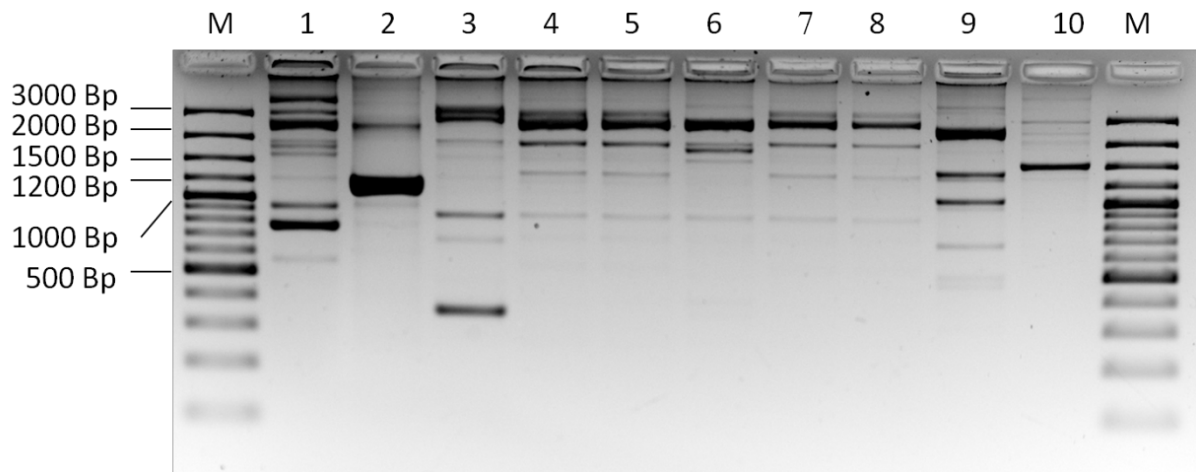


**Abbildung 9:** Genomische Fingerabdrücke nach REP-PCR der *Acinetobacter*-Isolate und den Referenzstämmen. *A. lwoffii* DSM 2403<sup>T</sup> (1), 114 (2), *A. baumannii* ATCC 19606<sup>T</sup> (3), 1566/10 (4), 1819/10 (5), 1906/10 (6), 2428/10 (7), 2459/10 (8), *A. johnsonii* DSM 6963<sup>T</sup> (9), *A. haemolyticus* ATCC 17906<sup>T</sup> (10), GeneRuler™ 100 Bp Plus DNA Ladder (M).

Aufgrund der Analyse der polaren Lipide, den molekularbiologischen Daten (ERIC- und REP-PCR) als auch dem diagnostischen Identifikationssystem API 20 NE handelt es sich bei den Isolaten 1566/10 1819/10, 1906/10, 2428/10 und 2459/10 höchstwahrscheinlich um *Acinetobacter baumannii* Stämme. Die Analysedaten, des aus Deutschland bereitgestellten Isolats 114, unterstützen die Annahme, dass es sich um eine neue *Acinetobacter* Art handelt. Das Muster der polaren Lipide konnte keinem der Referenzstämmen zugeordnet werden. Die Untersuchung der genomischen Fingerabdrücke zeigte, dass das Isolat ebenfalls keine Ähnlichkeiten zu den Referenzstämmen aufweist, weshalb anzunehmen ist, dass es sich bei dem Isolat um eine neue *Acinetobacter*-Art handelt.

Die Analyse der Intergenischen Sequenz des Isolats 4284/11 diente der Erklärung, zu welchem Genus das Isolat gehört (siehe 3.1.2). Wie die Genera *Luteimonas* und *Lysobacter* gehört auch der Genus *Acinetobacter* zur Klasse der *Gammaproteobacteria*. Daher wurde eine PCR mit den ITS Primern von *Luteimonas/Lysobacter* für die *Acinetobacter*-Isolate als auch deren Referenzstämmen durchgeführt.

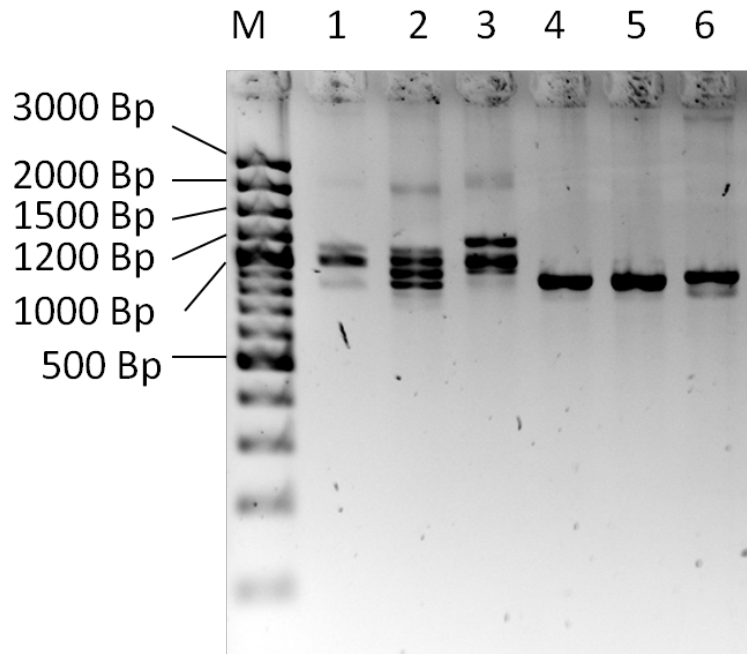


**Abbildung 10:** Ergebnisse der Amplifikation der Intergenischen Sequenz (ITS). Untersuchte Stämme: *A. johnsonii* DSM 6963<sup>T</sup> (1), *A. haemolyticus* ATCC 17906<sup>T</sup> (2), *A. lwoffii* DSM 2403<sup>T</sup> (3), 1566/10 (4), *A. baumannii* ATCC 19606<sup>T</sup> (5), 114 (6), GeneRuler™ 100 Bp Plus DNA Ladder (M).

Die dem Primer entsprechende Sequenz Lut\_ITSf wurde bei *A. baumannii* ATCC 17978 und *A. lwoffii* WJ10621 im Genom mehrfach gefunden, während die entsprechende Sequenz des Primers Lut\_ITSr bei *A. baumannii* ATCC 17978 an Position 3724 (E. coli Nummerierung, (Brosius *et al.*, 1981) die Base Cytosin und bei *A. lwoffii* WJ10621 an dieser Position ein Thymin aufweist. Die Visualisierung der PCR zeigte unterschiedliche Bandenmuster für die verschiedenen *Acinetobacter* Arten.

Die Primersequenzen flankieren bei *A. baumannii* ATCC 17978 (NCBI Referenz: NC\_009085.1) fünf 900 Bp lange ITS Regionen, weshalb nur eine dicke Bande bei 900 Bp zu erwarten gewesen wäre. Tatsächlich wurde für *A. baumannii* ATCC 19606<sup>T</sup> eine dicke Bande bei ca. 900 Bp und eine schwache bei ca. 800 Bp detektiert. Auch das Isolat 1566/10 zeigte dasselbe Bandenmuster, was in ausgezeichneter Übereinstimmung mit seiner Identifizierung als *A. baumannii* steht.

*A. lwoffii* WJ10621 (NCBI Referenz: NZ\_CM001194.1) besitzt vier ITS Regionen, welche unterschiedlich lang sind (980 Bp, 998 Bp, 1009 Bp bzw. 1010 Bp) und daher bei ca. 1000 Bp

als dicke Bande visualisiert werden sollte. Zusätzlich wurden die Sequenzen entsprechend des Primerpaars ein fünftes Mal im Genom gefunden mit 1413 Bp, allerdings scheint dieses PCR-Produkt keine ITS Region zu enthalten. Anhand der hinterlegten Sequenz (NCBI Referenz: NZ\_CM001194.1) bindet weder der Primer Lut\_ITSf im 16S rRNA kodierenden Gen, welches in dem Sequenzabschnitt nicht identifiziert wurde, noch bindet der Primer Lut\_ITSr im 23S rRNA kodierenden Gen. In der Regel sind in der ITS Region zwei tRNA kodierenden Gene, tRNA-Ile und tRNA-Ala, enthalten. Diese liegen ebenfalls außerhalb der zu amplifizierenden Sequenz. Für den Stamm *A. Iwoffii* DSM 2403<sup>T</sup> konnten 2 Banden um 1000 Bp gefunden werden. Zusätzlich dazu wurde eine weitere Bande bei ungefähr 1200 Bp und eine schwache Doppelbande bei ca. 2000 Bp detektiert. Diese Ergebnisse stimmen nicht mit den Daten des Stamms *A. Iwoffii* WJ10621 überein.

Für die Stämme *A. johnsonii* DSM 6963<sup>T</sup> und *A. haemolyticus* ATCC 17906<sup>T</sup> wurden zum aktuellen Zeitpunkt keine vollständigen Genome gefunden.

Während *A. johnsonii* DSM 6963<sup>T</sup> eine markante Bande bei 1000 Bp und je eine schwache bei 2000 Bp, 1100 Bp und 850 Bp aufweist, zeigt das Bandenmuster von *A. haemolyticus* ATCC 17906<sup>T</sup> drei dicke Banden bei 100 Bp, 900 Bp und 850 Bp sowie je eine schwache bei 2000 Bp und 800 Bp.

Die von Dolzani *et al.* (1995) untersuchten *Acinetobacter* Arten (*A. baumannii* ATCC 19606<sup>T</sup>, *A. johnsonii* ATCC 17909<sup>T</sup>, *A. Iwoffii* ATCC 15309<sup>T</sup> und *A. haemolyticus* ATCC 17906<sup>T</sup>) zeigten bezüglich der Intergenischen Region ein charakteristisches und konserviertes Bandenprofil. Die Arten *A. baumannii* ATCC 19606<sup>T</sup> und *A. johnsonii* ATCC 17909<sup>T</sup> zeigen eine markante Bande bei ca. 1000 Bp bzw. 1200 Bp, während die Arten *A. Iwoffii* ATCC 15309<sup>T</sup> und *A. haemolyticus* ATCC 17906<sup>T</sup> je zwei weniger markante Banden bei 1100-1200 Bp bzw. 950 und 1050 Bp besitzen. Die unterschiedliche Größe der Banden in dieser Arbeit und denen von der Arbeitsgruppe Dolzani ist mit der unterschiedlichen Wahl der Primer zu erklären. Dolzani *et al.* (1995) wählte ein Primerpaar, welches größere PCR-Produkte generierte.

Die Analyseergebnisse von Chang *et al.* (2005) bestätigen zunächst die Arbeit von Dolzani *et al.* (1995). Die Arbeitsgruppe von Chang identifizierte ebenfalls nach einer Gelelektrophorese je eine Bande für *A. baumannii* BCRC 10591<sup>T</sup> und *A. johnsonii* BCRC 14853<sup>T</sup> sowie je zwei Banden für die Stämme *A. Iwoffii* BCRC 14855<sup>T</sup> und *A. haemolyticus* BCRC 14852<sup>T</sup>. Die anschließende Sequenzierung der PCR Produkte erbrachte jedoch für *A. johnsonii* BCRC

14853<sup>T</sup> zwei Amplikons mit einem Unterschied von 13 Bp. Für die Stämme *A. Iwoffii* BCRC 14855<sup>T</sup> und *A. haemolyticus* BCRC 14852<sup>T</sup> konnten ebenfalls mehrere PCR Produkte identifiziert werden.

Beide Arbeitsgruppen zeigten, dass die Länge der ITS Region im Genus *Acinetobacter* heterogen ist und jede Art ein spezifisches Bandenprofil aufweist. Dies konnte auch in dieser Arbeit festgestellt werden. Die vermehrte Anzahl an Banden ist womöglich auf die Wahl der Primer als auch auf die Amplifikationsbedingungen zurückzuführen, die sich zu den beiden Arbeitsgruppen unterscheiden haben.

## 5 Resümee

### 5.1 Zusammenfassung

Im Zuge dieser Arbeit wurden verschiedene Bakterienisolate der Begleitflora von veterinärmedizinischen Proben molekularbiologisch und chemotaxonomisch untersucht und anschließend klassifiziert. Für die molekularbiologische Analyse wurde das Haushaltsgen *groEL* und die Intergenische Region sequenziert bzw. die Fingerabdruckanalysen (ERIC- und REP-PCR) durchgeführt. Zu den taxonomischen Methoden zählen die Analyse der respiratorischen Chinone, die Analyse der polaren Lipide und der Polyamine.

Das Isolat 4284/11 konnte als neue Art des Genus *Luteimonas* klassifiziert werden. Das Chinonsystem weist Ubichinon 8 als Hauptkomponente auf. Die Hauptkomponenten der polaren Lipidmuster sind Diphosphatidylglycerol und Phosphatidylethanolamin. Spermidin und Spermin dominieren das Polyaminmuster. Die Analyse des Haushaltsgens und der intergenischen Region zeigte, dass das Isolat 4284/11 dem Genus *Luteimonas* angehört. Im Laufe der Untersuchungen konnte festgestellt werden, dass der Referenzstamm *Luteimonas aestuarii* DSM 19680<sup>T</sup> genauer analysiert und dessen Position in der Taxonomie überprüft werden sollte.

Die Zuordnung des Isolats 1438/12 zum Genus *Chryseobacterium* gilt als abgesichert. Das Isolat 1438/12 besitzt ausschließlich Menachinon 6 und als Hauptkomponente des polaren Lipidmuster Phosphatidylethanolamin. Die Hauptkomponente der Polyamine ist *sym*-Homospermidin.

Das Isolat 2776/12 konnte aufgrund der Sequenzierung des 16S rRNA kodierenden Gens dem Genus *Streptococcus* zugeordnet werden. Die Hauptkomponenten der polaren Lipide sind Diphosphatidylglycerol, die Glykolipide GL1 bis GL6 sowie die Phosphoglykolipide PGL1 und PGL2 und bei den Polyaminen bilden Spermidin und Spermin die Hauptkomponenten.

Die 16S rRNA Genanalyse der Isolate 2385/12 und 2673/12 sowie die chemotaxonomischen Methoden liefern Beweise dafür, dass es sich um neue Arten des Genus *Corynebacterium* handelt. Die Ergebnisse wurden zusammengefasst und als Manuskript in diese Arbeit eingegliedert, in Zusammenarbeit mit den in der Autorenliste aufgeführten Personen.

Die Isolate 1566/10, 1819/10, 1906/10, 2428/10 und 2459/10 konnten mittels chemotaxonomischer als auch aufgrund der Fingerabdruckanalysen dem Stamm *Acinetobacter baumannii* zugeordnet werden. Das Chinonsystem besteht hauptsächlich aus

Ubichinon 9. Alle fünf Isolate weisen als Lipidhauptkomponenten Phosphatidylethanolamin, Phosphatidylglycerol und ein nicht identifiziertes Aminophospholipid auf. Die ERIC- und REP-Fingerabdruckanalysen zeigten ausgezeichnete Übereinstimmungen auch zu dem Referenzstamm *A. baumannii* ATCC 19606<sup>T</sup>.

Das Isolat 114, ebenfalls dem Genus *Acinetobacter* zugehörig, konnte als neue Art klassifiziert werden. Ubichinon 9 ist die Hauptkomponente des Chinonsystems. Das Muster der polaren Lipide wird dominiert von Diphosphatidylglycerol, Phosphatidylethanolamin, Phosphatidylserin und ein nicht identifiziertes Aminophospholipid. Hauptsächlich konnte beim Isolat 114 1,3-Diaminopropan detektiert werden. Die Ergebnisse wurden der Arbeitsgruppe von Gottfried Wilharm (Robert Koch Institut, Wernigerode) übermittelt und sollen publiziert werden.

Alle *Acinetobacter* Isolate zeigen ein unterschiedliches Bandenmuster nach der Amplifizierung der Intergenischen Region, welches zur Identifizierung der *Acinetobacter* Stämme eingesetzt werden kann.

