



universität
wien

MASTERARBEIT / MASTER'S THESIS

Titel der Masterarbeit / Title of the Master's Thesis

„Untersuchungen zur Klassifizierung nicht identifizierbarer
Bakterienisolate aus veterinärmedizinischen Proben“

verfasst von / submitted by

Tanita Kleinhagauer, BSc

angestrebter akademischer Grad / in partial fulfilment of the requirements for the degree of
Master of Science (MSc)

Wien, 2017

Studienkennzahl lt. Studienblatt /
degree programme code as it appears on
the student record sheet:

A >066 830<

Studienrichtung lt. Studienblatt /
degree programme as it appears on
the student record sheet:

Molekulare Mikrobiologie, Mikrobielle Ökologie und
Immunbiologie/ Molecular Microbiology, Microbial Ecology
and Immunobiology

Betreut von / Supervisor:

Univ.-Doz. Dr. Hans-Jürgen Busse

„Nur wenige wissen, wie viel man wissen muss, um zu
wissen, wie wenig man weiß.“

-Werner Heisenberg

Danksagung

Ich bedanke mich bei meinem Betreuer Dr. Hans-Jürgen Busse sowie bei Univ.-Prof. Dipl.-Ing. Dr.rer.nat. Monika Ehling-Schulz für die Möglichkeit meine Masterarbeit am Institut für Bakteriologie, Mykologie und Hygiene durchzuführen.

Dr. Igor Loncaric sowie Dr. Joachim Spargser danke ich für die Bereitstellung der untersuchten Stämme sowie für die große Unterstützung im Laufe der praktischen Arbeit. Des Weiteren danke ich Prof. Peter Kämpfer für die Durchführung der zahlreichen Analysen.

Ganz besonders aber danke ich meinen Eltern Simone Kleinhagauer und Wolfgang Blüthl, die mir mein Studium erst ermöglicht haben und mich immer unterstützt haben, sowie meiner restlichen Familie, meinen Freunden und Studienkollegen, dafür, dass sie immer für mich da waren.

Inhalt

Einleitung.....	3
Phylogenetische Methoden	5
Chemotaxonomische Methoden.....	7
Problemstellung	9
Material und Methoden	10
Bakterien	10
Nährmedien.....	11
Primärtests	12
Gram-Färbung	12
Zucker Fermentation	13
SIM Test	13
KOH Test	13
Katalase Test.....	14
API Coryne	14
Chemotaxonomische Untersuchungen	14
Analyse der Polyamine	14
Analyse von Chinonen	15
Analyse polarer Lipide	16
Analyse der Mykolsäuren	17
Nachweis der Isomere der Diaminopimelinsäure	19
Analyse der Fettsäuren.....	19
Molekularbiologische Untersuchungen	20
16S rRNA.....	20
ERIC PCR	21
BOX PCR.....	21
MLST	22
Ergebnisse und Diskussion	25
<i>Corynebacteria</i>	25
Isolat W7.....	25
Isolat W8.....	25

Isolat 812CH.....	28
Isolat 200CH.....	30
ERIC-PCR	35
BOX-PCR	35
<i>Corynebacteria</i> MLST.....	36
<i>Pasteurellaceae</i>	37
Isolat 38	37
Isolat 2028	39
Isolat 1387	43
Isolat 2805	45
Isolat 2425	47
Diverse.....	53
Isolat 2872-2	53
Isolat 2872-3	55
Isolat 2272/2.....	57
Zusammenfassung.....	58
Abstract	59
Anhang	61
16S Sequenzen	61
MLST Sequenzen	65
<i>Corynebacteria</i>	65
<i>Pasteurellaceae</i> :	68
Literatur	72
Manuskripte und Publikationen:.....	76

Einleitung

Für die Betrachtung und somit Erforschung der Bakterien war die Erfindung des Mikroskops durch Anton van Leeuwenhoek im 17. Jahrhundert ein großer Meilenstein. Der in Delft lebende Amateur-Linsenschleifer konnte durch die Betrachtung seines Speichels kleine Tiere entdecken, bei denen es sich, wie sich später herausstellte, um Bakterien handelte [1]. Auch vor Leeuwenhoeks Entdeckung gab es bereits die Erkenntnis der Übertragbarkeit der Erreger von einem Lebewesen auf ein anderes. Allerdings war man früher der Meinung, dass Lebewesen jederzeit spontan und direkt aus totem Material entstehen können. Die Rede ist von der sogenannten Urzeugungslehre, die aber schließlich durch den französischen Chemiker Louis Pasteur endgültig widerlegt werden konnte, indem er bewies, dass Leben nur weitergegeben werden kann, jedoch nicht „de novo“ entstehen kann [2].

Bakterien sind Kleinstlebewesen ohne Zellkern und ohne membranumhüllte Organellen und gehören daher zur Gruppe der Prokaryoten [3]. In den späten 1970er Jahren wurde durch Erkenntnisse von Woese, der sich mit der ribosomalen Ribonukleinsäure beschäftigte, herausgefunden, dass es nicht nur die zwei großen Gruppen der Prokaryoten und Eukaryoten gibt, sondern dass sich die Prokaryoten in Eubakterien und Archeabakterien aufspalten [4, 5]. Und so war es auch Woese der 1990 die Unterteilung der Organismen anhand der 16S rRNA in drei Reiche vorschlug: Bacteria (eubacteria), Archea (archeabacteria) und Eucarya (eukaryotes) [6]. Diese Unterteilung ist bis heute gültig.

Mit der geschätzten Nummer von $4-6 \times 10^{30}$ Individuen sind Prokaryoten die zahlreichsten Organismen der Erde [7] und auch wenn die Zahl an Spezies- Neubeschreibungen kontinuierlich steigt, haben molekulare, kultur-unabhängige Methoden gezeigt, dass wir nur eine kleine Fraktion der Diversität kennen. Am 10. Mai 2011 betrug die Zahl der beschriebenen Bakterien 10706, die in 2010 Genera und 291 Familien eingeordnet waren. Wobei die Mehrzahl der neu beschriebenen Arten im International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology veröffentlicht werden [8]. In der Liste: „List of procaryotic names with standing in nomenclature“ kann man alle bis jetzt beschriebenen Arten finden.

Ein Problem bei der Beschreibung neuer Arten ist es zu definieren, was denn überhaupt eine neue Art ist. Das am meisten akzeptierte Konzept ist das sogenannte „phylo-phenetic species“

Konzept. Eine Art ist somit ein monophyletisch und genomisch kohärentes Cluster von individuellen Organismen (Stämme) die ein hohes Maß an Ähnlichkeiten in vielen verschiedenen und voneinander unabhängigen Eigenschaften besitzen [9]. Das bedeutet, dass einerseits eine neue Genospezies, die sich nur anhand ihres Erbmaterials voneinander unterscheidet, alleine damit nicht als neue Art beschrieben werden kann. Andererseits sind auch die in der Diagnostik üblichen phänotypischen und chemotaxonomischen Methoden, die anschließend noch ausreichend beschrieben werden, unzureichend um eine neue Art zu beschreiben, aber beide zusammen erlauben eine ausreichend beschreibende Information für die Definition einer neuen Spezies.

Die Taxonomie befasst sich somit mit der Klassifizierung der Mikroorganismen anhand ihrer genetischen und phänotypischen Eigenschaften und deren anschließenden Benennung. Die Benennung und taxonomische Einordnung ist auch die Voraussetzung für die Identifizierung der Mikroorganismen, die sogenannte Diagnostik, welche besonders im medizinischen Bereich eine große Rolle spielt, da es dort besonders wichtig ist zu wissen, mit welchen Bakterien man es zu tun hat. Denn zu wissen mit welchem Erreger man es zu tun hat ermöglicht eine entsprechende Behandlung und eine Verhinderung des Ausbreitens eines Erregers.

Der menschliche Körper besteht aus 10^{14} Zellen von denen nur 10 % körpereigene Zellen sind, die restlichen 90% gehören zur Mikroflora [10]. Natürlich sind nicht alle Bakterien pathogen, im Gegenteil, der Großteil der Bakterien die unseren Körper besiedeln lösen keine Krankheiten aus und werden somit als Normalflora bezeichnet. Auch wenn der Begriff Normalflora oft benutzt wird, ist er dennoch etwas irreführend, da die Mikroflora je nach Körperregion, Alter, Ort, Gesundheitsstatus und Ernährung sehr variiert [11, 12]. Außerdem gibt es einige Bakterienarten, die sowohl pathogen sein können oder auch völlig harmlos. Ein Beispiel dafür ist *Helicobacter pylori*, ein Bakterium welches zu Magengeschwüren und Neoplasien führen kann, aber auch bei 60% der gesunden Wirte gefunden werden konnte und somit wohl nicht immer zu Magenbeschwerden führt [13-15].

Bakterien spielen aber nicht nur in der Humanmedizin eine sehr wichtige Rolle, auch in der Veterinärmedizin sind Bakterien und somit die Diagnostik nicht mehr wegzudenken. Besonders

im Bereich der Nutztiere und im Lebensmittelbereich ist eine ständige Überwachung der Mikroflora von Vorteil. In der Massentierhaltung kann die Information über vorhandene Arten in speziellen mikrobiologischen Habitaten, wie den Rindermagen, sogar die Effizienz der Futterverwertung steigern [16].

Leider ist die Literatur im Bereich Normalflora bei Tieren eher spärlich und meistens sehr alt. Kommt es nun aber zu einer Infektion wird in Folge einer veterinärmedizinischen Behandlung meistens eine Probe entnommen, die der Tierarzt dann zu einem mikrobiologischen Labor schickt, indem die Probe untersucht wird. Diese Probe enthält neben den Erreger der Infektion meistens auch noch Begleitflora, die oft noch nicht taxonomisch eingeordnet wurde. Ob dies der Fall ist wird zumeist durch eine Analyse der 16S rRNA Gensequenz und anderer phänotypischer Eigenschaften versucht herauszufinden. Wenn sich nun herausstellt, dass es sich bei der Begleitflora um noch nicht beschriebene Arten handelt, beginnt man diese Stämme auf molekulare, physiologische und chemotaxonomische Art zu untersuchen um sie danach taxonomisch einzuordnen.

Phylogenetische Methoden

Die 16S rRNA Sequenzanalyse hat sich deshalb als Standardtechnik in der Beschreibung neuer Arten in Bakterientaxonomie bewährt, da sie in allen Bakterien vorkommt und immer dieselbe Funktion hat, und hoch konserviert ist. Das phylogenetische Rückgrat des taxonomischen Systems kann man also durch den Vergleich der 16s rRNA Gensequenz erhalten [17]. Wenn diese jedoch nicht ausreicht um einen neue Art abzugrenzen ist noch immer die DNA:DNA Hybridisierung der Goldstandard in der Bakterientaxonomie.

Da die rRNA-Gene sehr in der Evolution konserviert sind, zeigen andere Gene, die nicht so konserviert sind, eine bessere Möglichkeit zur Diskrimination und daher eine feinere taxonomische Auflösung. Diese feinere Auflösung ergibt sich dadurch, dass die Sequenzunterschiede auch bei näher Verwandten Arten oder sogar bei Vertretern derselben Art etwas größer sind und man daher trotzdem noch Aussagen zur Verwandtschaft machen kann. Ein Beispiel dafür sind die sogenannten „house-keeping“ Gene, sie sind bis zu einem gewissen Grad universell und gehören zum Kern des Genoms.

Dieses sogenannte MLST (Multi Locus Sequence Typing) wurde ursprünglich dafür verwendet um Gruppen von Prokaryoten auf einem infra-spezifischen Level zu Untersuchen und wurde daher vor allem für epidemiologische Studien angewendet [18]. Wenn man Multilokus-sequenzieren hingegen verwendet um Arten oder sogar Genera damit voneinander zu unterscheiden und taxonomische Informationen zu erhalten wird von MLSA gesprochen (Multi Locus Sequence Analysis) [19].

Die sogenannten Fingerprinting Methoden, die zur Erstellung von genomischen Fingerabdrücken (Fingerprints) herangezogen werden, können ebenfalls zur Verwandtschafts-Klärung verwendet werden. Die verwendeten Primer führen zu unterschiedlich langen PCR Amplifikaten, da die Primer unspezifisch sind oder sich gegen repetitive Elemente richten und somit verschiedene Bandenmuster (Fingerprints) erzeugen, wenn man die PCR Produkte auf einem Agarosegel auftrennt [20]. Zwei Beispiele der Fingerprinting Methoden sind:

BOX PCR: das repetitive BOX Element wurde das erste Mal in *Streptococcus pneumoniae* entdeckt, dessen Genom ungefähr 25 von diesen BOX Einheiten enthielt. Die BOX Elemente bestehen aus drei Untereinheiten (BoxA, BoxB und BoxC) und sind 59, 45 und 50 Nukleotide lang [21]. Der Primer, der meistens für die BOX PCR verwendet wird, bindet in der boxA Untereinheit, welche auch in anderen Bakterienarten konserviert vorkommt [22].

Die ERIC PCR (Enterobacterial repetitive intergenic consensus): ERIC Sequenzen sind 127Bp lange imperfekte Palindrome und wurden, wie der Name schon sagt, das erste Mal in Enterobakterien entdeckt, und befinden sich in den Regionen zwischen den Genen (intergenic) [23]. Es wurde aber gezeigt, dass sich diese repetitiven Sequenzen auch in anderen Bakteriengruppen wiederfinden [24]. Die Anzahl dieser Sequenzen unterscheidet sich je nach Spezies.

Chemotaxonomische Methoden

Im Rahmen der chemotaxonomischen Methoden werden das Vorhandensein polarer Lipide, Fettsäuren, Chinone, Peptidoglykanstruktur und Polyamine analysiert. Die polaren Lipide befinden sich in der Cytoplasmamembran und sind als Lipiddoppelschicht angeordnet. Die häufigsten polaren Lipide, die in Bakterien vorkommen sind Phospholipide, Glycolipide und Glycophospholipide und Aminolipide [25]. Die meisten Bakterien besitzen eine komplexe Mischung an polaren Lipiden, von denen die chemische Struktur meistens noch nicht analysiert wurde. Aufgrund der verschiedenen Färbungen für diverse Lipidgruppen und dem zweidimensionalen Laufverhalten ergeben sich Lipidmuster, die miteinander verglichen werden können und somit Hinweise zur Artzugehörigkeit geben können.

Ein weiteres charakteristisches Merkmal sind die bereits erwähnten respiratorischen Chinone. Sie kommen in der Plasmamembran vor und spielen eine wichtige Rolle im Elektronentransport und bei der oxidativen Phosphorylation. Aufgrund der strukturellen Variation (Sättigung, Hydrogenierung und Länge der Isoprenoid Einheiten) haben sie aber auch einen hohen Stellenwert in der Bakteriensystematik eingenommen. Ubiquinone kommen ausschließlich in den Klassen der *Alpha*-, *Beta*- und *Gammaproteobacteria* vor, zum Teil zusammen mit Menaquinonen.

Menaquinone bzw. ihre Derivate findet man hingegen bei allen anderen respiratorischen Bakterien, wobei auch hier bestimmt Quinone spezifisch für bestimmte Gruppen von Bakterien sind. Sogenannte Demethylmenaquinone kommen zum Beispiel, zusätzlich zu Menaquinonen und Uniquinonen bei Mitgliedern der *Pasteurellaceae* vor [26, 27].

Peptidoglykan, welches für die Form der Bakterien zuständig ist und sie vor osmotischer Disruption schützt [28], kommt sowohl bei Gram-positiven als auch bei Gram-negativen Bakterien vor. Wobei der Anteil an Peptidoglykan bei Gram-positiven Bakterien 30-70% ausmacht und bei Gram-negativen Bakterien unter 10%. Während die Struktur des Peptidoglykans bei allen Gram-negativen Bakterien gleich ist [27], gibt es eine große Diversität in der Struktur des Peptidoglykans bei Gram-positiven Bakterien. Peptidoglykan ist ein Heteropolymer das aus Glykan-Strängen besteht, die über Peptidketten miteinander verbunden sind. Der sogenannte A Typ hat eine Verknüpfung zwischen den Aminosäuren 3 und 4 der

gegenüberliegenden Peptidseitenketten, während der B Typ eine Verknüpfung zwischen den Aminosäuren 2 und 4 der gegenüberliegenden Peptidseitenketten zeigt. Des Weiteren können die Peptidseitenketten direkt verknüpft sein oder über eine Interpeptidbrücke. Welche Diaminosäuren vorkommen, zusammen mit der Art der Verknüpfung der Peptidseitenketten, ergibt dann das Klassifikationssystem des Peptidoglykans.

Der Aufbau der Fettsäuren als Bestandteil der polaren Lipide ist ebenfalls ein oft Genus- bzw. Art-spezifisches Merkmal. Oft sind die Fettsäuren sogar das ausschlaggebende Merkmal um zwei Arten voneinander zu unterscheiden, die sich sonst sehr ähnlich sind. Es unterscheiden sich die Länge der Kohlenstoffkette (Anzahl der C-Atome), das Vorhandensein einer Hydroxidgruppe (-OH), ob sich der Methylrest in iso- oder anteiso Position befindet und ob die Position der Doppelbindung *cis*- oder *trans*- ist, außerdem gibt es cyclopropan Fettsäuren und ω -zyklische Fettsäuren. Mehrfach ungesättigte Fettsäuren sind eher selten wurden aber auch bei Bakterien gefunden, die bei niederen Temperaturen wachsen sowie auch bei Cyanobakterien [29-31]. Ein besonderer Fall der Fettsäuren sind die Mykolsäuren, die ausschließlich bei den Vertretern der *Corynebacteriales* vorkommen. Während die *Corynebacteria* Mykolsäuren mit 22-36C Länge besitzen, kommen bei den Mycobakterien Ketten von 60-90C vor.

Polyamine kommen mit sehr unterschiedlichen Konzentrationen in fast allen Prokaryoten vor und eignen sich daher ausgezeichnet zur Unterscheidung zwischen verschiedenen Arten. Allerdings ist die Menge der vorkommenden Polyamine stark von der Wachstumsphase abhängig, deshalb ist es wichtig sie spätlogarithmisch zu ernten. Es wurde gezeigt, dass Polyamine mit DNA interagieren um sie zu stabilisieren und die Expression verschiedener Gene zu beeinflussen [32] [27]. Oft ist das Vorkommen von verschiedenen Polyaminen charakteristisch für bestimmte Gruppen oder Familien von Bakterien. *Alphaproteobacteria* enthalten hauptsächlich Spermidine (SPD) und/oder *sym*-Homospermidine (HSPD), und oft, in hohen Mengen Putrescine (PUT). *Betaproteobacteria* hingegen enthalten meistens 2-hydroxy-Putrescine (HPUT), Putrescine und vernachlässigbare Mengen an Spermidine. Bei *Gammaproteobacteria* kann man hingegen eine höhere Variabilität erkennen.

Auch das Verstoffwechseln unterschiedlicher Nährstoffe oder verschiedene Wachstumsbedingungen können verwendet werden um Bakterien-Arten miteinander zu vergleichen.

Problemstellung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden in der veterinärmedizinischen Diagnostik isolierte Bakterien-Stämme zuerst bearbeitet und dann taxonomisch eingeordnet. Solche Stämme, bei denen 16S rRNA Gensequenz Analysen den Verdacht auf eine neue Art nahelegten, wurden weiterbearbeitet und die phänotypischen und genotypischen Merkmale wurden mit jenen Merkmalen der Referenzstämmen verglichen um gegebenen Falls eine Aussage über die Spezies Zugehörigkeit treffen zu können.

Material und Methoden

Bakterien

Die untersuchten Bakterienisolate wurden von Igor Loncaric bzw. Joachim Spargser (Institut für Bakteriologie, Mykologie und Hygiene – Veterinärmedizinische Universität Wien) bereitgestellt.

Tabelle 1: Auflistung, Herkunft und Sequenzierung der 16S rRNA Gensequenz der untersuchten Bakterienisolate aus der veterinärmedizinischen Diagnostik

Isolat	Tier	16S rRNA Sequenzierung durchgeführt von
W7	Waldrapp	Joachim Spargser
W8	Waldrapp	Joachim Spargser
200CH	Waldrapp	Joachim Spargser
812CH	Waldrapp	Joachim Spargser
38	Katze	Forward: Tanita Kleinhagauer Reverse: Igor Loncaric
2028	Pferd	Tanita Kleinhagauer
1387	Katze	Forward: Tanita Kleinhagauer Reverse: Igor Loncaric
2805	Huhn	Tanita Kleinhagauer
2425	Huhn	Tanita Kleinhagauer
2872-2	Fisch	Forward: Igor Loncaric Reverse: Tanita Kleinhagauer
2872-3	Fisch	Forward: Igor Loncaric Reverse: Tanita Kleinhagauer
2272-2	Alpaka	Tanita Kleinhagauer

Nährmedien

Difco PPLO Broth (BD Becton-Dickinson): 21g des PPLO Pulvers wurden in 700 ml deionisiertem Wasser gelöst und zur Herstellung von Agarplatten wurden, pro Liter Medium, noch 16g Agar Bacteriological (Agar No.1) von Oxoid hinzugegeben. Der Agar oder die Bouillons wurden bei 121°C für 20 Minuten autoklaviert. Nach dem Abkühlen wurden die Agarplatten unter dem Abzug gegossen.

PYE: Peptone Yeast Extract: Es wurden 3g Trypton/Pepton aus Casein (pankreatisch verdaut, für die Mikrobiologie, von ROTH) und 3g Hefeextrakt granuliert für die Mikrobiologie (Merck) in einem Liter deionisiertem Wasser gelöst. Ein pH-Wert von ca. 7,2 wurde eingestellt. Das Medium wurde für 20 Minuten bei 121°C autoklaviert. Für die Agar-Platten wurden 16g/L Agar Bacteriological (Agar No.1) von Oxoid verwendet und nach Abkühlen wurden die Platten unter dem Abzug gegossen.

BHI: Bacto Brain Heart Infusion, Porcine (BD Becton-Dickinson): 37g des BHI Pulvers wurden in einem Liter deionisiertem Wasser gelöst und danach bei 121°C für 20 Minuten autoklaviert. Für die Agar-Platten wurden 16g/L Agar Bacteriological (Agar No.1) von Oxoid verwendet. Nach dem Abkühlen wurden die Platten unter dem Abzug gegossen.

Saline: 0,89% NaCl

Supplementierung mit NAD: Zur Generation von Biomasse für die chemotaxonomischen Analysen eines bestimmten *Pasteurellaceae* Isolates (2028) wurde pro Liter Medium mit 10 mg NAD supplementiert. Dazu wurde NAD in bidestilliertem Wasser gelöst und die passende Menge wurde nach dem Autoklavieren des Mediums aseptisch, durch steril filtrieren in das Medium hinzugegeben.

Herstellung Agarwasser: 10g Agar Bacteriological (Agar No.1) von Oxoid wurde in destilliertem Wasser suspendiert und für eine halbe Stunde gerührt. Danach wurde der Agar im Wasser für 30 Minuten bei 10000 UpM zentrifugiert, damit sich der Agar absetzt. Der Überstand wurde abgegossen und separat aufbewahrt. Die Prozedur wurde zweimal wiederholt, und mit dem ersten Überstand vereint.

Die Verwendeten Blutagarplatten enthielten 5% Schafblut (BD Becton-Dickinson)

Herstellung der Biomasse und Konservierung

Die aus der Diagnostik stammenden isolierten Stämme wurden zuerst auf Blutagarplatten bzw. Kochblutagarplatten (2028) kultiviert und dann auf geeignetem Medium und Temperatur weiter kultiviert.

Zur Anzucht der Biomasse wurden 20ml einer Vorkultur mit Biomasse von der Agarplatte beimpft und solange auf dem Schüttler inkubiert, bis eine eindeutige Trübung zu erkennen war. Je nach Intensität der Trübung wurde dann eine geeignete Menge entnommen um eine 300ml Hauptkultur damit zu beimpfen. Wenn diese unter denselben Bedingungen wie die Vorkultur ausreichend gewachsen ist, wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet. Nach 30 Minuten bei 8000 UpM wurde der Überstand abgegossen und das Pellet in Saline resuspendiert und abermals für 10 Minuten bei 1200 UpM zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut abgegossen und das Pellet wurde lyophilisiert. Für das Isolat 1387 wurde, da das Wachstum in Flüssigkultur nur sehr spärlich war, für die Extraktion der Chinone und Lipide hier feuchte Biomasse von der Platte, anstelle von lyophilisierter Biomasse verwendet.

Zur Konservierung der bearbeiteten Bakterienstämme wurden Cryokulturen angelegt. Die Cryoröhrchen (Roth) wurden mit einer Impföse voll Biomasse beimpft und bei -80°C aufbewahrt.

Primärtests

Gram-Färbung

Ein Tropfen Bakteriensuspension in Saline wurde auf einen Objektträger getropft und nach Lufttrocknung hitzefixiert. Danach wurde eine Minute mit Kristallviolett gefärbt, anschließend wurde der Farbstoff abgegossen und mit Lugol'scher Lösung nachgespült. Das Präparat wurde mit Lugol überschichtet und das Lugol wurde für 2-3 Minuten einwirken gelassen. Mit der Entfärbelösung wurde anschließend gespült bis das Präparat keinen Farbstoff mehr freigab. Nach kurzem Spülen mit Wasser erfolgte eine Gegenfärbung durch Überschichten mit Safranin für 2 Minuten. Wieder wurde die Färbelösung mit Wasser abgespült und das Präparat wurde

zwischen Löschpapier getrocknet. Die Mikroskopische Untersuchung erfolgte mit dem Ölimmersionsobjektiv.

Lösungen:

- Kristallviolettlösung: Grams Kristallviolettlösung (Merck)
- Lugol'sche Lösung: 1g Jod, 2g Kaliumiodid gelöst in 300 ml Wasser
- Safraninlösung: Grams Safraninlösung (Merck)
- Entfärbelösung: Ethanol (96%ig): Aceton (1:1)

Zucker Fermentation

15 g Phenolred Broth Pulver (Merck) wurde in einem Liter deionisiertem Wasser gelöst und in 2 ml Aliquots auf Glasröhrchen verteilt. Danach wurden die Röhrchen für 20 Minuten bei 121 °C autoklaviert und verschiedene sterile Zuckerlösungen (10mg ml^{-1}) wurden anschließend aseptisch hinzugegeben. Danach wurden die Röhrchen mit 50 μl einer Bakteriensuspension beimpft und bei 28°C bzw. 37°C inkubiert. Ein positives Ergebnis erkennt man an der Verfärbung ins gelbliche durch die Säureproduktion. Für das Isolat 2805 wurde zur Herstellung der Phenolrotbouillons, PPLO Flüssigmedium mit 0,0018% Phenolrotpulver versetzt.

Folgende Zucker wurden supplementiert: Mannose, Raffinose, Melibiose, Maltose, Lactose, Glucose, L+Arabinose und D-Arabinose, Melezitose, Glucosamin, Mannit, N-Acetyl-D Glucosamin, Saccharose, Rhamnose, Galactose und Trehalose

SIM Test

30g SIM Medium (Merck) wurde in einem Liter deionisiertem Wasser gelöst, durch Erhitzen in der Mikrowelle, danach wurden jeweils 2 ml in Epruvetten gefüllt und danach für 20 Minuten bei 121°C autoklaviert. Die SIM Tests wurden mit dem Stichverfahren beimpft. Nach der Auswertung der Motilität und der Schwefelproduktion wurde der Test mit Indol überschichtet und nach 10 Minuten ausgewertet.

KOH Test

Es wurde ein kleiner Tropfen 3% ige KOH-Lösung auf einen Objektträger gegeben und eine Impföse voll Biomasse darin verrührt. Da Gram-negative Bakterien eine viel dünnere Peptidoglykanschicht haben, kann diese von KOH leicht zerstört werden und das Innere der

Zelle, inklusive DNA, kann austreten. Wenn die Suspension Fäden zieht ist das Ergebnis positiv. Ein positives Ergebnis bedeutet, dass es sich um Gram-negative, und ein negatives Ergebnis, dass es sich um Gram-positive Bakterien handelt.

Katalase Test

Ein Tropfen H_2O_2 wird auf die Biomasse getropft. Katalase kommt bei Bakterien vor, die in einer Umgebung mit Sauerstoff vorkommen um Sauerstoffradikale zu neutralisieren indem es diese zu Wasser und Sauerstoff aufbricht. Die rapide Freisetzung von Sauerstoff führt zu Bläschenbildung und zeigt somit ein positives Ergebnis.

API Coryne

Der API Coryne Test wurde wie in der Anleitung beschrieben durchgeführt. Die Auswertung der Tests erfolgte auf visuelle Art, nach 24h Inkubation wurden die Tests täglich bis zu einer Woche, jeden Tag ausgewertet.

Chemotaxonomische Untersuchungen

Analyse der Polyamine

Die Biomasse für die Extraktion der Polyamine wurde in der späten logarithmischen Wachstumsphase geerntet (ca. 70% der logarithmischen Phase). Dazu wurde entweder eine Wachstumskurve erstellt oder, wenn eine Messung der Optischen Dichte aufgrund von sichtbaren aggregierten Zellen nicht möglich war, zwei Kolben optisch miteinander verglichen. Geerntet wurde, wenn gerade noch ein Unterschied zwischen den beiden Kolben zu erkennen war, damit wurde garantiert, dass die Bakterien hier noch nicht in der stationären Phase waren.

Zur Analyse [33, 34] wurden ca. 40mg der lyophilisierten Biomasse eingewogen. Dazu wurde man 1ml HClO_4 (0,2M) und 1 μmol (für Gram-negative Bakterien) bzw. 20nmol (für Gram-positive Bakterien) interner Standard (1,8-Diaminooctan, 20 $\mu\text{mol/ml}$ bzw. 0,4 $\mu\text{mol/ml}$ H_2O) pro 40mg Biomasse gegeben. Die Zellsuspension wurde für insgesamt 30 Minuten bei 100 °C inkubiert wobei nach 15 Minuten gut durchgemischt (gevortext) wurde. Zum Pelletieren der Zellreste wurde die Zellsuspension in eine Eppendorfcap überführt und für 5 Minuten bei 13000 UpM zentrifugiert. Dann wurden 200 μl vom Überstand in ein Pyrexröhrchen pipettiert und nacheinander wurden 300 μl Na_2CO_3 -Lösung (100mg/ml) und 800 μl Dansylchloridlösung (7,5

mg/ml in Aceton) dazugegeben. Das Röhrchen wurde fest verschlossen und für 20 Minuten bei 60 °C inkubiert. Nachdem dann 100 µl Prolinlösung (50 mg/ml H₂O) hinzugegeben worden waren, wurde es für weitere 10 Minuten bei 60°C inkubiert. Nach dem Abkühlen des Reaktionsgemisches auf 4°C wurden die dansylierten Polyamine durch Zugabe von 100 µl Toluol und kurzem, kräftigem Schütteln extrahiert und dann mittels HPLC analysiert (die HPLC Analyse wurde durchgeführt von Prof. H.-J. Busse).

Es wurde, über die Konzentration des internen Standards, die Konzentration der Polyamine pro Gramm trockener Biomassen berechnet (unter Berücksichtigung folgender Korrekturfaktoren: Hydroxyputrescin 2,8; Putrescin 1,4; Diaminopropan 1,8; Cadaverin 1,2; Spermidin 1,0; und Spermin 0,8;)

Analyse von Chinonen

Das Arbeiten hierfür wurde so gut wie möglich im Dunkeln und unter sauerstofffreier Atmosphäre durchgeführt. Für die Analyse [35, 36] wurden hierbei ca. 120mg lyophilisierte Biomasse in ein Röhrchen mit Schraubverschluss, mit innenliegender Teflondichtung, eingewogen. Zur eingewogenen Biomasse wurde noch ein kleiner Rührfisch und 3,0 ml Hexan:Methanol (1:2; v/v) gegeben und dann mit Stickstoff begast und fest verschlossen. Auf dem Magnetrührer wurde die Probe 30 Minuten gerührt und danach in ein Eisbad gestellt, bis eine Phasentrennung Methanol-Hexan zu beobachten war. Um eine Mischung Methanol:Hexan 1:1 (v/v) zu erreichen, wurde 1ml eiskaltes Hexan zur Probe dazugegeben und die Phasentrennung wurde durch 5 Minuten Zentrifugation in einem Glaszentrifugenröhrchen bei 3000 UpM beschleunigt. Die Hexanphase (oben) wurde mit einer Pasteurpipette abgehoben und in ein Glasröhrchen überführt. Zu der Methanolphase wurden zur weiteren Extraktion 2ml eiskaltes Hexan und 2 ml 0,3% NaCl-Lösung dazugegeben, sodass das Mischungsverhältnis Hexan:Methanol:0,3%NaCl gleich 1:1:1 (v/v/v) beträgt. Die Probe wurde ein weiteres Mal wie oben beschrieben zentrifugiert. Die obere Phase wurde mit der ersten Hexanfraktion vereinigt und die untere Phase mit dem Zelldebris wurde für die Extraktion der polaren Lipide aufbewahrt (mit Stickstoff begast und bei 4°C). Die Hexanphase wurde unter einem Stickstoffstrom eingedampft und dann in ca. 12µl 1-Chlorbutan-Methanol (1:9) gelöst und über HPLC analysiert. (Die HPLC Analyse wurde durchgeführt von Prof. H.-J. Busse)

Analyse polarer Lipide

Die von der Extraktion der Chinone aufbewahrt Methanolphase wurde für die Extraktion der polaren Lipide verwendet [35, 36]. Die Methanolphase mit dem Zellmaterial wurde mit 5,5 ml Chloroform/Methanol (2,5:3,0; v/v) verdünnt um eine Mischungsverhältnis Chloroform:Methanol:0,3% NaCl (1:2:0,8; v/v/v) zu erreichen. Die Mischung wurde in ein Fläschchen mit mindestens 15 ml Volumen gegeben, welches auch einen Schraubverschluss mit innenliegender Teflondichtung besitzt. Die Mischung wurde kurz mit Stickstoff begast, fest verschlossen und dann 15 Minuten auf 80°C erhitzt und dabei gelegentlich geschüttelt. Danach wurde die Mischung auf Raumtemperatur abgekühlt und, falls sich eine Hexanphase bildete, wurde eine kleine Menge Methanol dazugegeben. Das Zelldebris wurde durch Zentrifugation bei 3000 UpM für 5-10 Minuten pelletiert und der Überstand wurde abgehoben. Dieser wurde in ein Fläschchen überführt, welches 5 ml einer Mischung Chloroform:0,3%iges NaCl (1:1; v/v) enthält. Nach kurzem und kräftigem Schütteln wurde die Mischung in einem Glaszentrifugenröhrchen bei 3000 UpM für 5 Minuten zentrifugiert. Die untere Phase (Chloroform) wurde mit einer Pasteurpipette abgehoben und in ein gasdicht verschließbares Röhrchen überführt. Die Chloroformphase wurde unter einem Stickstoffstrom eingedampft und dann in 0,15 ml Chloroform:Methanol (2:1; v/v) gelöst.