## 5.2 Abstract

In the course of this work different isolates of bacteria from clinical specimens of diseased animals were analysed by molecular biological and chemotaxonomic methods and finally classified. The molecular biological analysis comprised the sequencing of the housekeeping gene *groEL* as well as the intergenic region and the fingerprint analysis (ERIC- und REP-PCR) respectively. Methods like the analysis of the respiratory quinones, the polar lipids or the analysis of the polyamines are belonging to the chemotaxonomic methods.

Strain 4284/11 was identified as a new species of the genus *Luteimonas*. The quinone system composed of ubiquinone 8 as major compound. The major compounds of the polar lipid profile were diphosphatidylglycerole and phosphatidylethanolamine. For the polyamine pattern there were spermidine and spermine the major compounds. The analysis of the housekeeping gene and the intergenic spacer showed that strain 4284/11 belongs to the genus *Luteimonas*. During the investigation it was found that the reference strain *Luteimonas aestuarii* DSM 19680<sup>T</sup> should be analyzed in more detail and to review its position in the taxonomy.

The classification of the isolate 1438/12 to the genus *Chryseobacterium* is well established. The isolate 1438/12 composed menaquinone 6 only and the major polar lipids was phosphatidylethanolamine. Sym-Homospermidine dominated the polyamine pattern.

Because of the 16S rRNA gene sequencing the isolate 2776/12 was identified as a new species of the genus *Streptococcus*. The polar lipid profile composed of the major compounds diphosphatidylglycerole, the glycolipids GL1 to GL6 as well as the phosphoglycolipids PGL1 and PGL2. The major compounds of the polyamine pattern were spermidine and spermine.

The 16S rRNA gene analysis of the strains 2385/12 and 2673/12 as well as chemotaxonomic methods provide evidence that both strains were new species of the genus *Corynebacterium*. The results were summarized and incorporated as a manuscript in this work, in cooperation with the persons listed in the author list.

Because auf chemotaxonomic methods as well as fingerprint analysis the isolates 1566/10, 1819/10, 1906/10, 2428/10 and 2459/10 were identified as species belonging to *Acinetobacter baumannii*. The quinone system consists of ubiquinone 9 as major compound. All five strains showed phosphatidylethanolamine, phosphatidylglycerole and an unidentified aminophospholipid as major compound. The ERIC- and REP - fingerprinting analysis showed excellent matches to the reference strain *A. baumannii* ATCC 19606<sup>T</sup>.

Isolate 114, belonging as well to the genus *Acinetobacter*, was identified as a new species. Major compounds of the quinone system and the polar lipids respectively, were ubiquinone 9 and diphosphatidylglycerole, phosphatidylethanolamine, phosphatidylserine and an unidentified aminophospholipid. The polyamine 1,3-Diaminopropan was predominantly. The results were submitted to the Working Group by Gottfried Wilharm (Robert Koch Institute, Wernigerode, Germany) and will be published.

All *Acinetobacter* isolates showed a different band pattern of the amplification of the intergenic region, which could be used for identification of *Acinetobacter* strains.

## 6 Anhang

### 6.1 *groEL* Gensequenzen und translatierte Proteinsequenzen

Isolat 4284/11

CTCAAGTCCATGTCCAAGCCCACCGCCGACGACAAGGCCATCGCCCAGGTCGGCACCATCTCGGCCAA  
CTCGGACGAATCGATCGGCAACATCATCGCCGATGCGATGAAGAAGGTCGGCAAGGAAGGCGTGATCA  
CCGTCGAGGAAGGCTCGGGCCTGGACAACGAGCTGGACGTCGTCGAAGGCATGCAGTTCGACCGCGGC  
TACCTATCGCCGTACTTCGTCAACAACCAGCAGAGCATGAGCGCCGAGCTGGAAGACCCGTTTCATCCT  
GCTGCACGACAAGAAGATCTCCAATGTGCGCGATCTGCTGCCGGTGCTCGAAGGCGTGGCCAAGGCCG  
GCAAGCCGCTGCTCATCGTGGCCGAAGAAGTCGAGGGCGAGGCGCTGGCGACACTGGTGGTCAACACC  
ATCCGCGGCATCGTCAAGGTTTTCGCGGGTGAAGGCGCCGGGCTTCGGCGATCGTCGCAAGGCGATGCT  
GGAGGACATGGCGATCCTGACCGGCGGCACCGTGATCTCCGAGGAAGTCGGCCTCTCGCTTGAGAAGG  
CCACCATTAAGGATCTCGGCCGCGCCAAGAAAGTGCAGGTCTCGAAGGAGAACACCACCATCATCGAT  
GGCGCAGGCGACACCGCCGGTATCGAGGCGCGCATCAAGCAGATCAAGGCGCAGATCGAGGAAACCTC  
CTCCGATTACGACCGCGAGAAGCTGCAAGAGCGCGTGGCCAAGCTGGCCGGTGGCGTGGCCGTCATCA  
AGGTCGGCGCGGCGACGGAAGTCGAAATGAAGGAAAAGAAGGCGCGCGTCGAAGACGCCCTGCAC

LKSMKPTADDKAIAQVGTISANSDESIGNIIADAMKKVGKEGVITVEEGSGLDNELDVVEGMQFDRG  
YLSPLYFVNNQSMSAELEDPFILLHDKKISNVRDLLPVLEGVAKAGKPLLIIVAEVEGEALATLVVNT  
IRGIVKVCAPKAPGFGDRRKAMLEDMAILTGGTVISEEVGLSLEKATIKDLGRAKKVQVSKENTTIID  
GAGDTAGIEARIKQIKAQIEETSSDYDREKLQERVAKLAGGVAVIKVGAATEVEMKEKKARVEDALH

*L. aestaurii* DSM 19680<sup>T</sup>

CTCAAGAACCTGTCCAAGCCCACCGCCGACGACAAGGCGATCGCCCAGGTCGGCACCATCTCGGCCAA  
CAGCGACGAGTCGATCGGCACCATCATCGCCGACGCGATGAAGAAGGTCGGCAAGGAAGGCGTGATCA  
CGGTCGAGGAAGGCTCGGGCCTTGAGAACGAGCTGGACGTGGTCGAGGGCATGCAGTTCGACCGCGGC  
TACCTCTCGCCGTACTTCATCAACAACCAGCAGTCGATGTGCGGCGACCTGGACGATCCCTTCATCCT  
GCTGCACGACAAGAAGATCTCGAACGTCCGCGACCTGTTGCCCGTGCTGGAAGGCGTGGCCAAGGCGG  
GCAAGCCGCTGCTGATCGTCGCCGAGGAAGTCGAAGGCGAAGCGCTGGCGACCCTGGTGGTCAACACC  
ATCCGCGGCATCGTCAAGGTCTGCGCCGTCAAGGCCCGGGGCTTCGGCGACCGTCGCAAGGCGATGCT  
GGAAGACATGGCCGTGCTGACCGGCGGCACCGTGATCTCCGAGGAAGTCGGCCTGTGCTCGAGAAGG  
CGACCATCGCCGACCTCGGCCGCGCCAAGAAGATCCAGGTCTCCAAGGAGAACACCACGATCATCGAC  
GGCGCCGCGGAGACCACTGGCATCGAAGCCCGCATCAAGCAGATCAAGGCGCAGATCGAAGAGACTTC  
CTCGGACTACGACCGCGAGAAGCTGCAGGAGCGCGTGGCCAAGCTGGCCGGCGGCGTGCGGTGATCA  
AGGTCGGTGCCTCGACCGAGATCGAGATGAAGGAAAAGAAGGCGCGCGTCGAAGACGCCCTGCAC

LKNLSKPTADDKAIAQVGTISANSDESIGTIIADAMKKVGKEGVITVEEGSGLENELDVVEGMQFDRG  
YLSPLYFINNQSMSADLDDPFILLHDKKISNVRDLLPVLEGVAKAGKPLLIIVAEVEGEALATLVVNT

IRGIVKVCAPKAPGFGDRRKAMLEDMAVLTGGTVISEEVGLSLEKATIADLGRAKKIQVSKENTTIID  
GAGETTIEARIKQIKAQIEETSSDYDREKLQERVAKLAGGVAVIKVGASTEIEMKEKKARVEDALH

*L. mephitis* CIP 107229<sup>T</sup>

CTCAAGAACCTGTCCAAGCCCACCGCCGACGACAAGGCGATCGCCCAGGTCGGCACGATCTCGGCCAA  
CTCCGACGAGTCCATCGGCACGATCATCGCCGACGCGATGAAGAAGGTCGGCAAGGAAGGCGTGATCA  
CCGTCGAGGAAGGCTCGGGCCTGGACAACGAACCTCGACGTCGTCGAGGGCATGCAGTTCGACCGCGGC  
TACCTGTCGCCGTACTTCATCAACAACCAGCAGTCGATGTCGGCCGAGCTGGACGATCCGTTTCATCCT  
GCTGCACGACAAGAAGATCTCCAACGTGCGCGACCTGCTGCCCGTCCTCGAGGGCGTCGCCAAGGCCG  
GCAAGCCGCTGCTGATCGTCGAGAGGAAGTCGAAGGCGAGGCGCTGGCGACCCTGGTGGTCAACACC  
ATCCGCGGCATAGTCAAGGTCTGCGCCGTGAAGGCCCGGGCTTCGGCGACCGTCGCAAGGCGATGCT  
CGAGGACATGGCGATCCTCACCGGCGGCACCGTGATCTCCGAGGAAGTGGGCCTGTGCTCGAGAAGG  
CGACGATCAAGGACCTCGGCCGCGCAAGAAGATCCAGGTCTCGAAGGAAAACACCACCATCATCGAC  
GGCGCCGGCGAGACCGGTGGCATCGAAGGCCGCATCAAGCAGATCAAGGCGCAGATCGAGGAGACCTC  
TTCCGACTACGACCGCGAGAAGCTGCAGGAGCGCTGGCCAAGCTGGCCGGCGGCGTGGCGGTGATCA  
AGGTCGGCGCCTCGACCGAGATCGAAATGAAGGAAAAGAAGGCCCGCGCTCGAAGACGCCCTGCAC

LKNLSKPTADDKAIAQVGTISANSDESIGTIIADAMKKVGKEGVITVEEGSGLDNELDVVEGMQFDRG  
YLSYPFINNQSMSAELDDPFILLHDKKISNVRDLLPVLEGVAKAGKPLLIIVAEVEGEALATLVVNT  
IRGIVKVCAPKAPGFGDRRKAMLEDMAILTGGTVISEEVGLSLEKATIKDLGRAKKIQVSKENTTIID  
GAGETGGIEGRIKQIKAQIEETSSDYDREKLQERVAKLAGGVAVIKVGASTEIEMKEKKARVEDALH

*L. enzymogenes* subs. *enzymogenes* LMG 8762<sup>T</sup>

CTGAAGAAGCTGTCCAAGCCGTCCTCGACCTCGAAGGAAATCGCCCAGGTCGGCGCGATCTCGGCCAA  
CTCGGACCACAACATCGGCGACCTGATCGCTCAGGCGATGGACAAGGTCGGCAAGGAAGGCGTGATCA  
CCGTCGAAGACGGCTCGGGCCTGGAGAACGAACCTCGACGTCGTCGAGGGCATGCAGTTCGACCGCGGC  
TACCTGTCGCCGTACTTCATCAACAACCAGCAGTCGATGCAGGCCGAGCTGGACGATCCGTTTCATCCT  
GCTGCACGACAAGAAGATCTCCAACGTGCGCGACCTGCTGCCGGTGCTGGAAGGCGTCGCCAAGGCCG  
GCAAGCCGCTGCTGATCGTCGCCGAGGAAGTCGAAGGCGAAGCGCTGGCGACCCTGGTGGTCAACACC  
ATCCGCGGCATCGTCAAGGTCTGCGCCGTCAAGGCTCCGGGCTTCGGCGACCGTCGCAAGGCGATGCT  
GGAAGACATGGCCGTGCTGACCGGCGGCACCGTGATCTCCGAGGAAGTCGGCCTGCAGCTCGAGAAGG  
CCACCATCAAGGATCTGGGCCGCGCCAAGAAGATCCAGGTCTCGAAGGAAAACACCACGATCATCGAC  
GGCGCCGGCGAGAGCTCGGGCATCGAAGCGCGCATCAAGCAGATCAAGGCGCAGATCGAAGAGACCTC  
GTCGGACTACGACCGCGAGAAGCTGCAGGAGCGCTGGCCAAGCTGGCCGGCGGCGTTCGCGGTGATCA  
AGGTCGGCGCTGCGACCGAAGTCGAGATGAAGGAAAAGAAGGCCCGCGCTCGAAGACGCGCTGCAC

LKKLSKPSSTSKEIAQVGAISANS DHNIGDLIAQAMDKVGKEGVITVEDGSGLLENELDVVEGMQFDRG  
YLSYPFINNQSMQAEELDDPFILLHDKKISNVRDLLPVLEGVAKAGKPLLIIVAEVEGEALATLVVNT  
IRGIVKVCAPKAPGFGDRRKAMLEDMAVLTGGTVISEEVGLQLEKATIKDLGRAKKIQVSKENTTIID  
GAGESSGIEARIKQIKAQIEETSSDYDREKLQERVAKLAGGVAVIKVGAATEVEMKEKKARVEDALH

### 6.1.1 ClustalW Multiple Alignment 1.4 der groEL DNA-Sequenzen

```

          10      20      30      40      50      60
4284_11    ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
L. aesturarii CTCAAGTCCATGTCCAAGCCCACCGCCGACGACAAGGCCATCGCCCAGGTCGGCACCATC
L. mephitis  CTCAAGAACCTGTCCAAGCCCACCGCCGACGACAAGGCCGATCGCCCAGGTCGGCACGATC
L. enzymogenes CTGAAGAAGCTGTCCAAGCCGTCTCGACCTCGAAGGAAATCGCCCAGGTCGGCGCGATC

          70      80      90     100     110     120
4284_11    ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
L. aesturarii TCGGCCAACTCGGACGAATCGATCGGCAACATCATCGCCGATGCGATGAAGAAGGTCGGC
L. mephitis  TCGGCCAACAGCGACGAGTCGATCGGCACCATCATCGCCGACGCGATGAAGAAGGTCGGC
L. enzymogenes TCGGCCAACTCCGACGAGTCCATCGGCACGATCATCGCCGACGCGATGAAGAAGGTCGGC

          130     140     150     160     170     180
4284_11    ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
L. aesturarii AAGGAAGGCGTGATCACCGTCGAGGAAGGCTCGGGCCTGGACAACGAGCTGGACGTCGTC
L. mephitis  AAGGAAGGCGTGATCACCGTCGAGGAAGGCTCGGGCCTGGACAACGAACTCGACGTCGTC
L. enzymogenes AAGGAAGGCGTGATCACCGTCGAAGACGGCTCGGGCCTGGAGAACGAACTCGACGTCGTC

          190     200     210     220     230     240
4284_11    ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
L. aesturarii GAAGGCATGCAGTTCGACCGCGGCTACCTATCGCCGTACTTCGTCAACAACAGCAGAGC
L. mephitis  GAGGGCATGCAGTTCGACCGCGGCTACCTCTCGCCGTACTTCATCAACAACAGCAGTCG
L. enzymogenes GAGGGCATGCAGTTCGACCGCGGCTACCTGTGCGCCGTACTTCATCAACAACAGCAGTCG

          250     260     270     280     290     300
4284_11    ...|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
L. aesturarii ATGAGCGCCGAGCTGGAAGACCCGTTTCATCCTGCTGCACGACAAGAAGATCTCCAATGTG
L. mephitis  ATGTGCGCGGACCTGGACGATCCCTTCATCCTGCTGCACGACAAGAAGATCTCGAACGTC
L. enzymogenes ATGTGCGCCGAGCTGGACGATCCGTTTCATCCTGCTGCACGACAAGAAGATCTCCAACGTC

          310     320     330     340     350     360
4284_11    ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
L. aesturarii CGCGATCTGCTGCCGGTGCTCGAAGGCGTGGCCAAGGCCGGCAAGCCGCTGCTCATCGTG
L. mephitis  CGCGACCTGTTGCCCGTGCTGGAAGGCGTGGCCAAGGCCGGGCAAGCCGCTGCTGATCGTC
L. enzymogenes CGCGACCTGCTGCCGGTGCTGGAAGGCGTCGCCAAGGCCGGGCAAGCCGCTGCTGATCGTC

          370     380     390     400     410     420
4284_11    ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
L. aesturarii GCCGAAGAAGTCGAGGGCGAGGCGCTGGCGACACTGGTGGTCAACACCATCCGCGGCATC
L. mephitis  GCCGAGGAAGTCGAAGGCGAAGCGCTGGCGACCCTGGTGGTCAACACCATCCGCGGCATC
L. enzymogenes GCAGAGGAAGTCGAAGGCGAGGCGCTGGCGACCCTGGTGGTCAACACCATCCGCGGCATA

          430     440     450     460     470     480
4284_11    ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
L. aesturarii GTCAAGGTTTGCGCGGTGAAGGCGCCGGGCTTCGGCGATCGTCGAAGGCGATGCTGGAG
L. mephitis  GTCAAGGTCTGCGCCGTGAAGGCCCCGGGCTTCGGCGACCGTCGAAGGCGATGCTCGAG
L. enzymogenes GTCAAGGTCTGCGCCGTGAAGGCTCCGGGCTTCGGCGACCGTCGAAGGCGATGCTGGAA