Zur Analyse des Lipidprofils wurde eine kleine Menge der Probe in einem Möglichst kleinem Punkt in der linken Ecke eine Dünnschichtplatte (10x10 cm; zurechtgeschnitten aus 20x20 Merck 1.05554;) aufgetragen.

Laufmittel: 1.Dimension (Chloroform:Methanol:Wasser; 65:25:4; v/v/v)

2. Dimension (Chloroform:Methanol:Essigsäure:Wasser; 80:12:15:4; v/v/v/v)

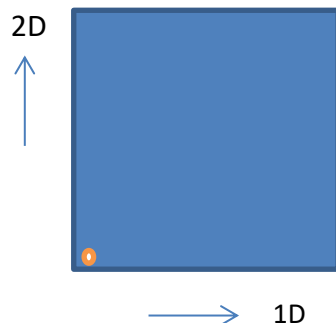


Abbildung 1:

In der Ecke der DC Platte wurde mittels einer Hamilton Spritze eine kleine Menge des Extraktes aufgetragen. In der ersten Dimension folgt die Laufrichtung dem Pfeil 1D und in der zweiten Dimension wird die Platte so gedreht, dass die Laufrichtung in der Richtung des Pfeiles 2D ist.

Nach dem Trocknen, für ca. 30 Minuten, wurde die Platte mit folgenden Sprayreagenzien besprüht:

- Molybdätophosphorsäure: Zusammengesetzt aus 5 g Molybdätophosphorsäure-Hydrat in 100 ml Ethanol_{absolut}, zur Detektion aller Lipide. Die Entwicklung erfolgte bei 120-160°C
- Molybdenum Blue spray reagent (Sigma): zur Detektion von Phospholipiden. Die Entwicklung erfolgte bei Raumtemperatur
- Ninhydrin: Zusammengesetzt aus 0,2 g Ninhydrin in 100 ml Ethanol_{absolut}, zur Detektion von Aminogruppen in den Lipiden. Dieselbe Platte wurde zuerst mit Ninhydrin besprüht und nach der Detektion mit Molybdenum Blue. Die Entwicklung von Ninhydrin erfolgte bei 100°C.
- α -Naphthol: Zusammengesetzt aus 8,4 ml Lösung a mit 5,2 ml H₂SO₄, 32,2 ml Ethanol_{absolut} und 3,2 ml destilliertes Wasser. Zur Detektion von zuckerhaltigen Lipiden. Die Entwicklung erfolgte bei 100°C. Um die Position der Glycolipidflecken besser zuordnen zu können wurde die Platte, nach sichtbar werden der positiven Flecken, bei 160°C weiterentwickelt, wobei dann nahezu alle Lipide sichtbar wurden (einbrennen).

Lösung a: 150 ml α -Naphthol mit 850ml Chloroform:Methanol (25:30, v/v)

Analyse der Mykolsäuren

Für die Extraktion [37] wurden 50 mg lyophilisierte Biomasse in 5 ml Methanol suspendiert und danach 5 ml Toluol und 200 μ l 98%ige Schwefelsäure dazugegeben. Das Probenröhrchen mit Schraubverschluss und innen liegender Teflondichtung wurde dicht verschlossen und nach kräftigem Schütteln bei 50°C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden 2 ml n-Hexan dazugegeben und nach dem Verschließen wieder kräftig geschüttelt. Nach der Phasentrennung wurde die Hexanphase, die die Mykolsäuren enthält abgehoben und in ein neues Röhrchen überführt und unter Stickstoffstrom eingedampft. Das Extrakt wurde mit 1 ml Hexan gelöst und davon 200 μ l auf eine DC-Kieselgelplatte (siehe polare Lipide) aufgetragen [38].

Das Laufmittel in der Chromatographie bestand aus Chloroform:Methanol:Wasser 65:25:4 (v/v/v). Detektiert wurde nach besprühen mit Molybdatophosphorsäure und Entwicklung bei 120°C

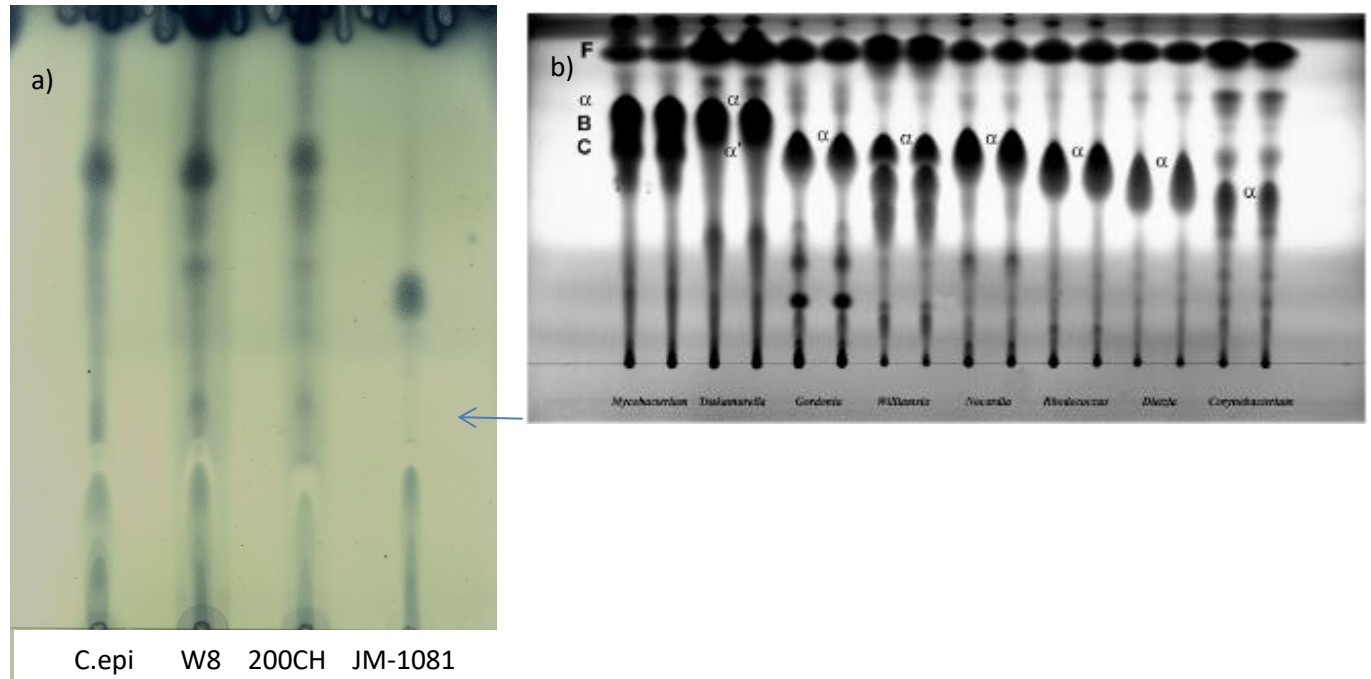


Abbildung2: a) Eindimensionale Dünnschichtchromatographie von verschiedenen Mykolsäuren enthaltenden *Actinobacteria* nach Entwicklung in Petroleum-Ether (95:5; v/v) $\alpha, \alpha' = \alpha$ -mycolates, α'' -mycolates; B=methoxymycolate; C=ketomycolate; F=nonhydroxylated fatty acids. [39] b) Mykolsäuren von W8; 200CH und *Corynebacterium epidermidicanis* 410^T mit JM-1081^T (*Sphingobacterium zeae*) als positive Kontrolle nach zweidimensionaler Dünnschichtchromatographie und Detektion mit Molybdatophosphorsäure.

Bei Abbildung A sehen Sie in folgender Reihenfolge: *Mycobacterium* (C 60-90) [40], *Tsukamurella* (C 64-78) [41], *Gordania* (C 46-66) [42], *Williamsia* (C 50-56) [43], *Nocardia* (C 46-60) [44], *Rhodococcus* (C 34-52) [42], *Dietzia* (C 34-38) [42] und *Corynebacterium* (30-36) [45]. Der blaue Pfeil zeigt die Lage der Mykolsäuren an, es konnten bei jedem Stamm Mykolsäuren nachgewiesen werden. JM-1081^T diente als Referenzstamm, da bei diesem bereits Mykolsäuren nachgewiesen werden konnten.

Nachweis der Isomere der Diaminopimelinsäure

Da die Isomere der Diaminopimelinsäure ausschließlich im Peptidoglykan vorkommen kann ihr Vorhandensein direkt in Ganzzellhydrolysaten nachgewiesen werden.

Für die Extraktion [46] wurden etwa 3-4 mg lyophilisierter Biomasse in einem Pyrexröhrchen in 200 µl 4M HCl suspendiert und dicht verschlossen bei 100°C für ca. 16h inkubiert. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde das Hydrolysat über Aktivkohle filtriert und danach bei 35°C unter einem Luftstrom eingedampft. Der Rückstand wurde in 200 µl H₂O (bidest) gelöst und erneut bei 35°C eingedampft. Um die Säure vollständig zu entfernen, wurde dieser Vorgang einmal wiederholt. Der Extrakt wurde dann in 100 µl H₂O suspendiert. Die Proben (2-3 µl) wurden punktförmig auf eine DC-Plastikfolie Cellulose (20x20 cm; Merck 5577) aufgetragen und in dem Laufmittelgemisch Methanol/Pyridin/H₂O/10 M HCl (320:40:70:10) aufgetrennt. Wenn die Laufmittelfront ca. 2/3-3/4 auf der Dünnschichtplatte erreicht hatte, wurde die Platte aus der Kammer herausgenommen und getrocknet, mit Ninhydrin besprüht und bei 100°C entwickelt. Als Vergleichssubstanz wurde Diaminopimelinsäure mit aufgetragen. Durch ihre R_f-Werte und ihre charakteristische Färbung nach 24-stündiger Aufbewahrung der Chromatogramme im Dunkeln ließ sich dann leicht der Nachweis für das Vorkommen der Isomere der Diaminopimelinsäure führen. Das Laufmittel trennt die optisch aktiven Isomere (LL bzw. DD) von der inaktiven *meso*-Diaminopimelinsäure. Da die im Handel erhältlichen Präparate ein Isomergemisch enthalten, treten zwei Flecken auf. Der Fleck mit dem höheren R_f-Wert entspricht der LL- bzw. DD-Form, mit dem niedrigeren R_f-Wert der *meso*-Form der Dpm.

Analyse der Fettsäuren

Die Analyse der Fettsäuren erfolgte von Prof. Dr. Dr. –Ing. Peter Kämpfer an der Justus-Liebig Universität Gießen.

Molekularbiologische Untersuchungen

Die Isolation und Aufreinigung der DNA aus den Zellen erfolgte mit dem UltraClean Tissue & Cell DNA Isolation Kit von MO BIO Laboratories. Die Isolation und Aufreinigung wurde durchgeführt wie vom Hersteller beschrieben. Anstelle des Verdauens mit Proteinase K wurden die Zellen 45 Minuten auf 60°C erhitzt und dabei geschüttelt.

Die verwendete Polymerase für alle im Zuge der Masterarbeit angewendeten PCR Methoden war der „ready to use“ Kit One Taq Quick Load® 2xMM mit Standard Buffer (England Bio Labs® Inc).

Primer und PCR-Programme:

16S rRNA

Die verwendeten Primer [47]: 27F: 5' AGAGTTTGATCMTGGCTCAG 3'
1492R: 5' TACGGYTACCTTGTTACGACTT 3'

Tabelle 2: PCR Reaktionsgemisch für die Amplifikation der 16S rRNA Gensequenz

Ansatz	60µl
H ₂ O	26,2 µl
One Taq Polymerase (Bio Labs)	30 µl
27f	0,65 µl
1492r	0,65 µl
DNA	2,5 µl

Das verwendete PCR Programm:

Start:	95°C	5min	
Denaturierung:	94°C	1:30min	} x30
Annealing:	55°C	1:30 min	
Elongation:	72°C	5 min	
Final Elongation	72°C	10 min	

ERIC PCR

Verwendete Primer [48]:

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

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

Tabelle 3: PCR-Reaktionsansatz für die Amplifikation der ERIC-Sequenz

Ansatz	30 µl
H2O	5,5 µl
One Taq Polymerase	15 µl
ERIC1R	4 µl
ERIC2	4 µl
DNA	1,5 µl

PCR Programm:

Start:	95°C	7min	
Denaturierung:	4°C	1min	} x30
Annealing:	52°C	1min	
Elongation:	65°C	8min	
Final Elongation:	65°C	15min	

BOX PCR

Verwendeter Primer: BOX-A1R: 5' CTA CGG CAA GGC GAC GCT GAC G 3' [49]

Tabelle 4: PCR Reaktionsgemisch für die Amplifikation der BOX Elemente

Ansatz	30 µl
H2O	9,5 µl
One Taq Polymerase	15 µl
BOX-A1R	4 µl
DNA	1,5 µl

PCR Programm:

Start:	92°C	2min	
Denaturierung:	92°C	30sec	} X35
Annealing:	40°C	1min	
Elongation:	72°C	120sec	
Final Elongation:	72°C	5min	

MLST

Um mehr über die genetische Verwandtschaft der untersuchten *Corynebacterium*- und *Pasteurellaceae* -Arten sagen zu können wurden die Sequenzen verschiedener house-keeping Gene untersucht. Dafür wurden Alignments mit der Software clustalx [50], mit bereits vorhandenen Sequenzen der untersuchten „house-keeping“ Genen, verschiedener, nahe verwandter, Arten erstellt. Anhand dieser Alignments wurden Primer designet, die mithilfe von NetPrimer analysiert wurden und dann bei Sigma-Aldrich bestellt wurden.

Es wird jeweils eine Distanzmatrix der Nukleotidsequenz und eine Distanzmatrix der Aminosäuresequenz angezeigt. Die Sequenzen wurden über BLAST [51] miteinander verglichen. Die Übersetzung der Nukleotidsequenz in die Proteinsequenz erfolgte über das ExPASy translate tool des bioinformatic resource portal [52].

Die Primer wurden vor Verwendung auf 50 ppm verdünnt.

Tabelle 5: Reaktionsgemisch für die Amplifikation der verschiedenen „housekeeping“ Gene

Ansatz	60 µl
H2O	22,5 µl
One Taq Polymerase	30 µl
Primer1	2,5 µl
Primer2	2,5 µl
DNA	2,5 µl

PCR Programm 50TD: dieses Programm wurde für alle Primer verwendet

Start:	94°C	5 min	
Denaturierung:	94°C	30sec	
Annealing:	55°C	30sec	X5
Elongation:	72°C	1min	
Denaturierung:	94°C	30sec	
Annealing:	50°C	30sec	X25
Elongation:	72°C	1min	
Final Elongation:	72°C	10min	

Corynebacteria:

fusA (translation elongation factor aEF-2):

Primer: 401f: 5' GCTTCG TSAACAAGATGGAC 3'
1516r: 5' RGTCTGCTTCTTGTGGGTG 3'

rpoC (RNA Polymerase subunit beta):

Primer: 1089f: 5' MGAGATCATCGTGAAYAACG 3'
2557r: 5' CRCGGAAGGAGGTCTTRATC 3'

dnaG (DNA primase): Dieses Primerpaar ist leider unspezifisch und zeigt daher kein einheitliches Amplifikat.

Primer: 368f: 5' CMATGCGTTACACCGAGTSC 3'
1707r: 5' CRCGRCCGWAGTTGGTGAAG 3'

gyrA (DNA gyrase subunit A):

Primer: 983f: 5' SAACAACCTSTWYAAGCACTC 3'
1720r: 5' CCGWAGTTGGTGAAGAASARG 3'

Pasteurellaceae:

rpoB (RNA Polymerase β -UE):

Primer:

2359f: 5' GGTCCTTCAACAGAYTTAGG 3'

3348r: 5' GTTCTAAGATCTGACCGATG 3'

Primer für 2425

Forward: 5' TGGTTCAGGAAGATCGTTTC 3'

Reverse: 5' ACGTTTCACCGCAAGATATAC 3'

atpD (ATP synthase CF1 delta subunit):

Primer: 114f: 5' TGARGTKCAACAACAATTAGG 3'

1330r: 5' CCATRTAGAAYGCTTGTTTC 3'

Gelelektrophorese der PCR-Produkte und anschließende Aufreinigung:

Zur Visualisierung der Amplifikate wurde ein 2%iges Agarosegel verwendet (SeaKem LE Agarose von Lonza) in 1xTBE Puffer. Es wurden jeweils 6 μ l des Amplifikates und 4,5 μ l des Markers auf das Gel geladen. Als Marker wurde der 2-log DNA Ladder von New England BioLabs Inc. verwendet. Die Auftrennung erfolgte bei 180V für ca. 75 Minuten. Das Agarosegel wurde nach der Auftrennung eine halbe Stunde im Ethydiumbromid-Bad (2,5g/ml) gefärbt und danach für 15 Minuten im Wasserbad entfärbt.

Bevor die Amplifikate zur Sequenzierung geschickt wurden erfolgte noch eine enzymatische Aufreinigung der PCR Produkte im Thermozykler zuerst 5 Minuten bei 37°C und dann 10 Minuten bei 80°C. Die dafür verwendeten Enzyme waren eine Exonuclease und Shrimp-Alkaline-Phosphatase (beide von New England BioLabs Inc.). Es wurden jeweils 1,5 μ l pro Enzym (also insgesamt 3 μ l) mit 7,5 μ l PCR Produkt vermischt.

Zur Sequenzierung wurde jeweils 5 μ l Wasser mit 3 μ l Primer und 7 μ l gereinigtem PCR Produkt vermischt und beim Sequenzierservice eingereicht. Die nahezu komplett sequenzierten 16s-rRNA Sequenzen, wurden mit Genbank Einträgen verglichen, verwendet wurde der EzTaxon-e Server [53] oder BLAST (NCBI) [51]. Um die Sequenzen der „housekeeping“ Gene miteinander zu vergleichen wurde ebenfalls BLAST (NCBI) verwendet. Außerdem wurden die Nukleotidsequenzen mit dem ExPASy translate tool in Aminosäuresequenzen translatiert und diese wurden ebenfalls über BLAST miteinander verglichen.

Ergebnisse und Diskussion

Corynebacteria

Isolat W7

Das Isolat stammt von einem Abstrich der Choane (paarige Öffnung der Nasenhöhlen) eines Waldrapps. Das Wachstum war sehr spärlich, am besten wuchs das Isolat dennoch auf BHI-Agar und -Bouillon bei 37°C. Wachstum konnte außerdem bei 28°C nachgewiesen werden, allerdings noch schwächer als bei 37°C. Die Kulturen waren sehr klein (0,5-1mm) und durchscheinend, weißlich. Der SIM Test zeigte ausschließlich ein Wachstum entlang des Stichkanals, also keine Trübung des Mediums um den Stichkanal herum und keine schwarze Verfärbung. Der KOH Test war negativ und weist somit auf Gram-positive Bakterien hin, der Katalase Test war hingegen positiv.

Aufgrund des spärlichen Wachstums war es nicht möglich ausreichend Biomasse zu ernten und daher war auch keine weitere Bearbeitung dieses Stammes möglich. Auch im API-Coryne Test und beim Test auf Säurebildung aus Zuckern in Phenolrot-Bouillons war kein ausreichendes Wachstum möglich, um eine Aussage machen zu können.

Isolat W8

Das Isolat stammt ebenfalls von einem Abstrich der Choane (paarige Öffnung der Nasenhöhlen) eines Waldrapps. Wachstum gab es auf ColumbiaIII Agar supplementiert mit 5% Schafblut. Außerdem wuchs das Isolat auf PYE-Agar und -Bouillon bei 28°C, die Kolonien waren klein, weißlich und wurden mit der Zeit nach außen hin gelblich. Die Gramfärbung von jungen Zellen (24h) zeigte ausschließlich Gram-positive kurze Stäbchen. Das Gram-Verhalten alter Zellen (6 Tage) zeigte sowohl Gram-negative als auch Gram-positive Zellen, die sich dann als Kokken oder sehr kurze Stäbchen zeigten und daher als pleomorph zu bezeichnen sind.

Der Vergleich der 16S rRNA Gensequenz ergab ein Fragment von 1380 Nukleotiden und zeigt als nächsten Verwandten *Corynebacterium pelargi* 136/3^T (97,97 %), es folgen *Corynebacterium mustelae* 3105^T (96,23%) und *Corynebacterium diphtheriae* (96,22%).

Der Vergleich der „house-keeping“ Gene zeigte, dass W8 weiter entfernt mit *C. pelargi* verwandt ist als 812CH mit *C. pelargi* und unterstützt so die 16S rRNA Analysen. Bei fusA war die

Sequenzähnlichkeit von W8 zu *C. pelargi* der Nukleotidsequenz nur 91% und die der Aminosäuresequenz nur 96%, bei rpoC waren es 91% in der Nukleotidsequenz und 98% in der Aminosäuresequenz und bei gyrA 86% in der Nukleotidsequenz und 95% in der Aminosäuresequenz.

Der SIM Test zeigte Wachstum entlang des Stichkanals jedoch keine Trübung um den Stichkanal und keine Verfärbung des Mediums ins Schwarze, daraus kann man schließen, dass W8 nicht beweglich ist und kein Sulfid gebildet wird. Auch die Indol-Reaktion war negativ. Der KOH Test zeigte ein negatives Ergebnis, welches bedeutet, dass die Zellen Gram-positiv sind. Die Testung auf Katalase war hingegen positiv. Die Testung auf Oxidase zeigte ein positives Ergebnis und unterscheidet W8 somit vom dem Oxidase negativen *C. pelargi*. Der Api-Coryne Test von W8 ergab folgenden Code: 3100324. (Tabelle 8)

Bei der Analyse des Chinonssystems zeigte das Isolat W8 ein Vorhandensein von MK-8 (H₂) als Hauptkomponente (69,21%) und signifikante Anteile von MK-9 (H₂) (21,65%) und MK-7 (H₂) (7,5%). Des Weiteren wurden Spuren von MK-7 und MK-10 (H₂) nachgewiesen (< 1%). Im Vergleich dazu zeigte *C. pelargi* [54] ebenfalls MK-8 (H₂) als Hauptkomponente und geringere Mengen an MK-9 (H₂), es wurden aber Spuren von MK-8 und MK-9 gefunden, wodurch dieser sich von W8 unterscheidet. Die Analyse der Fettsäuren ergab C_{18:1} ω9c (40,5%) und C_{16:0} (37,8%) Fettsäuren als Hauptkomponenten, in kleineren Mengen waren auch C_{18:0} und C_{17:1} ω8c Fettsäuren vorhanden. Mit 25,95% waren außerdem noch C_{16:1} ω7c und/oder C_{15:0} iso-2OH (Sum 3) Fettsäuren vorhanden. Da Corynebakterien keine Hydroxy-Fettsäuren besitzen, kann man davon ausgehen, dass es sich bei Sum3 um C_{16:1} ω7c handelt. Diese Daten stehen in guter Übereinstimmung mit der Literatur des nächsten Verwandten *C. pelargi*, der enthält zwar geringere Mengen an Sum3 und etwas höhere Mengen an C_{18:0}, außerdem kommen noch geringe Mengen an iso C_{15:0} vor, C_{16:0} und C_{18:1} ω9c Fettsäuren kommen jedoch in beinahe denselben Anteilen vor wie bei W8 [54]. Bei W8 kommt außerdem noch C_{17:1} ω8c in geringen Mengen vor. Wie bereits angedeutet, kann man hier wieder Unterschiede erkennen, die auf eine neue Art schließen lassen.

Mykolsäuren konnten nachgewiesen werden (siehe Abbildung 2) und im Peptidoglykan konnte meso-Diaminopimelinsäure nachgewiesen werden.

Die Analyse der Polyamine zeigte Spermidin und Spermin als Hauptkomponenten, mit geringen Mengen an Putrescin (Tabelle 6). Bei dem Vergleich der Polyamine von W8 mit denen von *C. pelargi* kann man die Verwandtschaft erkennen, aber auch eindeutige Unterschiede. Spermidin und Spermin kommen ebenfalls als Hauptkomponenten vor allerdings konnten neben Putrescin auch noch geringe Mengen an 1,3 Diaminopropan, Cadaverin und Tyramin gefunden werden [54].

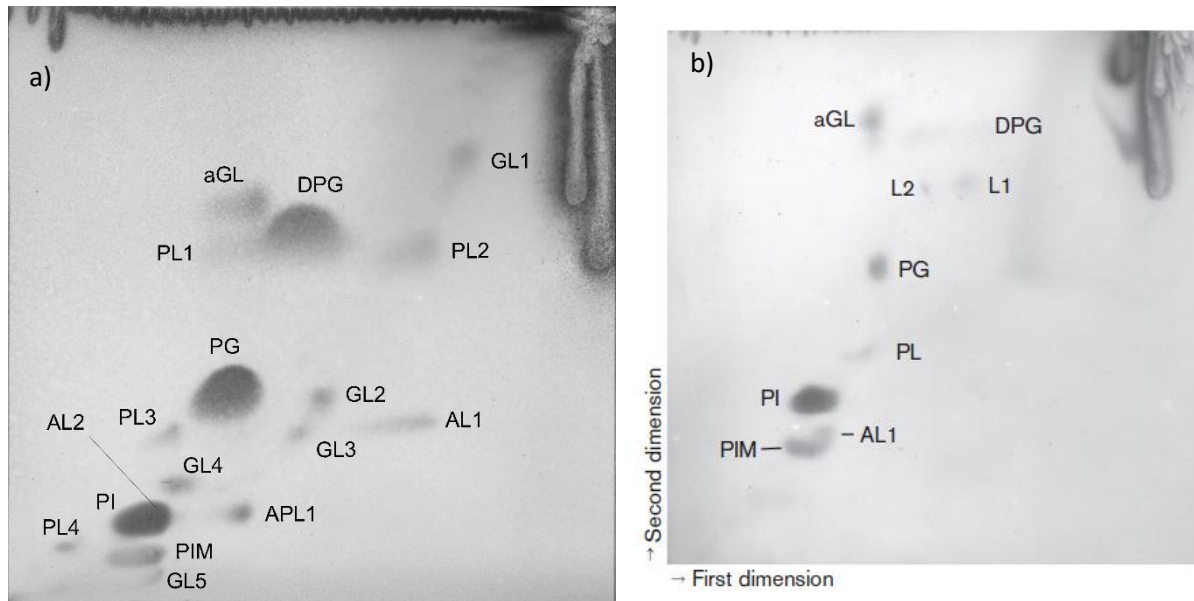


Abbildung 3: a) polare Lipide von W8 (*Corynebacterium sp.*) nach zweidimensionaler Dünnschichtchromatographie und Detektion mit Molybdatophosphorsäure. DPG (Diphosphatidylglycerol); PG (Phosphatidylglycerol); PI (Phosphatidylinositol); PIM (Phosphatidylinositol-Mannoside); GL1-GL5 (unidentifizierte Glycolipide); PL1-PL4 (unidentifizierte Phospholipide); AL1-AL2 (unidentifizierte Aminolipide); APL1 (unidentifiziertes Aminophospholipid); aGL (acidic Glycolipid) b) polare Lipide von *C. pelargi* [54]

Das Profil der polaren Lipide des Isolats W8 zeigte als Hauptkomponenten Diphosphatidylglycerol (DPG), Phosphatidylglycerol (PG), Phosphatidylinositol-Mannoside (PIM) und Phosphatidylinositol (PI), des Weiteren waren noch vier nicht identifizierte Glykolipide (GL1-GL5) und ein saures Glycolipid (aGL) vorhanden, vier nicht identifizierte Phospholipide (PL1-PL4), zwei nicht identifizierte Aminolipide (AL1-AL2) und ein nicht identifiziertes Aminophospholipid

(APL1) vorhanden. Die polaren Lipide des Isolates W8 unterscheiden sich ziemlich stark von den polaren Lipiden von *C. pelargi* [54], es sind zum Beispiel viel weniger Phospholipide bei *C. pelargi* vorhanden (PL1, PL2, PL4 fehlen), sowie viel weniger Glykolipide (GL1-GL5 fehlen). Dennoch sind einige Ähnlichkeiten vorhanden. Die Hauptkomponenten PG, DPG, PIM und auch PI kann bei beiden Stämmen nachgewiesen werden.

Ob es sich bei Isolat W8 um eine neue Art handelt ist nicht ganz eindeutig. Die 16srRNA zeigt eine hohe Sequenzähnlichkeit zu *C. pelargi*. Allerdings zeigen die Ergebnisse der „house-keeping“ Gene doch signifikante Unterschiede zu *C. pelargi*. Außerdem zeigen die chemotaxonomischen Analysen doch eindeutige Unterschiede in den Fettsäuren, polaren Lipiden und auch Polyaminen. Wenn man alle Daten zusammen betrachtet ist es durchaus möglich, dass es sich bei 200CH um eine noch nicht beschriebene Art innerhalb der Corynebakterien handelt.

Isolat 812CH

Das Isolat wurde ebenfalls aus dem Abstrich der Choane eines Waldrappes isoliert. Es ist auf Columbia 3 Agar supplementiert mit 5% Schafblut und auf PYE-Agar und –Bouillon bei 28°C gewachsen, die Kolonien waren klein, weißlich und wurden mit der Zeit nach außen hin gelblich. Junge Zellen (24h) zeigten sich als Gram-positive kurze Stäbchen.

Die Sequenzierung des 16S rRNA kodierenden Gens ergab ein Fragment von 1314 Nucleotiden. Der Vergleich der 16S rRNA Gensequenz zeigte als nächsten Verwandten mit 99,92% *Corynebacterium pelargi* 136/3^T. Es folgen mit 96,8% *Corynebacterium ulcerans* NCTC 7910^T und danach *Corynebacterium pseudotuberculosis* CIP 102968^T mit 96,64%. Die Analyse der house-keeping Gene zeigt eine hohe Übereinstimmung mit *C. pelargi*. Die Nukleotidsequenz (N) von *fusA* zeigt eine Übereinstimmung von 96% und die Aminosäuresequenz (P) zeigt eine Übereinstimmung von 99%. *rpoC* zeigte 97% (N) und 98% (P) und *gyrA* 99% (N) und 100% (P).

Der API Corynetest des Isolates 812CH zeigt folgendes Ergebnis: 3100304. (Tabelle 8)

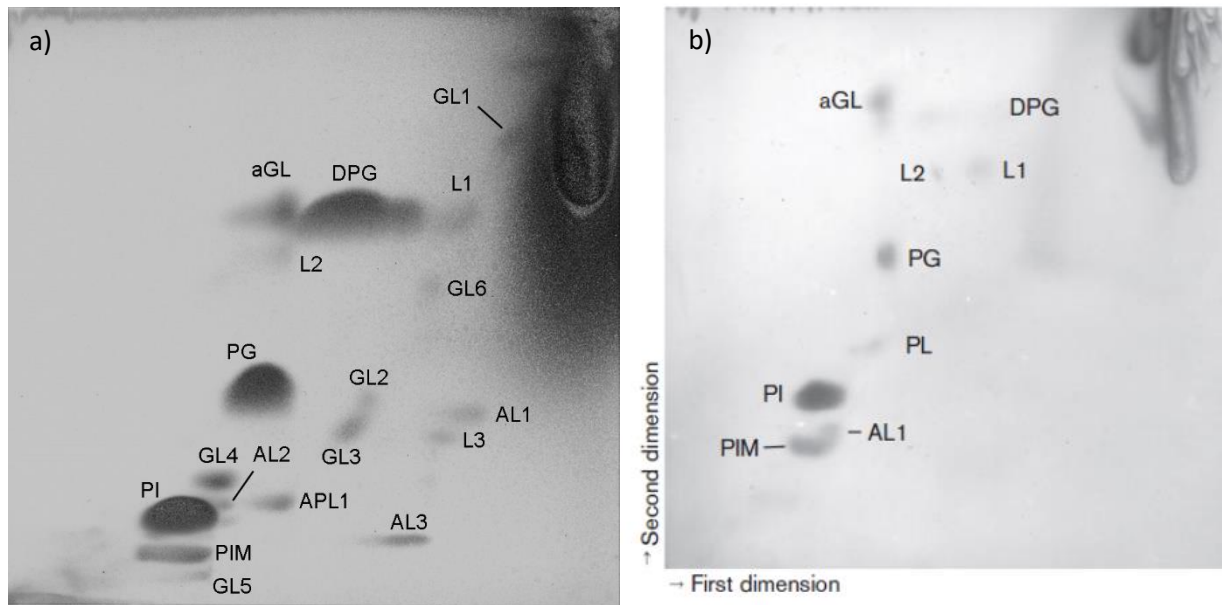


Abbildung 4: a) polare Lipide von 812CH (*Corynebacterium sp.*) nach zweidimensionaler Dünnschichtchromatographie und Detektion mit Molybdätdiäthylphosphorsäure. DPG (Diphosphatidylglycerol); PG (Phosphatidylglycerol); PI (Phosphatidylinositol); PIM (Phosphatidylinositol-Mannoside); L1-L3 (unidentifizierte Lipide); GL1-GL6 (unidentifizierte Glykolipide); AL1-AL3 (unidentifizierte Aminolipide); APL1 (unidentifiziertes Aminophospholipid); aGL (acidic Glykolipid) **b)** polare Lipide von *C. pelargi* [54]

Das Profil der polaren Lipide des Isolats 812CH zeigen als Hauptkomponenten Diphosphatidylglycerol (DPG), Phosphatidylglycerol (PG), Phosphatidylinositol-Mannoside (PIM) und Phosphatidylinositol (PI), desweiteren sind noch drei nicht identifizierte Lipide (L1-L3), sechs nicht identifizierte Glykolipide (GL1-GL6), drei nicht identifizierte Aminolipide (AL1-AL3) und ein saures Glykolipid (aGL) vorhanden. Die polaren Lipide des Isolates 812CH unterscheiden sich ziemlich stark von den polaren Lipiden von *C. pelargi* [54], es sind zum Beispiel viel weniger Aminolipide bei *C. pelargi* vorhanden, sowie viel weniger Glykolipide (GL1-GL6 fehlen). Dennoch sind einige Ähnlichkeiten vorhanden. PG, DPG, PIM und auch PI kann bei beiden Stämmen nachgewiesen werden. Sehr auffällig ist hingegen die starke Ähnlichkeit des Lipidprofils von 812CH zu W8.