```

|                |                                                                |     |     |     |     |     |
|----------------|----------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|
|                | 490                                                            | 500 | 510 | 520 | 530 | 540 |
|                | .... .... .... .... .... .... .... .... .... .... .... ....    |     |     |     |     |     |
| 4284_11        | GACATGGCGATCCTGACCGGCGGCACCGTGATCTCCGAGGAAGTCGGCCTCTCGCTTGAG   |     |     |     |     |     |
| L. aesturarii  | GACATGGCCGTGCTGACCGGCGGCACCGTGATCTCCGAGGAAGTCGGCCTGTCTGCTCGAG  |     |     |     |     |     |
| L. mephitis    | GACATGGCGATCCTCACC GGCGGCACCGTGATCTCCGAGGAAGTGGGCCTGTCTGCTCGAG |     |     |     |     |     |
| L. enzymogenes | GACATGGCCGTGCTGACCGGCGGCACCGTGATCTCCGAGGAAGTCGGCCTGCAGCTCGAG   |     |     |     |     |     |
|                | 550                                                            | 560 | 570 | 580 | 590 | 600 |
|                | .... .... .... .... .... .... .... .... .... .... .... ....    |     |     |     |     |     |
| 4284_11        | AAGGCCACCATTAAAGGATCTCGGCCGCGCCAAGAAAGTGCAGGTCTCGAAGGAGAACACC  |     |     |     |     |     |
| L. aesturarii  | AAGGCGACCATCGCCGACCTCGGCCGCGCCAAGAAGATCCAGGTCTCCAAGGAGAACACC   |     |     |     |     |     |
| L. mephitis    | AAGGCGACGATCAAGGACCTCGGCCGCGCAAGAAGATCCAGGTCTCGAAGGAAAAACACC   |     |     |     |     |     |
| L. enzymogenes | AAGGCCACCATCAAGGATCTGGGCCGCGCCAAGAAGATCCAGGTCTCGAAGGAAAAACACC  |     |     |     |     |     |
|                | 610                                                            | 620 | 630 | 640 | 650 | 660 |
|                | .... .... .... .... .... .... .... .... .... .... .... ....    |     |     |     |     |     |
| 4284_11        | ACCATCATCGATGGCGCAGGCGACACCGCCGGTATCGAGGCGCGCATCAAGCAGATCAAG   |     |     |     |     |     |
| L. aesturarii  | ACGATCATCGACGGCGCCGGCGAGACCACTGGCATCGAAGCCCGCATCAAGCAGATCAAG   |     |     |     |     |     |
| L. mephitis    | ACCATCATCGACGGCGCCGGCGAGACCGGTGGCATCGAAGGCCCGCATCAAGCAGATCAAG  |     |     |     |     |     |
| L. enzymogenes | ACGATCATCGACGGCGCCGGCGAGAGCTCGGGCATCGAAGCGCGCATCAAGCAGATCAAG   |     |     |     |     |     |
|                | 670                                                            | 680 | 690 | 700 | 710 | 720 |
|                | .... .... .... .... .... .... .... .... .... .... .... ....    |     |     |     |     |     |
| 4284_11        | GCGCAGATCGAGGAAACCTCCTCCGATTACGACCGCGAGAAGCTGCAAGAGCGCGTGGCC   |     |     |     |     |     |
| L. aesturarii  | GCGCAGATCGAAGAGACTTCTCGGACTACGACCGCGAGAAGCTGCAGGAGCGCGTGGCC    |     |     |     |     |     |
| L. mephitis    | GCGCAGATCGAGGAGACCTCTTCCGACTACGACCGCGAGAAGCTGCAGGAGCGCGTGGCC   |     |     |     |     |     |
| L. enzymogenes | GCGCAGATCGAAGAGACCTCGTCCGACTACGACCGCGAGAAGCTGCAGGAGCGCGTGGCC   |     |     |     |     |     |
|                | 730                                                            | 740 | 750 | 760 | 770 | 780 |
|                | .... .... .... .... .... .... .... .... .... .... .... ....    |     |     |     |     |     |
| 4284_11        | AAGCTGGCCGGTGGCGTGGCGGTATCAAGGTGCGCGCGGCGACGGAAGTCGAAATGAAG    |     |     |     |     |     |
| L. aesturarii  | AAGCTGGCCGGCGGCGTGGCGGTATCAAGGTGCGTGCCTCGACCGAGATCGAGATGAAG    |     |     |     |     |     |
| L. mephitis    | AAGCTGGCCGGCGGCGTGGCGGTATCAAGGTGCGCGCCTCGACCGAGATCGAAATGAAG    |     |     |     |     |     |
| L. enzymogenes | AAGCTGGCCGGCGGCGTTGCGGTATCAAGGTGCGCGCTGCGACCGAAGTCGAGATGAAG    |     |     |     |     |     |
|                | 790                                                            | 800 | 810 |     |     |     |
|                | .... .... .... .... .... .... .... ....                        |     |     |     |     |     |
| 4284_11        | GAAAAGAAGGCGCGCGTCAAGACGCCCTGCAC                               |     |     |     |     |     |
| L. aesturarii  | GAAAAGAAGGCGCGCGTCAAGACGCCCTGCAC                               |     |     |     |     |     |
| L. mephitis    | GAAAAGAAGGCCCGCGTCAAGACGCCCTGCAC                               |     |     |     |     |     |
| L. enzymogenes | GAAAAGAAGGCCCGCGTCAAGACGCGCTGCAC                               |     |     |     |     |     |

## 6.1.2 ClustalW Multiple Alignment 1.4 der GroEL Proteinsequenz

|                |                                                               |    |    |     |     |     |
|----------------|---------------------------------------------------------------|----|----|-----|-----|-----|
|                | 10                                                            | 20 | 30 | 40  | 50  | 60  |
|                | .... .... .... .... .... .... .... .... .... .... .... ....   |    |    |     |     |     |
| 4284_11        | LKSMKPTADDKAIQVGTISANSDESIGNIIADAMKKVGKEGVITVEEGSGLDNELDVV    |    |    |     |     |     |
| L. aestuarii   | LKNLSKPTADDKAIQVGTISANSDESIGTIIADAMKKVGKEGVITVEEGSGLLENELDVV  |    |    |     |     |     |
| L. mephitis    | LKNLSKPTADDKAIQVGTISANSDESIGTIIADAMKKVGKEGVITVEEGSGLDNELDVV   |    |    |     |     |     |
| L. enzymogenes | LKKLSKPSSTSKEIAQVGAIANS DHNIGDLIAQAMDKVGKEGVITVEDGSGLLENELDVV |    |    |     |     |     |
|                | 70                                                            | 80 | 90 | 100 | 110 | 120 |
|                | .... .... .... .... .... .... .... .... .... .... .... ....   |    |    |     |     |     |
| 4284_11        | EGMQFDRGYLSPYFVNNQQSMSAELEDPFILLHDKKISNVRDLLPVLEGVAKAGKPLLIV  |    |    |     |     |     |
| L. aestuarii   | EGMQFDRGYLSPYFINNQQSMSADLDDPFILLHDKKISNVRDLLPVLEGVAKAGKPLLIV  |    |    |     |     |     |
| L. mephitis    | EGMQFDRGYLSPYFINNQQSMSAELEDDPFILLHDKKISNVRDLLPVLEGVAKAGKPLLIV |    |    |     |     |     |
| L. enzymogenes | EGMQFDRGYLSPYFINNQQSMQAELEDDPFILLHDKKISNVRDLLPVLEGVAKAGKPLLIV |    |    |     |     |     |

|                       |                                                             |     |     |     |     |     |
|-----------------------|-------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|
|                       | 130                                                         | 140 | 150 | 160 | 170 | 180 |
|                       | .... .... .... .... .... .... .... .... .... .... .... .... |     |     |     |     |     |
| 4284_11               | AEEVEGEALATLVVNTIRGIVKVCAPGFGDRRKAMLEDMAILTGGTVISEEVGLSLE   |     |     |     |     |     |
| <i>L. aestuarii</i>   | AEEVEGEALATLVVNTIRGIVKVCAPGFGDRRKAMLEDMAVLTGGTVISEEVGLSLE   |     |     |     |     |     |
| <i>L. mephitis</i>    | AEEVEGEALATLVVNTIRGIVKVCAPGFGDRRKAMLEDMAILTGGTVISEEVGLSLE   |     |     |     |     |     |
| <i>L. enzymogenes</i> | AEEVEGEALATLVVNTIRGIVKVCAPGFGDRRKAMLEDMAVLTGGTVISEEVGLQLE   |     |     |     |     |     |

|                       |                                                              |     |     |     |     |     |
|-----------------------|--------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|
|                       | 190                                                          | 200 | 210 | 220 | 230 | 240 |
|                       | .... .... .... .... .... .... .... .... .... .... .... ....  |     |     |     |     |     |
| 4284_11               | KATIKDLGRAKKVQVSKENTTIIDGAGDTAGIEARIKQIKAQIEETSSDYDREKLQERVA |     |     |     |     |     |
| <i>L. aestuarii</i>   | KATIADLGRAKKIQVSKENTTIIDGAGETTIEARIKQIKAQIEETSSDYDREKLQERVA  |     |     |     |     |     |
| <i>L. mephitis</i>    | KATIKDLGRAKKIQVSKENTTIIDGAGETGGIEGRIKQIKAQIEETSSDYDREKLQERVA |     |     |     |     |     |
| <i>L. enzymogenes</i> | KATIKDLGRAKKIQVSKENTTIIDGAGESSGIEARIKQIKAQIEETSSDYDREKLQERVA |     |     |     |     |     |

|                       |                                    |     |     |
|-----------------------|------------------------------------|-----|-----|
|                       | 250                                | 260 | 270 |
|                       | .... .... .... .... .... .... .... |     |     |
| 4284_11               | KLAGGVAVIKVGAATEVEMKEKKARVEDALH    |     |     |
| <i>L. aestuarii</i>   | KLAGGVAVIKVGASTEIEMKEKKARVEDALH    |     |     |
| <i>L. mephitis</i>    | KLAGGVAVIKVGASTEIEMKEKKARVEDALH    |     |     |
| <i>L. enzymogenes</i> | KLAGGVAVIKVGAATEVEMKEKKARVEDALH    |     |     |

## 6.2 16S/23S Intergenische Sequenzen

Isolat 4284/11

AGAGACACGACAGAGCAAGTCTGTCAGGCGTCCGCACAAGTCACCTGCATCCAGAGAAGTCCCCTTGC  
CGAAAGGCAAGCCTTTGGGGCCTTAGCTCAGCTGGGAGAGCACCTGCTTTGCAAGCAGGGGGTCGTCCG  
GTTTCGATCCCGACAGGCTCCACCACTGGCAAGCCGCGACACGTTGGGTCTGTAGCTCAGGTGGTTAGA  
GCGCACCCCTGATAAGGGTGAGGCCGGTGTTTCGAGTCCTCCAGACCCACCACTTCTTTTTTAGAAC  
TGGATGACATGCGTACACGAAGATCAGATTGAAACATTGCAACGTTGAGGTTTCGAGTGTGTTCTATGA  
AAACCGGAATGTAGCGAGCGTTTGAGATGAAGAATACTCAAGACGTGTCGTTGAGGCTAAGCGGGTG  
CAGTGATGCACCTAACATTTGAATGTCGTTGATATTCGACAAGGTTGTATGACTTCGAGGCGACTTGA  
GGTTATAT

*L. aestuarii* DSM 19680<sup>T</sup>

AGAGACTAAAAGACAGCTAATTGCCTGTCAGGCGTCCGCACAAGTAACCTGCACATTAATCCGTACAA  
CAGACTGGGTCTGTAGCTCAGGTGGTTAGAGCGCACCCCTGATAAGGGTGAGGCCGGTGGTTTCGAGTC  
CTCCAGACCCACCACTATTCGGGGCCTTAGCTCAGCTGGGAGAGCACCTGCTTTGCAAGCAGGGGGT  
CGTCGGTTTCGATCCCGACAGGCTCCACCACTGTTGTATTGGATTGATTGCGCACACACATGAAGATTT  
GAAGCAATGCGGCGCTGAAGCCGGCATTGTGTTCTTTGAAAACAAGGGAAGTAGCGAGCGTTTGAGAC  
GATTGTCCAAAACGTGTCGTAAGAGGCTAAGGCGAAGTATCGAGAGATACTTTTATTTGATGTTGTGCG  
TTGATATTCGCGTCCGGGATTTGTACCCCTGGACATCACGATGACCCGAGGCGACTTGGGGTTATAT

*L. mephitis* CIP 107229<sup>T</sup>

AGAGACCAAAGACAGGCTTGAAGCTTGTGAGGCGTCCGCACAAGTGACCTGCATCCAGGAGTTCCAC  
GGCATAAGCCGGGGGACCGACCCCTTTTGGGGCCATAGCTCAGCTGGGAGAGCACCTGCTTTGCAAGC  
AGGGGGTCGTCGGTTCGATCCCGACTGGCTCCACCATCTGGCAATGAAGCATTGGGTCTGTAGCTCAG  
GTGGTTAGAGCGCACCCCTGATAAGGGTGAGGCCGGTGGTTCGAGTCCTCCCAGACCCACCATCCTGG  
ATGTCGACAGCGCACACAAAGATCAAGTTGGGTTTCGGTACTGTGGCCGGGACCCTGCTCTTTGAAAA  
AATGGGACGTAGCGAGCGTTTGAGACGAATATCCAAACGTGTCGTAGAGGCTAAGGCGAGGTGTCGAG  
AGGCACCTTTATTGAAGTTGTAGTTCGTTGTGTTGCAACGACATTAACCTCCGAGGCGACTTGGGGTT  
ATAT

*L. enzymogenes* subs. *enzymogenes* LMG 8762<sup>T</sup>

AGAGACTAAAGACAGCAAATTGCTCGTCGGACGTCCGCACAAGTGACCTGCACTCAGAGTTCCTCGTT  
GCCACAGGGCGGCGTGGGACCGTCCCGTTTCGATGGGGCTTTAGCTCAGCTGGGAGAGCACCTGCTTT  
GCAAGCAGGGGGTCGTCGGTTCGATCCCGACAAGCTCCACCACCAGCCAGTCAGTCAGTACATTGGGT  
CTGTAGCTCAGGTGGTTAGAGCGCACCCCTGATAAGGGTGAGGCCGGTGGTTCGAGTCCTCCCAGACC  
CACCACCCTGACGGACGAGCGGTAAACTCTGAATTGCGCACACACATAAAGATTTGAAGCATCGAAG  
GCGTTGAGGCCTACGGTGCGTTCTTTGAAACTGGAATGTAGCGAGCGTTTTGAGACGGAATGTCCAT  
GACGTGTCGTAGAGGCTAAGGCGAGTGTGCGAGAGACACTTTATTAATTGAGTCGTTATATTCGAGTTC  
GGGCTTTGTACCCCGAACCAATGACTCCGAGGCAACTTGGGGTTATAT

### 6.2.1 ClustaW Multiple Alignment 1.4 16S/23S Intergenischen Sequenzen

|                       | 10                                                           | 20                                                          | 30 | 40 | 50 | 60 |
|-----------------------|--------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|----|----|----|----|
| 4284_11               | .... .... .... .... .... .... .... .... .... .... .... ....  | AGAGAC-ACGACAGAG-CAAGTC--TGTCAGGCGTCCGCACAAGTCACCTGCATCCAGA |    |    |    |    |
| <i>L. aestuarii</i>   | AGAGACTAAAAGACAG-CTAATTGCCTGTCAGGCGTCCGCACAAGTAACCTGCACATTAA |                                                             |    |    |    |    |
| <i>L. mephitis</i>    | AGAGACCAAAGACAGGCTTGAAGCTTGTGAGGCGTCCGCACAAGTGACCTGCATCCAGG  |                                                             |    |    |    |    |
| <i>L. enzymogenes</i> | AGAGAC-TAAAGACAG-CAAATTGCTCGTCGGACGTCCGCACAAGTGACCTGCACTCAGA |                                                             |    |    |    |    |

|                       | 70                                                           | 80                                                     | 90 | 100 | 110 | 120 |
|-----------------------|--------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|----|-----|-----|-----|
| 4284_11               | .... .... .... .... .... .... .... .... .... .... .... ....  | GAAGTCCCCTTGCCGAAAGGC-----AAGCCTT-----TGGGGCCTTAGCTCAG |    |     |     |     |
| <i>L. aestuarii</i>   | -----TCCGTACAACAGAC-----TGGGTCTGTAGCTCAG                     |                                                        |    |     |     |     |
| <i>L. mephitis</i>    | AGT--TCCACGGCATAAGCCGG--GGGACCGACCCCTTT--TGGGGCCATAGCTCAG    |                                                        |    |     |     |     |
| <i>L. enzymogenes</i> | GTT-CCTCGTTGCCACAGGGCGGCGTGGGACCGTCCCGTTTCGATGGGGCTTTAGCTCAG |                                                        |    |     |     |     |

|                       | 130                                                          | 140                                                          | 150 | 160 | 170 | 180 |
|-----------------------|--------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|-----|
| 4284_11               | .... .... .... .... .... .... .... .... .... .... .... ....  | CTGGG-AGAGCACCTGCTTTGCAAGCAGGGGGTCGTCGGTTCGATCCCGACAGGCTCCAC |     |     |     |     |
| <i>L. aestuarii</i>   | GTGGTTAGAGCGCACCCCTGATAAGGGTGAGGCCGGTGGTTCGAGTCCTCCCAGACCCAC |                                                              |     |     |     |     |
| <i>L. mephitis</i>    | CTGGG-AGAGCACCTGCTTTGCAAGCAGGGGGTCGTCGGTTCGATCCCGACTGGCTCCAC |                                                              |     |     |     |     |
| <i>L. enzymogenes</i> | CTGGG-AGAGCACCTGCTTTGCAAGCAGGGGGTCGTCGGTTCGATCCCGACAAGCTCCAC |                                                              |     |     |     |     |

|                |                                                                         |     |     |     |     |     |
|----------------|-------------------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|
|                | 190                                                                     | 200 | 210 | 220 | 230 | 240 |
| 4284_11        | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... |     |     |     |     |     |
| L. aestuarii   | CACTGGCAAGCCG--CGACACGTTGGGTCTGTAGCTCAGGTGGTTAGAGCGCACCCCTGA            |     |     |     |     |     |
| L. mephitis    | CACTAT-----TCGGGGCCTTAGCTCAGCTGGG-AGAGCACCTGCTTTG                       |     |     |     |     |     |
| L. enzymogenes | CATCTGGCAAT----GAAGCATTGGGTCTGTAGCTCAGGTGGTTAGAGCGCACCCCTGA             |     |     |     |     |     |
|                | 250                                                                     | 260 | 270 | 280 | 290 | 300 |
| 4284_11        | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... |     |     |     |     |     |
| L. aestuarii   | TAAGGGTGAGGCCGGTGGTTCGAGTCCTCCCAGACCCACCACTTCTTTTTTAGAACTGGA            |     |     |     |     |     |
| L. mephitis    | CAAGCAGGGGGTCGTCGGTTCGATCCCGACAGGCTCCACCAGTGTTGTATTGGATTGATT            |     |     |     |     |     |
| L. enzymogenes | TAAGGGTGAGGCCGGTGGTTCGAGTCCTCCCAGACCCACCATCCTGGATGTCGA----CA            |     |     |     |     |     |
|                | 310                                                                     | 320 | 330 | 340 | 350 | 360 |
| 4284_11        | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... |     |     |     |     |     |
| L. aestuarii   | -----TGACATGCGTACACGAAGATCAGATTGAAACATTTCGAA-CGTTGAGGTTTCG-AG           |     |     |     |     |     |
| L. mephitis    | -----GCGCACACACATGAAGATTTGAAGCAATGCGG-CGCTGAAGCCGGCAT                   |     |     |     |     |     |
| L. enzymogenes | -----GCGCACACAAAGATCAAGTTGG-GTTTCGGTA---CTGTGGCCGGGAC                   |     |     |     |     |     |
|                | 370                                                                     | 380 | 390 | 400 | 410 | 420 |
| 4284_11        | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... |     |     |     |     |     |
| L. aestuarii   | TGTGTTCTATGAAAAC-CGGAATGTAGCGAGCGTTT-GAGATGAAGAATACTCAAGACGT            |     |     |     |     |     |
| L. mephitis    | TGTGTTCTTTGAAAACAAGGGAAGTAGCGAGCGTTT-GAGACG---ATTGTCCAAAACGT            |     |     |     |     |     |
| L. enzymogenes | CCTGCTCTTTGAAAAAATGGGACGTAGCGAGCGTTT-GAGACG---AATATCCAA-ACGT            |     |     |     |     |     |
|                | 430                                                                     | 440 | 450 | 460 | 470 | 480 |
| 4284_11        | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... |     |     |     |     |     |
| L. aestuarii   | GTCGTT-GAGGCTAAGGCGGG-TGCAGTGATGCACCTA-AC---ATTTGAATGTCGTTGA            |     |     |     |     |     |
| L. mephitis    | GTCGTAAGAGGCTAAGGCGAAGTATCGAGAGATACTTTTATTTGATGT---TGTCGTTGA            |     |     |     |     |     |
| L. enzymogenes | GTCGTA-GAGGCTAAGGCGAGGTGTCGAGAGGCACCTTTATTGAAGTTGTAGTTCGTT-G            |     |     |     |     |     |
|                | 490                                                                     | 500 | 510 | 520 | 530 | 540 |
| 4284_11        | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... |     |     |     |     |     |
| L. aestuarii   | TATTCGA--CAAGGTTGT-----ATGACTTCGAGGCGACTTGAGGTT                         |     |     |     |     |     |
| L. mephitis    | TATTCGCGTCCGGGATTTGTACCCCTGGACATCACGATGACCCCGAGGCGACTTGGGGTT            |     |     |     |     |     |
| L. enzymogenes | TGTTTCG---CAACGACAT-----TAACTCCGAGGCGACTTGGGGTT                         |     |     |     |     |     |
|                | .....                                                                   |     |     |     |     |     |
| 4284_11        | ATAT                                                                    |     |     |     |     |     |
| L. aestuarii   | ATAT                                                                    |     |     |     |     |     |
| L. mephitis    | ATAT                                                                    |     |     |     |     |     |
| L. enzymogenes | ATAT                                                                    |     |     |     |     |     |

## 7 Literaturverzeichnis

**Adams, M. K., Hendrickson, D. A., Rao, S., Popelka, F. O. & Bolte, D. (2010).** The Bacteria Isolated from the Skin of 20 Horses at a Veterinary Teaching Hospital. *Journal of Equine Veterinary Science* **30**, S. 687-695.

**Altenburger, P., Kämpfer, P., Akimov, V., Lubitz, W. & Busse, H.-J. (1997).** Polyamine Distribution in Actinomycetes with Group B Peptidoglycan and Species of the Genera *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, and *Tsukamurella*. *International Journal of Bacteriology* **47**, S. 270-277.

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

**Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D. J. (1997).** Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**, S. 3389-3402.

**Auling, G., Pilz, F., Busse, H.-J., Karrasch, S., Streichan, M. & Schön, G. (1991).** Analysis of the polyphosphate-accumulating microflora in phosphorus-eliminating, anaerobic-aerobic activated sludge systems by using diaminopropane as a biomarker for rapid estimation of *Acinetobacter* spp. *Applied and Environmental Microbiology* **12**, S. 3585-3592.

**Bernard, K. A. & Funke, G. (2012).** Genus I. *Corynebacterium* Lehmann and Neumann 1896, 350<sup>AL</sup> emend. Bernard, Wiebe Burdz, Reimer, Ng, Singh, Schindle and Pacheco 2010, 877. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (2. Auflage, vol 5 (The Actinobacteria), part A, S. 245-289. Edited by M. Goodfellow, P. Kämpfer, H.-J. Busse, M. E. Trujillo, K.-i. Suzuki, W. Ludwig & W. B. Whitman. New York: Springer

**Brosius, J., Dull, T. J., Sleeter, D. D. & Noller, H. F. (1981).** Gene Organization and Primary Structure of a Ribosomal RNA Operon from *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology* **148**, S. 107-127.

**Brötz, H. & Sahl, H. G. (2000).** New insights into the mechanism of action of lantibiotics - diverse biological effects by binding to the same molecular target. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **46**, S. 1-6.

**Busse, H.-J. & Auling, G. (1988).** Polyamine pattern as a chemotaxonomic marker within the *Proteobacteria*. *Systematic and Applied Microbiology* **11**, S. 1-8.

**Busse, H.-J., Denner, E. B. & Lubitz, W. (1996).** Classification and identification of bacteria: current approaches to an old problem. Overview of methods used in bacterial systematics. *Journal of Biotechnology* **47**, S. 3- 38.

**Chang, H. C., Wei, Y. F., Dijkshoorn, L., Vaneechoutte, M., Tang, C. T. & Chang, T. C. (2005).** Species-Level Identification of Isolates of the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* Complex by Sequence Analysis of the 16S-23S rRNA Gene Spacer Region. *Journal of Clinical Microbiology* **43**, S. 1632-1639.

**Clapper, W. E. & Meade, G. H. (1963).** Normal flora of the nose, throat, and lower intestine of dogs. *Journal of Bacteriology* **85**, S. 643-648.

**Clinical and Laboratory Standards Institute. (2012).** *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty-Second Informational Supplement* (Bde. M100-S22, replaces M100-S21). Wayne, PA : National Committee for Clinical Laboratory Standards.

**Cogen, A. L., Nizet, V. & Gallo, R. L. (2008).** Skin microbiota: a source fo disease or defence? *British Journal of Dermatology* **158**, S. 442-455.

**Cohn, F. (1872).** Grundzüge einer neuen natürlichen Anordnung der kryptogamischen Pflanzen. *Jahres-Bericht der Schlesischen Gesellschaft für vaterländische Cultur* **49**, S. 82-89.

**Collins, M. D. & Jones, D. (1981).** Distribution of isoprenoid quinone structural types in bacteria an their taxonomic implications. *Microbiology and Molecular Biology Review* **45**, S. 316-354.

**Collins, M. D., Goodfellow, M. & Minnikin, D. E. (1982).** A Survey of the Structure of Mycolic Acids in *Corynebacterium* and Related Taxa. *Journal of General Microbiology* **128**, S. 129-149.

**Devaud, M., Kayser, F. H. & Bächli, B. (1982).** Transposon-Mediated Multiple Antibiotic Resistance in *Acinetobacter* Strains. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **22**, S. 323-329.

**Dolzani, L., Tonin, E., Lagatolla, C., Prandin, L. & Monti-Bragadin, C. (1995).** Identification of *Acinetobacter* Isolates in the *A. calcoaceticus*-*A. baumannii* Complex by Restriction Analysis

of the 16S-23S rRNA Intergenic Spacer Sequences. *Journal of Clinical Microbiology* **33**, S. 1108-1113.

**Durham, D. R. & Kloos, W. E. (1978).** Comparative Study of the Total Cellular Fatty Acids of *Staphylococcus* Species of Human Origin. *International Journal of Systematic Bacteriology* **28**, S. 223-228.

**Euzéby, J. P. (1997).** List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature: a folder available on the Internet. *International Journal of Systematic Bacteriology* **47**, S. 590-592.

**Falbe, J. & Regitz, M. (1998).** Römpf Lexikon – Chemie (10. Auflage, Band 4 M-Pk), S. 2744. Georg Thieme Verlag: Stuttgart

**Fernández-Garayzábal, J. F., Egidio, R., Vela, A. L., Briones, V., Collins, M. D., Mateos, A., Hutson, R. A., Domínguez, L. & Goyache, J. (2003).** Isoaltion of *Corynebacterium falsenii* and description of *Corynebacterium aquilae* sp. nov., from eagles. *International Journal of Systematic an Evolutionary Microbiology* **53**, S. 1135-1138.

**Fernández-Garayzábal, J. F., Vela, A. I., Egidio, R., Huston, R. A., Lanzarot, M. P., Fernández-García, M. & Collins, M. D. (2004).** *Corynebacterium ciconiae* sp. nov., isolated from the trachea of black storks (*Ciconia nigra*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **54**, S. 2191-2195.

**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. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **50**, S. 273-282.

**Fischer, W. (1977).** The Polar Lipids of Group B *Streptococci* - I. Glycosylated Diposphatidylglycerol, a novel Glycophospholipid. *Biochimica et Biophysica Acta* **487**, S. 74-88.

**Fischer, W. & Arneth-Seifert, D. (1998).** D-Alanylcardiolipin, a Major Component of the Unique Lipid Pattern of *Vagococcus fluvialis*. *Journal of Bacteriology* **180**, S. 2950-2957.