Das Chinonsystem von 812CH besteht aus MK-9 (H₂) (43,42%), MK-8 (H₂) (32,22%) und MK-7(H₂) (24,34%). Im Vergleich dazu zeigt sowohl W8 als auch *C. pelargi* MK-8 (H₂) als

Hauptkomponente und es wurden auch noch Spuren von anderen Chinonen gefunden, die bei 812CH nicht vorkommen, wie MK-10 (H₂), MK-7, MK-8 und MK-9. Die Analyse der Fettsäuren ergab als Hauptkomponenten C_{18:1} ω9c (44,9%) und C_{16:0} (43,2%) Fettsäuren, auch C_{18:0} Fettsäuren konnten nachgewiesen werden (7%) und C_{16:1} ω7c (Sum3) Fettsäuren. Der Vergleich der Fettsäuren von 812CH mit *C. pelargi* zeigt eine hohe Ähnlichkeit, alle Fettsäuren, die bei 812CH vorkommen, konnten auch bei *C. pelargi* mit ähnlich hohen Anteilen gefunden werden, allerdings konnten bei *C. pelargi* noch zusätzlich Spuren von iso-C_{15:0} Fettsäuren gefunden werden [54]. Mykolsäuren konnten nachgewiesen werden und im Peptidoglykan konnte *meso*-Diaminopimelinsäure nachgewiesen werden.

Es ist nicht zu vermuten, dass es sich bei 812CH um eine neue Art handelt, da sowohl die 16S rRNA Gensequenz als auch der Vergleich der „house-keeping“ Gene eine sehr hohe Ähnlichkeit zu *C. pelargi* zeigt und auch sonst durch die chemotaxonomischen Analysen keine sehr großen Unterschiede erkennbar sind.

Isolat 200CH

Das Isolat wurde isoliert aus dem Abstrich der Choane (paarige Nasenöffnung) von einem Waldrapp. Es wächst auf Columbia III Agar supplementiert mit 5% Schafblut und auf PYE-Agar und -Bouillon bei 28°C. Die Kolonien sind sehr klein und weißlich-durchscheinend, werden nach einiger Zeit bis zu 5 mm groß und gelblich. Das Gram Verhalten alter Zellen (6 Tage) zeigt Gram-positive Zellen welche eine kokkoide Form haben. Junge Zellen (24h) hingegen zeigen sich sowohl Gram-positiv als auch Gram-negativ in kurzen Stäbchen. Sie sind ebenfalls als pleomorph zu bezeichnen.

Die Sequenzierung des 16S rRNA kodierenden Gens ergab ein Fragment von 1309 Nucleotiden. Ein Vergleich dieser 16S rRNA Gensequenz zeigt als nächsten Verwandten *Corynebacterium epidermidicanis* 410^T (96,71%), mit 96,32% folgen *Corynebacterium argentoratense* DSM 44202^T, *Corynebacterium ulcerans* NCTC 7910^T und *Corynebacterium pseudotuberculosis* CIP102968^T. Der Vergleich der *fusA* Gensequenz von 200CH mit *C. epidermidicanis* zeigte eine Übereinstimmung von nur 82% in der Nukleotidsequenz und von 87% in der Aminosäuresequenz.

Die Auswertung des API-Corynetests des Isolates 200CH zeigt ein Ergebnis von 1400325.
(Tabelle 8)

Der KOH Test war negativ und stimmt somit mit dem Ergebnis der Gramfärbung überein. Die Auswertung des SIM-Tests zeigte ausschließlich Wachstum entlang des Stichkanals. Keine Trübung und keine Verfärbung ins Schwarze deuten auf ein nicht bewegliches Bakterium hin, dass kein Sulfid bildet. Auch der Indol-Test war negativ. Der Oxidase Test zeigte ein negatives Ergebnis ebenso wie der Oxidase negative *C. epidermidicanis*. Mykolsäuren konnten nachgewiesen werden (siehe Abbildung 2).

Die zwei Hauptkomponenten des Chinonsystems sind MK-8 (H₂) mit 49,06% und MK-9 (H₂) mit 48,28%, des weiteres Vorhanden ist MK-7 (H₂) mit 2,66%. Als Diaminosäure konnte *meso*-Diaminopimelinsäure nachgewiesen werden. Die Fettsäure-Analyse ergab als Hauptkomponente C_{18:1} ω9c mit 51,8%, des Weiteren kommen C_{16:0} (41,5%) und C_{18:0} (6,7%) und Fettsäuren vor. Der große Unterschied zu *C. epidermidicanis* ist das Fehlen von C_{16:1} ω7c. Die Analyse der Polyamine zeigt SPD als Hauptkomponente, die anderen vorkommenden Polyamine kommen in ungefähr gleichen Mengenanteilen vor. Zum Vergleich, *C. epidermidicanis* zeigt ebenfalls Spermidin als Hauptkomponente, allerdings kommen dort statt sHSPD geringe Mengen von Cadaverin und 1,3-Diaminopropan vor [37].

Das Profil der polaren Lipide des Isolats 200CH zeigen als Hauptkomponenten Diphosphatidylglycerol (DPG), Phosphatidylglycerol (PG), PIM (Phosphatidylinositol-Mannoside) und Phosphatidylinositol (PI), des Weiteren sind noch drei nicht identifizierte Lipide (L1-L4), vier nicht identifizierte Glykolipide (GL1+GL3+GL7+GL8) und ein saures Glycolipid (aGL), drei nicht identifizierte Aminolipide (AL1+AL4+AL5) und ein nicht identifiziertes Aminophospholipid (APL1) vorhanden. Der Vergleich der polaren Lipide von 200CH mit denen von *Corynebacterium epidermidicanis* zeigt sowohl Unterschiede als auch Ähnlichkeiten. L1 und L2 von *C. epidermidicanis* fehlen bei 200CH, AL1, AL4 und AL5 hingegen sind bei 200CH vorhanden und fehlen bei *C. epidermidicanis*. Auch die Anordnung der Glykolipide unterscheidet sich in beiden Isolaten.

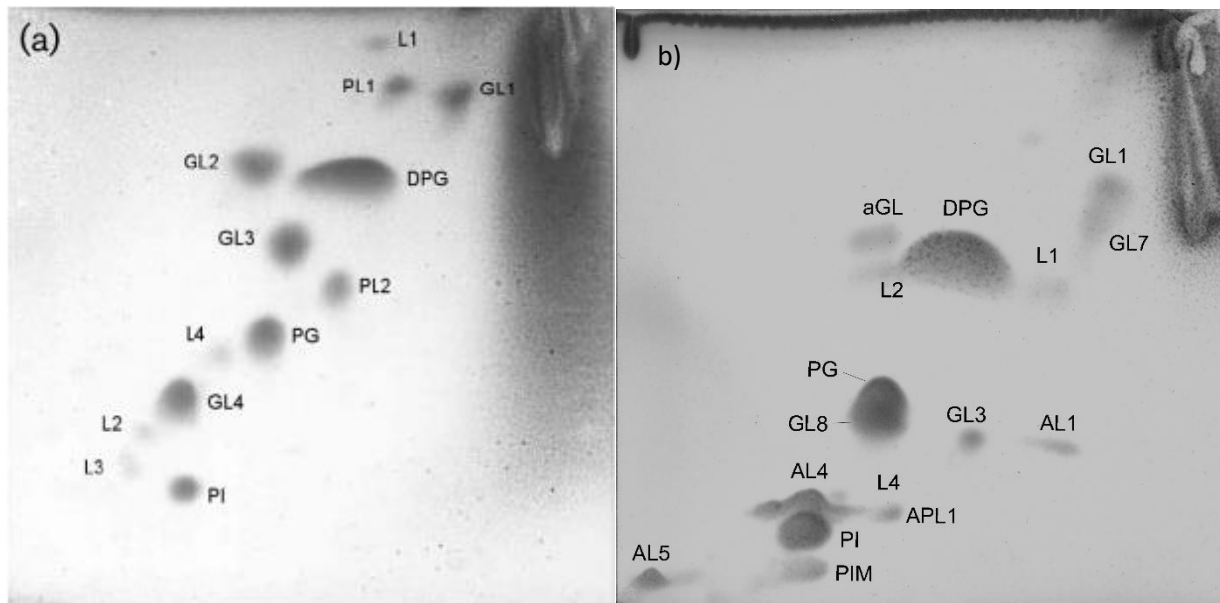


Abbildung 5: a) polare Lipide von *C. epidermidicanis* [37] b) polare Lipide von 200CH (*Corynebacterium* sp.) nach zweidimensionaler Dünnschichtchromatographie und Detektion mit Molybdätdi-phosphorsäure. DPG (Diphosphatidylglycerol); PG (Phosphatidylglycerol); PI (Phosphatidylinositol); PIM (Phosphatidylinositol-Mannoside) L1-L4 (unidentifizierte Lipide); GL1+GL3+GL7-8 (unidentifizierte Glycolipide); aGL (acidic Glycolipid); AL1+AL4-5 (unidentifizierte Aminolipide); APL1 (unidentifizierte Aminophospholipide);

Es gibt mehrere Hinweise darauf, dass es sich bei dem Isolat 200CH um eine neue Art handelt. Die 16S rRNA Sequenz, als auch die Sequenzen diverser „house-keeping“ Gene zeigen einen signifikanten Unterschied zu *C. epidermidicanis*. Die großen Unterschiede in den polaren Lipiden und die etwas größeren Unterschiede in den Polyaminen sind ein Hinweis auf eine neue Art. Aufgrund der Ergebnisse lässt sich das Isolat aber auch eindeutig dem Genus *Corynebacterium* zuweisen.

Tabelle 6: Polyamine von W8 und 200CH (*Corynebacterium sp.*) Abkürzungen: PUT (Putrescin); SPD (Spermidin); SPM (Spermin); sHSPD (*sym*-Hydroxyspermidin)

Polyamin	W8 µmol/g Biomasse	200CH µmol/g Biomasse
PUT	0,02	0,22
SPD	0,62	0,27
SPM	0,46	0,24
sHSPD	-	0,08

Zucker Fermentation der corynebacteria-Isolate und deren Referenzstämmme:

Tabelle 7: Zucker Fermentation der corynebacteria Arten in Phenolrotbouillons. Werte von *C. pelargi* aus der Literatur [54]

	W8	812CH	200CH	<i>C. pelargi</i> 136/3 ^T	<i>C. epidermidicanis</i> 410 ^T
Mannose	+	+	+		+
Raffinose	-	-	-	-	-
Melibiose	-	-	-	-	-
Maltose	+	-	+	-	+
Lactose	-	-	-	-	-
Glucose	+	+	+	+	+
L+Arabinose	-	-	-	-	-
D-Arabinose	-	-	-		-
Melezitose	-	-	-		-
Mannitose	-	-	+		+
N-Acetyl D-Glucosamin	-	-	-		-
Saccharose	-	-	+		-
Rhamnose	-	-	-	-	-
Galactose	+	-	+		-
Trehalose	+	+	+	-	+

Tabelle 8: Auswertung der API Corynetests der drei corynebacteria Isolate und Vergleich mit der Literatur [37, 54].

	200CH	<i>C. epidermidicanis</i>	W8	812CH	<i>C. pelargi</i>
Kaliumnitrat	+	-	+	+	+
Pyrazincarboxamid	-	+	+	+	+
Pyroglutaminsäure- β -naphthylamid	-	-	-	-	-
2-Naphthylphosphat	-	+	+	+	+
Naphthol ASBI-Glucoronsäure	-	-	-	-	-
2-Naphthyl- β D-galactopyranosid	+	-	-	-	-
2-Naphthyl- α D-glucopyranosid	-	-	-	-	-
1-Naphthyl-N-acetyl- β D-glucosaminid	-	-	-	-	-
Esculin Eisencitrat	-	-	-	-	+
Harnstoff	-	-	-	-	-
Gelatine (Rind)	-	-	-	-	-
Nullkontrolle	-	-	-	-	-
D-Glucose	+	+	+	+	+
D-Ribose	+	-	+	+	-
D-Xylose	-	-	-	-	-
D-Mannitol	-	-	-	-	-
D-Maltose	+	+	+	-	+
D-Lactose	-	-	-	-	-
D-Saccharose	+	-	-	-	-
Glykogen	-	-	-	-	-
Catalase	+	+	+	+	+

Anhand der Tabelle kann man erkennen, dass sich vor allem W8 und 812CH sehr ähnlich sind.

Der Unterschied zu *C. pelargi* ist ebenfalls zu erkennen. Vor allem die Verwertung von Esculin unterscheidet *C. pelargi* von den anderen Isolaten. 200CH hingegen unterscheidet sich durch das nicht-Verwerten von Pyrazincarboxamid, als auch durch das Verwerten von 2-Naphthyl- β D-galactopyranosid von allen anderen untersuchten corynebacteria Arten und somit auch von *C. epidermidicanis*.

W8 und 812CH:

Da beide Stämme eine sehr hohe 16S rRNA Sequenzähnlichkeit zu *Corynebacterium pelargi* besitzen, 812CH (99,92%) allerdings noch höher als W8 (98,04%), und auch die weiteren Ergebnisse der chemotaxonomischen Methoden auf keinen eindeutigen Schluss zur Zugehörigkeit dieser beiden Isolate schließen lassen wurden weitere molekularbiologische Untersuchungen durchgeführt.

ERIC-PCR

Man kann hier eindeutig erkennen, dass die repetitiven Sequenzen der drei untersuchten corynebacteria-Arten keine Ähnlichkeit zeigen. Wobei eine dicke Bande sowohl bei 812CH als auch bei *C. pelargi* vorzukommen scheint (Pfeil). Anhand von diesem Ergebnis kann man nicht davon ausgehen, dass es sich um drei Vertreter derselben Art handelt, allerdings ist auch der Umkehrschluss nicht möglich, dass es sich mit Sicherheit um drei verschiedene Arten handelt. Die ERIC PCR eignet sich daher bei den drei untersuchten corynebacteria Arten nicht dazu, eine eindeutige Aussage zur Spezieszugehörigkeit zu treffen.

BOX-PCR

Aus dem Ergebnis der BOX-PCR kann kein eindeutiges Ergebnis geschlossen werden. Zwar kann wieder bei 812CH und *C. pelargi* eine gemeinsame Bande gefunden werden ansonsten zeigen die untersuchten Stämme aber alle ein vollkommen unterschiedliches Bild. Somit ist die BOX-PCR in diesem Fall nicht geeignet um eine Aussage zur Spezies-Zugehörigkeit zu treffen.

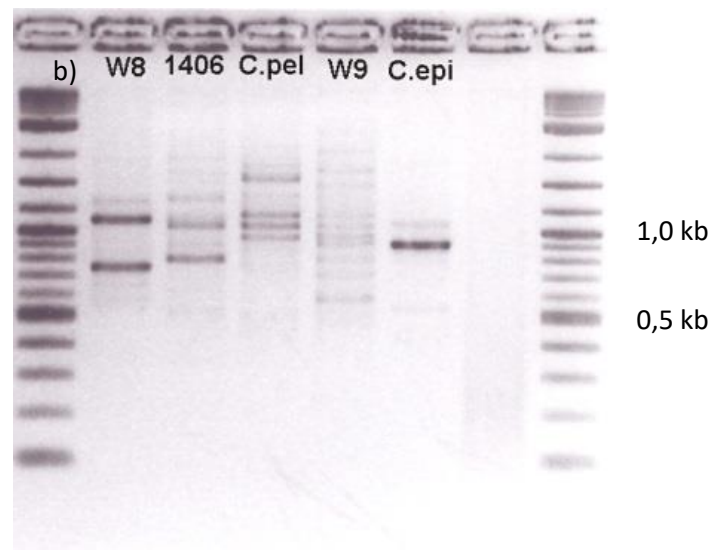
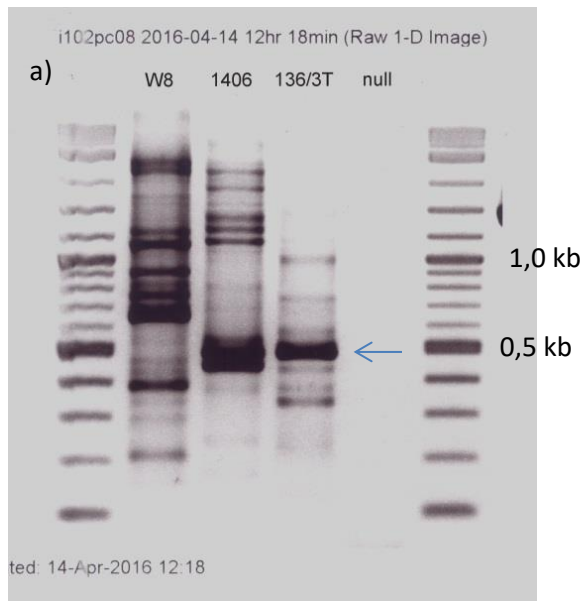


Abbildung 6: a) ERIC PCR der corynebacteria Arten, Bahn1 zeigt W8, Bahn 2 zeigt 812CH (=1406) und Bahn 3 zeigt *C. pelargi* 136/3^T; Bahn 4 zeigt die Nullkontrolle **b)** BOX PCR von den Corynebakterien. Bahn 1 zeigt W8, Bahn 2 zeigt 812CH (=1406), Bahn 3 zeigt *C. pelargi* 136/3^T., Bahn 4 zeigt 200CH (=W9) und Bahn 5 zeigt *C. epidermidicanis* 410^T, Bahn 6 zeigt die Nullkontrolle

Corynebacteria MLST

Bei dem Vergleich des „house-keeping“ Gens *fusA* von 200CH mit *C. epidermidicanis* ist eindeutig sichtbar, dass 200CH sowohl in der Nukleotidsequenz (82%) als auch in der Aminosäuresequenz (87%) sehr weit entfernt verwandt mit *C. epidermidicanis* ist und somit wohl nicht zur selben Art gehört, dies unterstützt die Ergebnisse der 16S rRNA Analyse. W8 zeigt zwar eine relativ hohe Sequenzähnlichkeit in den drei untersuchten „house-keeping“ Genen zu *C. pelargi* von 87-91% in der Nukleotidsequenz und 90-98% in der Aminosäuresequenz, wobei 812CH mit bis zu 99% Sequenzidentität sowohl in der Proteinsequenz (*fusA*) als auch in der Nukleotidsequenz (*gyrA*) zu *C. pelargi* noch viel näher verwandt zu sein scheint als W8, oder, wie auch die 16SrRNA vermuten lässt, es sich sogar um einen Vertreter derselben Art handelt.

Am Ende dieser Arbeit ist Beschreibung als neue Art von *Corynebacterium choanis* (200CH) und *Corynebacterium geronticis* (W8) in Form eines Manuskripts angefügt. Dieses soll im ‚International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology‘ eingereicht werden. Dort sind auch die Tabellen zu den „house-keeping“ Genen und der ML-Stammbaum zu finden.

Pasteurellaceae

Isolat 38

Das Isolat stammt aus einer Bronchiallavage (Spülung der Bronchien) einer weiblichen, europäischen Kurzhaar-Katze mit Atemproblemen. Das Isolat wuchs auf Columbia III Agar supplementiert mit 5% Schafsblut und auch sehr gut auf PPLO-Agar und –Bouillon, bei 28°C. Die Kolonien waren durchscheinend, weißlich. Die Gram-Färbung, sowohl von jungen als auch von alten Zellen, zeigte sehr kurze Gram-negative Stäbchen oder Kokken. Die Zellen sind somit als pleomorph zu bezeichnen. Der SIM-Test zeigte ausschließlich Wachstum entlang des Stichkanals. Keine Trübung außerhalb des Stichkanals bedeutet, dass das Isolat unbeweglich ist, außerdem gab es keine Verfärbung ins Schwarze und somit keine Sulfidproduktion, auch der Indoltest war negativ. Der KOH Test zeigte ein positives Ergebnis (Gram-negativ), ebenso der Katalase Test, wobei dieser nur ein sehr schwach positives Ergebnis zeigte.

Die Sequenzierung des 16S rRNA kodierenden Gens ergab ein Fragment von 1401 Nukleotiden und zeigt als nächsten Verwandten mit *Ursidibacter maritimus* Pb43106^T (96,83%) gefolgt von *Ursidibacter arcticus* Bamse61^T (96,60%), *Actinobacillus minor* NM305^T und *Haemophilus sputorum* CCUG 13788^T (beide 96,22%). Da das Isolat 38 und das Isolat 1387 im Maximum-Likelihood Stammbaum (Abbildung 12) sehr nahe beieinander liegen hat man die „house-keeping“ Gensequenzen des *rpoB* Gens miteinander verglichen. Dabei kam heraus, dass die zwei Isolate sich hierbei zu 99% gleichen und die Aminosäuresequenz sogar zu 100% gleich ist. Daraufhin wurde auch die Gensequenz des 16S rRNA Gens der zwei Isolate miteinander verglichen und zeigte ebenfalls eine Sequenzähnlichkeit von 99%. Es ist somit wahrscheinlich, dass Isolat 38 und 1387 derselben Art angehören.

Die Hauptkomponente des Chinonsystems mit 99% ist Q-8. DMK-8 und MK-8 wurden ebenfalls in Spuren nachgewiesen (unter 1%). Dies steht in Übereinstimmung mit der Literatur, die zeigt, dass bei *Pasteurellaceae* sowohl Ubiquinone als auch Menaquinone vorkommen [26]. Die Analyse der Fettsäuren ergab das Vorkommen von C_{16:0} (21,34%), und C_{14:0} (15,40%) Fettsäuren, in Spuren waren außerdem C_{18:1} ω7c und C_{12:0} Fettsäuren vorhanden. Da die Fettsäuren der *Pasteurellaceae* sehr homogen sind, ist eine Unterscheidung auf Artlevel meist nicht möglich [55].

Das Profil der polaren Lipide des Isolats 38 zeigen als Hauptkomponenten Phosphatidylethanolamin (PE), Phosphatidylglycerol (PG) und des Weiteren sind noch zwei nicht identifizierte Lipide (L1-L2) und drei nicht identifizierte Aminophospholipide (APL1-APL3) vorhanden. Auch die Verteilung der Phospholipide ist uniform innerhalb der Familie der *Pasteurellaceae* wobei PE und PG beinahe immer in unterschiedlich großen Mengen vorkommen [55]. Bei manchen Vertretern der Familie kann außerdem noch Diphosphatidylglycerol nachgewiesen werden.

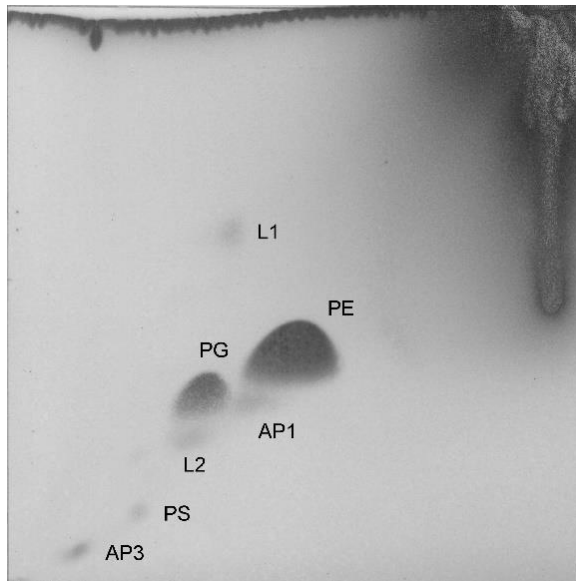


Abbildung 7: polare Lipide des Isolats 38 nach zweidimensionaler Dünnschichtchromatographie und Detektion mit Molybdätophosphorsäure. Phosphatidylglycerol (PG); Phosphatidylethanolamin (PE); L1-L2 (nicht identifizierte Lipide); AP1-AP3 (nicht identifizierte Aminophospholipide)

Die Hauptkomponenten der Polyamine des Isolates 38 sind 1,3-Diaminopropan und in geringeren Mengen Putrescin und Spermidin (Tabelle 14). Die nächsten Verwandten in der 16S rRNA Gensequenz bieten keine Vergleichsmöglichkeiten, aber *A. minor*, zeigt ebenfalls 1,3-Diaminopropan als Hauptkomponente (Busse, nicht publiziert).

Das Isolat verwertet folgende Zucker innerhalb der Phenolrot-bouillons: Mannose, Raffinose, Maltose, Lactose, L+Arabinose, Saccharose und Galactose und unterscheidet sich damit grundlegend von *Ursidibacter maritimus* und dem Isolat 1387. *U. maritimus* verwertet hingegen

Rhamnose, Trehalose, Glucose und Melibiose, aber auch Galactose, Lactose und Raffinose [56]. Die Fermentation der Zucker innerhalb der *Pasteurellaceae* ist sehr unterschiedlich und kann auch innerhalb eines Genus noch variieren wie es bei dem Genus *Actinobacillus* der Fall ist [57].

Dass die Gensequenz des 16S rRNA Gens des Isolates 38 mit dem nächsten Verwandten nur 96,22% Identität besitzt, ist schon ein eindeutiges Indiz dafür, dass es sich um eine noch nicht beschriebene Art handelt. Da die nächsten zwei Verwandten zu dem Genus *Ursidibacter* gehören und *Ursidibacter maritimus* auch die Typspezies des Genus ist, ist eine Zuteilung zu dem Genus möglich. Das Genus *Ursidibacter* ist ein noch relativ neues Genus mit nur zwei Arten und es wurden weder polare Lipide, noch Fettsäuren oder Chinone beschrieben [56]. Um eine eindeutige Zuteilung zu gerechtfertigen wäre es sinnvoll Vertreter des Genus *Ursidibacter* chemotaxonomisch zu bearbeiten um Vergleichswerte zu erhalten. Im ML-Stammbaum der untersuchten *Pasteurellaceae* Arten ist zu erkennen, dass die beiden Isolate 38 und 1387 ein eigenes Cluster bilden, daher ist eine Zuordnung zu dem Genus *Actinobacillus* unwahrscheinlich.

Isolat 2028

Das Isolat stammt aus dem Trachealsekret eines Pferdes, männlich mit akutem Husten. Die Kolonien waren sehr klein, ungefähr ein Millimeter im Durchschnitt, sie waren außerdem durchscheinend mit weißlicher Farbe. Das Isolat wuchs am besten auf PPLO-Agar und -Bouillon, mit 10 mg pro Liter NAD supplementiert und bei 37°C. Es wuchs ist außerdem auf Kochblutagar, allerdings nicht auf Columbia Blutagar. Da es kein Wachstum auf PPLO Agar ohne NAD gab, kann man davon ausgehen, dass das Isolat abhängig von NAD (V-Faktor) ist. Um die Zuckerverwertung zu testen wurden die Phenolrotbouillons ebenfalls mit NAD supplementiert. Die Ergebnisse der Zuckerverwertung sind in Tabelle 16 angegeben. Die Gramfärbung alter Zellen zeigte Gram-negative Stäbchen, die sich pleomorph verhielten. Der KOH-Test zeigte ein eindeutig positives Ergebnis und lässt somit ebenfalls auf Gram-negative Zellen schließen. Der Katalase Test zeigte ein negatives Ergebnis. Der Vergleich der Zuckerverwertung in Phenolrotbouillons mit dem Typstamm von *A. equuli* subsp. *equuli* zeigt bis auf die Verwertung von Melibiose starke Übereinstimmung [58].

Die Sequenzierung des 16S rRNA kodierenden Gens ergab ein Fragment von 1402 Nukleotiden. Ein Vergleich der 16Srna Gensequenz zeigte als nächsten Verwandten mit 96,11%

Actinobacillus equuli subsp. *equuli* NCTC 8529^T, danach folgt *Actinobacillus ureae* ATCC 25976^T mit 96,07% und *Actinobacillus arthritidis* CCUG 24862^T mit 96,02%.

Das Chinonsystem besteht aus Q-8 (69,83%) als Hauptkomponente und aus Q-7 (28,45%) sowie aus geringen Mengen an DMK-8 (1,72%). Diese Werte stehen in guter Übereinstimmung mit der Literatur, die gezeigt hat, dass *Pasteurellaceae* sowohl Ubiquinone als auch Menaquinone besitzen [26]. Die Literatur zeigt ebenfalls, dass Demethylmenquinone (DMK) typisch für Mitglieder der *Pasteurellaceae* sind [26]. Die Hauptkomponenten des Fettsäureprofils waren C_{14:0} (32,07%) und C_{16:0} (18,70%) Fettsäuren, außerdem kommen noch größere Mengen an C_{16:1} ω7c und/oder C_{15:0} iso-2OH (Sum2) Fettsäuren dazu sowie kleinere Mengen an C_{14:0} 3OH und/oder C_{16:0}-Iso (sum3) Fettsäuren. Ein Vergleich mit den Fettsäuren von *Actinobacillus equuli* zeigt keine signifikanten Unterschiede. Die Hauptkomponenten, C_{14:0} und C_{16:0} Fettsäuren kommen auch dort vor ebenso wie ungesättigte C₁₆- und hydroxy-C_{14:0} Fettsäuren [59]. Da auch in der Literatur keine iso- Fettsäuren vorkommen, kann man davon ausgehen, dass es sich bei Sum2 und Sum3 um C_{16:1} ω7c und C_{14:0} 3OH handelt.

Das Profil der polaren Lipide des Isolats 2028 zeigen als Hauptkomponenten Phosphatidylethanolamin (PE), Phosphatidylglycerol (PG) und Phosphatidylserin (PS), des Weiteren ist noch ein nicht identifiziertes Lipid (L1) vorhanden.

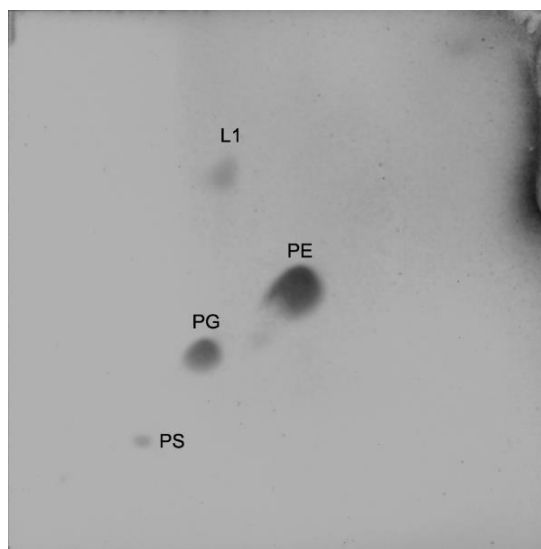


Abbildung 8: polare Lipide von Isolat 2028 nach zweidimensionaler Dünnschichtchromatographie und Detektion mit Molybdätdi-phosphorsäure: PE

(Phosphatidylethanolamin), PG (Phosphatidylglycerol), PS (Phosphatidylserin) und ein unbekanntes Lipid L1

Die Hauptkomponente des Polyaminsystems von dem Isolat 2028 ist 1,3-Diaminopropan, in geringen Mengen konnten auch Putrescin, Spermidin und Spermin gefunden werden. Im Literaturvergleich mit *A. equuli* stimmen die Ergebnisse relativ gut überein. *A. equuli* zeigte auch sehr hohe Mengen an DAP, und geringere Mengen an Cadaverin, Spermidin und Spermin [60].

Die Fermentation der Zucker innerhalb der Phenolrotbouillons zeigte eine Verwertung von Mannose, Raffinose, Maltose, Lactose, Glucose, L+Arabinose, Melezitose, Mannit, Saccharose und Trehalose. Die Fermentation passt somit sehr gut in das Schema des Genus *Actinobacillus*. Während *A. equuli* ebenfalls Raffinose, Maltose und Trehalose verwertet und dazu noch Melibiose [61], verwertet *A. minor* auch noch Mannose und Glucose [62].

Aufgrund der eher niedrigen Sequenzidentität der 16S rRNA Gensequenz mit dem nächsten Verwandten kann man davon ausgehen, dass es sich bei Isolat 2028 um eine neue Art handelt. Die Ergebnisse der chemotaxonomischen Untersuchungen stehen allerdings in sehr guter Übereinstimmung mit denen von *A. equuli* und zeigen nur einige geringe Unterschiede, was eine Zuordnung zum Genus *Actinobacillus* erlaubt. Auch im ML-Baum der *Pasteurellaceae* ist zu erkennen, dass 2028 innerhalb des Clusters der *Actinobacillus* Arten liegt. Ein eindeutiger Unterschied zu *A. equuli* ist aber, dass *A. equuli* nicht V-Faktor abhängig ist, diese Eigenschaft variiert aber innerhalb des Genus *Actinobacillus* und beeinflusst somit nicht die Zuordnung zu diesem Genus. Um zu veranschaulichen wie weit die zwei Isolate 2028 und 38 in ihrer Verwandtschaft auseinander liegen wurden die Sequenzen der „house-keeping“ Gene miteinander verglichen. Die Ergebnisse dieses Vergleichs zeigte, dass die zwei Isolate 38 und 2028 in der Gensequenz (87%-90%) weit auseinanderliegen, die Nukleotidsequenz sich allerdings sehr ähnlich ist (97%-99%).

rpoB (RNA Polymerase β -UE):

Tabelle 9: Ähnlichkeiten in der partiellen *rpoB* Gensequenz und der korrespondierenden rpoB Proteinsequenz von 2028, 38, 1387, *A. pleuropneumoniae* Shope 4074^T und *F. canicola* HPA21^T (Oberes Dreieck, Nukleotidsequenz; unteres Dreieck, Aminosäuresequenz. Angaben in Prozent.)

	2028	38	<i>A. pleuropneumoniae</i> Shope 4074 ^T	1387	HPA21 ^T
2028		87,0	88,4	87,3	86,4
38	96,9		87,3	99,2	89,7
<i>A. pleuropneumoniae</i> Shope 4074 ^T	99,0	97,4		87,0	86,7
1387	96,8	100,0	87,7		90,1
HPA21 ^T	95,4	97,0	86,8	97,1	

atpD (ATP synthase CF1 delta subunit):

Tabelle 10: Ähnlichkeiten in der partiellen *atpD* Gensequenz und der korrespondierenden atpD Proteinsequenz von 2028, 38, *A. pleuropneumoniae* Shope 4074^T (Oberes Dreieck, Nukleotidsequenz; unteres Dreieck, Aminosäuresequenz. Angaben in Prozent)

	2028	38	<i>A. Pleuropneumoniae</i> Shope 4074 ^T
2028		89,6	87,2
38	99,2		88,0
<i>A. pleuropneumoniae</i> Shope 4074 ^T	99,6	97,7	

Tabelle 11: Polyamine von Isolat 38 und Isolat 2028, Abkürzungen: DAP (1,3-Diaminopropan); PUT (Putrescin); CAD (Cadaverin); SPD (Spermidin); SPM (Spermin)

Polyamin	µmol/g 38	µmol/g 2028
DAP	39,41	113,14
PUT	4,85	0,64
CAD	0,03	-
SPD	3,96	0,36
SPM	0,95	1,66

Isolat 1387

Das Isolat wurde aus einem Nasentupfer einer männlichen BKH (Britisch-Kurz-Haar) Katze mit Rhinitis (Schnupfen) isoliert. Es wuchs auf PPLO-Agar und -Bouillon bei 37°C, außerdem auch auf BHI und Blutagar, allerdings nicht auf PYE und 3x3 PYE. Die Bakterien waren durchscheinend und weißlich bis gelblich. Das Wachstum in PPLO Flüssigkultur war nur sehr spärlich. Auch in PPLO mit Agarwasser anstatt deionisiertem Wasser konnte kein besseres Wachstum beobachtet werden.