- Fox, G. E., Pechman, K. R. & Woese, C. R. (1977).** Comparative Cataloging of 16s Ribosomal Ribonucleic Acid: Molecular Approach to Procaryotic Systematics. *International Journal of Systematic Bacteriology* **27**, S. 44-57.
- Fox, G. E., Stackebrandt, E., Hespell, R. B., Gibson, J., Maniloff, J., Dyer, T. A., Wolfe, R. S., Balch, W. E., Tanner, R. S., Magrum, L. J., Zablen, L. B., Blakemore R, Gupta, R., Bonen, L., Lewis, B. J., Stahl, D. A., Luehrsen, K. R., Chen, K. N. & Woese, C. R. (1980).** The Phylogeny of Prokaryotes. *Science* **209**, S. 457-463.
- Frischmann, A (2011).** Untersuchung der Klassifizierung der bakteriellen Begleitflora in veterinärmedizinischen Proben. *Diplomarbeit*.
- Frischmann, A., Knoll, A., Hilbert, F., Zasada, A. A., Kämpfer, P. & Busse, H.-J. (2012).** *Corynebacterium epidermidicanis* sp. nov., isolated from skin of a dog. *International Journal of Systematic and Evolutional Microbiology* **62**, S. 2194–2200.
- Gauteraux, M. D., Deitsch, E. A. & Berg, R. D. (1994).** Bacterial Translocation from the Gastrointestinal Tract to Various Segments of the Mesenteric Lymph Node Complex. *Infection and Immunity* **62**, S. 2132-2134.
- Gevers, D., Cohan, F. M., Lawrence, J. G., Spratt, B. G., Coenye, T., Feil, E. J., Stackebrandt, E., Van der Peer, Y., Vandamme, P., Thompson, F. L. & Swings J. (2005).** Re-evaluating prokaryotic species. *Nature Reviews Microbiology* **3**, S. 733-739.
- Gonçalves, E. R. & Rosato, Y. B. (2002).** Phylogenetic analysis of *Xanthomonas* species based upon 16S-23S rDNA intergenic spacer sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **52**, S. 355-361.
- Guarner, F. & Malagelada, J.-R. (2003).** Gut flora in health and disease. *The Lancet* **361**, S. 512-519.
- Hall, T. A. (1999).** A User-friendly Biological Sequence Alignment Editor and Analysis Program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* **41**, S. 95-98.
- Hamana, K., & Matsuzaki, S. (1992).** Polyamines As A Chemotaxonomic Marker in Bacterial Systematics. *Critical Reviews in Microbiology* **18**, S. 261-283.

**Hecht, N. B., Bleyman, M. & Woese, C. R. (1968).** The Formation of 5S Ribosomal Ribonucleic Acid in *Bacillus subtilis* by Posttranscriptional Modification. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **59**, S. 1278-1283.

**Honeycutt, R. J., Sobral, B. W. & McClelland, M. (1995).** tRNA intergenic spacers reveal polymorphisms diagnostic for *Xanthomona albilineans*. *Microbiology* **141**, S. 3229-3239.

**Hulton, C. S., Higgins, C. F. & Sharp, P. M. (1991).** ERIC sequence: a novel family of repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and other enterobacteria. *Molecular Microbiology* **5**, S. 825-834.

**Kämpfer, P., Vanechoutte, M., Lodders, N., De Baere, T., Avesani, V., Janssens, M., Busse, H.-J. & Wauters, G. (2009).** Description of *Chryseobacterium anthropi* sp. nov. to accommodate clinical isolates biochemically similar to *Kaistella koreensis* and *Chryseobacterium haifense*, proposal to reclassify *Kaistella koreensis* as *Chryseobacterium koreense* comb. nov. and emended. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **59**, S. 2421-2428.

**Kim, O. S., Cho, Y. J., Lee, K., Yoon, S. H., Kim, M., Na, H., Park, S. C., Jeon, Y. S., Lee, J. H., Yi, H., Won, S. & Chun, J. (2012).** Introducing EzTaxon-e: a prokaryotic 16S rRNA Gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **62**, S. 716–721.

**Kneifel, H., Stetter, K. O., Andreesen, J. R., Wiegel, J., König, H. & Schoberth, S. M. (1986).** Distribution of Polyamines in Representative Species of Archaeobacteria. *Systematic and Applied Microbiology* **7**, S. 241-245.

**Latscha, H., Kazmaier, U. & Klein, H. (2008).** Lipide (S. 436-440). In *Organische Chemie* (6. Auflage). Springer.

**Lechevalier, M. R. & Moss, C. W. (1977).** Lipids in Bacterial Taxonomy - A Taxonomist's View. *Critical Reviews in Microbiology* **5**, S. 109-210.

**Lee, H.-J. & Lee, S.-S. (2010).** *Acinetobacter kyonggiensis* sp. nov., a  $\beta$ -glucosidase-producing bacterium, isolated from sewage treatment plant. *The Journal of Microbiology* **48**, S. 754-759.

**Leewenhoek, A. (1684).** An Abstract of a Letter from Mr. Anthony Leewenhoeck at Delft, Dated Sep. 17. 1683. Containing Some Microscopical Observations, Substance Call'd Worms in the Nose, the Cuticula Consisting of Scales. *Philosophical Transactions* **14**, S. 568-574.

**Loncaric, I., Oberlerchner, T., Heissenberger, B. & Moosbeckhofer, R. (2009).** Phenotypic and genotypic diversity among strains of *Aureobasidium pullulans* in comparison with related species. *Antonie van Leeuwenhoek* **95**, S. 165-178.

**Lu, P., Zheng, L.-Q., Sun, J.-J., Liu, H.-M., Li, S.-P., Hong, Q. & Li, W.-J. (2012).** *Burkholderia zhejiangensis* sp. nov., a methyl-parathion-degrading bacterium isolated from a wastewater-treatment system. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **62**, S. 1337-1341.

**Madigan, M. T. & Martinko, J. M. (2006).** *Brock Mikrobiologie* (11 Auflage.). Pearson Studium.

**Malhotra, J., Anand, S., Jindal, S., Rajagopal, R. & Lal, R. (2012).** *Acinetobacter indicus* sp. nov., isolated from a hexachlorocyclohexane dump site. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **62**, S. 2883–2890.

**Mannheim, W., Stieler, W., Wolf, G. & Zabel, R. (1978).** Taxonomic Significance of Respiratory Quinones and Fumarate Respiration in *Actinobacillus* and *Pasteurella*. *International Journal of Systematic Bacteriology* **28**, S. 7-13.

**Mattner, F., Bange, F.-C., Meyer, E., Seifert, H., Wichelhaus, T. A. & Chaberny, I. F. (2012).** Prävention der Ausbreitung von multiresistenten gramnegativen Erregern: Vorschläge eines Experten-Workshops der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie. *Deutsche Ärzteblatt* **109**, S. 39-45.

**McFarland, L. V. (2000).** Normal flora: diversity and function. *Microbial Ecology in Health and Disease* **12**, S. 193-207.

**Meyer, K. (2002).** Farbenfrohe Antioxidantien Carotinoide – Bedeutung und technische Synthesen. *Chemie in unserer Zeit* **36**, S. 178-192.

- Moore, R. M., Schneider, R. K., Kowalski, J., Bramlage, L. R., Mecklenburg, L. M. & Kohn, C. W. (1992).** Antimicrobial susceptibility of bacterial isolates from 233 horses with musculoskeletal infections during 1979-1989. *Equine Veterinary Journal* **24**, S. 450-456.
- Myers, E. W. & Miller, W. (1988).** Optimal alignments in linear space. *Comput Appl Biosci* **4**, S. 11-17.
- Nahaie, M. R., Goodfellow, M., Minnikin, D. E. & Hajek, V. (1984).** Polar Lipid and Isoprenoid Quinone Composition in the Classification of *Staphylococcus*. *Journal of General Microbiology* **130**, S. 2427-2437.
- Pearson, W. R. & Lipman, D. J. (1988).** Improved tools for biological sequence comparison. *Proceeding of the National Academy of Science* **85**, S. 2444-2448.
- Perry, R. D. & Fetherston, J. D. (1997).** *Yersinia pestis*--etiologic agent of plague. *Clinical Microbiology Reviews* **10**, S. 35-66.
- Qian, G., Hu, B., Jiang, Y. & Liu, F. (2009).** Identification and Characterization of *Lysobacter enzymogenes* as a Biological Control Agent Against Some Fungal Pathogens. *Agricultural Science in China* **8**, S. 68-75.
- Quatrini, P., Scaglione, G., Cardinale, M., Caradonna, F. & Puglia, A. M. (2002).** *Bradyrhizobium* sp. nodulating the Mediterranean shrub Spanish broom (*Spartium junceum* L.). *Journal of Applied Microbiology* **92**, S. 13-21.
- Roh, S. W., Kim, K.-H., Nam, Y.-D., Chang, H.-W., Kim, M.-S., Yoon, J.-H., Oh, H.-M. & Bae, J.-W. (2008).** *Luteimonas aestuarii* sp. nov., Isolated from Tidal Flat Sediment. *The Journal of Microbiology* **5**, S. 525-529.
- Saddler, G. S., & Bradbury, J. F. (2005).** Order III. *Xanthomonadales* ord. nov. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (2. Ausgabe, vol. 2 - The Proteobacteria), part B, S. 63. Edited by D. J. Brenner, N. R. Krieg & J. T. Staley. New York: Springer.
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. (1977).** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **72**, S. 5463-5467.

**Savini, V., Favaro, M., Fontana, C., Consilvio, N. P., Manna, A., Talia, M., Catavitello, C., Balbinot, A., Febbo, F., Di Bonaventura, G., Di Giuseppe, N. & D'Antonio, D. (2008).** A case of pharyngitis caused by *Streptococcus pneumoniae*. *Journal of Medical Microbiology* **57**, S. 674-675.

**Schaal, K. P. & Kühn, J. (1994).** Mikrobiologische und serologische Untersuchungsverfahren (S. 127-128). In *Lehrbuch der Medizinischen Mikrobiologie*. Edited by H. Brandis, H. J. Eggers, W. Köhler & G. P. Pulverer. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart - New York.

**Schleifer, K.-H. (2009).** Classification of Bacteria and Archaea: Past, present and future. *Systematic and Applied Microbiology* **32**, S. 533-542.

**Schleifer, K.-H. & Kilpper-Bälz, R. (1984).** Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the Genus *Enterococcus* nom. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* **34**, S. 31-34.

**Schmidt, K. H. (1996).** Gärungssessig. In *Lebensmitteltechnologie* (S. 332) Edited by R. Heiss. Springer Verlag.

**Schmidt, V. S., Mayr, R., Wenning, M., Glöckner, J., Busse, H.-J. & Scherer, S. (2009).** *Bavariicoccus seileri* gen. nov., sp. nov., isolated from the surface and smear water of German red smear soft cheese. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **59**, S. 2437-2443.

**Schroeter, A & Käsbohrer A. (2010).** Deutsche Antibiotika-Resistenzsituation in der Lebensmittelkette - DARLink. *BfR-Wissenschaft* 12/2010

**Schwarz, S., Silley, P., Simjee, S., Woodford, N., van Duikeren, E., Johnson, A. P., & Gaastra, W. (2010).** Editorial: Assessing the antimicrobial susceptibility of bacteria obtained from animals. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy Advance* **65**, S. 601-604.

**Segal, H., Thomas, R. & Elisha, B. G. (2003).** Characterization of class 1 integron resistance gene cassette and the identification of a novel IS-like element in *Acinetobacter baumannii*. *Plasmid* **49**, S. 169-178.

- Sheu, S.-Y., Chou, J.-H., Bontemps, C., Elliott, G. N., Gross, E., Bueno dos Reis Jr, F., Melkonian, R., Moulin, L., James, E. K., Sprent, J. I., Young, J. P. W. & Chen, W.-M. (2013).** *Burkholderia diazotrophica* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa* spp. *Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **63**, S. 435-441.
- Sheu, S.-Y., Chou, J.-H., Bontemps, C., Elliott, G. N., Gross, E., James, E. K., Sprent, J. I., Young, J. P. W. & Chen, W.-M. (2012).** *Burkholderia symbiotica* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa* spp. native to north-east Brazil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **62**, S. 2272-2278.
- Steinbrugger, R. (1998).** Charakterisierung von Bakterien aus einem mittelalterlichen Wandgemälden. *Diplomarbeit*.
- Tabor, C. W., & Tabor, H. (1985).** Polyamines in Microorganisms. *Microbiological Reviews* **49**, S. 81-99.
- Tindall, B. (1990).** Lipid composition of *Halobacterium lacusprofundi*. *FEMS Microbiology Letters* **66**, S. 199-202.
- Truman, R. W. & Krahenbuhl, J. L. (2001).** Viable *M. leprae* as a Research Reagent. *International Journal of Leprosy* **69**, S. 1-12.
- Unger, S. (1991).** Die Bedeutung von Pro- und Präbiotika in der Ernährung. *Journal für Ernährungsmedizin* **1**, S. 22-29.
- Urakami, T., Ito-Yoshida, C., Araki, H., Kijima, T., Suzuki, K.-I. & Komagata, K. (1994).** Transfer of *Pseudomonas plantarii* and *Pseudomonas glumae* to *Burkholderia* as *Burkholderia* spp. and Description of *Burkholderia vandii* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* **44**, S. 235-245.
- Vandamme, P., Bernardet, J.-F., Segers, P., Kersters, K. & Holmes, B. (1994).** New Perspectives in the Classification of the *Flavobacteria*: Description of *Chryseobacterium* gen. nov., *Bergeyella* gen. nov., and *Empedobacter* norn. rev. *International Journal of Systematic Bacteriology* **44**, S. 827-831.

**Versalovic, J., Koeuth, T. & Lupski, J. (1991).** Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Research* **19**, S. 6823-6831.

**Vonberg, R.-P., Wolter, A., Chaberny, I. F., Kola, A., Ziesing, S., Suerbaum, S., & Gastmeier, P. (2008).** Epidemiology of multi-drug-resistant Gram-negative bacteria: Data from an university hospital over 36-month period. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* **211**, S. 251-257.

**Watson, J. D. & Crick, F. H. (1953).** Molecular Structure of Nucleic Acids. *Nature* **171**, S. 737-738.

**Welch, D. F. (1991).** Application of Cellular Fatty Acids Analysis. *Clinical Microbiology Reviews* **4**, S. 422-438.

**Whiley, R. A. & Hardie, J. M. (2009).** Genus I *Streptococcus* Rosenbach 1884, 22AL. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (2. Auflage, vol 3 (The Firmicutes), S. 655-711. Edited by P. De Vos, G. M. Garrity, D. Jones, N. R. Krieg, W. Ludwig, F. A. Rainey, K.-H. Schleifer & W. B. Whitman. New York: Springer

**Whiley, R., Russell, R., Hardie, J. & Beighton, D. (1988).** *Streptococcus downei* sp. nov. for Strains Previously Described as *Streptococcus mutans* Serotype h. *International Journal of Systematic Bacteriology* **38**, S. 25-29.

**Wieser, M. & Busse, H.-J. (2000).** Rapid identification of *Staphylococcus epidermidis*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **50**, S. 1087-1093.

**Woese, C. R. (1968).** Primary Structure Homology within the 23S Ribosomal RNA. *Nature* **220**, S. 923.

**Woese, C. R. & Fox, G. E. (1977).** Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: The primary kingdoms. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **74**, S. 5088-5090.

**Woese, C. R., Fox, G. E., Zablen, L., Uchida, T., Bonen, L., Pechman, K., Lewis B. J. & Stahl, D. (1975).** Conservation of primary structure in 16S ribosomal RNA. *Nature* **254**, S. 83-86.

**Wu, Y.-F., Wu, Q.-L. & Liu, S.-J. (2013).** *Chryseobacterium taihuense* sp. nov., isolated from a eutrophic lake, and emended descriptions of the genus *Chryseobacterium*, *Chryseobacterium twiwanense*, *Chryseobacterium jejuense* and *Chryseobacterium indoltheticum*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **63**, S. 913-919.

**Yakoubou, S. & Côté, J.-C. (2010).** Assessment of a short phylogenetic marker based on comparisons of 3' end 16S rDNA and 5' end 16S-23S ITS nucleotide sequences on the genus *Xanthomonas*. *Natural Science* **12**, S. 1369-1374.

**Yang, G., Benson, R. F., Ratcliff, R. M., Brown, E. W., Steigerwalt, A. G., Thacker, W. L., Daneshvar, M. I., Morey, R. E., Saito, A. & Fields, B. S. (2012).** *Legionella nagasakiensis* sp. nov., isolated from water samples and from a patient with pneumonia. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **82**, S. 284-288.

**Yassin, A. F. & Siering, C. (2008).** *Corynebacterium sputi* sp. nov., isolated from the sputum of a patient with pneumonia. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **58**, S. 2876-2879.

## I. Manuskripte

### Publikationen:

***Falsiporphyromonas endometrii* gen. nov., sp. nov., isolated from the postpartum bovine Uterus and emended description of the genus *Porphyromonas* (Shah & Collins 1988), emend.**

Wagener K, Drillich M, Baumgardt S, Kämpfer P, Busse H.-J. and Ehling-Schulz M  
International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology (paper in press, 2013)

**Description of *Corynebacterium tapiri* sp. nov. and *Corynebacterium nasicanis* sp. nov., isolated from a tapir and a dog (in progress, 2013)**

**Description of *Corynebacterium tapiri* sp. nov. and *Corynebacterium nasicanis* sp. nov., isolated from a tapir and a dog**

Sandra Baumgardt<sup>1</sup>, Igor Lonaric<sup>1</sup> Peter Kämpfer<sup>2</sup> and Hans-Jürgen Busse<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institut für Bakteriologie, Mykologie und Hygiene, Veterinärmedizinische Universität Wien, A-1210 Wien, Austria

<sup>2</sup>Institut für Angewandte Mikrobiologie, Justus-Liebig-Universität Giessen, D-35392, Germany

**Abstract**

Two Gram-stain-positive bacterial isolates, strain 2385/12<sup>T</sup> and strain 2673/12<sup>T</sup> were isolated from a tapir and a dog's nose. The two strains were rod to coccoid-shaped, non-motile and oxidase-negative bacteria. Highest 16S rRNA gene sequences similarity identified *Corynebacterium singulare* (96.3% similarity) as the next relative of strain 2385/12<sup>T</sup> and *Corynebacterium humireducens* (98.7% similarity) as the next relative of strain 2673/12<sup>T</sup>. Strain 2385/12<sup>T</sup> showed a quinone system consisting predominantly of menaquinones MK-8(H<sub>2</sub>) and MK-9(H<sub>2</sub>) whereas strain 2673/12<sup>T</sup> contained only MK-8(H<sub>2</sub>) as predominant quinone. The polar lipid profiles of the two strains showed the major compounds diphosphatidylglycerol, phosphatidylglycerol, one glycolipid (GL2), moderate amounts of phosphatidylinositol, minor amounts of phosphatidylinositol-mannoside, and variable counts of several unidentified lipids, including some glycolipids. Both strains contained corynemycolic acids. Only low amounts of cellular polyamines were detected. Putrescine was predominant in 2385/12<sup>T</sup> and spermidin in strain 2673/12<sup>T</sup>. In the fatty acid profiles predominantly C<sub>18:1</sub>ω9c, and C<sub>16:0</sub> were detected. Results from DNA-DNA hybridization between 2385/12<sup>T</sup> and *C. singulare* (43.5%; reciprocal 28,0%) and 2673/12<sup>T</sup> and *C. humireducens* (30.5%; reciprocal 21.4%), respectively demonstrated that each of the two isolates is representing a novel species. The two strains are distinguished from each other and established *Corynebacterium* species phylogenetically and

phenotypically. In conclusion two novel species of the genus *Corynebacterium* are propose, namely *Corynebacterium tapiri* 2385/12<sup>T</sup> (DSM XXXXX<sup>T</sup> = LMG YYYYY<sup>T</sup>) and *Corynebacterium nasicanis* 2673/12<sup>T</sup> (DSM WWWWW<sup>T</sup> = LMG ZZZZZ<sup>T</sup>), respectively.

The genus *Corynebacterium* was first described by Lehmann and Neumann (1896) and consists of Gram-positive rods. Chemotaxonomic characteristic are a quinone system consists of dehydrogenated menaquinones with eight or nine isoprenoid units in the side chain (Collins & Jones, 1981), an A1 $\gamma$  peptidoglycan type with meso-diaminopimelic acid (Schleifer & Kandler, 1972) and usually short mycolic acids with 22-38 carbons (Collins *et al.*, 1982). Most species of this genus are isolated from human and animal clinical samples. The following two described strains, 2385/12<sup>T</sup> and 2673/12<sup>T</sup>, were isolated from veterinary sources.

During a study regarding unusual bacterial isolates from clinical specimens of diseased animals submitted to the Unit of Clinical Microbiology and Infection Biology of the Institute of Bacteriology, Mycology and Hygiene at the Veterinary University, Vienna two strains were isolated which could not be identified during routine veterinary microbiological examinations. One strain designated 2385/12<sup>T</sup> was recovered from a sample taken from the tonsil of a captive South American Tapir (*Tapirus terrestris*). Strain 2673/12<sup>T</sup> was isolated from a dog's nose swab. Colonies of this strain were growing among *Aspergillus* sp.. The two strains grew well aerobically on 3.3x PYE agar (0.99% peptone from casein, 0.99% yeast extract, 1.5% agar, pH 7.2) at 28 °C and in the corresponding liquid medium, as well. They also grew on Columbia III agar (BD Becton Dickinson) supplemented with 5% sheep blood but not on MacConkey II agar (BD Becton Dickinson). Gram-staining was carried out using (Gram-Color, Merck) according to manufactures conditions. The two strains showed Gram-positive staining and these results were confirmed in the KOH-lysis test as described by Moaledji (1986). Presence of oxidase was tested using DrySlide™ Oxidase (BD Becton Dickinson) and the two strains were tested negative. Presence of catalase activity was testing with a drop of 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> applied to the colonies of the two strains. The development of bubbles demonstrated that the two strains are positive for catalase. Microscopic observations of the cells with a Leitz,

Dialux 20 microscope at x1000 magnification, strain 2385/12<sup>T</sup> and strain 2673/12<sup>T</sup> showed a rod to coccoid-shape.

The 16S rRNA gene was amplified using universal primers 27f and 1494r (Lane, 1991). The PCR reaction mix consisted of 30 µl REDTaq ReadyMix PCR Reaction Mix with MgCl<sub>2</sub> (Sigma-Aldrich), 37.5 pmol of each primer (Invitrogen), 2.50 µl DNA and 26.20 µl sterile water. The amplification program was set at an initial denaturation step at 95 °C for 5 min, subsequently 30 cycle of denaturation at 94 °C for 1.5 min, annealing at 53 °C for 1.5 min and elongation at 72 °C for 5 min, followed by a final elongation at 72 °C for 10 min.

The PCR products were cleaned up with GenElute™ PCR Clean-Up Kit (Sigma), sequenced by LCG Genomics resulting in sequence with a length of 1423 nucleotides (2385/12<sup>T</sup>) and 1382 nucleotides (2673/12<sup>T</sup>). Sequence comparisons were carried out using the EzTaxon-e server (<http://eztaxon-e.ezbiocloud.net/>; Kim *et al.*, 2012). The two strains shared 96.4% 16S rRNA gene sequence similarity with each other. Strain 2385/12<sup>T</sup> shared highest sequence similarities with *Corynebacterium singulare* CIP 105491<sup>T</sup> (96.34%), *Corynebacterium doosanense* CAU 212<sup>T</sup> (95.97%) and *Corynebacterium freiburgense* 1045<sup>T</sup> (95.89%). These results demonstrate that strain 2385/12<sup>T</sup> must be considered as a representative of a so far unrecognized species. Strain 2673/12<sup>T</sup> shared highest 16S rRNA gene sequence similarity *Corynebacterium humireducens* DSM 45392<sup>T</sup> (98.47%) and *Corynebacterium tuberculostearicum* CIP 107291<sup>T</sup> (96.95%), *Corynebacterium pseudogenitalium* ATCC 33035<sup>T</sup> and *Corynebacterium epidermidicanis* 410<sup>T</sup> (96.81%). Sequence similarities of 2385/12<sup>T</sup> and 2673/12<sup>T</sup> with *Corynebacterium diphtheriae*, the type species of the genus, were 95.19% and 96.59% demonstrating that both strains are members of the genus *Corynebacterium*

16S rRNA gene sequences of 53 type strains of species of the genus *Corynebacterium* showing sequence similarities higher than 95.0% at least with one of our strains after comparison using the EzTaxon-e Server (<http://eztaxon-e.ezbiocloud.net/>; Kim *et al.*, 2012) comparison were manually edited for uncertain bases and gaps using BioEdit 7.0.9.0 (Hall, 1999) and finally a multiple alignment was carried out using ClustalW Multiple Alignment 1.4 (included in BioEdit 7.0.9.0). Phylogenetic relationships of strain 2385/12<sup>T</sup> and 2673/12<sup>T</sup> were analysed by

maximum likelihood and neighbour joining algorithms performed in MEGA 5.1 (Tamura *et al.*, 2011).

In the two trees applied using the maximum likelihood algorithm (Fig. 2) and neighbour joining algorithm (data not shown), respectively, strain 2385/12<sup>T</sup> showed a closer relatedness to the type strain of *C. doosanense* CAU 212<sup>T</sup> than to the type strain of *C. singular* CIP 105491<sup>T</sup>, but both without good bootstrap support (<65%). The discrepancy between 16S rRNA similarities and phylogenetic relatedness is most likely due to the fact that after editing the sequences for ambiguous nucleotides and gaps the sequence similarities between strain 2385/12<sup>T</sup> and the two next related species *C. singulare* CIP 105491<sup>T</sup> and *C. doosanense* CAU 212<sup>T</sup> were almost identical (97.0 and 97.1%, respectively). The close relatedness between strain 2673/12<sup>T</sup> and the type strain of *C. humireducens* DSM 45392<sup>T</sup> as indicated from high 16S rRNA gene sequence similarity is also shown in the phylogenetic tree applying the maximum likelihood algorithm (Fig.2) and in the neighbour joining tree (data not shown), as well.

Since strain 2673/12<sup>T</sup> and *C. humireducens* DSM 45392<sup>T</sup> shared high 16S rRNA gene sequence similarity DNA-DNA hybridization were carried out and resulted in 30.5% similarity (reciprocal: 21.4%). These results unambiguously demonstrates that also strain 2673/12<sup>T</sup> is a representative of a so far not described species.

Biomass used for the extraction of quinones, polar lipids, polyamines and mycolic acids was from cells that were cultivated at 28 °C in 3.3x PYE broth. Quinones and polar lipids were extracted and analysed as described by Tindall (1990a, b) and Altenburger *et al.* (1996). Polyamines were extracted and analysed as described by Busse & Auling (1988) and Altenburger *et al.* (1997). Mycolic acids were extracted and analysed as described by Frischmann *et al.* (2012). Production of biomass, extraction and analysis of fatty acids was carried out as described previously (Kämpfer and Kroppenstedt, 1996). The physiological/biochemical characterization was performed to assess the carbon source utilization pattern, and hydrolysis of chromogenic substrates according to Kämpfer *et al.* (1991).

The quinone systems of the two strains exclusively contained menaquinones. Strain 2385/12<sup>T</sup> contained 55% MK-9(H<sub>2</sub>), 35% MK-8(H<sub>2</sub>), 5% MK-10(H<sub>2</sub>) and 5% MK-7(H<sub>2</sub>), whereas in strain 2673/12<sup>T</sup> 84% MK-8(H<sub>2</sub>), 11% MK-9(H<sub>2</sub>) and 5% MK-7(H<sub>2</sub>).

These two quinone systems are in line with that listed for the genus *Corynebacterium* (Bernard & Funke, 2012) described that MK-8 (H<sub>2</sub>) or MK-9 (H<sub>2</sub>) or both could appear in that genus. A quinone system rather similar to that of strain 2385/12<sup>T</sup> was detected in *C. singulare* CIP 105491<sup>T</sup> composed of 59% MK-9(H<sub>2</sub>), 35% MK-8(H<sub>2</sub>), 4% MK-10(H<sub>2</sub>) and 2% MK-7(H<sub>2</sub>). *C. humireducens* DSM 45392<sup>T</sup> showed a quinone system which was almost identical to that of strain 2673/12<sup>T</sup> consisting of 84% MK-8(H<sub>2</sub>), 12% MK-9(H<sub>2</sub>) and 5% MK-7(H<sub>2</sub>).

Strains 2385/12<sup>T</sup>, 2673/12<sup>T</sup> and the reference strains *C. singulare* CIP 105491<sup>T</sup> and *C. humireducens* DSM 45392<sup>T</sup> each showed complex polar lipid profiles (Fig. 1). Strain 2385/12<sup>T</sup> exhibited phosphatidylglycerol, diphosphatidylglycerol and an unidentified glycolipid (GL2) as major compounds. Moderate to minor amounts phosphatidylinositol, phosphatidylinositol-mannoside, an unidentified aminophospholipid, an unidentified aminoglycolipid, seven unidentified glycolipids and eight unidentified polar lipids were detected (Fig. 1a). Strain 2385/12<sup>T</sup> could be distinguished from the reference strain *C. singulare* CIP 105491<sup>T</sup> (Fig. 1b) in containing the unidentified glycolipids GL3, GL4, lacking GL8, aminolipid AL4, and based on presence/absence of several minor lipids and the significantly lower content of phosphatidylinositol and phosphatidylinositol-mannoside.

In comparison to 2385/12<sup>T</sup> the polar lipid profile of strain 2673/12<sup>T</sup> contained less lipids. The major compounds were phosphatidylglycerol, diphosphatidylglycerol and, like in strain 2385/12<sup>T</sup>, the unidentified glycolipid GL2. Moderate to minor amounts of phosphatidylinositol, phosphatidylinositol-mannoside, phosphatidylethanolamine, an unidentified aminoglycolipid, five unidentified glycolipids and three unidentified polar lipids were detected as well (Fig. 1c). Major lipids distinguishing *C. humireducens* DSM 45392<sup>T</sup> (Fig. 1d) from strain 2673/12<sup>T</sup> are the two unidentified aminolipids (AL1, AL2) and the high amount of phosphatidylinositol. All these four polar lipid profiles were in good agreement with those reported for other *Corynebacterium* species including *Corynebacterium efficiens* (Fudou et al., 2002), *Corynebacterium glaucum* (Yassin et al., 2003), *Corynebacterium lubricantis* (Kämpfer et al., 2009), and *Corynebacterium epidermidicantis* (Frischmann et al., 2012). The unidentified glycolipid GL11 showed, relative to phosphatidylglycerol a chromatographic motility similar to  $\beta$ -gentiobiosyl diacylglycerol supposed to be a major lipid of staphylococci

(Nahaie *et al.*, 1984). By co-chromatography with a lipid extract of *Staphylococcus petrasii* CCM 8418<sup>T</sup> it could be shown that the chromatographic motility of GL11 is indistinguishable from that of  $\beta$ -gentiobiosyl diacylglycerol, Hence, GL11 is preliminarily identified as  $\beta$ -gentiobiosyl diacylglycerol.

The polyamine pattern of strain 2385/12<sup>T</sup> was composed of the major compound putrescine [1.1  $\mu\text{mol (g dry weight)}^{-1}$ ] and lesser amounts of spermine [0.3  $\mu\text{mol (g dry weight)}^{-1}$ ], spermidine [0.1  $\mu\text{mol (g dry weight)}^{-1}$ ] and in trace amounts cadaverine and 1,3-diaminopropane [ $<0.1 \mu\text{mol (g dry weight)}^{-1}$ ].

In contrast strain 2673/12<sup>T</sup> contained the major polyamine spermidine [0.5  $\mu\text{mol (g dry weight)}^{-1}$ ] and lesser amounts of spermine [0.1  $\mu\text{mol (g dry weight)}^{-1}$ ], putrescine [0.1  $\mu\text{mol (g dry weight)}^{-1}$ ] and in trace amounts cadaverine and 1,3-diaminopropane [ $<0.1 \mu\text{mol (g dry weight)}^{-1}$ ]. The polyamine pattern of *C. humireducens* contained the major compounds putrescine [0.6  $\mu\text{mol (g dry weight)}^{-1}$ ], spermidine [1.2  $\mu\text{mol (g dry weight)}^{-1}$ ], spermine [0.6  $\mu\text{mol (g dry weight)}^{-1}$ ], and in trace amounts of cadaverine and 1,3-diaminopropane [ $<0.1 \mu\text{mol (g dry weight)}^{-1}$ ]. The polyamine pattern of *C. singulare* was composed of the major compound 1,3-diaminopropane [0.5  $\mu\text{mol (g dry weight)}^{-1}$ ], moderate amounts of spermidine [0.2  $\mu\text{mol (g dry weight)}^{-1}$ ], spermine [0.2  $\mu\text{mol (g dry weight)}^{-1}$ ], and trace amounts of putrescine [ $<0.1 \mu\text{mol (g dry weight)}^{-1}$ ]. These pattern with overall relatively low amounts of polyamines and varying major polyamines are in line with the polyamine patterns reported for other species of the genus *Corynebacterium* (Altenburger *et al.*, 1997).