Die Sequenzierung des 16S rRNA kodierenden Gens ergab ein Fragment von 1400 Nukleotiden. Ein Vergleich der 16S rRNA Gensequenz zeigt als nächsten Verwandten *Ursidibacter maritimus* Pb43106^T (97,13%) gefolgt von *Frederiksenia canicola* HPA 21^T (96,47%), danach folgt *Haemophilus felis* ATCC 49733^T (96,26%) und *Bibersteinia trehalosis* NCTC 10370^T (96,01%). Als Referenzstamm wurde HPA 21^T angeordnet und dieser wurde zusammen mit 1387 aufgearbeitet um Vergleichswerte zu haben.

Das Chinonsystem bestand aus Q-8 als Hauptkomponente (77,17%) und aus Q-7 (21,7%). In geringen Mengen konnte außerdem MK-7 (1,14%) nachgewiesen werden. Als Referenz dienen die Werte des *Frederiksenia canicola* Typstammes HPA21^T. Dieser zeigt als Hauptkomponente mit 74,22% ebenfalls Q-8. Allerdings sind die Mengen an MK-7 um vieles höher und betrugen 18,17% während Q-7 nur mit 7,6 % vorkam [63]. Dieser Unterschied unterstützt die Vermutung, dass das Isolat 1387 kein Vertreter der Art *Frederiksenia canicola* ist.

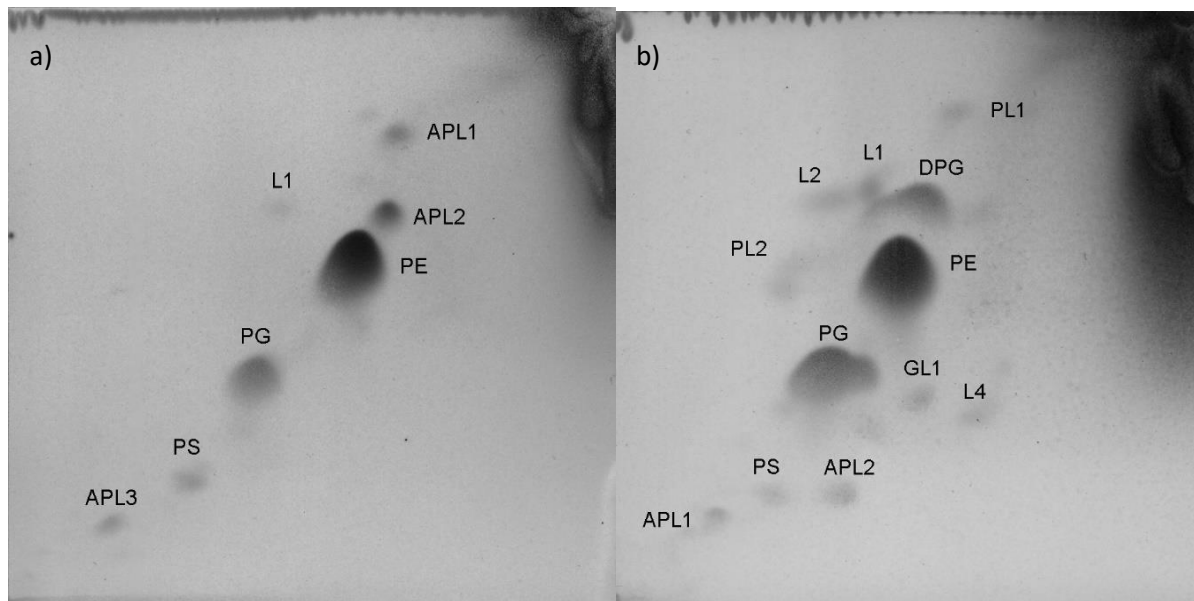


Abbildung 9: polare Lipide von a) Isolat 1387 und b) Referenzstamm HPA21^T (*Frederiksenia canicola*) nach zweidimensionaler Dünnschichtchromatographie und Detektion mit Molybdatophosphorsäure. DPG (Diphosphatidylglycerol); PG (Phosphatidylglycerol); PE (Phosphatidylethanolamin); PS (Phosphatidylserin); L1-L2 (nicht identifizierte Lipide); GL1 (nicht identifiziertes Glykolipid); PL1-PL2 (nicht identifizierte Phospholipide); APL1-APL3 (nicht identifizierte Aminophospholipide);

Das Lipidprofil von Stamm 1387 zeigte als Hauptkomponenten Phosphatidylethanolamin (PE), Phosphatidylglycerol (PG) und auch geringere Mengen von Phosphatidylserin (PS). Des Weiteren waren drei nicht identifizierbare Aminophospholipide vorhanden und ein weiteres nicht identifizierbares Lipid. Das Lipidprofil des Referenzstammes *F. canicola* unterscheidet sich sehr von dem des Stammes 1387. Der wohl größte Unterschied war das Fehlen des Diphosphatidylglycerols bei 1387. HPA21^T hat hingegen zwei nicht identifizierbare Phospholipide sowie ein Glykolipid, das bei 1387 nicht vorkommt. Generell hat *F. canicola* ein komplexeres Lipidprofil als 1387. Dieser gravierende Unterschied zwischen den zwei Stämmen unterstützt die Annahme, dass es sich bei 1387 um eine neue Art handelt.

Die Analyse des Fettsäureprofils zeigt C_{16:0} (33,20%) und C_{14:0} (17,75%) als Hauptkomponenten, des Weiteren wurde C_{15:0}, C_{16:0} und C_{18:1} ω7c Fettsäuren in kleinen Mengen nachgewiesen. Es kommen auch C_{16:1} ω7c und/oder C_{15:0} iso 2 OH (Sum3) und C_{14:0} 3OH und/oder C_{16:1} Iso (Sum2) Fettsäuren vor. Im Vergleich mit dem nächsten Verwandten *F. canicola* zeigen sich einige

Ähnlichkeiten, bis auf C_{18:1} ω7c und Sum2 kommen auch bei *F. canicola* alle oben erwähnten Fettsäuren vor [63].

Der Vergleich der *rpoB* Gensequenz von 1387 mit HPA21^T (*Frederiksenia canicola*) zeigt eine Ähnlichkeit von 90% im Vergleich der Nukleotidsequenzen. Der Vergleich der Aminosäuren zeigt eine Ähnlichkeit von 97%. Aufgrund des eindeutigen Unterschiedes in der 16S rRNA Gensequenz und der *rpoB* Gensequenz sowie aufgrund der eindeutigen phänotypischen Unterschiede im Fettsäureprofil und Lipidmuster, ist anzunehmen, dass es sich bei 1387 nicht um einen Vertreter der Art *F. canicola* handelt. Die Sequenzähnlichkeit des *rpoB* Gens, als auch des 16S rRNA Gens zu Isolat 38 sind ein Hinweis, dass es sich bei den beiden Isolaten um Vertreter derselben Art handeln könnte. Auch das Profil der polaren Lipide der zwei Isolate ähnelt einander, da sie beide kein DPG besitzen, jedoch PE, PG und PS bei beiden vorkommt. Q8 ist bei beiden die Hauptkomponente im Chinonsystems und dass sich auch noch das Fettsäureprofil der zwei Isolate sehr ähnelt, unterstützt diese Vermutung. Was sich allerdings sehr stark unterscheidet ist die Zuckerverwertung. Während das Isolat 38 Raffinose und Lactose verwertet, wird von Isolat 1387 Glucose, D-Arabinose und Trehalose verwertet. Aufgrund der Ergebnisse der molekularen Untersuchungen ist es wahrscheinlich, dass beide Isolate dem Genus *Ursidibacter* angehören, dies kann aber anhand fehlender chemotaxonomischer Vergleichsmöglichkeiten nicht bestätigt werden.

Isolat 2805

Dieses Isolat wurde isoliert aus der Choane (paarige Nasenöffnungen) eines Huhns und wuchs auf BHI-Agar und -Bouillon bei 37°C und auch auf Blutagar. Das Isolat 2805 bildete sehr große Kolonien mit gelblich-bräunlicher Farbe, sie waren trübe und schleimig in der Konsistenz. Die Gram-Färbung zeigte Gram-negative lange Stäbchen. Der KOH Test war positiv und lässt somit ebenfalls auf Gram-negative Stäbchen schließen, der Katalase Test war ebenfalls positiv.

Die Sequenzierung des 16S rRNA kodierenden Gens ergab ein Fragment von 1365 Nukleotiden. Ein Vergleich der 16S rRNA Gensequenz zeigt als nächsten Verwandten mit 99,27% *Gallibacterium anatis* F149^T, danach folgen mit 94,33% *Gallibacterium melopsittaci* F450^T und mit 94,07% *Avibacterium volantium*.

Die Hauptkomponenten des Polyaminsystems von 2805 waren 1,3-Diaminopropan, Putrescin und Spermidin. Diese Werte stimmen sehr genau mit denjenigen von *G. anatis* aus der Literatur überein [60]. Das Chinonsystem bestand hauptsächlich aus Q-8 (52,86%), DMK-8 (45,34%), und aus geringen Mengen an MK-8 und Q-7 (beide weniger als 1%). Das Chinonsystem von *G. anatis* [64] zeigt ebenfalls Q-8 als Hauptkomponente, allerdings mit höheren Werten an MK-7, welches bei 2805 ganz fehlt, und geringeren Werten an DMK-8.

Das Profil der Fettsäuren besteht aus C_{16:0} (26,96%) und C_{14:0} (14,64%) Fettsäuren als Hauptkomponenten und geringeren Mengen an C_{18:1} ω7c (4,39%) und C_{18:0} (3,68%) Fettsäuren. Des Weiteren kommen noch C_{16:1} ω7c und/oder C_{15:0} iso 2OH (Sum3) in relativ großen Mengen vor und in geringeren Mengen C_{14:0} 3OH und/oder C_{16:1} Iso (Sum2). Das Fettsäureprofil stimmt sehr genau mit dem von *G. anatis* überein, wobei bei *G. anatis* noch einige andere Fettsäuren in Spuren gefunden wurden. Aber alle Fettsäuren die bei dem Isolat 2805 nachgewiesen wurden, konnten auch bei *G. anatis* in ähnlichen Mengen gefunden werden [65].

Das Profil der polaren Lipide des Isolats 2805 zeigte als Hauptkomponenten Diphosphatidylglycerol (DPG), Phosphatidylethanolamin (PE), Phosphatidylglycerol (PG) und Phosphatidylserin (PS), des Weiteren sind noch zwei nicht identifizierte Lipide (L2-L4) und ein nicht identifiziertes Aminophospholipid (APL) vorhanden.

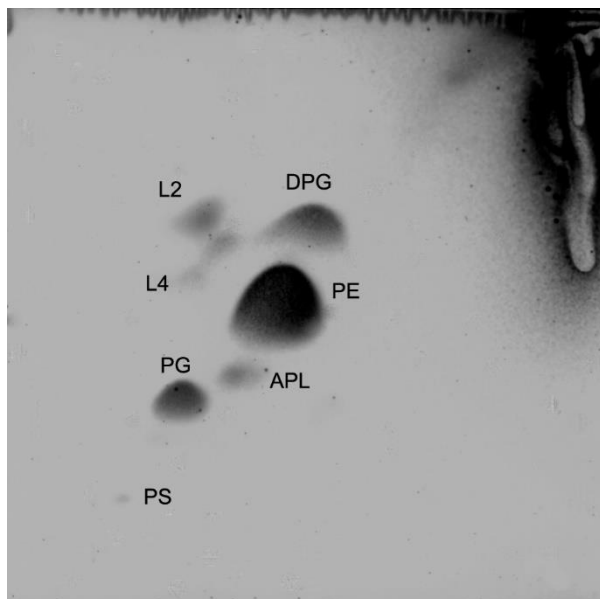


Abbildung 10: polare Lipide von 2805 nach zweidimensionaler Dünnschichtchromatographie und Detektion mit Molybdatophosphorsäure. Diphosphatidylglycerol (DPG), Phosphatidylethanolamin (PE), Phosphatidylglycerol (PG) und Phosphatidylserin (PS), zwei unidentifizierte Lipide (L2-L4) und ein unidentifiziertes Aminophospholipid (APL)

Die sehr hohe Sequenzähnlichkeit der 16S rRNA Gensequenzen, als auch der Gensequenzen der untersuchten „house-keeping“ Gene (Tabelle 14-15) sind ein sehr eindeutiges Indiz, dass es sich bei 2805 um einen Stamm der Art *G. anatis* handelt. Merkwürdig ist allerdings das Fehlen von MK-7 im Chinonsystem von 2805.

Isolat 2425

Das Isolat wurde isoliert aus der Choane (paarige Nasenöffnung) eines Huhns, es wuchs auf BHI-Agar und –Bouillon aber auch auf Blutagar bei 37°C, die Kolonien waren durchscheinend, gelblich und relativ klein. Die Gramfärbung zeigt lange Gram-negative Fäden und der Katalase Test war negativ.

Die Sequenzierung des 16S rRNA kodierenden Gens ergab ein Fragment von 1331 Nukleotiden und zeigt als nächsten Verwandten *Gallibacterium anatis* F149^T (94,74%) und *Avibacterium avium* NCTC 11297^T (93,52%), danach folgt *Gallibacterium mellopsittaci* F450^T (93,14%). Im Vergleich der „house-keeping“ Gene zeigt 2425 eine Sequenzähnlichkeit von 83%-87% zu *G. anatis*, was um einiges weniger ist als 2805 (97%-99%) zu *G. anatis*.

Das Chinonsystem bestand aus Q-8 (79,27%) als Hauptkomponente, aus DMK-8 (13,29%), Q-7 (6,53%) und geringen Mengen an MK-8 (weniger als 1%). Das Chinonsystem ähnelt dem von Isolat 2805 sehr, der Unterschied zu *G. anatis* ist erneut das Fehlen von MK-7 [64]. Die Analyse der Polyamine zeigte als Hauptkomponenten 1,3 - Diaminopropan (DAP) und Putrescin (PUT), sowie Spermidin (SPD). Auch hier stimmen die Werte wieder sehr gut mit denen von *G. anatis* aus der Literatur überein [60], allerdings konnte bei *G. anatis* kein NSPD gefunden werden. Da bei 2425 aber auch nur Spuren von NSPD gefunden wurden und die Menge der Polyamine sehr stark von der Wachstumsphase abhängt, kann dieser Unterschied nicht als Signifikant angesehen werden.

Das Profil der polaren Lipide des Isolats 2425 zeigte als Hauptkomponenten Diphosphatidylethanolamin (DPG), Phosphatidylethanolamin (PE), Phosphatidylglycerol (PG) und Phosphatidylserin (PS), des Weiteren sind noch fünf nicht identifizierte Lipide (L2-L7) vorhanden, ein nicht identifiziertes Phospholipid (PL1) und ein nicht identifiziertes Aminophospholipid (APL1).

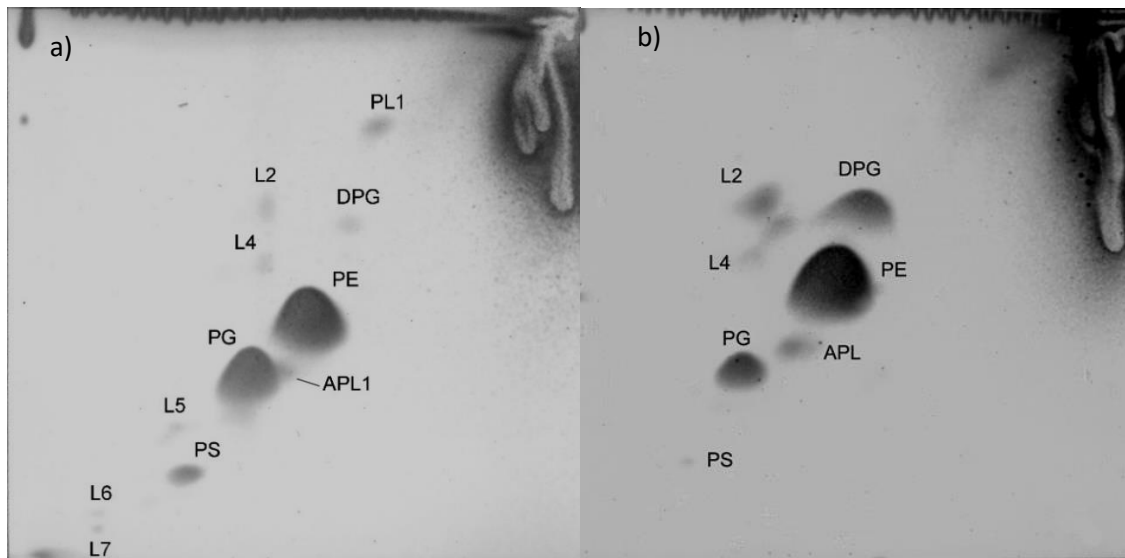


Figure 12: polare Lipide von a) Isolat 2425 b.) Isolat 2805 nach zweidimensionaler Dünnschichtchromatographie und Detektion mit Molybdätdi-phosphorsäure. DPG (Diphosphatidylglycerol), PG (Phosphatidylglycerol); PE (Phosphatidylethanolamin); PS (Phosphatidylserin); L2-L7 (nicht identifizierte Lipide), PL1 (nicht identifiziertes Phospholipid), APL1 (nicht identifiziertes Aminophospholipid)

Das Lipidprofil von 2805 und 2425 sind relativ ähnlich aber doch verschieden. Alle identifizierten Lipide kommen auch bei Isolat 2805 vor, aber die nicht identifizierten Lipide L5-L7 konnten bei 2805 nicht nachgewiesen werden.

Die sehr niedrige 16S rRNA Gensequenz Ähnlichkeit von 2425 zu *G. anatis* von unter 95% könnte auf ein neues Genus schließen lassen, da die phänotypischen Eigenschaften aber sehr gut zu *G. anatis* passen, wäre eine Zuteilung zu dem Genus *Gallibacterium* denkbar. Folgende Tabelle zeigt einen Vergleich der 16S rRNA Gensequenzen der verschiedenen *Gallibacterium* Arten. Dass

die Sequenzähnlichkeit nirgends über 95% geht zeigt, dass es sehr wohl möglich ist das Isolat 2425 den Genus *Gallibacterium* zuzuordnen.

Tabelle 12: Vergleich der 16S rRNA Gensequenzen der *Gallibacterium* Arten. Angaben in Prozent

	<i>G. anatis</i> F149 ^T	<i>G. melopsittaci</i> F450 ^T	<i>G. salpingitidis</i> F150 ^T	<i>G. trehalosi</i> 52/S3/90 ^T
<i>G. anatis</i> F149 ^T	100	94,2	93,0	92,2
<i>G. melopsittaci</i> F450 ^T		100	94,2	95,2
<i>G. salpingitidis</i> F150 ^T			100	93,7
<i>G. trehalosi</i> 52/S3/90 ^T				100

Tabelle 13: Das Polyaminmuster von 2425, Abkürzungen: DAP (1,3-Diaminopropan); PUT (Putrescin); CAD (Cadaverin); NSPD (Norspermidin); SPD (Spermidin); und SPM (Spermin)

polyamin	µmol/g 2425	µmol/g 2805
DAP	21,20	59,58
PUT	7,03	12,02
CAD	3,63	0,13
NSPD	1,18	-
SPD	6,70	12,27
SPM	0,27	1,22

rpoB (RNA Polymerase β -UE):

Tabelle 14: Ähnlichkeiten in der partiellen *rpoB* Gensequenz und der korrespondierenden rpoB Proteinsequenz von 2425, 2805 und *G. anatis* F149^T (Oberes Dreieck, Nukleotidsequenz; unteres Dreieck, Aminosäuresequenz. Angaben in Prozent)

	2425	2805	<i>G. anatis</i> F149 ^T
2425		81,8	83,0
2805	91,0		97,1
<i>G. anatis</i> F149 ^T	91,5	99,6	

atpD (ATP synthase CF1 delta subunit):

Tabelle 15: Ähnlichkeiten in der partiellen *atpD* Gensequenz und der korrespondierenden atpD Proteinsequenz von 2425, 2805 und *G. anatis* F149^T (Oberes Dreieck, Nukleotidsequenz; unteres Dreieck, Aminosäuresequenz. Angaben in Prozent)

	2425	2805	<i>G. anatis</i> F149 ^T
2425		86,9	86,5
2805	99,5		99,4
<i>G. anatis</i> 149 ^T	99,5	99,2	

Tabelle 16: Zucker Fermentation der verschiedenen *Pasteurellaceae* Arten in Phenolrotbouillons.

	38	2028	2805	1387
Mannose	+	+	+	+
Raffinose	+	+	-	-
Melibiose	-	-	-	-
Maltose	+	+	-	+
Lactose	+	+	+	-
Glucose	-	+	+	+
L+Arabinose	+	+	-	-
D-Arabinose	-	-	-	+
Melezitose	-	+	-	-
Mannit	-	+	+	-
N-Acetyl D-Glucosamin	-	-	+	+
Saccharose	+	+	+	+
Rhamnose	-	-	-	-
Galactose	(+)	(+)	+	+
Trehalose	-	+	+	+

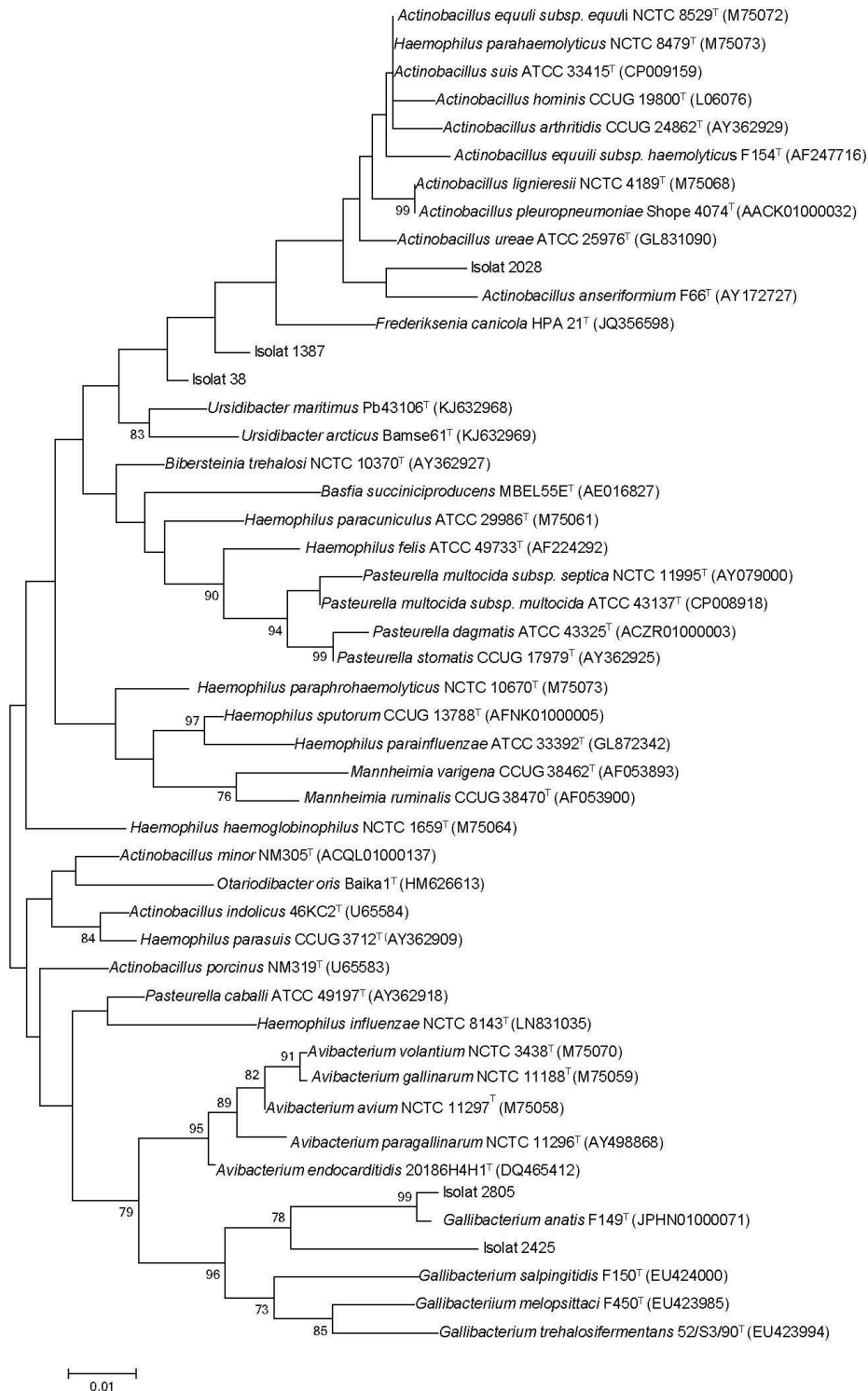


Abbildung 12: Maximum Likelihood Baum basierend auf 16S rRNA Gensequenzen der untersuchten *Pasteurellaceae* Isolate und deren nächsten Verwandten. Bootstrap Werte <70% basierend auf 500 Wiederholungen.

Im Großen und Ganzen unterstützt der Stammbaum die bereits erlangten Ergebnisse und Interpretationen. Eindeutig zeigt er zum Beispiel, dass 2805 sehr nahe bei *G. anatis* steht, während 2425 einen eigenen Ast hat und somit in der Verwandtschaft weiter entfernt liegt. Durch den Stammbaum konnte ebenfalls darauf aufmerksam gemacht werden, wie nahe sich die zwei Isolate 1387 und 38 stehen, und wie weit dennoch 2028 von dem Isolat 38 entfernt ist.

Diverse

Isolat 2872-2

Das Isolat stammt aus einem Fisch (Art nicht dokumentiert). Es wuchs auf Blutagar, PYE-Agar und –Bouillon bei 28°C, die Kolonien waren durchscheinend gelblich und werden nach einiger Zeit relativ groß. Die Zuckerverwertung des Isolates 2872-2 wurde hier ebenfalls anhand von Phenolrotbouillons getestet, zeigte aber keine Säurebildung und somit keine Verfärbung ins gelbliche, bei keinem der supplementierten Zucker. Die Gram-Färbung zeigte relative große aber kurze Stäbchen die Gram-negativ färbten. Die Färbung von alten und jungen Zellen zeigte hierbei dasselbe Ergebnis. Der KOH Test war negativ bei alten Zellen und wurde mit jungen Zellen wiederholt, wo das Ergebnis eindeutig positiv war. Der Katalase Test war negativ. Die Auswertung des Sim Tests zeigte eine Trübung des Mediums außerhalb des Stichkanals, was auf eine Beweglichkeit des Isolates hinweist, es trat keine schwarze Verfärbung auf und auch der Indol Test war negativ.

Die Sequenzierung des 16S rRNA kodierenden Gens ergab ein Fragment von 1395 Nukleotiden. Ein Vergleich der 16SrRNA Gensequenz zeigt als nächsten Verwandten mit 94,05% *Aquitalea denitrificans* 5YN1-3^T, danach folgt *Aquitalea magnusonii* TRO-001DR8^T (93,90%) und *Vogsella indigofera* ATCC 19706^T (93,58%).

Die Hauptkomponenten der Polyamine sind Putrescin und in geringeren Mengen kommen Cadaverin und Spermidin vor.

Tabelle 17: Polyaminmuster von 2872-2, Abkürzungen: DAP (1,3-Diaminopropan); PUT (Putrescin); CAD (Cadaverin); SPD (Spermidin); SPM (Spermin)

polyamine	µmol/g
DAP	0,23
PUT	37,20
CAD	4,83
SPD	2,46
SPM	2,23

Das Chinonsystem bestand aus Q-8 als Hauptkomponente mit 97,79%, in geringen Mengen kamen auch Q-7 und Q-9 vor. Das Fettsäureprofil zeigte als Hauptkomponente C_{16:0} (33,49%) Fettsäuren, außerdem kamen noch C_{12:0} (6,20%), C_{14:0} (6,54%), C_{10:0} (5,04%), C_{10:0} 3OH (3,58%), C_{12:0} 3OH (4,24%) und C_{15:0} (4,03%) Fettsäuren vor und relativ große Mengen an C_{16:1} ω7c und/oder C_{15:0} iso 2OH Fettsäuren (Sum3). Der Vergleich mit *A. denitrificans* zeigt ebenfalls Sum3 und C_{16:0} Fettsäuren als Hauptkomponenten und auch die anderen Werte stimmen sehr genau überein, bis auf C_{15:0} und C_{10:0} konnten alle Fettsäuren des Isolates 2872-2 auch bei *A. denitrificans* nachgewiesen werden [66].

Das Profil der polaren Lipide des Isolats 2872-2 zeigt als Hauptkomponenten Diphosphatidylglycerol (DPG), Phosphatidylethanolamin (PE), Phosphatidylglycerol (PG) und Phosphatidylserin (PS), des Weiteren sind noch zwei nicht identifizierte Lipide (L1-L2) und ein nicht identifiziertes Phospholipid (PL) vorhanden.

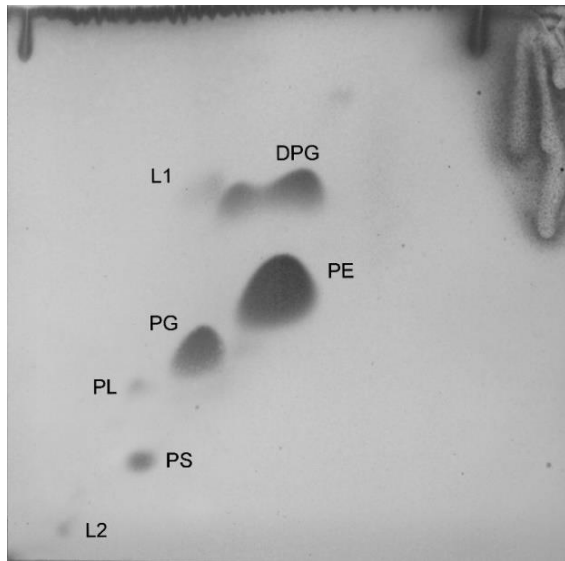


Abbildung 13: polare Lipide von 2872-2 (*Aquitalea* sp.) nach zweidimensionaler Dünnschichtchromatographie und Detektion mit Molybdatophosphorsäure. DPG (Diphosphatidylglycerol); PG (Phosphatidylglycerol); PE (Phosphatidylethanolamin); PS (Phosphatidylserin) L1-L2 (nicht identifizierte Lipide); PL (nicht identifiziertes Phospholipid)

Anhand der nicht molekularen Eigenschaften ist es schwer zu sagen, ob es sich bei dem Isolat 2872-2 um eine neue Art handelt, da es bei *A. denitrificans* keine Polyamine oder polaren Lipide zum Vergleich gibt und auch die Fettsäuren sehr genau übereinstimmen. Es wäre also sinnvoll die polaren Lipide und Polyamine von *A. denitrificans* zu analysieren um Vergleichswerte zu schaffen. Die Sequenzen der 16S rRNA von 2872-2 und *A. denitrificans* sind sehr unterschiedlich (94,05%), was wiederum eindeutig auf eine neue Art oder sogar ein neues Genus schließen lässt. Da die zwei *Aquitalea* Arten *A. denitrificans* und *A. magnusonii* in der 16S rRNA Gensequenz 99% Übereinstimmung zeigen, ist eine Zuordnung zu einem noch nicht beschriebenen Genus denkbar.

Isolat 2872-3

Das Isolat wurde aus einem Fisch isoliert (Art nicht dokumentiert). Die Kolonien waren weißlich durchscheinend und der Rand war ausgefranst. Das Isolat wuchs auf Blutagar, PPLO-Agarplatten und in PPLO Flüssigkultur mit Agarwasser. Für die Flüssigkultur wurde anstatt destilliertem Wasser Agarwasser verwendet. Die Auswertung der Zuckerverwertung in den

Phenolrotbouillons zeigte eine Verwertung von Maltose, Glucose, N-Acetylglucosamin und Saccharose.

Die Gram-Färbung von alten Zellen (6 Tage) zeigt Gram-negative Kokken, die sich in langen dünnen Ketten anordnen. Junge Zellen (24h) hingegen zeigten sich sowohl Gram-positiv als auch Gram-negativ und ordnen sich als Stäbchen zu langen Ketten an. Der KOH Test war negativ und deutet somit auf Gram-positive Zellen hin, der Katalase Test war positiv.

Die Sequenzierung des 16S rRNA kodierenden Gens ergab ein Fragment von 1413 Nukleotiden. Ein Vergleich der 16SrRNA Gensequenz zeigt als nächsten Verwandten mit 95,70% *Bacillus oryzaecorticis* R1^T, danach folgen mit 95,04% *Bacillus vietnamensis* 15-1^T und *Bacillus gaemokensis*^T.

Das Chinonsystem bestand aus MK-7 als Hauptkomponente mit 99,65%, in Spuren wurde MK-6 gefunden. Das Chinonsystem von *B. oryzaecorticis* hingegen zeigt neben MK-7 auch noch MK-5 als Hauptkomponente (50%). Das Fettsäure-Profil besteht aus den Fettsäuren C_{15:0} ISO (32,63%) und C_{15:0} ANTEISO (33,41%) als Hauptkomponenten, außerdem aus C_{16:1} ω7c alcohol (16,83%), C_{14:0} ISO (5,63%), C_{16:1} ω11c (3,75%) und ISO C_{17:1} ω10c (4,84%) Fettsäuren. Geringe Mengen an C_{17:1} Iso I und/oder Anteiso C8 Fettsäuren (Sum4) wurden ebenfalls gefunden. Der Vergleich mit *B. oryzaecorticis* zeigt einige Ähnlichkeiten. Es kommen dieselben Fettsäuren in ungefähr gleichen Mengen vor aber C_{16:1} ω7c alcohol kommt bei 2872-3 in viel höheren Mengen vor als bei *B. oryzaecorticis*, umgekehrt kommt bei *B. oryzaecorticis* dafür C_{16:0} vor, welche bei 2872-3 fehlt [67]. *meso*-Diaminopimelinsäure konnte bei 2872-3 als Diaminosäure nachgewiesen werden.