The analysis for presence of mycolic acid in 2385/12<sup>T</sup> and 2673/12<sup>T</sup> in spots that showed the same chromatographic motility as the corresponding spot in *C. singulare* CIP 105491<sup>T</sup> (results not shown) which was reported to contain mycolic acid with a length of 26-36 carbons, so called corynemycolic acids (Riegel *et al.*, 1997). The presence of corynemycolic acids was also shown in *C. humireducens* DSM 45392<sup>T</sup> (results not shown).

The fatty acid profiles (Tab. 1) were composed predominantly of the fatty acids C<sub>18:1</sub>w9c and C<sub>16:0</sub>. This is in accordance with fatty acid profiles given for *C. singulare* (Riegel *et al.*, 1997), and *C. humireducens* (Wu *et al.*, 2011), who also found oleic,

hexadecanoic, and octadecanoic acids as the main fatty acids in representatives of these species.

All four strains utilized few carbon sources, but on the basis of physiological tests, all strains were clearly distinguishable. (Tab. 2)

The results from 16S rRNA gene analysis and in chemotaxonomic characteristics of strain 2385/12 and 2673/12 differ from their references *C. singulare* CIP 105491<sup>T</sup> and *C. humireducens* DSM 45392<sup>T</sup>. These data are considered to represent two novel species, for which the names *Corynebacterium tapiri* sp. nov. and *Corynebacterium nasicanis* sp. nov. are proposed.

### **Description of *Corynebacterium tapiri* sp. nov.**

(ta.pi'ri. N.L. gen. n. Tapiri of tapirus, named after the tapirus, from which the type strain was isolated).

Cells are Gram-positiv, coccoid rods, which grew aerobic and facultative anaerobic. They are catalase positive and oxidase negative. They are non-motile. The rods grow on 3.3x PYE agar, where the cells form gray-whitish, circular, non-translucent colonies. Growing on Columbia III agar with 5% sheep blood, but on MacConkey agar no colonies were observed. The polar lipid profile is composed of the major compounds phosphatidylglycerol, phosphatidylinositol, an unidentified glycolipid and in minor or trace amounts diphosphatidylglycerol, phosphatidylinositol-mannoside, an unidentified aminophospholipid, an unidentified aminoglycolipid, seven unidentified glycolipids and eight unidentified polar lipids. The major polyamine is putrescine. The quinone system contains MK-9 (H<sub>2</sub>) and MK-8 (H<sub>2</sub>). The cell wall contains mycolic acids. In the fatty acid profiles predominantly C<sub>18:1</sub>ω9c, and C<sub>16:0</sub> and C<sub>18:0</sub> in minor amounts were detected.

Positive for assimilation of: D-fructose, D-glucose, D-maltose, sucrose, D-trehalose, maltitol, L-malate, fumarate, DL-lactate, and pyruvate. Negative for the acid production from: D-glucose, lactose, sucrose, D-mannitol, dulcitol, salicin, adonitol, inositol, sorbitol, L-arabinose, raffinose, rhamnose, maltose, D-xylose, trehalose, cellobiose, methyl-D-glucoside, erythritol, melibiose, D-arabitol and D-mannose. Negative for the hydrolysis of: esculin, oNP-β-D-galactopyranoside, pNP-β-D-

glucopyranoside, pNP-β-D-xylopyranosid, pNP-phosphoryl-choline, 2-deoxythymidine-5'-thymidine-pNP-phosphate, L-alanine-pNA, L-glutamate-gamma-3-carboxy-pNA, L-proline-pNA. Negative for assimilation of: N-acetyl-D-galactosamin, L-arabinose, p-arbutin, D-cellobiose, D-galactose, gluconate, D-mannose, alpha-D-melibiose, L-rhamnose, Salicin, D-xylose, adonitol, i-inositol, D-mannitol, D-sorbitol, putrescine, propionate, *cis*-aconitate, *trans*-aconitate, adipate, azelate, glutarate, DL-3-hydroxybutyrate, itaconate, mesaconate, oxoglutarate, suberate, β-alanine, L-leucine, L-ornithine, L-phenylalanine, L-proline, L-serine, L-tryptophane, 3-hydroxybenzoate, 4-hydroxybenzoate, and phenylacetate,

The type strain 2385/12<sup>T</sup> (DSM XXXXX<sup>T</sup> = LMG YYYYY<sup>T</sup>) and was isolated from the tonsils of a South American tapir.

### **Description of *Corynebacterium nasicanis* sp. nov.**

(*nasicanis*. na.si.ca`nis. L. masc. n. *nasus* nose; L. gen. n. *canis*; N.L. gen. n. *nasicanis*, of the nose of a dog).

Cells are Gram-positive short, slightly curved rods, which are obligate aerobic, catalase positive and oxidase negative. They are non-motile. On 3.3x PYE agar the cells form creamy-whitish, circular, non-translucent colonies. Growing on Columbia III agar with 5% sheep blood, but on MacConkey agar no colonies were observed. The polar lipid profile is composed of the major compounds phosphatidylglycerol, phosphatidylinositol, diphosphatidylglycerol and in minor or trace phosphatidylinositol-mannoside, phosphatidylethanolamine, an unidentified aminoglycolipid, five unidentified glycolipids and three unidentified polar lipids. The major polyamine is spermidine. The quinone system contains MK-8 (H<sub>2</sub>). The cell wall contains mycolic acids. In the fatty acid profiles predominantly C<sub>18:1</sub>ω9c, and C<sub>16:0</sub> and C<sub>16:1</sub> ω7c and/or 15:0 iso 2-OH in minor amounts were detected.

Positive for assimilation of: N-acetyl-D-glucosamin, D-fructose, D-glucose, D-maltose, ribose, D-trehalose, acetate, L-malate, DL-lactate, and pyruvate. Negative for the acid production from: D-glucose, lactose, sucrose, D-mannitol, dulcitol, salicin, adonitol, inositol, sorbitol, L-arabinose, raffinose, rhamnose, maltose, D-xylose,

trehalose, cellobiose, methyl-D-glucoside, erythritol, melibiose, D-arabitol and D-mannose. Negative for the hydrolysis of: esculin, oNP- $\beta$ -D-galactopyranoside, pNP- $\beta$ -D-glucopyranoside, pNP- $\beta$ -D-xylopyranosid, pNP-phosphoryl-choline, 2-deoxythymidine-5'-thymidine-pNP-phosphate, L-alanine-pNA, L-glutamate-gamma-3-carboxy-pNA, L-proline-pNA. Negative for assimilation of: N-acetyl-D-galactosamin, L-arabinose, p-arbutin, D-cellobiose, D-galactose, gluconate, D-mannose, alpha-D-melibiose, L-rhamnose, Salicin, D-xylose, adonitol, i-inositol, D-mannitol, D-sorbitol, putrescine, propionate, *cis*-aconitate, *trans*-aconitate, adipate, azelate, glutarate, DL-3-hydroxybutyrate, itaconate, mesaconate, oxoglutarate, suberate,  $\beta$ -alanine, L-leucine, L-ornithine, L-phenylalanine, L-proline, L-serine, L-tryptophane, 3-hydroxybenzoate, 4-hydroxybenzoate, and phenylacetate,

The type strain is 2673/12<sup>T</sup> (DSM WWWWW<sup>T</sup> = LMG ZZZZZ<sup>T</sup>) and was isolated from the nose of a dog.

## Acknowledgements

I am indebted to many of my colleagues to support me during this work.

## References

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

**Altenburger, P., Kämpfer, P., Akimov, V. N., Lubitz, W. & Busse, H.-J. (1997).** Polyamine Distribution in Actinomycetes with Group B Peptidoglycan and Species of the Genera *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, and *Tsukamurella*. *Int J Syst Bacteriol* **47**, 270-277.

**Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D. J. (1997).** Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**, 3389-3402.

**Bernard, K. A. & Funke, G. (2012).** Genus I. *Corynebacterium* Lehmann and Neumann 1896, 350<sup>AL</sup> emend. Bernard, Wiebe Burdz, Reimer, Ng, Singh, Schindle and Pacheco 2010, 877. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (2nd edn, vol 5 (The Actinobacteria), part A, pp. 245-289. Edited by M. Goodfellow, P. Kämpfer, H.-J. Busse, M. E. Trujillo, K.-i. Suzuki, W. Ludwig and W. B. Whitman. New York: Springer

**Busse, H.-J. & Auling, G. (1988).** Polyamine pattern as a chemotaxonomic marker within the *Proterobacteria*. *Syst Appl Microbiol* **11**, 1-8.

**Busse, H.-J. (2012).** Family I. *Corynebacteriaceae* Lehmann and Neumann 1902<sup>AL</sup> emend. Stackebrandt, Rainey and Ward-Rainey 1997, 485 emend. Zhi, Li and Stackebrandt 2009, 593. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (2nd edn, vol 5 (The Actinobacteria), part A, pp. 244-245. Edited by M. Goodfellow, P. Kämpfer, H.-J. Busse, M. E. Trujillo, K.-i. Suzuki, W. Ludwig and W. B. Whitman. New York: Springer

- Chen, H.-H., Li, W.-J., Tang, S.-K., Kroppenstedt, R. M., Stackebrandt, E., Xu, L.-H. & Jiang, C.L. (2004).** *Corynebacterium halotolerans* sp. nov., isolated from saline soil in the west of China. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**, 779-782.
- Collins, M. D. & Jones, D. (1981).** Distribution of isoprenoid quinone structural types in bacteria and their taxonomic implications. *Microbiol Rev* **45**, 316-354.
- Collins, M. D., Goodfellow, M. & Minnikin, D. E. (1982).** A Survey of the Structures of Mycolic Acids in *Corynebacterium* and Related Taxa. *J Gen Microbiol* **128**, 129-149.
- Frischmann, A., Knoll, A., Hilbert, F., Zasada, A., Kämpfer, P. & Busse, H.-J. (2012).** *Corynebacterium epidermidicanis* sp. nov., isolated from skin of a dog. *Int J Syst Evol Microbiol* **62**, 2194–2200.
- Fudou, R., Jojima, Y., Seto, A., Yamada, K., Kimura, E., Nakamatsu, T., Hiraishi, A. & Yamanaka, S. (2002).** *Corynebacterium efficiens* sp. nov., a glutamic acid-producing species from soil and vegetables. *Int J Syst Evol Microbiol* **52**, 1127-1131.
- Hall, T. (1999).** A User-friendly Biological Sequence Alignment Editor and Analysis Program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser* **41**, 95-98.
- Kämpfer, P. & Kroppenstedt, R. M. (1996).** Numerical analysis of fatty acid patterns of coryneform bacteria and related taxa. *Can J Microbiol* **42**, 989-1005.
- Kämpfer, P., Steiof, M. & Dott, W. (1991).** Microbiological characterization of a fuel-oil contaminated site including numerical identification of heterotrophic water and soil bacteria. *Microb Ecol* **21**, 227-251.
- Kim, O. S., Cho, Y. J., Lee, K., Yoon, S. H., Kim, M., Na, H., Park, S. C., Jeon, Y. S., Lee, J. H., Yi, H., Won, S. & Chun, J. (2012)** Introducing EzTaxon-e: a prokaryotic 16S rRNA Gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species. *Int J Syst Evol Microbiol* **62**, 716–721.
- Lane, D. J. (1991).** 16S/23S rRNA sequencing. In *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*, pp. 115–175. Edited by E. Stackebrandt & M. Goodfellow. Chichester: Wiley.

**Minnikin, D., Patel, P., Alshamaony, L. & Goodfellow, M. (1977).** Polar Lipid Composition in the Classification of *Nocardia* and Related Bacteria. *Int J Syst Bacteriol* **27**, 104-117.

**Moaledji, K. (1986).** Comparison of Gram-staining and alternate methods, KOH test and aminopeptidase activity in aquatic bacteria: their application to numerical taxonomy. *J Microbiol Methods* **5**, 303-310.

**Myers, E. W. & Miller, W. (1988).** Optimal alignments in linear space. *Comput Appl Biosci* **4**, 11-17.

**Nahaie, M. R., Goodfellow, M., Minnikin, D. E. & Hajek, V. (1984).** Polar Lipid and Isoprenoid Quinone Composition in the Classification of *Staphylococcus*. *J Gen Microbiol* **130**, 2427-2437.

**Pantůček, R., Švec, P., Dajcs, J. J., Machová, I., Černohlávková, J., Šedo, O., Gelbíčovčá, T., Mašlaňová, I., Doškař, J., Zdráhal, Z., Růžicková, V. & Sedláček, I. (2013).** *Staphylococcus petrasii* sp. nov. including *S. petrasii* subsp. *petrasii* subsp. nov. and *S. petrasii* subsp. *croceilyticus* subsp. nov., isolated from human clinical specimens and human ear infections. *Syst Appl Microbiol* **36**, 90-95.

**Pitcher, D., Soto, A., Soriano, F. & Valero-Guillén, P. (1992).** Classification of Coryneform Bacteria Associated with Human Urinary Tract Infectio (Group D2) as *Corynebacterium urealyticum* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* **42**, 178-181.

**Riegel, P., Ruimy, R., Renaud, F. N. R., Freney, J., Prevost, G., Jehl, F., Christen, R. & Monteil, H. (1997).** *Corynebacterium singulare* sp. nov., a New Species for Urease-Positive Strains Related to *Corynebacterium minutissimum*. *Int J Syst Bacteriol* **44**, 1092-1096.

**Schleifer, K.-H. & Kandler, O. (1972).** Peptioglycan type of bacterial cell walls and their taxonomic implications. *Bacteriol Rev* **36**, 407-477.

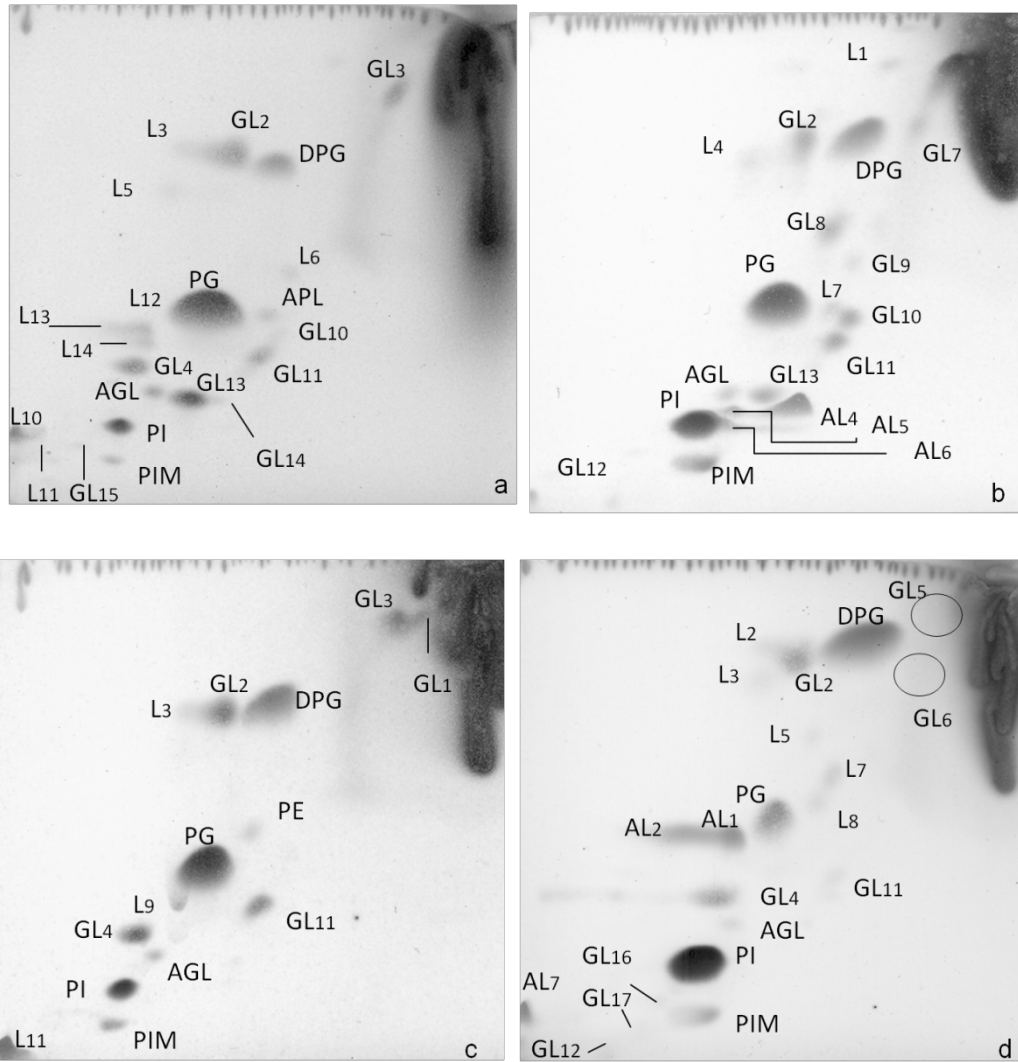
**Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. & Kumar, S. (2011).** MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Mol Biol Evol* **28**, 2731-2739.

**Tindall, B. J. (1990a).** Lipid composition of *Halobacterium lacusprofundi*. *FEMS Microbiol Lett* **66**, 199-202.

**Tindall, B. J. (1990b).** A comparative study of the lipid composition of *Halobacterium saccharovorum* from various sources. *Syst Appl Microbiol* **13**, 128–130.

**Yassin, A. F., Kroppenstedt, R. M. & Ludwig, W. (2003).** *Corynebacterium glaucum* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* **53**, 705-709.

**Wu, C.-Y., Zhuang, L., Zhou, S.-G., Li, F.-B. & He, J. (2011).** *Corynebacterium humireducens* sp. nov., an alkaliphilic, humic acid-reducing bacterium isolated from a microbial fuel cell. *Int J Syst Evol Microbiol* **61**, 882-887.



↑                      →  
 2<sup>nd</sup> dimension      1<sup>st</sup> dimension

**Fig. 1:** Polare lipid profiles of strains 2385/12<sup>T</sup> (a), *C. singulare* CIP 105491<sup>T</sup> (b), 2673/12<sup>T</sup> (c) and *C. humireducens* DSM 45392<sup>T</sup> (d); two-dimensional TLC detected with molybdato-phosphoric acid; abbreviations: DPG (diphosphatidylglycerol), PG (phosphatidylglycerol), PE (phosphatidylethanolamine), PI (phosphatidylinositol), PIM (phosphatidylinositol-mannoside), APL (unidentified aminophospholipid), AGL (unidentified aminoglycolipid), AL<sub>x</sub> (unidentified aminolipids), L<sub>x</sub> (unidentified lipids) and GL<sub>x</sub> (unidentified glycolipids); Circles indicates glycolipids, which were only visible on the TLC.

**Tab. 1:** Cellular fatty acid composition of strains 2385/12<sup>T</sup> (1), *C. singulare* CIP 105491<sup>T</sup> (2), 2673/12<sup>T</sup> (3); *C. humireducens* DSM 45392<sup>T</sup> (4). Data were obtained with the Sherlock MIDI version 2.1 (TSBA version 4.1).

| Fatty acid                                 | 1    | 2    | 3    | 4    |
|--------------------------------------------|------|------|------|------|
| C <sub>10:0</sub>                          | 3.4  |      |      |      |
| C <sub>15:0</sub>                          |      |      |      |      |
| Iso C <sub>15:0</sub>                      |      |      |      |      |
| C <sub>15:1</sub> ω6c                      |      |      |      |      |
| C <sub>16:1</sub> ω5c                      |      |      |      |      |
| C <sub>16:1</sub> ω9c                      |      | 3.3  |      |      |
| C <sub>16:1</sub> ω7c and/or 15:0 iso 2-OH |      |      | 4.0  |      |
| anteiso C <sub>17:1</sub> ω9c              |      |      |      |      |
| C <sub>17:1</sub> ω7c                      |      | 21.8 |      |      |
| C <sub>16:0</sub>                          | 44.8 | 11.4 | 37.1 | 42.1 |
| C <sub>18:1</sub> ω9c                      | 46.8 | 56.6 | 58.9 | 58.8 |
| C <sub>18:1</sub> ω7c                      |      |      |      |      |
| C <sub>17:0</sub>                          |      |      |      |      |
| C <sub>17:0</sub> ω8c                      |      |      |      |      |
| C <sub>17:0</sub> ω6c                      |      |      |      |      |
| TSBA / 10-methyl 18:0                      |      | 2.5  |      |      |
| C <sub>18:0</sub>                          | 4.8  | 4.4  |      |      |

**Tab. 2:** Results of physiological tests of strains 2385/12<sup>T</sup> (1), *C. singulare* CIP 105491<sup>T</sup> (2), 2673/12<sup>T</sup> (3); *C.humireducens* DSM 45392<sup>T</sup> (4).

All data from this study.

All strains are negative for the acid production from: D-glucose, lactose, sucrose, D-mannitol, dulcitol, salicin, adonitol, inositol, sorbitol, L-arabinose, raffinose, rhamnose, maltose, D-xylose, trehalose, cellobiose, methyl-D-glucoside, erythritol, melibiose, D-arabitol and D-mannose.

All strains are negative for the hydrolysis of: esculin, oNP-β-D-galactopyranoside, pNP-β-D-glucopyranoside, pNP-β-D-xylopyranosid, pNP-phosphoryl-choline, 2-deoxythymidine-5'-thymidine-pNP-phosphate, L-alanine-pNA, L-glutamate-gamma-3-carboxy-pNA, L-proline-pNA.

All strains are negative for assimilation of: N-acetyl-D-galactosamin, L-arabinose, p-arbutin, D-cellobiose, D-galactose, gluconate, D-mannose, alpha-D-melibiose, L-rhamnose, Salicin, D-xylose, adonitol, i-inositol, D-mannitol, D-sorbitol, putrescine, propionate, *cis*-aconitate, *trans*-aconitate, adipate, azelate, glutarate, DL-3-hydroxybutyrate, itaconate, mesaconate, oxoglutarate, suberate, β-alanine, L-leucine, L-ornithine, L-phenylalanine, L-proline, L-serine, L-tryptophane, 3-hydroxybenzoate, 4-hydroxybenzoate, phenylacetate, and all are positive for assimilation of: D-fructose, D-glucose, D-maltose, L-malate, pyruvate.

+, Positive; (+), weakly positive; -, negative.

|                             | 1   | 2 | 3 | 4 |
|-----------------------------|-----|---|---|---|
| Hydrolysis of:              |     |   |   | - |
| pNP-β-D-glucuronide         | (+) | - | - | - |
| pNP-alpha-D-glucopyranoside | (+) | - | - | - |
| Bis-pNP-phosphate           | +   | + | - | - |
| pNP-phenyl-phosphonate      | +   | + | - | - |
|                             |     |   |   |   |
| Utilization of:             |     |   |   |   |
| N-Acetyl-D-glucosamin       | -   | - | + | + |
| D-Mannose                   | -   | - | + | - |

|                 |     |     |   |     |
|-----------------|-----|-----|---|-----|
| D-Ribose        | -   | -   | + | +   |
| Sucrose         | (+) | +   | - | -   |
| D-Trehalose     | (+) | -   | + | +   |
| Maltitol        | (+) | -   | - | -   |
| Acetate         | -   | +   | - | (+) |
| 4-Aminobutyrate | -   | (+) | - | -   |
| Citrate         | -   | (+) | - | -   |
| Fumarate        | (+) | (+) | - | -   |
| DL-Lactate      | +   | (+) | - | (+) |
| L-Malate        | (+) | (+) | + | (+) |
| L-Alanine       | -   | (+) | - | -   |
| L-Aspartate     | -   | (+) | - | -   |
| L-Histidine     | -   | (+) | - | -   |

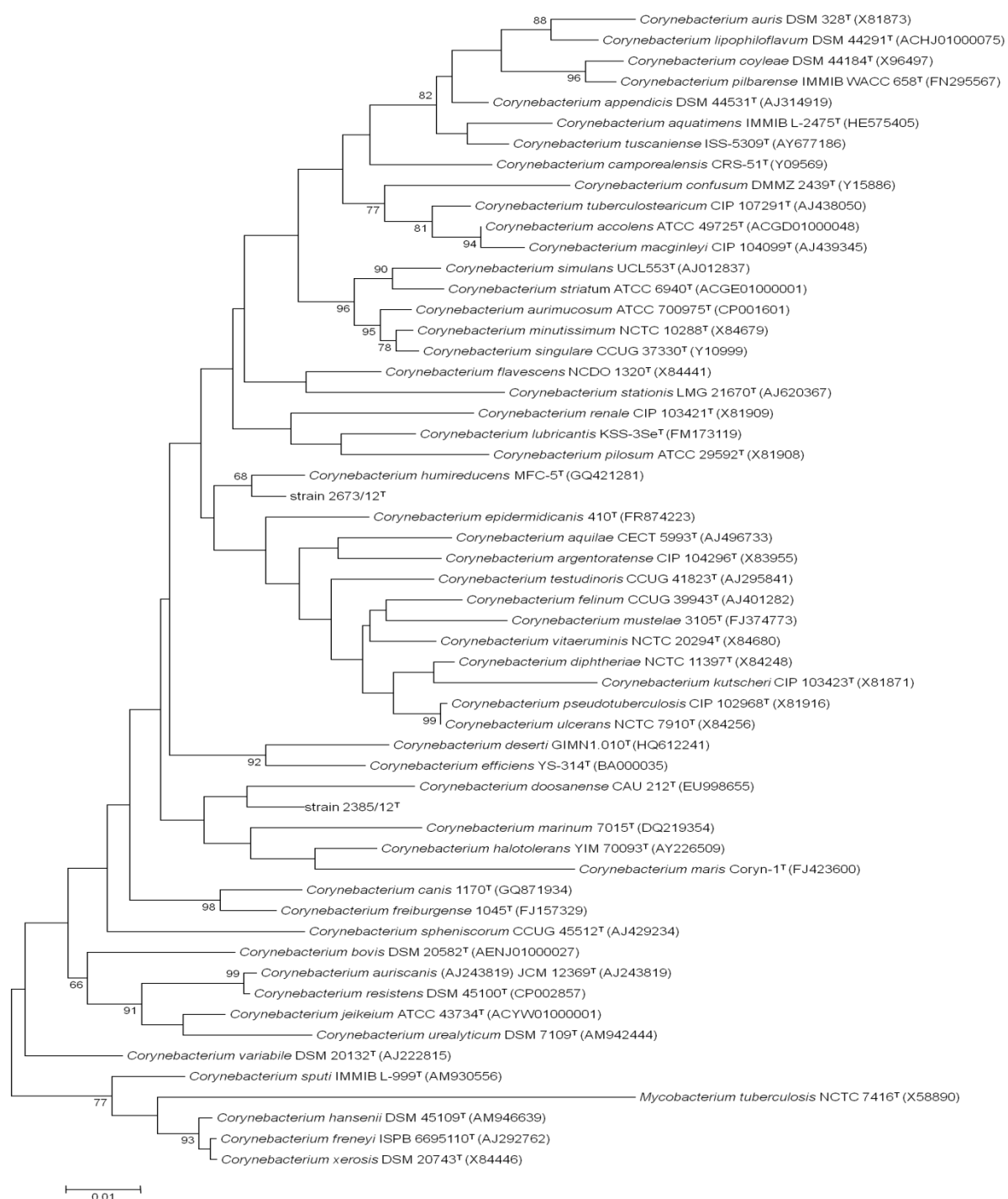


**Fig. 2:** Molecular Phylogenetic analysis by Maximum Likelihood method. The analysis based on 16S rRNA gene sequences demonstrating the relatedness of strain 2385/12 and 2673/12 to 53 *Corynebacterium* species, which showed at least a similarity of 95.0% with strain 2385/12 and/or 2673/12. As outgroup was used *Mycobacterium tuberculosis* NCTC 7416<sup>T</sup> (X58890). More than 65% are given at nodes (based on 1000 replicates). Scale bar, 0.01 sequence divergence.

## II. Curriculum vitae

Name: Sandra Baumgardt, BSc.  
Geburtsdatum/-ort: 23.09.1984/ Berlin, Deutschland  
Adresse: Diemgasse 16/21, 1190 Wien  
E-Mail: sbaumgardt@gmx.de

### ***Ausbildung:***

08/1997 – 06/2004 **Ernst-Friedrich-Oberschule**, Berlin  
Abschluss: Abitur

09/2004 – 07/2007 **Ausbildung zur Biologielaborantin**  
Bundesamt für Strahlenschutz, Neuherberg

08/2007 – 09/2007 **Biologielaborantin**  
Bundesamt für Strahlenschutz, Neuherberg

10/2007 – 03/2011 **Universität Wien** (Mikrobiologie und Genetik)  
Bachelorarbeit durchgeführt im Labor von M. Gomolka, Bundesamt für Strahlenschutz

10/2010 – 09/2011 **Biologielaborantin/ Werkstudentin**  
Austrian Institute of Technology, Seibersdorf/Tulln

seit 03/2011 **Universität Wien** (Immunologie und Molekulare Mikrobiologie)  
Masterarbeit durchgeführt im Labor von H.-J. Busse,  
Veterinärmedizinische Universität Wien

05/2012 – 06/2012 **Werkstudentin/ FEMtech Praktikum**  
Austrian Institute of Technology, Tulln

04/2013 **Tutorin im Mikrobiologie Lab**  
FH Campus Wien

09/2012 und 03/2013 **Tutorin bei der Übung** in Molekularer Mikrobiologie – Systematik  
Universität Wien

### **III. Danksagung**

Ich danke Frau O.Univ.-Prof. Dr.rer.nat. Renate Rosengarten und dessen Nachfolgerin Univ.-Prof. Dipl.-Ing. Dr.rer.nat. Monika Ehling-Schulz sowie Dr. Busse für die Möglichkeit meine Masterarbeit am Institut für Bakteriologie, Mykologie und Hygiene durchzuführen.

Ein weiterer Dank gilt den Mitarbeitern für die freundliche Aufnahme während meiner Zeit am Institut.

Der Arbeitsgruppe von Prof. Peter Kämpfer möchte ich für die Durchführung der Analysen danken, sowie der Arbeitsgruppe von Gottfried Wilharm (Robert Koch Institut, Wernigerode) für die Bereitstellung des Isolats 114.

Ein großes Dankeschön fällt Ivana O. zu, da sie mir geduldig viele Methoden erklärt hat und immer mit gutem Rat zu Seite stand.

Ebenfalls möchte ich Ivana I., Igor und Karin danken, die immer ein offenes Ohr für mich hatten und mich mit wertvollen Tipps und viel Motivation unterstützten.

Insbesondere möchte ich meiner Familie danken, die mir meinen großen Traum vom Studieren möglich gemacht haben. Sowie meinen Freunden und Studienkollegen, die mit mir die Höhen und Tiefen des Studiums teilten.