Das Profil der polaren Lipide des Isolats 2872-3 zeigt als Hauptkomponenten Diphosphatidylglycerol (DPG), Phosphatidylethanolamin (PE), Phosphatidylglycerol (PG) und des Weiteren sind noch zwei nicht identifizierte Lipide (L1-L2), zwei nicht identifizierte Aminophospholipide (APL1-APL2), ein nicht identifiziertes Glycolipid (GL1) und ein nicht identifiziertes Aminophosphoglycolipid (APGL1) vorhanden. Das Lipidprofil von *B. oryzaecorticis* ist dem von Isolat 2872-3 ähnlich, es kommen ebenfalls die Hauptkomponenten DPG, PE und PG vor, allerdings konnte das GL1, APL2 und APGL1 bei *B. oryzaecorticis* nicht gefunden werden.

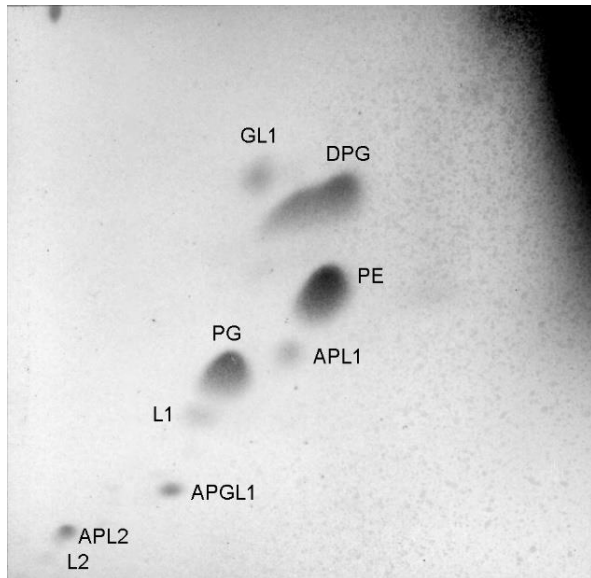


Abbildung 14: polare Lipide von Isolat 2872-3 (*Bacillus* sp.) nach zweidimensionaler Dünnschichtchromatographie und Detektion mit Molybdatophosphorsäure: Diphosphatidylglycerol (DPG), Phosphatidylethanolamin (PE), Phosphatidylglycerol (PG), zwei unidentifizierte Lipide (L1-L2), zwei unidentifizierte Aminophospholipide (APL1-APL2), ein unidentifiziertes Glycolipid (GL1) und ein unidentifiziertes Aminophosphoglycolipid (APGL1)

Die sehr eindeutigen Unterschiede bei dem Chinonsystem zu *B. oryzaecorticis* und die auch vorhandenen Unterschiede in den polaren Lipiden lassen darauf schließen, dass es sich bei 2872-3 um eine noch nicht beschriebene Art innerhalb des Genus *Bacillus* handelt. Die Ergebnisse der 16S rRNA Gensequenz Vergleiche unterstützen dieses Ergebnis.

Isolat 2272/2

Das Isolat wurde aus einem Alpaka-Gelenk isoliert und wuchs bei 37°C und auf Blutagar jedoch nicht auf BHI/PPLO oder PYE. Die Gram-Färbung zeigte kleine Gram-positive Kokken.

Die Sequenzierung des 16S rRNA kodierenden Gens ergab ein Fragment von 1149 Nukleotiden. Es zeigt als nächsten Verwandten mit 98,26% *Actinomyces cardiffensis* CCUG 44997^T, danach folgen mit 97,65% *Actinomyces meyeri* CIP103148^T und mit 97,39% *Actinomyces funkei* CCUG 42773^T.

Zusammenfassung

Die aus der veterinärmedizinischen Diagnostik stammenden Bakterienisolate wurden molekularbiologisch, physiologisch und chemotaxonomisch untersucht um Aussagen zu deren Verwandtschaft treffen zu können und sie danach taxonomisch einzuordnen. Im Rahmen der molekularbiologischen Methoden wurden, neben der 16S rRNA, auch diverse „house-keeping“ Gene analysiert. Die chemotaxonomischen Methoden beinhalten die Analyse der Chinone, polaren Lipide, Polyamine und Fettsäuren.

Drei der untersuchten Isolate stammen vom Waldrapp und konnten alle eindeutig dem Genus *Corynebacterium* zugeordnet werden. Während es sich bei 200CH eindeutig um eine neue Art handelt, ist es wahrscheinlich, dass 812CH *C. pelargi* zugeordnet werden kann, bei W8 ist die Zuordnung nicht so eindeutig, aber vor allem die Analyse der „house-keeping“ Gene lässt auch hierbei vermuten, dass es sich um eine neue Art handelt.

Die Isolate 38, 2028, 1387, 2805 und 2425 lassen sich alle eindeutig der Familie der *Pasteurellaceae* zuordnen, gehören aber unterschiedlichen Genera an. 2028 ist abhängig vom V-Faktor und zeigt chemotaxonomisch eine sehr hohe Ähnlichkeit zu *A. equuli*, welcher aber V-Faktor unabhängig ist und auch die molekularbiologischen Untersuchungen zeigen eindeutig, dass es sich hierbei um eine neue Art handelt. Die Isolate 1387 und 38 zeigen sehr ähnliche 16S rRNA Gensequenzen und zeigen auch beide Vertreter des Genus *Ursidibacter* als nächsten Verwandten. Auf molekularer Ebene ist eine Zuordnung zu diesem Genus für beide Isolate eindeutig, da das Genus sehr jung ist, gibt es leider wenig Vergleichsmöglichkeiten um diese Aussage auch chemotaxonomisch zu bestätigen. Das Isolat 1387 zeigt außerdem sowohl chemotaxonomisch, als auch auf molekularer Ebene, signifikante Unterschiede zu *Frederiksenia canicola*, welche laut 16S rRNA die nächste Verwandte Art nach *Ursidibacter* ist. Sehr auffällig ist, dass DPG (Diphosphatidylglycerol) im polaren Lipidprofil von *F. canicola* vorkommt aber nicht bei Isolat 1387.

Die Isolate 2805 und 2425 gehören beide zum Genus *Gallibacterium*, wobei 2805 chemotaxonomisch und genetisch sehr ähnlich zu *G. anatis* ist, jedoch signifikante Unterschiede im Chinonsystem zu erkennen sind. 2425 zeigt sowohl morphologisch als auch auf molekularer Ebene eindeutige Unterschiede zu *G. anatis*. Die Ergebnisse der chemotaxonomischen

Untersuchungen lassen auf eine Zugehörigkeit zum Genus *Gallibacterium* schließen. Da auch die anderen *Gallibacterium* Arten geringe Übereinstimmung in der 16S rRNA Gensequenz vorweisen (92%-95%), ist die geringe Übereinstimmung der 16S rRNA von Isolat 2425 mit der von *G. anatis* hier kein Widerspruch, wenn es um die Genuszugehörigkeit geht.

2872-2 ist das einzige in Rahmen dieser Arbeit untersuchte Isolat, bei dem die Beschreibung eines neuen Genus möglich ist. Bis jetzt ist dies aber anhand der wenigen Vergleichsmöglichkeiten der chemotaxonomischen Eigenschaften innerhalb des Genus *Aquitalea* nicht möglich. Das Isolat 2872-3 ist nun wieder eindeutig dem Genus *Bacillus* zuzuordnen. Als Diaminosäure konnte *meso*-Diaminopimelinsäure nachgewiesen werden. Mit MK-7 als Hauptkomponente und Spuren von MK-6 unterscheidet sich das Chinonsystem von 2872-3 eindeutig von dem des nächsten Verwandten *B. oryzaecorticis* und auch der Sequenzvergleich der 16S rRNA lässt darauf schließen, dass es sich hier um eine noch nicht beschriebene Art handelt.

Abstract

The bacterial isolates, received from the veterinary diagnostics, were analyzed on a molecular and chemotaxonomic basis to investigate their relatedness and to establish species according to taxonomic standards. The molecular methods include 16S rRNA analysis as well as analysis of multiple housekeeping genes. The chemotaxonomic methods on the other hand include the analysis of quinones, polar lipids, polyamines and fatty acids.

Three of the analyzed isolates were isolated from a waldrapp and they were classified as strains of the genus *Corynebacterium*. Data collected for 200CH clearly demonstrated that this strain is a representative for a new species and 812CH is a member of the *C. pelargi* species, it is not that easy with the classification of W8. But especially the analysis of the housekeeping genes let assume that W8 as well is a new species.

The isolates 38, 2028, 1387, 2805 and 2425 all belong to the family of *Pasteurellaceae*, however they belong to different genera. 2028 is dependent on the V-factor and shows chemotaxonomically high similarities to *A. equuli*, which is not dependent on V-factor, however, the molecular analysis of the 16S rRNA gene sequence showed that 2028 is a new

species for sure. The two isolates 1387 and 38 showed very high 16S rRNA sequence similarity and both showed species of the genus *Ursidibacter* as their next relatives. On molecular basis, the assignment to this genus is clear, but the genus *Ursidibacter* is newly described and there are not enough comparative possibilities to confirm this statement on a chemotaxonomic level. The isolate 1387 showed significant differences, chemotaxonomically as well as molecular, to *Frederiksenia canicola*, which is the next relative to 1387 after the *Ursidibacter* species. It is quite suspicious, that DPG (Diphosphatidylglycerol) is present in the polar lipid profile of *F. canicola*, but not in the polar lipid profile of 1387.

The isolates 2805 and 2425 both belong to the genus *Gallibacterium* with 2805 having high similarities with *G. anatis*. 2425 shows significant differences to *G. anatis* morphological as well as on a molecular basis. Results of the chemotaxonomic analysis suggest that both isolates belong to the genus *Gallibacterium*. As all other *Gallibacterium* species have low values of accordance in the 16S rRNA gene sequence (92%-95%), there is no contradiction to 2425 being member of the genus *Gallibacterium*.

The isolate 2872-2 could be described as a new genus, according to its 16S rRNA gene sequence but as there are no possibilities to compare polyamines and polar lipids with the next relative, *A. dentitrificans*, it is hard to say whether 2872-2 is a new genus or not. 2872-3 belongs to the genus *Bacillus*. The peptidoglycan contains *meso*-diaminopimelic acid. With MK-7 as main component in the quinone system and traces of MK-6, the quinone system of 2872-3 is quite different to the one of *B. oryzaecorticis*, which is the next relative of 2872-3. The 16S rRNA gene sequence comparison also suggests that 2872-3 is a not yet described species.

Anhang

16S Sequenzen

W8:

CCTTGCTTGAAGGTAAGTCTGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTGACCTGCCCTGCACTTTGGGATAAGCCTGGGAAA
CTGGGTCTAATACCAGATAGGACCATGATGTAGTGATTGTGGTGGAAAGTTTTTCGGTGTGGGATGGGCCCGCGGCCTATCA
GCTTGTGGTGGGGTAATGGCCTACCAAGGCGGCGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGGACGGCCACATTGGGACTGAGA
TACGGCCAGACTCCTACGGGAGGACAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGGG
GGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCGCAAGGGACGAAGCGTTTTGTGACGGTACCTTGAGAAGAAGCACCGGCTAA
CTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGTGCAGCGTGTCCGGAATTACTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGTGGTTTGT
CGCGTCGTCTGTGAAATTCGGGGCTTAACCTCCGGGCGTGCAGGCGATACGGGCATAACTTGAGTGCTGTAGGGGAGACTGG
AATCCTGGTGTAGCGGTGAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGATGGCGAAGGCAGGTCTCTGGGCAGTAACGACGC
TGAGGAGCGAAAGCATGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGGTGGGCGCTAGGTGTAGGG
GTCTTCCACGACTTCTGTGCCGTAGCTAACGCATTAAGCGCCCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAA
TTGACGGGGGCGCCGACAAGCGGCGGAGCATGTGGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGGCTTGACATACACC
AGATCGCTGCAGAGATGTAGTTCCCTTGTGGTTGGTGTACAGGTGGGTGCATGGGTTGTCGTACGCTTCGTGTCGTGAGAT
GTTGGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCTTATGTTGCCAG

200CH:

GGGTGATCTGCCCCGCACTCCGGGATAAGCCTGGGAACTGGGTCTAATACTGGATATTCAGTGCCTTCTAGGTGGGTAGTGG
AAAGTTTTTCGGTGTGGGATGAGCCTGCGGCCTATCAGCTTGTGGTGGGGTAATGGCCTACCAAGGCGGCGACGGGTAGCC
GGCCTGAGAGGGTGTACGGCCACATTGGGACTGAGATACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACA
ATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCGGCAGGGACGAAGCG
TAAGTGACGGTACCTGCATAAGAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGTGCAGCGTTGTCCG
GAATTACTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGTGGTTTGTGCGTCGTCTGTGAAATTCGGGGCTTAACCTCCGGGCGTGCAGGCGA
TACGGGCATAACTTGAGTGCTGTAGGGGAGACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCG
ATGGCGAAGGCAGGTCTCTGGGCAGTAACGCTGAGGAGCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTA
GTCCATGCTGTAAACGGTGGGCGCTAGGTGTGGGGGTCTTCCACGACTTCTGTGCCGTAGCTAACGCATTAAGCGCCCCGCT
GGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCGCCGACAAGCGGCGGAGCATGTGGATTAATTCGAT
GCAACGCGAAGAACCTTACCTGGGCTTGACATACAGAGATCGCTGCAGAGATGTAGTTTCCCTTGTGGTTCTGTGTACAGGTG
GTGCATGGTTGTCGTACGCTCGTGTGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCTTATGTTGCCAGCAC
GTGATGGTGGGGACTCATGAGAGACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATATGCCCTTATG
TCCAGGGCTTACACATGCTACAATGGTCGGTACAGCGCGCTGCGAGCCTGTGAGGGTAAGCGAATCGCTTTGAAAGCCGGCC
TCAGTTCCGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAACGCTGCGGTGAATAC
GTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACGTCATGAAAGTTGGTAACACCCGAAGCCAGTGGCTTAACC

812CH:

GAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTGACCTGCCCTGCACTTTGGGATAAGCCTGGGAACTGGGTCTAATACCAGAT
AGGACCACATGGTAGTTCGTGTGGTGGAAAGTTTTTCGGTGTGGGATGGGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTGGTGGGGTAAT
GGCCTACCAAGGCGGCGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGGACGGCCACATTGGGACTGAGATACGGCCAGACTCCTAC
GGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCTGGGGGATGACGGCCTTCGGGT
GTAAACCTCTTTCGCAAGGGACGAAGCTTTTTGTGACGGTACCTTGAGAAGAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGC
GGTAATACGTAGGGTGCAGCGTTGTCCGGAATTACTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGTGGTTTGTGCGTCGTCTGTGAAATT
CCGGGGCTTAACCTCCGGGCGTGCAGGCGATACGGGCATAACTTGAGTGCTGTAGGGGAGACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGT
GGAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGATGGCGAAGGCAGGTCTCTGGGCAGTAACGCTGAGGAGCGAAAGCATG
GGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGGTGGGCGCTAGGTGTAGGGATCTTCCACGATTCTGTG
CCGTAGCTAACGCATTAAGCGCCCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCGCCGACA
AGCGGCGGAGCATGTGGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGGCTTGACATACACCAGATCGGGCTAGAGATA
GTCTTCCCTTGTGGTTGGTGTACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTACGCTCGTGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGA
GCGCAACCCTTGTCTTATGTTGCCAGCACGTAATGGTGGGGACTCATGAGAGACTGCCGGGGTGAACCTCGGAGGAAGGTGGG
GATGACGTCAAATCATATGCCCTTATGTCCAGGGCTTACACATGCTACAATGGTCGGTACAACGCGCAGCGAGCCTGTGAG
GGTAAGCGAATCGCTGAAAGCCGGCCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCG
CAGATCAGCAACGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACGTCATGAAAGTTGGTAACAC

TGCAGTCGAACGGTAAACAGGGAGGAGCTTGCTCCTTTGCTGACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAATGCTTGGGAATCTGGCTT
ATGGAGGGGGATAACTACGGGAACTGTAGCTAATACCGCGTAATATCTTCGGATTAAAGAATGGGACTTTTTAGCCATTCGC
CATAAGATGAGCCCAAGTGGGATTAGGTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGCCGACGATCTCTAGCTGGTCTGAGAGGA
TGACCAGCCACACTGGAAGTGAACACGGTCCAGACTCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGGGGAACC
CTGATGCAGCCATGCCGCGTGAATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAGTTCTTCGGTAGCGAGGAAGGTGTCAATTCTAATA
GGTTTGCCAATTGACGTAACTACAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCGAGCG
TTAATCGGAATAACTGGGCGTAAAGGGCACGCAGGCGGTTGATTAAAGTGAGATGTGAAAGCCCCGAGCTTAACTTGGGAATT
GCATTTCACTGGTCAACTAGAGTACTTTAGGGAGGGGTAGAATTCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGG
AATACCGAAGGCGAAGGCAGCCCCTTGGGAATGTACTGACGCTCATGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACC
CTGGTAGTCCACGCTGTAAACGCTGTCGATTTGGGGATTGGGCTTTAAGCTTGGTGCCCGTAGCTAACGTGATAAATCGACCGC
CTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTAAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCTGA
TGCAACGCGAAGAACCTTACCTACTCTTGACATCCAAAGAATTCTGCAGAGATGCGGAAGTGCCTTCGGGAGCTTTGAGACAG
GTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTATCCTTTGTTGCCAG
CGATTTGGCCGGGAACTCAAAGGAGACTGCCAGTGATAAAGTGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTA
CGAGTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGTGCATACAGAGGGAAGCAATCCTGCGAGGGGGAGCAAATCTCACAAGTGAT
CTAAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTNGTAATCGCGAATCAGAATGTCGCGGTGAATAC
GTTCCCGGGCCTTGATACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTGGGTTGTACCAGAAGTAGATAGCTTAACCGCAAGGGGGGC

GCTCAGCGCAATGGATGAGAGCTTGCTCTCAGAAGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCTTAAGACT
GGGATAACATCGAGAAATCGGTGCTAATACCGGATAATTTATTTGACCGCATGGTTGAATAATGAAAGGTGGCGTAAGCTACC
ACTTATGGATGGACCCGCGCGTATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTACCAAGGCAACGATACGTAGCCGACCTGAGAG
GGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAA
GTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAAACCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAAGTGCCGTTCTGA
ATAGGGCGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCGA
GCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGGTTCCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCACGGCTCAACCGTGGAG
GGTCATTGGAAACTGGGGAACCTGAGTGCAAGGAGAGGAAAGTGGAATTCGAAGTGACGGGTGAAATGCGTAGAGATTTGG
AGGAACACCAAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGCCTGTAACCTGACACTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGAT
ACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTCCGCCCTTAGTGCTGAAGTTAACGCATTAAGCA
CTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGTGGTGAGCATGTGGTTTA
ATTGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAACCCTAGAGATAGGGCGTTCCTTCGGGGACAGAG
TGACAGGTGGTGATGGTTGTCGTGAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTCTTAGT
TGCCAGCATTCAGTTGGGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCC
CCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATGGTACAAAGGGCTGCAAACCTCGCGAGGGTAAGCGAATCCCATAAAAAC
CATTCTCAGTTCGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGCCGGAATCACTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAA
TACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAAACCCGAAGTCGGTGGGGTAACCGTAAGGAGC
CAGCCGCC

GCAGTCGAACGGTAACGGGTTGAAAGCTTGCTTTCAATGCTGACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAATGCTTGGGAATCTGGCT
TATGGAGGGGGATAACCATTGAAACGATGGCTAATACCGCTAGAAATCGAGAGATGAAAGGGGAGCGCAAGCTTTTGCCAT
GAGATGAGCCCAAGTAAGATTAGGTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGCCGACGATCTTTAGCTGGTCTGAGAGGATGA
TCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCGCAATGGGGGGAACCTG
ACGCAGCCATGCCGCGTGAATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTTCCTTCGGTGATGAGGAAGATTGGTGTGTGAATAGCA
CATTAAATTTGACGTTAGTTACAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGGTGCGAGCGTTAA
TCGGAATAACTGGGCGTAAAGGGCACGCAGGCGGTTATTTAAGTGAGATGTGAAAGCCCCGAGCTCAACTTGGAATTGCATT
TCAGACTGGATAGCTAGAGTACTTTAGGGAGGGGTAGAATCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAATAC
CGAAGGCGAAGGCAGCCCCCTTGGAAGATACTGACGCTCATGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGT
AGTCCACGCTGTAACGATGTCGATTTGGGTGTTGAAGGAGTTATGGCACTCGAAGCTAACGTGATAAATCGACCGCCTGGG
GAGTACGGCCGCAAGGTTAACTCAATGAATTGACGGGNGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTTCGATGCAA
CGCGAAGAACCTTACCTACTCTTGACATCCTAAGGAGAAGCTAGAGATAGCTTTGTGCTTTCGAGAACTTAGAGACAGGTGCTG
CATGGCTGTCGTGAGCTCGGGTTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGGGCAACCCTTATCCTTTGTTACCATCGGGTA
AAGCCGGGGACTCAAAGGAGACTGCCAGTGACAAGCTGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGAGT

AGGGCTACACACGTGCTACAATGGTGCATACAGAGGGAGGCGAGCCTGCGAGGGTAAGCGAAACTCAGAAAGTGCATCGTA
GTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGAAATCAGAATGTTGCGGTGAATACGTTCC
CGGGCCTTGT

38:

GCAGTCGAACGGTAGCAGGAGAAAGCTTGCTTTCTTGCTGACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAATGCTTGGAATCTGGCTTA
TGGAGGGGGATAACTACGGGAAACTGTAGCTAATACCGCTAATATCTTCGGATTAAAGGGTGGGACTTTCGGGCCACCTGCC
ATAAGATGAGCCCAAGTGGGATTAGGTAGTTGGTGGGGTAAGGGCTACCAAGCCGACGATCTTAGCTGGTCTGAGAGGAT
GACCAGCCACACTGGAAGTGAACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGGGGAACCC
TGATGCAACCATGCCGCGTGAATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTCTTTTCGGTAGCGAGGAAGGCAATTTGTTTAATAG
ACAAGTTGATTGACGTTAACTACAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGGTGCAGCGT
TAATCGGAATGACTGGGCGTAAAGGGCACGCGAGCGGTGACTTAAGTGAGATGTGAAAGCCCCGGGCTTAACCTGGGAATTG
CATTTCACTGGGTGCTAGAGTATTTAGGGAGGGGTAGAATTCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGA
ATACCGAAGGCGAAGGCAGCCCTTGGGAATATACTGACGCTCATGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCC
TGGTAGTCCACGCTGTAAACGATGTGATTTGGGGATTGGGCTATATGCTTGGTGGCGAAGCTAACGTGATAAATCGACCGC
CTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCGACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTGCA
TGCAACGCGAAGAACCTTACCTACTCTTGACATCCAAAGAAGCTCGTAGAGATATGAGTGTGCCTTCGGGAACCTTGAGACAG
GTGCTGCATGGCTGTCGTGAGCTCGTGTGTGAAATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCCTTTGTTGCCAG
CGATTAGGTTCGGGAACCTCAAAGGAGACTGCCAGTGATAAAGTGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTA
CGAGTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGTGCATACAGAGGGAAGCAATAGTGCAGCTGGAGCGAATCTCAGAAAGTGCAT
CTAAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGAAATCAGAATGTTGCGGTGAATAC
GTTCCCGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTGGGTTGTACCAGAAGTAGATAGCTTAACCTTCGGGAGGGC

2872/2:

TGCAGTCGAACGGTAACAGGGAGCTTCGGCCTGCTGACGAGTGGCGAACGGGTGAGTAATGCGTCGGAACGTGCCAAGTAGT
GGGGGATAACGCATCGAAAGGTGTGCTAATACCGCATACGCTCTGAGGAGGAAAGCAGGGGATCTTAGGACCTTGCGCTATT
TGAGCGGCCGACGTCTGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGATGAT
CAGCCACACTGGAAGTGAACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTGGACAATGGGCGCAAGCCTGA
TCCAGCCATGCCGCGTGAGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCTCTTTGTCCGGGAGGAAATCCCTGAAGTTAATACCTTC
AGGGGATGACAGTACTGGAAGAATAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGTGAAGCGTTAAT
CGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGCGCAGGCGGTTTGATAAGTAAGATGTGAAATCCCCGGGCTTAACCTGGGAACCTGCGTTT
TAACTGTCAGACTAGAGTACGTGAGAGGGGGGTAGAATTCACGTGTAGCAGTGAATGCGTAGAGATGTGGAGGAATACC
GATGGCGAAGGCAGCCCCCTGGGATGATACTGACGCTCATGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTA
GTCCACGCCCTAAACGATGTCAATTAGCTGTTGGGGGTTAGAATCCTTGGTAGCGTAGCTAACGCGTGAAATTGACCGCTGG
GGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGACAAGCGGTGGATGATGTGGATTAATTCGATGCA
ACGCGAAAAACCTTACCTACCTTGACATGTATCGAAGTTCAGAGATGGCTTGGTGGCGAAAGGGAGCGATAACACAGGT
GCTGCATGGCTGTCGTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGCCATTAGTTGCCATCA
TTAAGTTGGGCACTTAATGGGACTGCCGGTGACAAACCGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTCATGGCCCTTATGG
GTAGGGCTTCACACGTCATACAATGGTCCGTACAGAGGGTTGCGAAGCCGCGAGGTGGAGCTAATCTCATAAAACCGATCGTA
GTCCGGATCGCACTCTGCAACTCGAGTGCCTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTT
CCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTGGGTTTACCAGAAGTGGGTAGGCTAACCGTAAGGA

2272/2:

GGTGACCGGTACATTGGGACTGAGATACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGGAA
GCCTGATGCAGCGACGCCGCTGAGGGATGTAGGCCCTTCGGGTTGTGAACCTCTTCGCTCATGGTCAAGCCGAGCTTTGGG
TTGTGGTGAGGGTAGTGGGTAAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGCGCGAGCGTTGTC
CGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTTGTAGGCGGTTGGTTGCGTCTGTCGTGAAATCCTCTGGCTTAAGTGGGGCTTGCGGTG
GGTACGGGCTGGCTTGAAGTGCCTAGGGGAGACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGGAATGCGCAGATATCAGGAGGAACAC
CGGTGGCGAAGGCGGCTCTTGGGCCGTTACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGG
TAGTCCACGCTGTAAACGTTGGGCACTAGGTGTGGGGGCCACCCGTGGTTTTCTGCGCCGTAGCTAACGCTTTAAGTGGCCCGC
TGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGACAAGCGGCGGAGCATGCGGATTAATTCGA
TGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTACATGCGCCCTGTTCTGAGAGATGTGGGGTCAATTTGGTTGGGGGTGTACAGG
TGGTGCATGGTTGTCGTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGCCTATGTTGCCAGC

ACGTTGTGGTGGGGACTCGTGGGGGACTGCCGGGGTAACTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTA
TGTCTTGGGCTTCACGCATGCTACAATGGCTGGTACAGAGGGTTGCGATGTCGTGAGGCGGAGCGAATCCCTTAAAGCCGGTC
TCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGGTGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAACGCTGCGGTGAATAC
GTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACGTACGAAAGTTGGTAACACCCGAAGCTCATGGCCTAACCATCG

2805:

AAGCTTGCTTTCAATGCTGACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAAGGCTTGGGGATCTGGCTTTTGGAGGGGGATAACCATTGGA
AACGATGGCTAATACCGCANAGAATCGAGAGATGAAAGGGGTGGGAAACCACTTGCCAAGGGATGAACCCAAGTGAGATTA
GGTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGCCGACGATCTCTAGCTGGTCTGAGAGGATGGCCAGCCACACTGGGACTGAGAC
ACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCGCAATGGGGGGAACCCTGACGCAGCCATGCCGCGGGAAT
GAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTCTTTTCGGTGGTGAGGAAGGTGGTAGTGTTAATAGCATTACTGTTTGACGTTAGCCAC
AGAAGAAGCACCGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCGAGCGTTAATCGGAATAACTGGGCGTAAA
GGGCACGCAGGCGGGACGTTAAGTGAGATGTGAAAGCCCCGGGCTTAACCTGGGAACAGCATTTTCATACTGGCGTACTAGAG
TACTTTAGGGAGGGGTAGAATTCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAATACCGAAGGCGAAGGCAGCCCC
TTGGGAAGATACTGACGCTCATGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGCT
GTCGATTTGGGGGTTGTACGAAAGGTATGGCTCTCGAAGCAAACGTGATAAATCGACCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGT
TAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCGCAACGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTA
CTCTTGACATCCTAAGGAGGAGCTAGAGATAGCTTTGTGCTTCGAGAAGTTAGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTGAGCTC
GTGTTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCTTATTCTTTGTTACCAGCGGGTAGAGCGGGGACTCAAAG
GAGACTGCCAGTGACAAGCTGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTGCT
ACAATGGTGCATACAGAGGGAGGCGAAGTAGCGATACGGAGCGAAAAGTGCATCGTAGTCCGATTGGAGTCTGC
AACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCAATCAGAATGTCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCG
CCCGTCACACCATGGGAGTGGGTTGTACCAGAAGTAGATAGCTTAACC

1387:

GCAGTCGAACGGTAGCAGGAGAAAGCTTGCTTTCTTGCTGACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAATGCTTGGGAATCTGGCTTA
TGGAGGGGGATAACTACGGGAACTGTAGCTAATACCGGTAATATCTTCGATTAAAGGGTGGGACTTTCGGGCCACCTGCC
ATAAGATGAGCCCAAGTGGGATTAGGTAGTTGGTGGGGTAAGGGCCTACCAAGCCGACGATCTCTAGCTGGTCTGAGAGGAT
GACCAGCCACACTGGAAGTACAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGGGGAACCC
TGATGCAGCCATGCCGCGTGAATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTCTTTTCGGTAGCGAGGAAGGTATTTGTTTTAATAG
AACAAGTAATTGACGTAACTACAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCGAGCGT
TAATCGGAATGACTGGGCGTAAAGGGCACGCAGGCGGGTTGTTAAGTGAGATGTGAAAGCCCCGGGCTTAACCTGGGAATTG
CATTTAGACTGGCAATCTAGAGTATTTAGGGAGGGGTAGAATTCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGA
ATACCGAAGGCGAAGGCAGCCCTTGGGAATATACTGACGCTCATGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCC
TGGTAGTCCACGCTGTAAACGATGTCGATTTGGGGATTGGGCTATATGCTTGGTGCCCGAAGCTAACGTGATAAATCGACCGC
CTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCGCAACGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGA
TGCAACGCGAAGAACCTTACCTACTCTTGACATCAAAGAAGCTCGTAGAGATATGAGTGTGCCTTCGGGAACCTTGAGACAG
GTGCTGCATGGCTGTCGTGAGCTCGTGTGTTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCTTATCCTTTGTTGCCAG
CGATTTGGTTCGGGAAGTCAAAGGAGACTGCCAGTGATAAAGTGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTA
CGAGTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGTGCATACAGAGGGAAGCAATAGTGCGAGCTGGAGCGAATCTCACAAGTGCAT
CTAAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCAAATCAGAATGTTGCGGTGAATAC
GTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTGGGTTGTACCAGAAGTAGATAGCTTAACCTTCGGGAGGG

MLST Sequenzen

Corynebacteria:

fusA

w8:

TCATCGATCGCCTCGGCGCTAAGCCCTTGGTGATGCAGCTTCCTATCGGCGCTGAAGATGACTTCGACGGCGTTGTGGACCTGC
TCGAAATGAAGGCCATCACCTGGCGCGGCAAGGTTGAGACCGCGCCGAGCCACCATCGAGGAGATCCCGGCTGATCTGGC
CGACAAGGCAGCCGAGTACCGCGAGAAGCTCGTGGAACCGTAGCTGAGTCCGACGAAGAGCTCATGGAGAAGTACTTCGGT
GGCGAGGAACCTACCATCGAGGAGCTCAAGGCCGGCATTGCAAGATGACCGTGAAGTCTGAGGTCTACCCTGTGCTCTGCGG
TACCGCTACCGCAACAAGGGCGTGACGCCCTGCTGGACGCCGTATTGACTACCTGCCTACCCCGCTGGACATCGGCGAGG
TTCACGGCCACGCTGTCAACGACGAGGCCAAGGAAGTGGTGCACAAGCCTTCCGTGGACGAGCCTTTCTCGGCTCTCGCCTTCA
AGATTGCTGCTACCCATTCTTCGGCAAGCTCACCTTCGTGCGTGTGTACTCCGGCATCGTTGAGCCGGGAGCTCAGGTGGCGA
ACTCCACCAAGGGCAAGAACGAGCGCATCGGCAAGCTCTTCAAATGCACGCCAACAAGGAGAACCCTGTCTCCGAGGCTCGC
GCAGGTAACATCTACGCGTTCATTGGCCTGAAGGACACCACCACTGGTGACACCCTTTCGATAAGAACGACCAGATCATCCTT
GAGTCTATGGACTTCCCGGATCCCGTGATCAAGGTGTCCATCGAGCCGAAGACCAAGTCTGACCAGGAGAAGCTCGGCGTTGC
CATCCAGAACTCGCCGAAGAGGACCCGACCTTCAGATTGAGCTGGATGAAGAGTCCGGCCAGACCGTGATCGGCGGCATG
GGCGAGCTCCACCTCGACGTGCTCGTGACCGCAGGAAGCGCGAGTTCAAGGTGGAAGCAAACGTGGGTAACCCCCAGGTTG
CGTACCGCGGGAC

200CH:

TCATCGACCGCCTCGGCGCCNAGCCGTTGGTACTGCAGCTGCCAATCGGCGCTGAAGACGACTTCGACGGCGTTGTTGACCTG
ATCAACATGCAGGCCATCACCTGGCGCGGCAAGGTTGACGTGCGGTGCAGAACCAACCTACGAAGAAATCCCTGCAGATCTCGC
TGACAAGGCTGCAGAATATCGCGAAAAGCTGCTGGAACTGTGCGCAGAGTCTGATGAAGAACTCATGGACAAGTACTTCGGTG
GCGAAGAACTACCGTCAAGAGATCAAGACCGCCATCCGCAAGATGACCGTCGCCTCTGAGGTCTACCCGGTACTGTGTGGC
TCCGCCTACAAGAACAAGGGCATCCAGCCGCTGCTCGACGCGGTTCATCGACTACCTGCCGACCCCAATGGACGTGGCGAGGT
GCACGGTCACGCTGTGCGCAACGAGAGCGAAGACATGACTCGTAAGCCTTCGTCTGACGAGCCATTCTCCGCGCTGGCCTTCA
AGATTGCCGCCACCCATTCTTCGGCAAGCTCACCTTCGTGCGCGTCTACTCCGGTGTGGTTACCCCTGGTGCCAGGTGCAAA
ACTCCACCAAGGACAAGAAAGAACGCATCGGTAAGCTCTCCAGATGCACGCGAACAAGGAGAACCCGGTTCGACGAAGCACG
CGCCGGTCACATCTACGCGTTCATCGGTCTGAAGGACACCACCACCGGTGACACCCTCTGCGACATCCAGAAGCCAATCATCCT
CGAATCGATGGACTTCCCGATCCGGTGATCCAGGTTGCGATCGAGCCGAAGTCAAGGCTGACCAGGAGAAGCTGTCCCTG
GCTATCCAGAAGCTCGCTGAAGAAAGACCCAACCTTCACCGTGAAGCTGGACGAAGAAACCGGCCAGACCGTGATCGGCGGTA
TGGGCGAGCTGCACCTCGACGTGCTCGTGACCGTATGAAGCGGGAATTCAAGGTGAAGCAAACGTTGGTGACCCGACAGGT
GGCTTACCGCGAGACCATCCGCAAGCCGGTCGAA

812CH:

TCGACCGCCTCGGCGCTAAGCCGTTGGTAATGCAGCTTCCTATCGGTGCTGAAGATGACTTCGACGGCGTTGTAGACCTGCTCG
AGATGAAGGCCATCACCTGGCGCGGCAAGGTTGAGACTGGTGCTGAACCCACCATCGAAGAGATCCCTGCTGATCTGAAGGA
AAAGGCTGAGCAGTACCGCGAGCAGCTCGTCGAGACCGTTGCTGAGTCCGATGAAGAGCTCATGGAGAAGTACTTCGGTGGC
GAAGAACTACCATCGAAGAGCTCAAAGCCGGCATCCGCAAGATGACCGTGAAGTCCGAGGTGTACCCCGTGCTTTGCGGTAC
CGTTACCGCAACAAGGGTGTGACGCCGCTCCTCGACGCTGTGATCGACTACCTGCCACCCCGCTGGACATCGGCGAGGTTCA
CGGCCACGCTGTTGGCGATGAGACCAAGGAAGTCTGCGTAAGCCTTCCGTTGAGGAGCCTTTCTCCGCACTGGCCTTCAAGAT
CGCCGCACACCCCTTCTTTGGCAAGCTCACCTTCGTGCGCGTGTACTCCGGTCTGGTTGAGCCCGGTGCTCAGGTGGCTAACTC
CACCAAGGGTAAGAACGAGCGCATTGGCAAGCTCTTCAGATGCACGCCAACAAGGAGAACCCGGTTTCCGAGGCTCGCGCA
GGTAACATCTACGCGTTCATCGGCCTGAAGGACACCACCACTGGTGACACCCTCTGCGATAAGAACAACCAGATCATCCTCGAG
TCCATGGACTTCCCGATCCTGTGATCAAGGTTTCATCGAGCCGAAGACCAAGTCTGACCAGGAGAAGCTCGGCGTTGCTATT
CAGAAGCTCGCCGAAGAGGACCCGACCTTCACCGTTGAGCTGGATGAGGAATCCGGCCAGACCGTGATCGGCGGCATGGGCG
AGCTGCACCTCGACGTGCTGGTCGACCGCATGAAGCGCGAGTTCAAGGTTGAAGCCAACGTTGGTAACCCGCAGGTTGCTTAC
CGCGAGACCATCCGCAAGCCTGTGG

C.epidermidicanis:

TCATCGACCGACTCGGAGCAAGCCATTGGTTCTCCAAGTCCCAATCGGTGCTGAAGATGACTTTGACGGCGTTGTCGACCTCGT
CAACATGCAGGCTCTGACCTGGCGCGGAAGGTTGAGGTTGGTCTCTGCCACCATCGAAGAGATCCCAGCAGATCTCGTCG
ACAAGGCCAACGAGTGGCGCGAGAAGCTCCTTGAGACCGTCGCTGAGTCCGATGAAGAGCTCATGGAGAAGTACTTCGGTGG
AGAAGAGCTCACCGTTGAGGAAATCAAGGCTGCTATCCGTAAGATGACGGTTGCTCCGAAGTTTACCCAGTTCTTTGTGGTAC
CGCATACCGCAACAAGGGCGTTACGCCCTGCTCGACGCAGTTATTGACTACCTGCCAACCCCACTGGACATCGGTGAAGTTCA
CGGCCACAAGGTGGGCGACGAAGCTGTTGATCTCATCCGTAAGCCTTCTGTTGATGAACCGTTCTCTGCTCTTGCCTTCAAGATC
GCTGCTACCCATTCTTTGGTAAGCTGACCTTTGTTGCGTTTACTCCGGTATCGTTGAGCCTGGCGCCAGGTTGCTAACTCCA
CCAAGGGCAAGAAGGAGCGCATCGGTAAGCTGTTCCAGATGCACGCCAACAAAGGAAAATCCTGTCGACGAAGCACGGGCTGG
TAACATCTACGCGTTTATCGGTCTGAAGGACACCACCACCGGTGACACCCTCTGTGACATCAACGACCAAATCATCCTGGAGTC
GATGGACTTCCCGATCCGTTATTGAGGTTGCTATTGAGCCTAAGACCAAGGCTGACCAGGAAAAGCTGGGTACCGCCATCC
AGAAGCTCGCTGAAGAGGACCCAACCTTACCGTTAAGCTCGATGAAGAGACCGGCCAGACCGTCATCGGCGGAATGGGCGA
GCTTCACCTCGACGTCCTCGTTGACCGCATGAAGCGCGAATACAAGGTGCA

C. pelargi:

TCATCGACCGCCTCGGCGCTNAGCCGTTGGTTATGCAGCTTCTATCGGCGCTGAGGACGACTTCGACGGCGTTGTCGACCTGC
TCGAGATGAAGGCCATCACCTGGCGCGCAAGGTTGAGACTGGTCTGAACCCACCATCGAAGAGATCCCTGCCGACCTGAA
GGAAAAGGCTGAGCAGTACCGTGAGCAGCTCGTCGAGACCGTTGCTGAGTCCGATGAAGAGCTCATGGAGAAGTACTTCGGT
GGCGAAGAACTCACCATCGAAGAGCTCAAGGCCGGCATCCGCAAGATGACCGTGAACCTCCGAGGTCTACCCCGTCTTTGCGG
TACCGCTTACCGCAACAAGGGCGTGCAGCCTCTGCTCGACGCCGTGATCGACTACCTGCCACCCCGCTCGACATCGGCGAGGT
TCACGGCCACGCTGTGCGCGACGAGGCCAAGGAACTCGTGCGCAAGCCTTCCGTTGAAGAGCCTTTCTCTGCACTGGCCTTCAA
GATTGCTGCACACCCCTTCTTTGGCAAGCTCACCTTCGTGCGCGTGTACTCCGGCCTGGTTGAGCCGGGTGCTCAGGTGGCCAA
CTCCACCAAGGGCAAGAACGAGCGCATCGGCAAGCTCTCCAGATGCACGCCAACAAAGGAGAACCCGGTTTCCGAGGCTCGC
GCAGGTAACATCTACGCGTTTCATCGGCCTGAAGGACACCACCACTGGTGACACCCTCTGCGATAAGAACAACCAGATCATCTC
GAGTCCATGGACTTCCCGGATCCTGTGATCAAGGTGTCCATCGAGCCGAAGACCAAGTCGGACCAAGAGAAGCTCGGTATCGC
TATTAGAAGCTGGCCGAAGAGGACCCGACCTTACCGTTGAGTTGGATGAGGAATCCGGCCAGACCGTTATTGGCGGCATGG
GCGAGCTTACCTCGACGTGCTGGTTGACCGCATGAAGCGCGAGTTCAAGGTTGAGGCCAACGTGGGTAACCCGCAGGTTGC
GTACCGCGAGACCATCCGCAAGCCCGTGAG

rpoC

w8:

CGCTGTTGACACGGCCGTCGCGGACGCCCCGTGTCCGGCCCTGGCAACCGTCCGCTGAAATCCCTGAGTGACCTGCTCAAGG
GCAAGGCTGGCCGTTTCCGTGAGAACCTGCTGGGTAAAGCGCGTGATTACTCCGGCCGTTGCGTGATTATCGTCGGCCCGCAG
CTTAAGCTGCACGAGTGTGGTCTGCCAAGCTCATGGCGTTGGAGCTGTTCAAGCCCTTCGTGATGAAGCGCCTGGTAGAAAA
CGACTTCGCCCAGAACATCCGCTCCGCGAAGCGCATGGTGGAACGCCAGCGCCCGAGGTGTGGGACGTGTTGGAAGAGGCT
ATTGCTGAGCACCCCGTGATGCTCAACCGTGCGCCTACCCTGCACCGCCGGGGTATTAGGCCCTTCGAGCCGAAGCTCGTTGAG
GGTAAAGCTATTAGCTCCACCCCTTGGCATGTGAAGCGTTCAACGCCGACNTCGACGGTGACCAGATGGCTGTGCACCTGCC
ACTTTCGGCAGAAGCACAGGCTGAGGCGCGCGTGCTGATGCTTGCTTCCCAACAACATCCTTTCGCCCAGATCCGGTAAGCCCTT
GGCGATGCCGCGTCTGGACATGGTGACTGGTCTGTACTTCTCACCATGGATAAGGGCGAGGACGAGCTCGGCGGCGAGGGC
GCCTACAAGCCCGCCACCGACGATGCTCCGGCACAGGGTGTGTAATCCTCTATGCGGAGGCCATCATGGCTCGTGACCGCGG
TGTGCTTGGCCTGCAGGCCAAGATCAAGGTGCGCATTTTCGACCTGCGCCCGCCGCGAGACATTGAGGCTGAGCAGTTCCCCG
ATGGTTGGGAACAGGGACAGACTTGGTTGGCGGATACGACCTTGGGTGAGTCATGTTCAACGAGTTGCTGCCGTGGAACCTAC
CCATACCTCGAGGGCGTCATGGTCCGAAAGGGCGGCGGATCCGACAAGATCATGCTTGGCGACGTCTTAACGATCTCGCAGC
CAAGTATCCCATGATCACCGTCGCGCAGACGATGGACAAGATGAAGGACGCCGTTTCTACTGGGCGACCCGCTCCGGTGTCA
CCATCGCTATGTCCGACGTGCTCGTCTCCGAACAAGACCGAGATGCTCGAAAACCTACGAGGCCGAGGCCCGCAAGATCGAG
CGCAAGTACTGGGAACAGGGTGCACTACCGAGCGCGAGCGTTATGACCGCCTGGTGGAAGTGTGGAAGGACGCCACCGACG
AAGTTGGTCAGGCCGTCGAGGATTGTACCCGACGACAACCCGATTCCGATGATCGTGAAGTCCGGTGCTGCCGGTAAGTGC
GTCAGATCTGGACCCTGGCCGGCATGAAGGGCA

812CH:

CGCTCTTCGATACGGCCGTCGTGGCCGCCCGTGTCTGGTCCGGGCAACCGCCCGCTGAAGTCTTTGAGCGACCTGCTCAAGG
GCAAGGCTGGCCGTTTCCGTGAGAACCTGCTGGGTAAAGCGTGTTGATTACTCCGGCCGTTGCGTGATTATCGTCGGCCCGCAG
CTCAAGCTGCACGAGTGTGGTCTGCCAAGCTCATGGCGTTGGAGCTGTTCAAGCCCTTCGTGATGAAGCGTCTGGTGGAAAA
TGACTTCGCCCAGAACATCCGCTCCGCAAAGCGCATGGTGGAACGCCAGCGCCCGAGGTGTGGGACGTGCTGGAAGAGGCC

ATTGCAGAGCACCCCGTGATGCTCAACCGTGACCTACCCTGCACCGCCTGGGTATCCAGGCCTTCGAGCCGAAGCTGGTGGA
AGGTAAAGCCATCCAGCTACACCCGCTTGCCTGCGAAGCCTTCAACGCCGACNTCGACGGCGACCAGATGGCTGTGCACCTGC
CGCTTTCGGCAGAGGCACAGGCAGAGGCCCGCATCCTCATGCTTGCTCCAACAACATCCTTTCGCTGCCTCGGGTAAGCCCT
TGGCTATGCCGCTCTGGATATGGTGACCGGCCTGACTTCCTACCATGGATAAGGCCGAAGGCGAGCTCGGTGGCGAAGGT
GCCTACAAGCCTGCTACCGAGGATCACCCCGCGCAGGGCGTGACTCCTCCTATGCTGAGGCAATCATGGCGCGGACCGCGG
CGTGCTTGGCCTGCAGGCCAAGATCAAGGTGCGTATTTCTACCTGCGTCCGCCGCGAGATATCGAGGCCGAGCAGTTCCCCG
ATGGCTGGCAACAGGGTCAGACCTGGTTGGCAGACACCACCTTGGGTGCTGTCATGTTCAACGAGTTGCTGCCGTGGAACACTAC
CCCTACCTTGANGGCGTCATGGTGCGTAAGGGCGGCGGCTCCGACAAGATCATGCTTGGCGATGTGATTAATGATCTCGCTGC
CAAGTACCCCATGATCACCGTGGCTCAGACCATGGACAAGATGAAGGATGCCGGCTTCTACTGGGCAACCCGTTCCGGTGTCA
CCATCGCCATGTCCGACGTGCTCGTGCTTCCAACAAGGACGAGATGCTCGAAAACACTACGAGGCCGAGGCCCGCAAGATCGAG
CGCAAGTACTGGGAGCAGGGTGCGCTGACCGAGCGCGAGCGTTACGACCGCCTGGTGAGCTGTGGAAGGATGCCACCGAC
GAAGTTGGTCAGGCCGTCGAGGATCTGTACCCGACGACAACCCGATCCCGATGATCGTGAAGTCCGGTGCTGCCGGTAAGTG
CGTCAGATCTGGACCTGGCCGGCATGAAGGGCA

C. epidermidicis:

CGCTCTTCGACATGGTCGTCGCGGCCGCCCCGGTCACCGGACCAGGCAACCGTCCACTGAAGTCCCTGTCTGACCTGCTCAAGG
GTAAGCAAGGCCGCTTCCGTCAGAACTTGCTCGGTAAGCGCGTTGACTACTCTGGTCGTTCCGTAATTATCGTCGGCCCTCAGC
TGCGCCTGCACGAATGTGGCTTGCCAAAGCTGATGGCTCTCGAACTGTTCAAGCCTTTCGTGATGAAGCGTCTGGTCGAAAACG
ACTACGCGCAAAACATTAAGTCCGCGAAGCGCATGGTGAACGCCAGCGTCCAGAGGTGTGGGACGTCCTCGAAGAGGCGAT
TTCCGAGCACCCAGTGATGCTGAACCGTGCGCCAACGCTGCACCGCCTCGGTATTAGGCCTTCGAGCCTGTTCTCGTTGAAGG
TAAGGCAATCCAGCTGCACCCGCTGGCTTGTAAGCCTTCAACGCCGACTTCGACGGTGACCGATGGCAGTTCACCTGCCACT
GTCCGCGAAGCCAGGCCGGAAGCTCGTGCTGATGCTGGCTTCCAACAACATTCTGTCCCCAGCATCCGGTAAGCCACTGG
CTATGCCACGTCTGGATATGGTGACCGGCCTGACTTCTGACCTCGATAAGAAGGAAGACGAATTGCGCGGCCAGGGCGCG
TACCGCCAGCCGACGANAACGGTCCGGCACAGGGTGCTACTCCTCATGGCGGAAGCCATCATGGCGTACGACCGTGGGG
TGCTCGGCCTGCAGGCAAAGATCAAGGTGCGCATCAGCCACCTGCGTCCGCCTGCAGATATCGAGGCAGAGCAGTTCCAGAC
GGCTGGAACAAGGGCGACACCTGGATGGCTGACACCACCTAGGCCGCATCATGTTCAACGAGCTCCTGCCATGGAACACTACC
ATACCTCGAAGGTGTGATGGTTCGTAAGGGCGGCGGCTCCGACAAGATCATGCTCGGCGACGTCATACCGACCTGTCCGCGC
GTTACCCAATGATCACGGTGCACAGACCATGGACAAGATGAAGGACGCTGGTTTCTACTGGGCAACCCGTTCCGGCGTGACC
ATTACCATGTCTGACGTTCTGGTCTTGCCAAACAAGGACGAAATGCTGGATCGCTACGAAGCAGAAGCTCGTACGATCGAGAC
GAAGTTCAGTTCCGTAACACTACGACCCGCGAGCGTTACGACCGCCTGGTTGAGCTGTGGAAGGATGCCACCGACGAAGTTG
GTAAGGCTGTGAGGATCTGTACCCGGACGACAACCCGATTCCAATGATCGTGAAGTCTGGTGCTGCAGGTAAGTGCCTCAGA
TCTGGACCTGGCCGGTATGAAGGGCA

C. pelargi:

CGCTCTTCGACACGGCCGTCTGGCCGTCCGGTGTCTGGTCCGGGCAACCGCCGCTGAAGTCCCTGAGCGACCTGCTCAAGG
GTAAGGTGGCCGTTTCCGTCAGAACCTGCTGGGTAAAGCGTGTGACTACTCCGGCCGTTCCGGTGATTATCGTCGGCCCGCAGC
TCAAGCTGCATGAGTGTGGTCTGCCAAAGCTCATGGCGTTGGAGCTGTTCAAGCCCTTCGTGATGAAGCGTCTGGTGGAAT
GACTTCGCCCAGAACATCCGCTCCGCAAAGCGCATGGTGAACGCCAGCGCCCCGAGGTGTGGGACGTGCTGGAAGAGGCCA
TTGCTGAGCACCCAGTGATGCTCAACCGTGCGCTACCCTGCACCGCCGGGGTATTAGGCCTTCGAGCCGAAGCTGGTGGA
GGTAAAGCCATCCAGCTACACCCGCTGGCCTGTGAAGCCTTCAACGCCGACTTCGACGGCGACCGATGGCTGTGCACCTGCC
GCTTTCGCGAGAAGCACAGGCAGAGGCCCGCATCCTCATGCTCGCCTCCAACAACATCCTTTCGCTGCCTCGGGTAAGCCCC
GGCTATGCCGCTCNGGATATGGTTACCGGCCTGACTTCTCACCATGGACAAGGCCGAAGGCGAGCTCGGTGGCGAGGGT
GCCTACAAGCCTGCTAGCGATGATCAGCCTGCACAGGGCGTGACTCCTCCTACGCCGAGGCAATCATGGCGCGGACCGTGG
CGTGCTTGGCCTACAGGCCAAGATCAAGGTGCGTATTTCTACCTGCGCCCCGCCGCGAGACATCGAGGCAGAGCAGTTCCCCG
ATGGCTGGCAACAGGGTCAGACCTGGTTGGCAGACACCACCTTGGGTGCTGTCATGTTCAACGAGTTGCTGCCGTGGAACACTAC
CCCTACCTTGANGGCGTCATGGTGCGTAAGGGTGGCGGTTCCGACAAGATCATGCTTGGCGATGTGATTAATGATCTCGCCGC
CAAGTACCCCATGATCACCGTGGCTCAAACCATGGACAAGATGAAGGATGCCGGCTTCTACTGGGCAACCCGTTCCGGTGTCA
CCATCGCCATGTCCGACGTGCTCGTGCTTCCAACAAGGACGAGATGCTCGAAAACACTACGAGGCCGAGGCCCGCAAGATCGAG
CGCAAGTACTGGGAGCAGGGTGCGCTGACCGAGCGCGAGCGTTACGACCGCCTGGTGAACTGTGGAAGGATGCCACCGAC
GAAGTTGGTCAGGCCGTCGAGGATCTGTACCCGACGACAACCCGATCCCGATGATCGTGAAGTCCGGTGCTGCCGGTAAGTG
CGTCAGATCTGGACCTGGCCGGCATGAAGGGCA

gyrA

w8:

GCTCTCCATCGTCGATGGCGTGCCCCGCACCCTGCGCCTGGACCAGCAGTTGCGCCACTATGTGGCTCACCAGATCGACGTGAT
CGTGCGCCGCACCCAGTTCCGCCTGGACGAGGCCGAAAAGCGCGCACACATTCTGCGCGGCTTGGTGAAAGCGCTGGACATG
CTCGACGAGGTTATCGCCTTGATCCGTGCCTCCAGACCGTGGACATCGCCCGCACTGGGCTGATGGAGCTGCTGGATATTGAT
GAGATCCAAGCGGACGCCATCCTCGCCATGCAGCTTCGCCGCTGGCTGCCCTGGAGCGCCAAAAGATCATCGATGAGCTGGC
TGAAATCGAGCTGGAAATCGAGGATCTCAAGGACATCTTGCGCGCCCCGGAGCGCCAGCGTGAGATCGTCCGTGATGAGCTG
CGTGAGATCGTCGAAAAGTATGGCGACGAGCGCCGCACCCAGATCGTTGCTGCTTCCGGCGAGGTGAGCGAGGAAGACCTCA
TCGCCCGCGAAAACGTGGTGGTCACCATCACTTCCACCGTTACGCCAAGCGCACCAAGGTGGACGCTTACAAGTCGCAGCGT
CGCGGCGCAAGGGCGTGCGCGGAGCCGAGCTCAAGCAGGACGACGTGGTCCGCCACTTCTTTGTAGCTCCACGCACGACT
GGATCCTC

812CH:

GCTCTCCATCGTCGATGGTGTGCCGCGCACCTGCGTTTAGATCAGCAACTGCGCCACTATGTGGCCACCAGATCGACGTGAT
TGTGCGCCGTACCCAGTACCGCCTGGATGAGGCCGAAAAGCGCGCCCATATTCTGCGCGGCTTGGTCAAGGCACTGGACATGC
TCGATGAAGTCATCGCATTAAATCCGTGCCTCCGCCACCGTGGACGTGGCCCGCACCGGCTTGATGGAGCTGCTGGAGATCGAC
GAGATCCAAGCAGATGCCATTTTGGCCATGCAGCTTCGCCGTCTGGCTGCCCTGGAGCGCCAGAAGATCGTCGACGAGCTAGC
CGAGATCGAGCGCGAGATCGAAGACCTCAAGGACATCCTTGCCCGCCCCGAGCGTCAGCGATCCATCGTTCGTGATGAGCTGG
CCGAGATCGTCGAAAAGTATGGCGATGAGCGCCGCACCCAGATCGTGGCAGCAACCGGCGAGGTAACCGAAGAAGACCTGAT
CGCCCGCGAAAACGTGGTGGTCACCATCACCTCCACCGGCTACGCCAAGCGCACCAAGGTGATGCCTACAAGTCGCAGCGTC
GCGGCGGCAAGGGCGTGCGCGGTGCCGAGCTCAAGCAAGACGATGTGGTCCGCCACTTCTTTGTAGCTCCACGCACGACTG
GATC

C. epidermidicis:

TCACCAGATCGAAGTCATTATCCGACGCACCCAGTTCCGCCTGGACGAGGCTGAAAAGCGCGCCACATTCTGCGTGGCCTGGT
CAAGGCGCTCGACATGCTCGACGAGGTCATCGCCCTGATCCGCCGTTCCGCAACTGTCGAGGAGGCTCGCTCGGGCCTGATGG
GGCTTCTCGACGTGACGAGATCCAAGCAGACGCGATCCTCGCCATGCTGCTGCGTCGCTGGCTGCCCTGGAGCGGCAAAAG
ATCGTGGATCAGCTCGCCGAAATCGAGCTGGAAATCGCCGACCTCAAGGACATTCTGGCCAATCCGGAACGGCAGCGCGCCAT
CGTACGCGACGAGTTGAAAGAAATCGTCGATAAGTACGGCGATGAGCGCCGCACCCAGATCGTGGCCGCGACCGGCGATGTC
ACCGAAGAAGACTTGATCGCCCGGAGAACGTAGTAGTAACCATTACATCCACGGGTACGCCAAGCGCACCAAGGTGGATGC
GTACAAGTCGCAGCGCGGTGGCGGCAAGGGAGTACGAGGCGCAGAGCTGAAGCAGGACGACGTGCTCCGCCACTTCTTCGTG
TGCTCCACCCATGACTGGATCCTCTTCTTCACTCACTACG

C. pelargi:

CTGCGCGCCTGGTCAAGGCACTGGACATGCTCGATGAAGTCATCGCATTAAATCCGTGCCTCCGCCACCGTGGACGTGGCCCG
CACCGGCTTGATGGAGTTGCTGGAGATCGACGAGATCCAAGCAGATGCCATTTTGGCCATGCAGCTTCGCCGTCTGGCTGCCCT
GGAGCGCCAGAAGATCGTCGACGAGTAGCCGAGATCGAGCGGAGATCGAAGACCTCAAGGACATCCTTGCCCCCCCCGAG
CGTCAGCGATCCATCGTTCGTGATGAGCTGGCCGAGATCGTCGAAAAGTATGGCGACGAGCGCCGCACCCAGATCGTGGCAG
CAACCGGCGAGGTAACCGAAGAAGACCTGATCGCTCGCGAAAACGTGGTGGTCAACCATCACCTCCACCGGCTACGCCAGCGCA
CCAGGTGATGCCTACAGTCGCAGCGTCGCGGCGCAAGGGCGTGCGCGGTGCCGAGCTCAAGCAAGACGATGTGGTCCGCC
ACTTCTTTGTAGCTCCACGCACGACTGGATCCTCTTCTTCCCACTACG

Pasteurellaceae:

rpoB

2028:

TCCATATTCAAGAATTATCTTGTGTGGCGGTGACACCAAATTAGGTGCGGAAGAAATCACTGCCGATATTCCAAACGTGGGCG
AATCAGCATTAAAGCAAACCTTGATGAATCAGGTATCGTGTACGTTGGTGCGGAAGTGAAAGGTGGCGATATTCTTGTGGGTAAA
GTAACGCCAAAAGGCGAAACACAATTAACCCGAGAGAAAATTATTGCGTGCGATCTTCGGTGAAAAAGCATCAGACGTGAA
AGACTCTTCACTTCGTGTGCCAAACGGTACTTCAGGTACGGTTATCGACGTTCAAGTATTTACCCGTGATGGCGTAGAGAAAGA
CAAGCGTGCATTAGAAATCGAAGAAATGCAGCTTAAAGAAGCGAAGAAAGACTTAACCGAAGAGCTAGAAATCTTAGAAGCA
GGCTTATTCACTCGTGTGCGTAACCTCTTAATTGAAGGTGGCGTATCAGAAGCTGAATTAGATAAAGTTGCTCGTGAATAATGG

TTAGAACAAACCTTAGAAGACGAAGCGAAACAAAATCAGCTTGAACAGCTTGCGGAACAGCACGAAGAACTTCGTAAAGAGTT
TGAACGCAAACCTTGAAATCAAACGTAACAAGATCATTCAAGGTTTCAAGATTTAGCACCGGGCGTGTGAAAGTCGTGAAAGTTT
ACCTTGCGGTAAAACGCCAAATCCAACCGGGTGATAAAATGGCGGGTCGTACGCGTAACAAAGGGGTTATCTCAAAAATTAAC
CCAGTTGAAGATATGCCGTACGATGAAAACGGTCAGCCAGTGAGATCGTATTGAACCCACTGGGCGTACCTTCTCGTATGAA
CATCGG

38:

TAACTTCGAAGACTCAATGTTAGTGTCTGAGCGTGTGGTACAAGAAGATCGCTTCACAACTATCCACATTCAAGAGCTTTCTTGT
GTGGCTCGTGATACCAAATAGGTGCTGAAGAGATCACGGCAGATATCCAAACGTGGGTGAATCTGCATTAAGCAAACCTTGA
TGAATCAGGTATCGTTTACATCGGTGCGGAAGTAAAAGGTGGTGACATCTTAGTTGGTAAAGTAACACCTAAAGGTGAAACGC
AATTAACGCCTGAAGAGAACTTCTTCGTGCAATCTTCGGTGAAAAAGCATCGGATGTTAAAGATTCTTCATTACGTGTGCCAA
ATGGTACATCAGGTACAGTTATCGACGTTCAAGTCTTCACTCGTGATGGCGTAGAAAAAGATAAACGTGCGAAAGAAATCGAA
GAGATGCAACTTCGTGATGCGAAAAAAGACTTAGCGGAAGAGTTAGAAAATCTTAGAAGCAGGTTTATTCACCCGTGTTGCGAA
CTTATTAGTTGAAGGTGGTGTGTCAGAAGCATCATTAGACAAAGTCGCTCGTGAGAAATGGTTAGAGCAAACCTTTAGACGACG
AAGCGAAACAAAATCAGCTTGAACAGCTTGCGAACAACACGAAGAACTGCGTAAAGAATTTGAACGTAAACTTGAGATCAAA
CGTAACAAGATCATCCAAGGCGACGATCTTGACCGGGTGATTAAAAGTGGTAAAAGTTTACCTTGCGGTGAAACGTCAAAT
TCAACCAGGTGATAAGATGGCGGGTCGTACGCGTAACAAAGGTGTTATCTCGAAAATCAACCCTGTGGAAGATATGCCATACG
ATGAAAATGGTCAGCCAGTTGAGATCGTATTGAACCCACTGGGCGTTCATCTCGTATGAACATCGGT

2805:

TATAACTTCGAAGACTCAATGTTAGTTTCTGAGCGTGTGGTTCAGGAAGATCGTTTCACCACTATTCATATTCAGGAACTTTCT
GTATTGCTCGTGATACGAAATAGGTGCGGAAGAAATCACTGCGGATATCCGAATGTCGGCGAAGCGGCATTAAGCAAACCTG
GATGAATCCGGGATCGTTTATATCGGTGCGGAAGTAAAAGGCGGAGATATTCTAGTGGGTAAAAGTTACACCAAAGGTGAAA
CACAACCTTACTCTGAAGAAAAATTGTTACGTGCTATCTTCGGTGAAAAAGCGTCTGATGTAAAAGATTCTTCATTACGTGTACC
GAACAGCACCACAGGTACTGTTATTGATGTTCAAGTGTTCACGCGATGGCGTAGAAAAAGATAAACGTGCAATTAGAAATCG
AAGAAATGCAGTTAAAACAAGCGAAGAAAGATTTAACTGCGGAATTGGATATTCTGGAAGCCGGTTTATTTACTCGCGTGCGT
AATTTATTGTTGGCGAACGGATTTAGTGCCGATAAGCTTGAACAGATGGATCGTATGAAATGGCTTGAACAATCTCTGCAGAT
GAAGAGAAACAAGCTCAGTTGGAACAGCTTCCGAACAATTGGACGAGTTACGCAAAGAATTTGATCATAAATTAGAGGTTAA
ACGTANTAAGATTATCCAAGGTGATGATCTTGACCGGGCGTGTTGAAAGTCGTTAAAGTATATCTTGCGGTGAAACGTCAAAT
TCAGCCGGG

2425:

TCTTGATTGCTCGAGATACAAAACCTCGGTTCTGAAGAAATTACTTCTGATATTCCAAATGTGGGTGAAGCGGCATTAAGTAAA
CTTGATGAATCAGGTATTGTTTACATTGGTGAGAAGTAAAAGGTGGTGATATCCTTGTTGGTAAAGTGACACCAAAGGCGA
AACCAATTAACACCAGAAGAAAAATTATTACGTGCGATCTTGGTGAAAAAGCCTCTGATGTGAAAGATTATCATTACGTGT
ACCTAATAGTGTGCTGGTACGGTTATTGATGTTCAAGTCTTCACGCGTATGGCGTAGAAAAAGATAAACGTGCCTTAGAAAT
TGAAGAAATGCAGTTAAAACAAGCGAAGAAAGATTTAACGGCAGAATTAGATATCTTGAAGCAGGTTTATTTGCTCGTGTTG
TGCTTGTATTAGCAAATGGCTTCAGCGAAGCAGACCTTACAAAATTAGACCGTATGAAGTGGTTAGAACAATCTCTGCGGA
CGAAAGCAAACAAGAACAATTAGAACAACCTGCAGAGCAGCTTGATGAATTACGTAAAGAATTTGATCGTAAATTAGAAGTTC
AACGTAATAAGATTATCCAAGGTGATGATTTAGCACCAGGTGTATTAAGGTTGTTAAAGTATATC

1387:

TGCCTTGGAATGGCTATAACTTCGAAGACTCAATGTTAGTGTCTGAGCGTGTGGTACAAGAAGATCGCTTCACTACTATCCACA
TTCAAGAACCTTTCTGTGTGGCTCGTGATACCAAATAGGTGCTGAAGAGATCACGGCAGATATCCAAACGTGGGTGAATCTG
CATTAAGCAAACCTTGATGAATCAGGTATCGTTTACATCGGTGCGGAAGTAAAAGGTGGCGACATCTTAGTCGGTAAAGTAACG
CCTAAAGGTGAAACGCAATTAACACCTGAAGAGAACTTCTGCGTGCAATCTTCGGTGAAAAAGCATCGGATGTTAAAGATTCT
TCATTACGTGTGCCAAATGGTACATCAGGTACAGTTATCGACGTTCAAGTCTTCACTCGTGATGGCGTAGAAAAAGATAAACGT
GCGAAAGAAATCGAAGAGATGCAACTTCGTGATGCGAAAAAAGACTTAGCGGAAGAGTTAGAAATCTTAGAAGCAGGTTTAT
TCACCCGTGTTGCAACTTATTAGTTGAAGGTGGTGTGTCAGAAGCATCATTAGACAAAGTCGCTCGTGAGAAATGGTTAGAGC
AACTTTAGACGACGAAGCGAAACAAAATCAGCTTGAACAGCTTGCGAACAACACGAAGAACTGCGTAAAGAATTTGAACGT
AACTTGAGATCAAACGTAACAAGATCATCCAAGGCGACGATCTTGACCGGGTGATTAAAAGTGGTAAAAGTTTACCTTGC
GGTGAACGTCAAATTCAACCAGGTGATAAGATGGCGGGTCGTACGCGTAACAAAGGTGTTATCTCGAAAATCAACCCTGTGG
AAGATATGCCATACGATGAAAATGGTCAGCCAGTTGAGATCGTATTGAACCCACTGGGCGTTCATCTCGTATGA

hpa21:

CGCGTGGCGTTTCATGCCTTGAATGGTTATAAATTGGAAGACTCAATGTTAGTGTCTGAGCGTGTGGTACAAGAAGATCGCTTC
ACCACCATTACATTCAAGAACCTTCTTGTGTGGCGGTGATACCAAAGTGGGTGCGGAAGAGATCACGGCTGATATCCAAAC
GTGGGCGAATCAGCATTAAAGTAAATTAGATGAATCAGGTATTGTTTACATCGGTGCGGAAGTAAAGGTGGCGACATCTTAGT
GGGTAAAGTCACTCCGAAAGGCGAAACCAATTAACCCAGAAAGAGAACTTCTCCGTGCAATTTTCGGTGAAAAAGCGTCTG
ACGTTAAAGATTCTTCATTACGTGTACCAAACGGTACATCAGGTACGGTTATCGATGTTCAAGTCTTCACTCGTGATGGCGTAGA
AAAAGATAAACGTGCGAAAGACATCGAAGAAATCCAACCTTCGTGAAGCGAAAAAGACTTAACCGAAGAGTTGGAAATCTTA
GAAGCAGGCTTATTCCTCGAGTGCCTAACTTGTGGTGGAAAGGCGGTGTGTCTGAAGCAGCGTTGGATAAAGTTGATCGTGA
AAAATGGTTAGAACAAACCTTAGACGACGAAGTAAACAAAACCAATTAGAAGAGCTTGCAGAACAGCAGCAAGAGTTGCGT
AAAGAGTTTGAACGAACTTGAAATCAAACGCAATAAGATTATCCAAGGGGACGACTTAGCTCCTGGCGTATTGAAAGTGGT
GAAAGTGTACCTTGCCTGAAACGCCAAATTCAACAGGTGATAAAATGGCGGGTGCACCGGTAAACAAAGGGGTTATCTCG
AAAATCAACCCTGTGGAAGATATGCCATACGATGAAAACGGTCAGCCAGTTGAGATCGTATTGAACCGTTGGGCGTTCCTCT
CG

atpD

2028:

CACCGAACTTTTAGAAACGGGGATTAAAGTTATCGACTTAATCTGCCATTTCGCAAAAGGGGGTAAAGTTGGTTTATTCGGTGG
TGCGGGTGTAGGTAAACCGTAAATATGATGGAGTTAATCCGTAACATTGCGATTGAGCATAGCGGTTACTCTGTGTTGCGG
GCGTGGGTGAGCGTACTCGTGAGGGTAACGACTTCTACCACGAAATGACAGACTCTAACGTATTAGATAAAGTATCACTGGT
TACGGTCAGATGAACGAGCCACCAGGCAACCGTCTGCGTGTAGCATTAACTGGCTTAACAATGGCTGAAAAATTCGTGACGA
AGGTCGTGATGTATTATCTTCGTGGATAATATCTATCGTTACACCTTGCAGGGACAGAAGTGTACGCGTTATTAGGTCGTAT
GCCATCAGCGGTAGGTTATCAGCAACCTTGCAGAAAGAAATGGGTGTGCTGCAAGAGCGTATCACTTCAACCAAAACAGGTT
CGATTACCTCGGTGCAAGCGGTTTACGTTCTGCCGATGACTTAACAGACCCATCGCCAGCAACAACCTTTGCTCACTTGGACTC
AACGGTGGTATTAAGCCGTCAAATCGCATCACTTGGTATCTACCCAGCGGTTGATCCACTCGACTCAACCTCTCGCCAATTAGAC
CATTAGTGG

38:

GTCGTATTATGAACGTATTAGGTGAGCCTATCGATGAAGCAGGTCCAATCGGCGAAGAAGAGCGTTGGGCAATTCATCGTGCA
GCACCAAGCTACGAAGAACAAGCTAACAGCACTGAGCTTTACAGACAGGTATTAAGTTATCGACTTAATCTGTCCATTGCGG
AAAGGTGGTAAAGTTGGTTTATTCGGTGGTGCAGGTGTAGGTAAACCGTAAATATGATGGAGTTAATCCGTAACATCGCGAT
TGAGCACTCAGGTTACTCAGTATTCGAGGTGTTGGTGAGCGTACCCGTGAAGGTAAACGACTTCTACCACGAAATGAAAGACT
CTAACGTATTAGACAAAGTATCTCTTGTATTGTTGTCAGATGAATGAGCCACCAGGTAAACCGTTTACGTGTTGATTAACAGTTT
AACAATGGCGGAAAAATTCGTGATGAAGGTGCTGACGTATTATTCTCGTAGATAACATCTACCGTTACACCTTGCAGGTAC
AGAAGTATCAGCATTGTTAGGTCGTATGCCATCAGCGGTAGGTTACCAGCAACTCTTGCAAGAGATGGGTGTACTTCAAG
AGCGTATTACCTCAACTAAACAGGTTCTATCACCTCTGTGCAAGCGGTTTACGTTCTGCCGATGACTTAACTGACCCATCGCC
AGCAACAACCTTTGCTCACTTAGACTCAACAGTTGTATTAAGCCGTCAAATCGCATCATTAGGTATCTACCCAGCGGTTGACCCA
CTTGACTCAACTTACGTGATGATCCACTCGTTGTTGGTCAAGAACTATGATGTTGCTCGTGGCGTACAAGGTACATTAC
AACGCTACAAAGAGTTAAAGACATTATCGCAATTCTTGGTATGGACGAACTTTCTGAAGACGACAACTTGTGTTGCACGTG
CTCGTAAATTAACGTTTCTTATCAACAACCTTCTCGTGGCAGAAAGTGTCAACGGTACACCAGGTAAGTATGTTCCATTAA
AGAAACAATTCTGGTTAAAGGC

2805:

CTTCAGACGGATTAAACGTGGCTTGTCTGTAACATAACAGGCAGCCCAATTTCTGTACCGGTGCGAACAGAAACATTAGGTC
GTATTATGAATGACTTGGTGAGCCAATTGATGAACGTGGTCTATCGGCGAAAAAGCTCGTTGGTCAATTCACCGTGCTGCAC
CAAGTTATGAAGAACAAGCAACAGTACAGAATTGTTGAAACCGGTATCAAAGTTATCGACTTGGTTGCCATTTGCGAAA
GGGGGTAAAGTTGGTTTGTTCGGTGGTGCGGGTGTAGGTAAACCGTTAATATGATGGAACCTTATCCGTAATATTGCGATTGA
ACACTCAGGTTATCTGTATTCGCCGGGTAGGTGAGCGTACTCGTGAAGGTAATGACTTCTACCACGAAATGCAGGAATCCAA
CGTTTTGGATAAAGTATCACTTGTTCGCGACAAATGAATGAGCCACCGGGTAACCGTTTACGTGTTGCGTTAACCGGTTTGAC
TATGGCTGAAAAATTCGTGATGAAGGTCGTGATGTGTTGTTCTTCGTGATAATATTTATCGTTATACCTTGCAGGTACAGAG
GTATCAGCGTTGTTAGGACGTATGCCGTCAGCGGTAGGTTATCAACCTACTCTTGCAGGAAGAAATGGGGGTTTTACAAGAACG
TATTACTTCAACTAAACCGGATCAATCACTTCTGTACAAGCGGTTTACGTTCCGGCGGATGACTTGACTGACCCATCTCCGGCA
ACAACCTTTGCTCACTTGGATTCAACCGTTGTATTAAGCCGTCAAATTGCTTCACTCGGTATTTATCCTGCGGTGGATCCGTTGA
TTCAACTTACGTCAATTAGATCCGCAAGTTGTTGGACAGGAACATTATGATGTTGCTCGTGGCGTACAGGGTATCTTACAGCG
TTATAAGAATTGAAAGATATTATCGCAATTCTTGGTATGGACGAATTGTCTGAAGAAGATAAATTAGTGGTGGCTCGTGACG

TAAAATTGAACGTTTCTTATCACAGCCGTTCTTCGTTGCTGAAGTATTTACTGGTTCACCGGGTAAATATGTGCCATTAAAAGAA
ACAATCGCGGCTTTAAAGGT

2425:

GATCTTCAGATGGATTAAAACGAGGATTATCTGTCACCAATACGAATAATCCAATTTCTGTTCCAGTGGAACGAAACATTGGG
TCGTATTATGAACGTGTTAGGTGAGCCAATTGATGAACGTGGGCCTATTGGTGAAAAAGAACGTTGGTCAATTCACCGTGCTG
CACCAAGTTATGAAGAGCAAGCAAATAGCACAGAACTATTAGAAACAGGAATTAAGTTATTGACTTGTTTTGCCATTTGCAA
AAGGGGGAAAAGTTGGTCTATTTCGGTGGTCTGGTGTAGGTAAAACCGTTAATATGATGGAACCTATCCGTAATATTGCGATT
GAGCATTCAAGGATATTCTGTTTTGCTGGGGTAGGTGAACGTACTCGTGAAGGGAACGACTTCTATCATGAAATGCAAGAGTC
AAACGTTTTAGATAAAGTATCCCTTGTTTACGGTCAAATGAATGAGCCACCAGGTAACCGCTTACGTGTTGCATTAACGGGTTTA
ACAATGGCAGAGAAAATTCGTCGACGAAGGACGTGATGTATTATTCTTCGTAGATAATATTTATCGTTATACCTTAGCGGGAACA
GAAGTATCTGCGTTGTTAGGTGCTATGCCATCTGCGGTAGGTTATCAGCCAACATTAGCAGAAGAAATGGGGGTTTTACAAGA
GCGTATTACTTCGACTAAAACCTGGTTCTATTACTTCTGTACAAGCAGTATATGTGCCTGCTGATGACTTAACTGACCCATCACCA
GCAACAACCTTTGCTCACTTAGATTCAACTGTTGTATTAAGCCGTCAAATTGCATCATTAGGGATTTATCCTGCGGTTGATCCATT
GGATTCAACATCTCGTCAGCTTGATCCACAAGTTGTTGGGCAAGAGCATTATGAAGTGGCTCGTGGCGTTCAAGGTATCTTACA
ACGCTACAAAGAATTGAAAGATATCATCGCGATTCTTGGTATGGACGAGCTTTCTGAAGAAGATAAACTTGTGGTAGCACGTG
CGCGTAAAATCGAACGTTTCTTATCACAACCATTCTTCGTTGCAGAAGTATTTACAGGTTGCCAGGTAAATATGTGCCATTAAA
AGAAACAATTC

Literatur

1. **Leewenhoek A.** An abstract of a letter from Mr. Anthony Leewenhoek at Delft, dated Sep. 17. 1683. Containing some microscopical observations, substance call'd worms in the nose, the cuticula consisting of scales. *Phil Trans.* 1684;14(155-166):568-574.
2. **Klein P, Falke D, Hahn H.** Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie 2012.
3. **Madigan MT, Martinko JM, Dunlap PV, Clark DP.** Biology of Microorganisms, 12th edition, Pearson, Benjamin Cummings, San Francisco. 2009.
4. **Fox GE, Magrum LJ, Balch WE, Wolfe RS, Woese CR.** Classification of methanogenic bacteria by 16S ribosomal RNA characterization. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1977;74(10):4537-4541.
5. **Woese CR, Fox GE.** Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1977;74(11):5088-5090.
6. **Woese CR, Kandler O, Wheelis ML.** Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1990;87(12):4576-4579.
7. **Whitman WB, Coleman DC, Wiebe WJ.** Prokaryotes: the unseen majority. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998;95(12):6578-6583.
8. **Tindall BJ, Kämpfer P., Euzeby, J. and Oren, A.** Valid publication of names of prokaryotes according to the rules of nomenclature: past history and current practice. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2006;56:2715-2720.
9. **Rossello-Mora R, Amann R.** The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiol Rev.* 2001;25(1):39-67.
10. **Hooper LV, Bry L, Falk PG, Gordon JI.** Host-microbial symbiosis in the mammalian intestine: exploring an internal ecosystem. *Bioessays.* 1998;20(4):336-343.
11. **Savage DC.** Microbial ecology of the gastrointestinal tract. *Annu Rev Microbiol.* 1977;31:107-133.
12. **Salminen S, Isolauri E, Onnela T.** Gut flora in normal and disordered states. *Chemotherapy.* 1995;41:5-15.
13. **Smith VC, Genta RM.** Role of *Helicobacter pylori* gastritis in gastric atrophy, intestinal metaplasia, and gastric neo- plasia. *Microsc Res Tech.* 2000;48(6):313-320.
14. **Quartero AO, Numans ME, de Melker RA, de Wit NJ.** In-practice evaluation of whole-blood *Helicobacter pylori* test: its usefulness in detecting peptic ulcer disease. *Br J Gen Pract.* 2000;50(450):13-16.
15. **Parente F, Cucino C, Bollani S, Imbesi V, Maconi G, Bonetto S, et al.** Focal gastric inflammatory infiltrates in inflammatory bowel diseases: prevalence, immunohistochemical characteristics, and diagnostic role *Am J Gastroenterol* 2000;95(3):705-711.
16. **Al-Khaldi SF, Martin SA, Rasooly A, Evans JD.** DNA microarray technology used for studying foodborne pathogens and microbial habitats: Minireview. *J AOAC int.* 2002;85(4):906-910.
17. **Woese CR.** Bacterial evolution. *Microbiol Rev.* 1987;51(2):221-271.
18. **Maiden MCJ, Bygraves JA, Feil E, Morelli G, Russel JE, Urwin R, et al.** Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998;95(6):3140-3145.
19. **Gevers D, Cohan FM, Lawrence JG, Spratt BG, Coenye T, Feil EJ, et al.** Opinion: Re-evaluating prokaryotic species. *Nat Rev Microbiol.* 2005;3(9):733-739.
20. **Szczuka E, Kaznowski A.** Typing of clinical and environmental *Aeromonas sp.* strains by random amplified polymorphic DNA PCR, repetitive extragenic palindromic PCR, and enterobacterial repetitive intergenic consensus sequence PCR. *J Clin Microbiol.* 2004;42(1):220-228.
21. **Martin B, Humbert O, Camara M, Guenzi E, Walker J, Mitchell T, et al.** A highly conserved repeated DNA element located in the chromosome of *Streptococcus pneumoniae*. *Nucleic Acids Res.* 1992;20(13):3479-3483.

22. **Koeuth T, Versalovic J, Lupski JR.** Differential subsequence conservation of interspersed repetitive *Streptococcus pneumoniae* BOX elements in diverse bacteria. *Genome Res.* 1995;5(4):408-418.
23. **Wilson LA, Sharp PM.** Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus (ERIC) sequences in *Escherichia coli*: evolution and implications for ERIC-PCR. *Mol Biol Evol.* 2006;23(6):1156-1168.
24. **Gillings M, Holley M.** Repetitive element PCR fingerprinting (rep-PCR) using enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC) primers is not necessarily directed at ERIC elements. *Lett Appl Microbiol.* 1997;25:17-21.
25. **da Costa MS, Albuquerque L, Nobre MF, Wait R.** Methods in Microbiology: Elsevier; 2011.
26. **Kroppenstedt RM, Mannheim W.** Lipoquinones in members of the family Pasteurellaceae. *Int J Syst Evol Microbiol.* 1989;39:304-308.
27. **Al-Dilaimi A, Bednarz H, Lömker A, Niehaus K, Kalinowski J, Rückert C.** Revisiting *Corynebacterium glyciniphilum* (ex Kubota et al., 1972) sp. nov., nom. rev., isolated from putrefied banana. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2015;65:177-182.
28. **Schumann P.** Peptidoglycan Structure. *Methods in Microbiology-Taxonomy of Prokaryotes.* 2011;38:101-126.
29. **Russel NJ, Nichols DS.** Polyunsaturated fatty acids in marine bacteria - a dogma rewritten. *Microbiology.* 1999;145:767-779.
30. **Singh SC, Sinha RP, Häder DP.** Role of lipids and fatty acids in stress tolerance in *Cyanobacteria*. *Acta Protozool.* 2002;41:297-308.
31. **Yano Y, Nakayama A, Yoshida K.** Distribution of polyunsaturated fatty acids in bacteria present in intestines of deep-sea fish and shallow-sea poikilothermic animals. *Int J Syst Evol Microbiol.* 1997;63:2572-2577.
32. **Eraso JM, Kaplan S.** Regulation of gene expression by PrrA in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1: role of polyamines and DNA topology. *J Bacteriol.* 2009;191(13):4341-4352.
33. **Busse H-J, Auling G.** Polyamine pattern as a chemotaxonomic marker within the Proteobacteria. *Syst Appl Microbiol.* 1988;11(1):1-8.
34. **Altenburger P, Kämpfer P, Akimov VN, Lubitz W, Busse H-J.** Polyamine distribution in Actinomycetes with group B peptidoglycan and species of the genera *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, and *Tsukamurella*. *Int J Syst Evol Microbiol.* 1997;47:270-277.
35. **Tindall BJ.** A comparative study of the lipid composition of *Halobacterium saccharovororum* from various sources. *Syst Appl Microbiol.* 1990;13(2):128-130.
36. **Altenburger P, Kämpfer P, Makristathis A, Lubitz W, Busse H-J.** Classification of bacteria isolated from a medieval wall painting. *J Biotechnol.* 1996;47(1):39-52.
37. **Frischmann A, Knoll A, Hilbert F, Zasada AA, Kämpfer P, Busse H-J.** *Corynebacterium epidermidicanis* sp. nov., isolated from skin of a dog. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2012;62:2194-2200.
38. **Minnikin DE, Alshamaony L, Goodfellow M.** Differentiation of *Mycobacterium*, *Nocardia*, and related taxa by thin-layer chromatographic analysis of whole-organism methanolysates *J Gen Microbiol.* 1975;88(1):200-204.
39. **Yassin A-AF.** Detection and characterization of mycolic acids and their use in taxonomy and classification. *Methods Microbiol.* 2011;38:207-237.
40. **Barry CER, Lee RE, Mdluli K, Sampson AE, Schroeder BG, Slayden RA, et al.** Mycolic acids: structure, biosynthesis and physiological functions. *Prog Lipid Res.* 1998;37(2-3):143-179.
41. **Tomiyasu I, Yano I.** Separation and analysis of novel polyunsaturated mycolic acids from a psychrophilic, acid-fast bacterium, *Gordona aurantiaca*. *Eur J Biochem.* 1984;139(1):173-180.
42. **Nishiuchi Y, Baba T, and Yano I.** Mycolic acids from *Rhodococcus*, *Gordonia*, and *Dietzia*. *J Microbiol Methods.* 2000;40(1):1-9.
43. **Kämpfer P, Andersson MA, Rainey FA, Kroppenstedt RM, Salkinoja-Salonen M.** *Williamsia muralis* gen. nov., sp. nov., isolated from the indoor environment of a children's day care centre. *Int J Syst Evol Microbiol.* 1999;49:681-687.

44. **Nishiuchi Y, Baba T, Hotta HH, Yano I.** Mycolic acid analysis in *Nocardia* species. The mycolic acid compositions of *Nocardia asteroides*, *N. farcinica*, and *N. nova*. . *J Microbiol Methods*. 1999;37(2):111-122.
45. **Collins MD, Goodfellow M, Minnikin DE.** Fatty acid composition of some mycolic acid-containing coryneform bacteria. *J Gen Microbiol*. 1982;128(11):2503-2509.
46. **Schumann P.** Taxonomy of Prokaryotes. Fred Rainey AO, editor 2011. 101-126 p.
47. **Lane DJ.** 16S/23S rRNA sequencing. Chichester, United Kingdom: John Wiley & Sons; 1991. 115-175 p.
48. **Versalovic J, Koeuth T, Lupski J.** Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res*. 1991;19(24):6823-6831.
49. **Louws FJ, Fulbright DW, Stephens CT, de Bruijn FJ.** Specific genomic fingerprints of phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas* pathovars and strains generated with repetitive sequences and PCR. *Appl Environ Microbiol*. 1994;60(7):2286-2295.
50. **Jeanmougin F, Thompson JD, Gouy M, Higgins DG, Gibson TJ.** Multiple sequence alignment with Clustal X. *Trends Biochem Sci*. 1998;23(10):403-405.
51. **Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, et al.** Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res*. 1997;25(17):3389-3402.
52. **Gasteiger E, Gattiker A, Hoogland C, I. I, Appel RD, Bairoch A.** ExPASy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Res*. 2003;31(13):3784-3788.
53. **Kim O-S, Cho Y-J, Lee K, Yoon S-H, Kim M, Na H, et al.** Introducing EzTaxon-e: a prokaryotic 16S rRNA gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species. *Int J Sys Evol Microbiol*. 2012;62:716-721.
54. **Kämpfer P, Jerzak L, Bochenski M, Kasprzak M, Wilharm G, Golke J, et al.** *Corynebacterium pelargi* sp. nov., isolated from the trachea of white stork nestlings. *Int J Sys Evol Microbiol*. 2015;65:1415-1420.
55. **Mutters R, Mouahid M, Engelhard E, Mannheim W.** Characterization of the family Pasteurellaceae on the basis of cellular lipids and carbohydrates. *Zentralbl Bakteriol*. 1993;279(1):104-113.
56. **Hansen MJ, Braaten MS, Bojesen AM, Christensen H, Sonne C, Dietz R, et al.** *Ursidibacter maritimus* gen. nov., sp. nov. and *Ursidibacter arcticus* sp. nov., two new members of the family Pasteurellaceae isolated from the oral cavity of bears. *Int J Sys Evol Microbiol*. 2015;65:3683-3689.
57. **Christensen H, Bisgaard M.** Revised definition of *Actinobacillus* sensu stricto isolated from animals. A review with special emphasis on diagnosis. *Vet Microbiol*. 2004;99(1):13-30.
58. **Christensen H, Bisgaard M, Olsen JE.** Reclassification of equine isolates previously reported as *Actinobacillus equuli*, variants of *A. equuli*, *Actinobacillus suis* or Bisgaard taxon 11 and proposal of *A. equuli* subsp. *equuli* subsp. nov. and *A. equuli* subsp. *haemolyticus* subsp. nov. *Int J Sys Evol Microbiol*. 2002;52:1569-1576.
59. **Calhoun DA, Mayberry WR, Slots J.** Cellular fatty acid and soluble protein composition of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and related organisms. *J Clin Microbiol*. 1981;14(4):376-382.
60. **Busse H-J, Bunka S, Hensel A, Lubitz W.** Discrimination of members of the family Pasteurellaceae based on polyamine patterns. . *Int J Syst Evol Microbiol*. 1997;47:698-708.
61. **Straaten V.** Bacteriologische bevindingen bij eenige gevallen van pyo-septicaemie (Lähme) der veuluens. *Verslag van den Werksaamheden der Rijksseruminrichting voor 1916-1917*. 1918:71-76.
62. **Möller K, Füssing V, Grimont PAD, J. PB, Dewhirst FE, Kilian M.** *Actinobacillus minor* sp. nov., *Actinobacillus porcinus* sp. nov., and *Actinobacillus indolicus* sp. nov., Three New V Factor-Dependent Species from the Respiratory Tract of Pigs *Int J Sys Bact*. 1996;46(4):951-956.
63. **Korczak BM, Bisgaard M, Christensen H, Kuhnert P.** *Frederiksenia canicola* gen. nov., sp. nov. isolated from dogs and human dog-bite wounds. . *Antonie van Leeuwenhoek*. 2014;105(4):731-741.

64. **Engelhard E, Kroppenstedt RM, Mutters R, Mannheim W.** Carbohydrate patterns, cellular lipoquinones, fatty acids and phospholipids of the genus *Pasteurella* sensu stricto. *Med Microbiol Immunol.* 1991;180(2):79-92.
65. **Hansen MJ, Bertelsen MF, Christensen H, Bojesen AM, Bisgaard M.** *Otariodibacter oris* gen. nov., sp. nov., a member of the family Pasteurellaceae isolated from the oral cavity of pinnipeds. *Int J Sys Evol Microbiol.* 2012;62:2572-2578.
66. **Lee CM, Woen HY, Kim YJ, Son JA, Yoon SH, Koo BS, et al.** *Aquitalea denitrificans* sp. nov., isolated from a Korean wetland. *Int J Sys Evol Microbiol.* 2009;59:1045-1048.
67. **Hong SW, Kwon SW, Kim SJ, Kim SY, Kim JJ, Lee JS, et al.** *Bacillus oryzaecorticis* sp. nov., a moderately halophilic bacterium isolated from rice husks. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2014;64:2786-2791.

Manuskripte und Publikationen:

- **Classification of three corynebacterial strains isolated from the Northern bald ibis (*Geronticus eremita*): proposal of *Corynebacterium choanis* sp. nov. and *Corynebacterium geronticis* sp. nov. (Manuskript in progress 2017)**

- ***Pseudoduganella danionis* sp. nov. isolated from Zebra fish (*Danio rerio*)**

Peter Kämpfer, Rute Irgang, Hans-Jürgen Busse, Mathías Poblete-Morales, Tanita Kleinhagauer, Stefanie P. Glaeser, Ruben Avendaño-Herrera

Int J Syst Evol Microbiol, 08 August, 2016 doi: 10.1099/ijsem.0.001408

- ***Rothia aerolata* sp. nov., isolated from exhaust air of a pig barn**

Peter Kämpfer, Tanita Kleinhagauer, Hans-Jürgen Busse, Kerstin Klug, Udo Jäckel, Stefanie P. Glaeser

Int J Syst Evol Microbiol, September 2016 66: 3102-3107, doi: 10.1099/ijsem.0.001153

- ***Saccharibacillus endophyticus* sp. nov. an endophyte of cotton**

Peter Kämpfer, Hans-Jürgen Busse, Tanita Kleinhagauer, John A. McInroy, Stefanie P. Glaeser

Int J Syst Evol Microbiol, 08 September, 2016 doi: 10.1099/ijsem.0.001484

- ***Undibacterium danionis* sp. nov. isolated from a zebrafish (*Danio rerio*)**

Peter Kämpfer, Rute Irgang, Hans-Jürgen Busse, Matías Poblete-Morales, Tanita Kleinhagauer, Stefanie P. Glaeser, Ruben Avendaño-Herrera

Int J Syst Evol Microbiol, September 2016 66: 3625-3631, doi: 10.1099/ijsem.0.001244

- ***Jeotgalicoccus schoeneichii* sp. nov. isolated from exhaust air of a pig barn**

Stefanie P. Glaeser, Tanita Kleinhagauer, Udo Jäckel, Kerstin Klug, Peter Kämpfer

Int J Syst Evol Microbiol, September 2016 66: 3503-3508, doi: 10.1099/ijsem.0.001230

- ***Rufibacter ruber* sp. nov., isolated from Antarctic fragmentary rock**

Kamila Kýrová, Ivo Sedláček, Roman Pantůček, Stanislava Králová, Pavla Holochová, Ivana Mašláňová, Eva Staňková, Tanita Kleinhagauer, Tereza Gelbíčová, Roman Sobotka, Pavel Švec, Hans-Jürgen Busse

Int J Syst Evol Microbiol, 02 August, 2016 doi: 10.1099/ijsem.0.001364

**Classification of three corynebacterial strains isolated from the Northern bald ibis
(*Geronticus eremita*): proposal of *Corynebacterium choanis* sp. nov. and *Corynebacterium
geronticis* sp. nov.**

Tanita Kleinhagauer¹, Stefanie P. Glaeser², Joachim Spargser¹, Peter Kämpfer², Hans-Jürgen
Busse¹

¹Institut für Mikrobiologie, Veterinärmedizinische Universität, Wien, Austria

²Institut für Angewandte Mikrobiologie, Justus-Liebig-Universität Giessen, D-35392 Giessen,
Germany

Corresponding author:

Hans-Jürgen Busse

Institut für Mikrobiologie, Veterinärmedizinische Universität Wien, Veterinärplatz 1, 1210
Wien, Austria

Tel. +43 1 25077-2128

E-mail: hans-juergen.busse@vetmeduni.ac.at

Subject category: New Taxa; **Subsection:** Actinobacteria

Running title: Two novel *Corynebacterium* species

The GenBank/ EMBL/ DDBJ/ PIR] accession number for the 16S rRNA gene sequences of
strains W8^T, 200CH^T and 812CH are XX00000. The GenBank/ EMBL/ DDBJ/ PIR]
accession number for the *fusA*, *gyrA* and *rpoC* of strains W8^T, 200CH^T and 812CH are
.....

25

26 Abstract

27 Three Gram-stain positive, rod-to-coccoid shaped, catalase positive and non-motile
28 bacterial strains isolated from the choanae of northern bald ibis, designated strain
29 200CH^T, W8^T and 812CH, **respectively**, were subjected to comprehensive taxonomic
30 characterization. The three strains were oxidase negative and catalase positive.
31 Comparison of the 16S rRNA gene sequence of 200CH^T showed highest similarities to
32 *Corynebacterium epidermidicanis* 410^T (96.7 %) followed by *Corynebacterium*
33 *argentoratense* DSM 44202^T, *Corynebacterium ulcerans* NCTC 7910^T and
34 *Corynebacterium pseudotuberculosis* CIP102968^T (each 96.3 %). Strains W8^T and 812CH
35 both showed the highest 16S rRNA sequence similarities with *Corynebacterium pelargi*
36 136/3^T (98.0% and 99.9%, respectively). Analysis of housekeeping genes (*fusA*, *gyrA* and
37 *rpoC*) and corresponding amino acid sequences supported these differences in relatedness.
38 All three strains possessed corynemycolic-acids and contained *meso*-diaminopimelic acid
39 as the diagnostic diamino acid of the peptidoglycan. The two strains 200CH^T and W8^T
40 are distinguished from each other and established *Corynebacterium* species
41 phylogenetically and phenotypically. In conclusion two novel species of the genus
42 *Corynebacterium* are proposed, namely *Corynebacterium choanis* 200CH^T and
43 *Corynebacterium geronticis* W8^T, respectively.

44 The genus *Corynebacterium* was proposed by Lehmann & Neumann [1], and the type species
45 of the genus is *Corynebacterium diphtheriae*. At the time of writing the genus
46 *Corynebacterium* contains more than 120 recognized species with validly published names.

47 The quinone system of the genus *Corynebacterium* is composed of dihydrogenated
48 menaquinones with eight or nine isoprenoid units in the side chain [MK-8(H₂), MK9(H₂)] or a
49 mixture of both [2]. The peptidoglycan type is A1γ with the diagnostic diamino acid *meso*-
50 diaminopimelic acid [3] and they usually contain corynemycolic acids with 22 – 38 carbons.
51 The fatty acid pattern consists mainly of straight-chain saturated and mono-unsaturated fatty
52 acids [4]. The three analyzed strains were isolated from choanal swabs taken from healthy
53 Northern bald ibises (*Geronticus eremita*) by cultivation on blood agar plates at the clinical
54 diagnostic unit of the Institute of Microbiology, Veterinary University Vienna. The strains
55 grew well aerobically on PYE agar (0.3% peptone from casein, 0.3 % yeast extract, 1.5 %
56 agar, pH 7.2) at 28 °C and in the corresponding liquid medium and they were able to grow on

Columbia III agar supplemented with 5 % sheep blood (BD Becton Dickinson) without any signs of hemolysis.

Gram-staining was carried out using Gramcolour (Merck) according to the manufacturer's instructions and KOH lysis test was done as described by Moaledj [5]. In both tests the three strains were Gram-positive. Cell morphological characteristics were observed with a Zeiss light microscope at x1000 magnification. Cells of the three strains were rod-shaped to coccoid. The presence of catalase was revealed after placing a drop of 3 % (v/v) H₂O₂ on a well grown colony. In the SIM Test (Merck) none of the three strains revealed production of sulfide, indol or motility. Acid production from carbohydrates was tested in phenolred-broth (Merck) supplemented with different sugars (10mg ml⁻¹). The API Coryne test (bioMérieux) was carried out according to the instructions of the manufacturer. The API-Coryne code of strains 200CH^T, W8^T and 812CH was 1440124, 3100104 and 3100104, respectively.

The 16S rRNA genes of the three strains were PCR amplified using the universal primers 27f and 1492r [6] and the ready-to-use kit One Taq Quick Load® 2xMM with Standard Buffer (England Bio Labs® Inc). The PCR reaction mix consisted of 30 µl of the ready to use kit, 37.5 pmol of each primer (Invitrogen), 2.5 µl DNA and 26.2 µl PCR grade water. The amplification program was set at an initial denaturation step at 95 °C for 5 min, followed by 30 cycles of denaturation at 94 °C for 1.5 min, annealing at 55 °C for 1.5 min and elongation at 72 °C for 5 min, and finished by a final elongation at 72 °C for 10 min. Resulting PCR products were purified enzymatically using shrimp alkaline-phosphatase and exonuclease (both New England Biolabs) for 5 min at 37 °C followed by 10 min at 80°C. The partial sequences (W8^T, 1380 bases; 200CH, 1309 bases; 812CH, 1314 bases) were compared to gene bank entries using the *EzTaxon-e* server [7]. Strain 200CH^T shared the highest sequence similarity with *Corynebacterium epidermidicanis* 410^T (96.7 %) followed by *Corynebacterium argentoratense* DSM 44202^T, *Corynebacterium ulcerans* NCTC 7910^T and *Corynebacterium pseudotuberculosis* CIP102968^T (each 96.3 %) demonstrating that it is representing a novel species of the genus *Corynebacterium*. Strain W8^T showed the highest similarity to *Corynebacterium pelargi* 136/3^T (98.0 %). All other 16S rRNA gene sequences of recognized *Corynebacterium* species showed less than 96.3% similarity. Since the highest 16S rRNA gene similarity is well below the threshold value of 98.65 % for differentiation of species [8] also strain W8^T can be considered a novel species of the genus *Corynebacterium*. Strain 812CH showed almost identical 16S rRNA gene similarity to *C. pelargi* 136/3^T (99.9 %) and with no other *Corynebacterium* species a similarity value above 96.9 %. The high 16S

rRNA similarity of strain 812CH with *C. pelargi* suggests that it might be a strain of this species.

Phylogenetic relationships of strain 200CH^T, W8^T and 812CH were analyzed applying maximum-likelihood (Fig. 1), maximum parsimony (supplementary Fig. S1) and neighbour joining (supplementary Fig. S2) algorithms provided in the program MEGA 6 [9]. In all three trees the three isolates formed a clade with the two established species, namely *C. epidermidicanis* and *C. pelargi* and were clearly separated from other established corynebacterial species. The branching order between the five strains was well in accordance with the 16S rRNA gene sequence similarities.

For more detailed genetic analysis partial sequences of translation elongation factor aEF-2 (*fusA*), DNA-directed RNA polymerase subunit beta' (*rpoC*) and DNA gyrase subunit A (*gyrA*) of the three isolates, *C. pelargi* and *C. epidermidicanis* were subjected to PCR amplification. The PCR reaction mix consisted of 30 µl of the ready to use kit OneTaq® Quick-Load® 2X Master Mix with Standard Buffer, 125 pmol of each primer (Sigma-Aldrich), 2.50 µl DNA and 22.50 µl of sterile water. The amplification program was set at an initial denaturation step at 45 °C for 5 min, subsequently 5 cycle of denaturation at 94 °C for 0.5 min, annealing at 55 °C for 0.5 min and elongation at 72 °C for 1 min, followed by another 25 cycle of denaturation at 94 °C for 0.5 min, annealing at 50 °C for 0.5 min and elongation at 72 °C for 1 min and a final elongation at 72 °C for 10 min. Primers employed were fusA401f-Corynebacterium (5'-GCTTCGTSAACAAGATGGAC-3'), fusA1516r-Corynebacterium (5'-RGTCTGCTTCTTGTGGGTG -3') , rpoC1089f-Corynebacterium (5' - MGAGATCATCGTGAAYAACG -3'), rpoC2557r-Corynebacterium (5'- CRCGGAAGGAGGTCTTRATC-3'), and gyrA983f-Corynebacterium (5'- SAACAACCTSTWYAAGCACTC -3') and gyrA1720r-Corynebacterium (5'- CCGWAGTTGGTGAAGAASARG -3'). Amplification products of partial *fusA* consisted of 969 – 1028 nucleotides. Amplification products of *rpoC* consisted of 1357 – 1360 nucleotides and amplification product of *gyrA* consisted of 620 – 670 nucleotides. However, no products were obtained for the genes *rpoC* and *gyrA* after PCR with DNA of isolate 200CH^T. Also newly constructed primers for amplification of partial *rpoC* and *gyrA* sequences (rpoC212f-Corynebacterium: 5'-TGTTCAGCCYTTTCGTGATG-3'; rpoC1250r-Corynebacterium: 5'-CAACTTCGTCGGTGGCRTCC-3'; gyrA1028f-Corynebacterium: 5'-AACATGCTSATCGTSGAYGG-3' gyrA1945r-Corynebacterium: 5'-TCGTTSARGTTGATSGCGAT-3') did not provide any products.

The sequence comparisons of the partial genes *fusA*, *rpoC* and *gyrA* and the corresponding amino acid sequences reflected well the relationships between strains W8^T, 812CH and *C. pelargi* 136/3^T (supplementary Tab. S1, S2, S3) already indicated from 16S rRNA gene sequence analyses. Strain 812CH and *C. pelargi* 136/3^T are very closely related and might be considered strains of a single species. Sequence similarities of strain W8^T with strain 812CH and *C. pelargi* support the view that it is representing a novel species. The sequence similarities in the *fusA* sequence of strain 200CH^T do not suggest relatedness with *C. epidermidicanis* at the species level.

For the production of biomass subjected to analyses of quinones, polar lipids, diaminopimelic acid, polyamines and mycolic acids, strains 200CH^T, W8^T and 812CH as well as the reference strains were grown in PYE broth (0.3 % peptone from casein, 0.3 % yeast extract, pH 7.2) at 28°C with shaking. The mycolic acids were extracted and analyzed as reported by Frischmann et al. [10]. All three strains were shown to contain corynemycolic acids (results not shown). Polyamine analysis was carried out as described previously [11, 12]. Quinones and polar lipids were extracted by an integrated procedure as described recently [13-15]. HPLC analyses were carried out using the equipment described by Stolz et al [16]. The quinone system of strain 200CH^T was composed of MK-8(H₂) (48.0 %), MK-9(H₂) (47.2 %), MK-7(H₂) (4.4 %) and MK-10(H₂) (0.3 %). W8^T contained MK-8 (H₂) (69.2 %), MK-9 (H₂) (21.7 %), MK-7 (H₂) (7.5 %), MK-7 (0.7 %) and MK-10(H₂) (1.0 %). The quinone system of 812CH contained MK-8(H₂) (90.9 %), MK-7(H₂) (4.9 %) and MK-9(H₂) (4.2 %). The quinone systems found in the three isolates are in line with those reported for other species of the genus *Corynebacterium*. Regarding the major quinone MK-8(H₂) strain 812CH is highly similar to *C. pelargi* 136/3^T [17] supporting their close relatedness as indicated from sequence comparisons of the 16S rRNA gene, *fusA*, *rpoC* and *gyrA*.

The complex polar lipid profile of W8^T (Fig. 2a) contained diphosphatidylglycerol, phosphatidylglycerol, phosphatidylinositol and phosphatidylinositol-mannoside as main components. Moderate to minor amounts of five unidentified glycolipids (GL1-GL5), an unidentified acidic glycolipid (aGL), two unidentified aminolipids (AL1-AL2), one unidentified aminophospholipid (APL1) and four unidentified phospholipids (PL1-PL4) were detected, as well. Strain 812CH showed in its polar lipid profile (Fig. 2b) the major components diphosphatidylglycerol, phosphatidylglycerol, phosphatidylinositol and phosphatidylinositol-mannoside and moderate amounts of six unidentified glycolipids (GL1 -

GL6), an unidentified acidic glycolipid (aGL), three unidentified aminolipids (AL1 – AL3), one unidentified aminophospholipid (APL1), and three lipids (L1-3) lacking a functional group. Especially the presence of GL4 and GL5 might be considered to reflect the close phylogenetic relationships between strains W8^T and 812CH. Also strain 200CH^T showed a complex polar lipid profile (Fig. 2c) consisting of the major lipids diphosphatidylglycerol, phosphatidylglycerol, phosphatidylinositol, phosphatidylinositol-mannoside and an unidentified aminolipid (AL4). Additionally, moderate to minor amounts of four unidentified glycolipids (GL1, GL3, GL7, GL8), an unidentified acidic glycolipid (aGL), two unidentified aminolipids (AL1, AL5), one unidentified aminophospholipid (APL1) and three unidentified lipids (L1, L2, L4) lacking a functional group.

The polyamine pattern of 200CH^T was composed of spermidine [0.27 µmol (g dry weight)⁻¹], putrescine [0.22 µmol (g dry weight)⁻¹], sym-homospermidine [0.08 µmol (g dry weight)⁻¹] and spermine [0.24 µmol (g dry weight)⁻¹]. The polyamine pattern of W8^T was composed of spermidine [0.62 µmol (g dry weight)⁻¹], and spermine [0.46 µmol (g dry weight)⁻¹] and small amounts of putrescine [0.02 µmol (g dry weight)⁻¹]. These polyamine pattern and especially the very low polyamine contents are highly similar to those reported for other species of the genus *Corynebacterium* [10, 12, 17-20]. The presence of meso-diaminopimelic acid was shown in the three strains 200CH^T, W8^T and 812CH following the protocol of Schumann [21].

Production of biomass, extraction and analysis of fatty acids was carried out as described by Kämpfer & Kroppenstedt (1996) [22]. The fatty acid profile (Table 1) was composed predominantly of straight-chain, saturated and mono-unsaturated fatty acids. The fatty acid profile of W8^T contained large amounts of C_{18:1}ω9c and C_{16:0}, moderate amounts of C_{16:1}ω7c and minor amounts of C_{18:0}. Strain 812CH showed a similar fatty acid profile but with a significant lower proportion of C_{16:1}ω7c. However, both of them are similar to the fatty acid profile of *C. pelargi*. Strain 200CH^T was characterized by the major fatty acids C_{18:1}ω9c and C_{16:0} and moderate amounts of C_{18:0}.

For MALDI TOF mass spectrometry single colonies of 200CH^T, *C. epidermidicanis* 410^T, W8^T, 812CH and *C. pelargi* 136/3^T were suspended in 300 µl distilled water and 900 µl of absolute ethanol for precipitation. After centrifugation at 20,000 x g for 5 min, the supernatant was removed and the pellet was dissolved in equal volumes (20 µl) of 70% formic acid and acetonitrile followed by centrifugation at 20,000 x g for 2 min. One µl of the supernatant was then spotted onto a target steel plate (Bruker Daltonics, Bremen, Germany), air-dried, and

overlaid with 1 µl of 10 mg/ml α -cyano-4-hydroxycinnamic acid in 50% acetonitrile and 2.5% trifluoroacetic acid matrix solution. MALDI-TOF mass spectra measurements were carried out using a Microflex LT Biotyper operating system under control of the FlexControl 3.4 software (Bruker Daltonics, Bremen, Germany). Generated mass spectra were processed using the Flex Analysis version 3.4 and Biotyper version 3.1 software (Bruker Daltonics, Bremen, Germany). Main spectra (MSP) were created according to the manufacturer's recommendations by using the automated MSP creation functionality of the MALDI Biotyper software package. For each strain three independent mass spectrum measurements of eight different spots of protein extracts were acquired and a minimum of 15 quality checked spectra were selected for MSP creation. To infer relationships between the investigated strains and members of the genus *Corynebacterium* present in the Bruker taxonomy library, a dendrogram reflecting arbitrary distance levels was generated using Biotyper 3.1 software. The resulting dendrogram showed an overall topology that was comparable to that of the phylogenetic 16S rRNA gene tree.

From the results of the 16S rRNA gene analysis, similarities in the sequences of house-keeping genes MALDI-Tof spectra and the differences in the polar lipid profile and physiological traits, we conclude that strains 200CH^T and W8^T are representative of novel species of the genus *Corynebacterium* for which we propose the names *Corynebacterium choanis* sp. nov. and *Corynebacterium geronticis* sp. nov. On the other hand, especially the very high sequence similarities in the house-keeping genes suggest that strain 812CH is a representative of the species *C. pelargi*.

Description of *Corynebacterium choanis* sp. nov.

Cells are coccoid or irregular rods. They are Gram-stain-positive and show a Gram-positive behavior in the KOH test. Forms creamy-whitish, opaque colonies, which turn to yellowish after prolonged growth. On PYE agar colonies are 0.5 mm in diameter. Good growth occurs on PYE agar, R2A, CASO agar, nutrient agar, marine Agar and Columbia III agar supplemented with 5% sheep-blood at 28 °C and weak growth is observed on malt agar and glycin/arginine agar but no growth on McConkey agar. Catalase positive, oxidase negative. In the SIM test no motility, sulfide and indole production are observed. Major polar lipids are diphosphatidylglycerol, phosphatidylglycerol, phosphatidylinositol, phosphatidylinositol-mannoside and an unidentified aminolipid (AL4). Four unidentified glycolipids (GL1, GL3,

GL7, GL8), an unidentified acidic glycolipid (aGL), two unidentified aminolipids (AL1, AL5), one unidentified aminophospholipid (APL1) and three unidentified lipids (L1, L2, L4) lacking a functional group are detectable as well. Major polyamines are spermine, spermidine and putrescine. The quinone system is characterized by the major menaquinones MK-8(H₂) and MK-9(H₂) and minor amounts of MK-7(H₂) and MK-10(H₂). Major fatty acids are C_{18:1}ω9c and C_{16:0} and C_{18:0} is present in moderate amounts. Corynemycolic acids are present and *meso*-diaminopimelic acid is the diagnostic diamino acid of the peptidoglycan.

Acid production in phenolred-broth is positive for mannose, maltose, glucose, glucosamine, saccharose, galactose and trehalose but not for raffinose, melibiose, lactose, L⁺-arabinose, D-arabinose, melezitose, mannitol, N-acetyl-D-glucosamine and rhamnose.

In the Api Coryne test acid is produced from glucose and maltose, but not from ribose, xylose, mannose, lactose, saccharose and glycogen. Potassium nitrate is reduced and β-galactosidase as well as esculin hydrolysis is positive. Negative for pyrazinamidase, pyrolidonyl arylamidase, alkaline phosphatase and β-glucuronidase. α-Glucosidase, N-acetyl-β-glucosaminidase, urease and the hydrolysis of gelatin are negative. The resulting Api Coryne code is 1440124..

The type strain of *Corynebacterium choanis* is strain 200CH^T (= CCM XXXXX = LMG YYYYYY) isolated from the choana of a Northern bald ibis (*Geronticus eremita*).

239

240 **Description of *Corynebacterium geronticis* sp. nov.**

Cells are irregular shaped rods, Gram-stain positive and Gram-positive in the KOH test. Catalase positive and oxidase negative. Good growth occurs on PYE agar, R2A, CASO agar, nutrient agar, marine Agar and Columbia III Agar supplemented with 5% sheep-blood at 28°C and weak growth is observed on malt agar and glycin/arginine agar but no growth on McConkey agar. Forms creamy-whitish, opaque colonies, which turn into yellow after prolonged time of incubation. Size of colonies is up to 3 mm in diameter. In the SIM Test no motility, sulfide or indole production are observed.

The polar lipid profile consists of the major compounds diphosphatidylglycerol, phosphatidylglycerol, phosphatidylinositol and phosphatidylinositol-mannoside. Moderate to minor amounts of five unidentified glycolipids (GL1-GL5), an unidentified acidic glycolipid

(aGL), two unidentified aminolipids (AL1-AL2), one unidentified aminophospholipid (APL1) and four unidentified phospholipids (PL1-PL4) are also detectable. Major polyamines are spermidine and spermine. The quinone system contains the major menaquinone MK-8(H₂), moderate amounts of MK-9(H₂) and minor amounts of MK-7(H₂), MK-7 and MK-10(H₂). In the fatty acid profile C_{18:1}ω₉c and C_{16:0} are predominant and C_{18:0} and C_{16:1} are present in minor and moderate amounts, respectively. Corynemycolic acids are present and *meso*-diaminopimelic acid is the diagnostic diamino acid of the peptidoglycan.

In phenol red broth acid is produced from mannose, maltose, glucose, galactose and trehalose but not from raffinose, melibiose, lactose, L⁺-arabinose, D-arabinose, melezitose, mannitol, N-acetyl-D- glucosamine, saccharose, glucosamine or rhamnose.

In the Api Coryne test, acid is produced from glucose but not from maltose, ribose, xylose, mannose, saccharose, lactose and glycogen. Potassium nitrate is reduced and pyrazinamidase and alkaline phosphatase are positive. Negative for β-galactosidase, pyrolidonyl arylamidase, β-glucuronidase, α-glucosidase, N-acetyl-β-glucosaminidase, urease production and hydrolysis of esculin and gelatin. The Api Coryne code is 3100104.

The type strain of the new species *Corynebacterium geronticis* is strain W8^T (= CCM XXXXX = LMG YYYYY) isolated from the choanae of a Northern bald ibis (*Geronticus eremita*).

References

1. **Lehmann KB, Neumann R.** Atlas und Grundriss der Bakteriologie und Lehrbuch der speciellen bakteriologischen Diagnostik. 1 ed. München: Lehmann, J. F.; 1896.
2. **Collins MD, Jones D.** Distribution of isoprenoid quinone structural types in bacteria and their taxonomic implications. *Microbiol Rev.* 1981;45(2):316-354.
3. **Schleifer KH, Kandler O.** Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. *Bacteriol Rev.* 1972;36(4):407-477.
4. **Collins MD, Goodfellow M, Minnikin DE.** Fatty acid composition of some mycolic acid-containing coryneform bacteria. *J Gen Microbiol.* 1982;128(11):2503-2509.
5. **Moaledj K.** Comparison of Gram-staining and alternate methods, KOH test and aminopeptidase activity in aquatic bacteria: their application to numerical taxonomy. *J Microbiol Methods.* 1986;5(5-6):303-310.
6. **Lane DJ.** 16S/23S rRNA sequencing. Chichester, United Kingdom: John Wiley & Sons; 1991. 115-175 p.

285 7. **Kim O-S, Cho Y-J, Lee K, Yoon S-H, Kim M, Na H, et al.** Introducing EzTaxon-e: a prokaryotic
286 16S rRNA gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species. *Int J Sys Evol*
287 *Microbiol.* 2012;62:716-721.

288 8. **Kim M, Oh H-S, Park S-C, Chun J.** Towards a taxonomic coherence between average
289 nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes.
290 *Int J Sys Evol Microbiol.* 2014;64:346-351.

291 9. **Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S.** MEGA6: Molecular Evolutionary
292 Genetics Analysis version 6.0. *Mol Biol Evol.* 2013;30(12):2725-2729.

293 10. **Frischmann A, Knoll A, Hilbert F, Zasada AA, Kämpfer P, Busse H-J.** *Corynebacterium*
294 *epidermidicanis* sp. nov., isolated from skin of a dog. *Int J Sys Evol Microbiol.* 2012;62:2194-2200.

295 11. **Busse H-J, Auling G.** Polyamine pattern as a chemotaxonomic marker within the
296 Proteobacteria. *Syst Appl Microbiol.* 1988;11:1-8.

297 12. **Altenburger P, Kämpfer P, Akimov VN, Lubitz W, Busse H-J.** Polyamine distribution in
298 Actinomycetes with group B peptidoglycan and species of the genera *Brevibacterium*,
299 *Corynebacterium*, and *Tsukamurella*. *Int J Syst Evol Microbiol.* 1997;47:270-277.

300 13. **Tindall BJ.** A comparative study of the lipid composition of *Halobacterium saccharovororum*
301 from various sources. *Syst Appl Microbiol.* 1990;13(2):128-130.

302 14. **Tindall BJ.** Lipid composition of *Halobacterium lacusprofundi*. *FEMS Microbiol Lett.*
303 1990;66(1-3):199-202.

304 15. **Altenburger P, Kämpfer P, Makristathis A, Lubitz W, Busse H-J.** Classification of bacteria
305 isolated from a medieval wall painting. *J Biotechnol.* 1996;47(1):39-52.

306 16. **Stolz A, Busse H-J, Kämpfer P.** *Pseudomonas knackmussii* sp. nov. . *Int J Sys Evol Microbiol.*
307 2007;57:572-576.

308 17. **Kämpfer P, Jerzak L, Bochenski M, Kasprzak M, Wilharm G, Golke J, et al.** *Corynebacterium*
309 *pelargi* sp. nov., isolated from the trachea of white stork nestlings. *Int J Sys Evol Microbiol.*
310 2015;65:1415-1420.

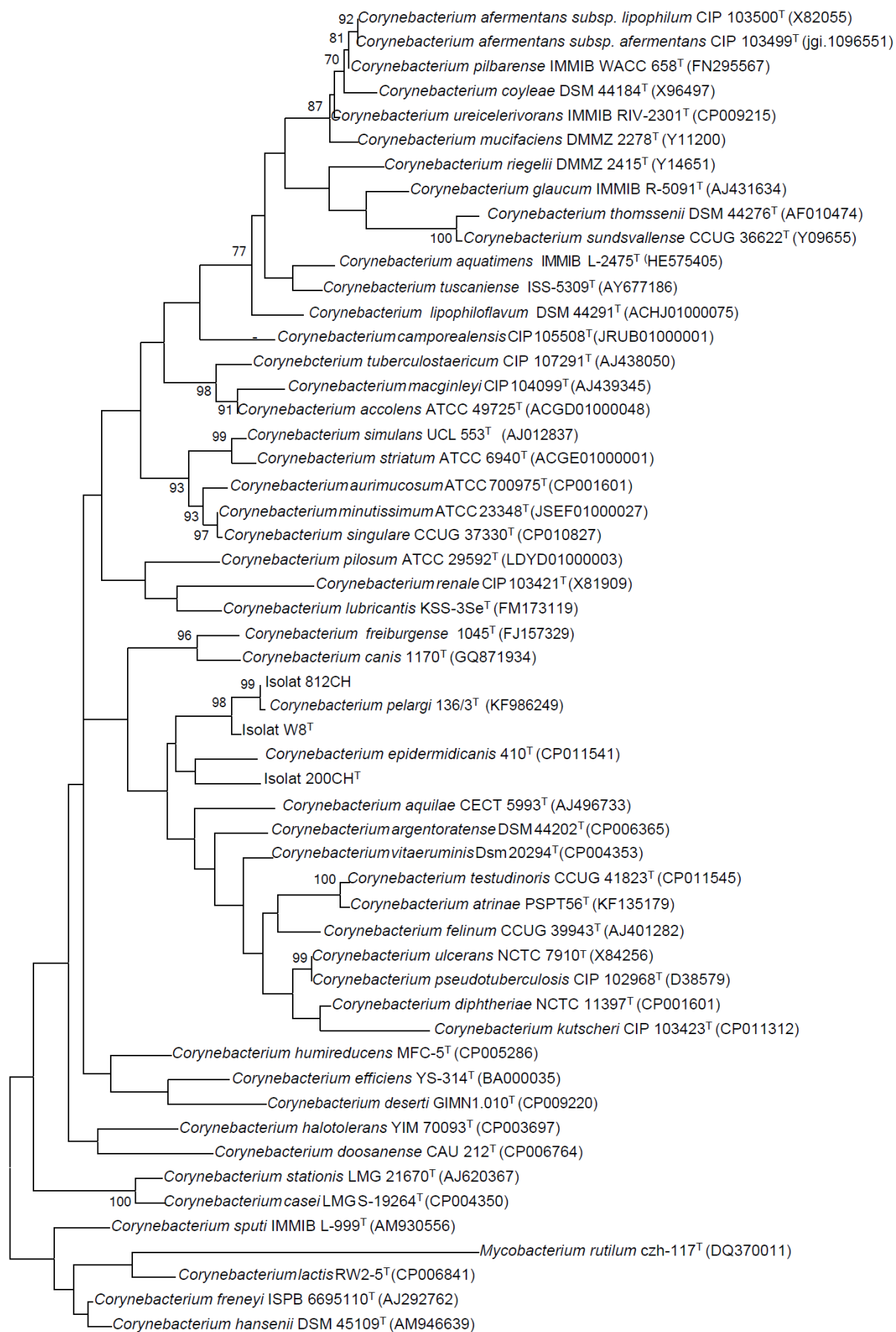
311 18. **Kämpfer P, Lodders N, Warfolomeow I, Falsen E, Busse H-J.** *Corynebacterium lubricantis* sp.
312 nov., isolated from a coolant lubricant. *Int J Sys Evol Microbiol.* 2009;59:1112-1115.

313 19. **Kämpfer P, Jerzak L, Wilharm G, Golke J, Busse H-J, Glaeser SP.** Description of
314 *Corynebacterium trachiae* sp. nov., isolated from a white stork (*Ciconia ciconia*). *Int J Sys Evol*
315 *Microbiol.* 2015;65:784-788.

316 20. **Baumgardt S, Loncaric I, Kämpfer P, Busse H-J.** *Corynebacterium tapiri* sp. nov. and
317 *Corynebacterium nasicanis* sp. nov., isolated from a tapir and a dog, respectively. *Int J Sys Evol*
318 *Microbiol.* 2015;65:3885-3893.

319 21. **Schumann P.** Taxonomy of Prokaryotes. Fred Rainey AO, editor 2011. 101-126 p.

320 22. **Kämpfer P, Kroppenstedt RM.** Numerical analysis of fatty acid patterns of coryneform
321 bacteria and related taxa. *Can J Microbiol.* 1996;42(10):989-1005.



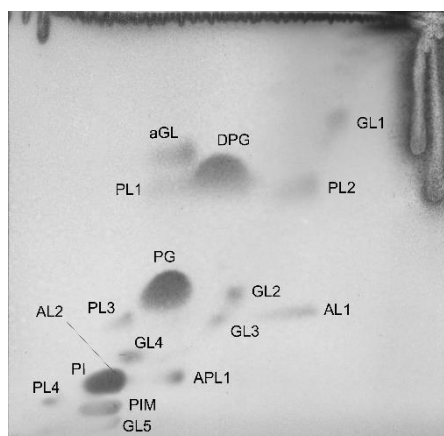
0.01

Figure 1: Maximum-Likelihood tree based on 16S rRNA gene-sequences showing the relatedness of the strains W8^T, 200CH^T and 812CH to each other and to other corynebacterial-species. Only reference species were included in the analysis that were sharing at least 95.0 % 16S rRNA gene sequence similarity. *Mycobacterium rutilum* czh-117^T was used as an outgroup. Bootstrap values (%) <70 based on 500 replicates are given at nodes.

329

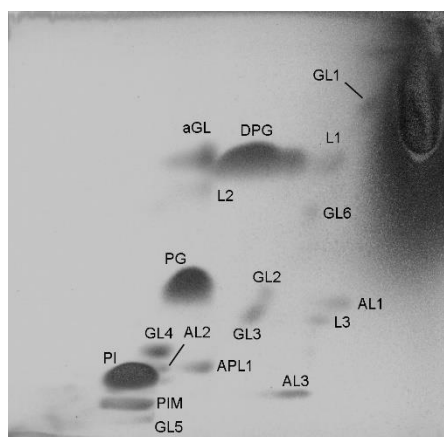
330 **Figure 2:** Polar lipid profiles of strains, W8^T (a), strain 812CH (b) strain 200CH^T (c) after
 331 two-dimensional TLC and applying molybdatophosphoric acid. DPG, diphosphatidylglycerol;
 332 PG, phosphatidylglycerol; PI, phosphatidylinositol; PIM, phosphatidylinositol-mannoside;
 333 aGL, acidic glycolipid; GL1-GL8, unidentified glycolipids; APL1, unidentified
 334 aminophospholipid; AL1–5, unidentified aminolipids; PL1 – PL4, unidentified phospholipids;
 335 L1–L4 unidentified lipids lacking a functional group.

336



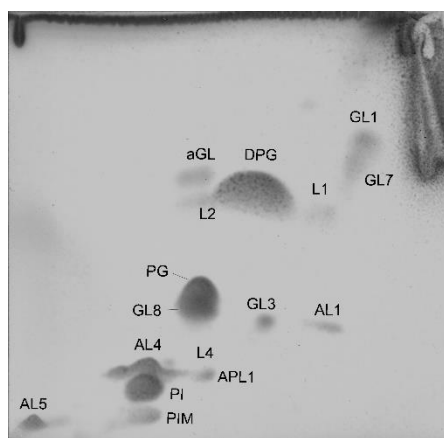
(a) W8^T

337



(b) 812CH

338



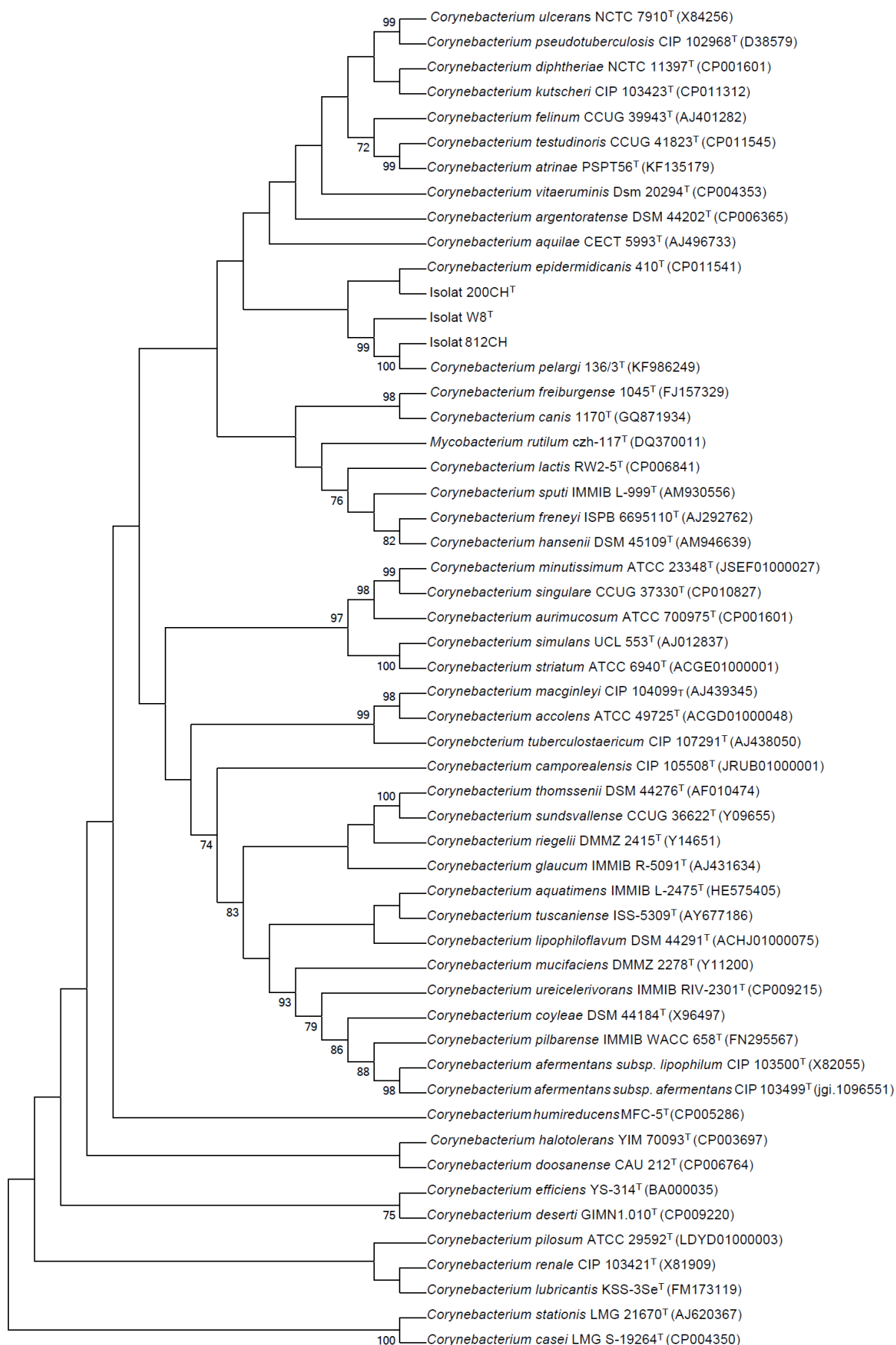
(c) 200CH^T

339 1st dimension → 2nd dimension ↑

Table 1. Cellular fatty acid composition of strains 200CH^T (this study), *C. epidermidicanis* 410^T [10], strain 812CH (this study), and *C. pelargi* 136/3^T [17] and W8^T (this study).

	200CH ^T	<i>C. epidermidicanis</i> 410 ^T	812CH	<i>C. pelargi</i> 136/3 ^T	W8 ^T
C _{15:0}	-	0.7	-	-	-
C _{18:1} ω9c	51.8	30.6	44.9	40.0	40.5
C _{18:1} ω7c	-	2.6	-	-	-
C _{17:1} ω8c	-	7.9	-	-	-
C _{17:1} ω6c	-	3.2	-	-	-
C _{16:0}	41.5	18.0	43.2	30.1	37.8
C _{18:0}	6.7	1.3	5.7	12.8	4.2
iso-C _{17:0}	-	-	-	1.6	-
iso-C _{15:0}	-	1.0	-	3.6	-
Anteiso-C _{15:0}	-	-	-	2.5	-
Anteiso-C _{17:1} ω9c	-	1.5	-	-	-
Anteiso-C _{17:0}	-	-	-	1.6	--
10 Methyl C _{18:0}	-	-	-	2.5	-
C _{15:1} ω6c	-	1.0	-	-	-
C _{16:1} ω5c	-	3.1	-	-	-
C _{16:1} ω7c*	-	25.3	6.2	6.1	17.5

*The MIDI system identified this fatty acid as C_{16:1}ω7c and/or iso-C_{15:0} 2-OH. Since members of the genus *Corynebacterium* are known to lack hydroxy fatty acids, it is most likely that this fatty acid in fact is C_{16:1}ω7c.

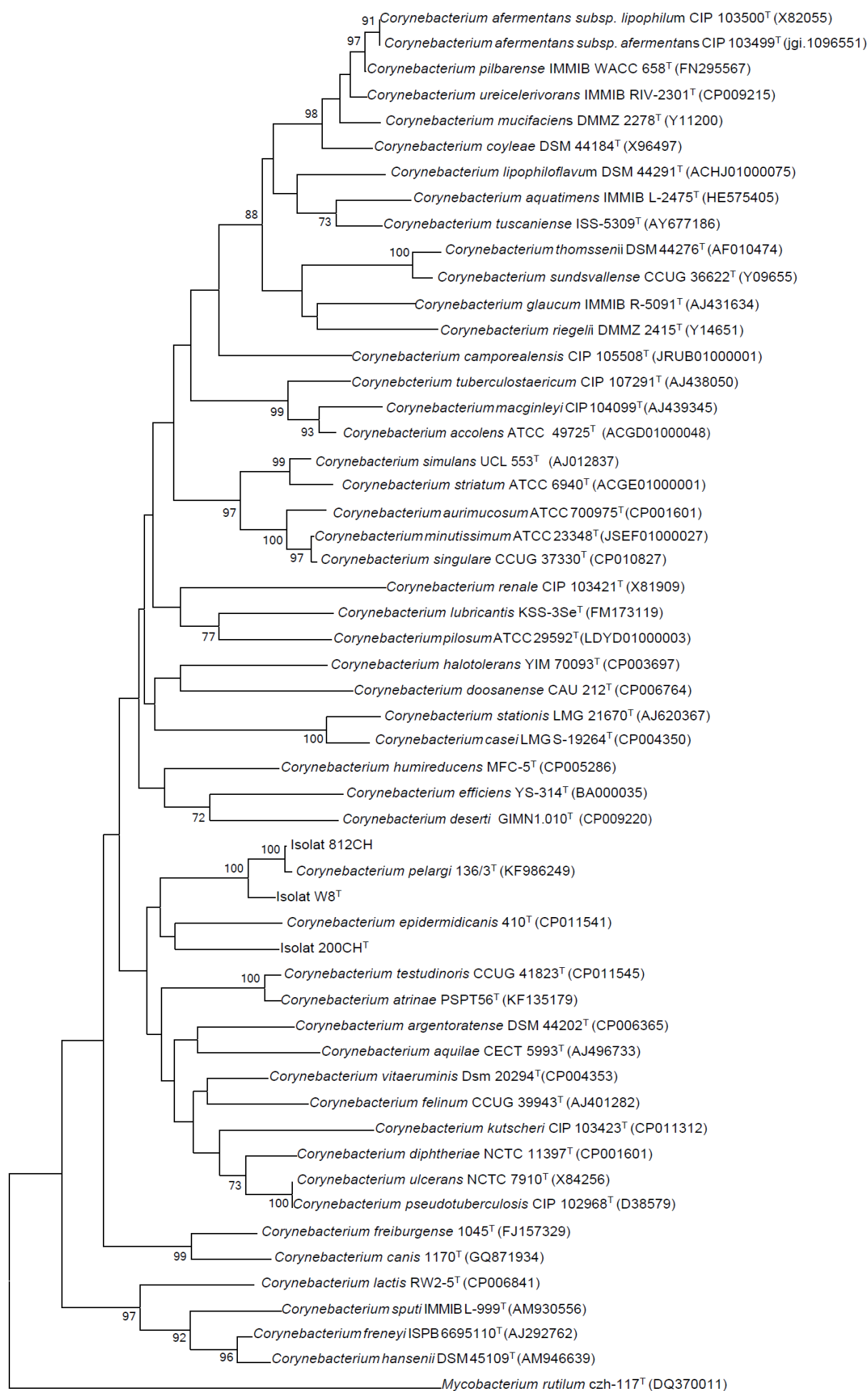


344

345

346 **Supplementary figure S1:**

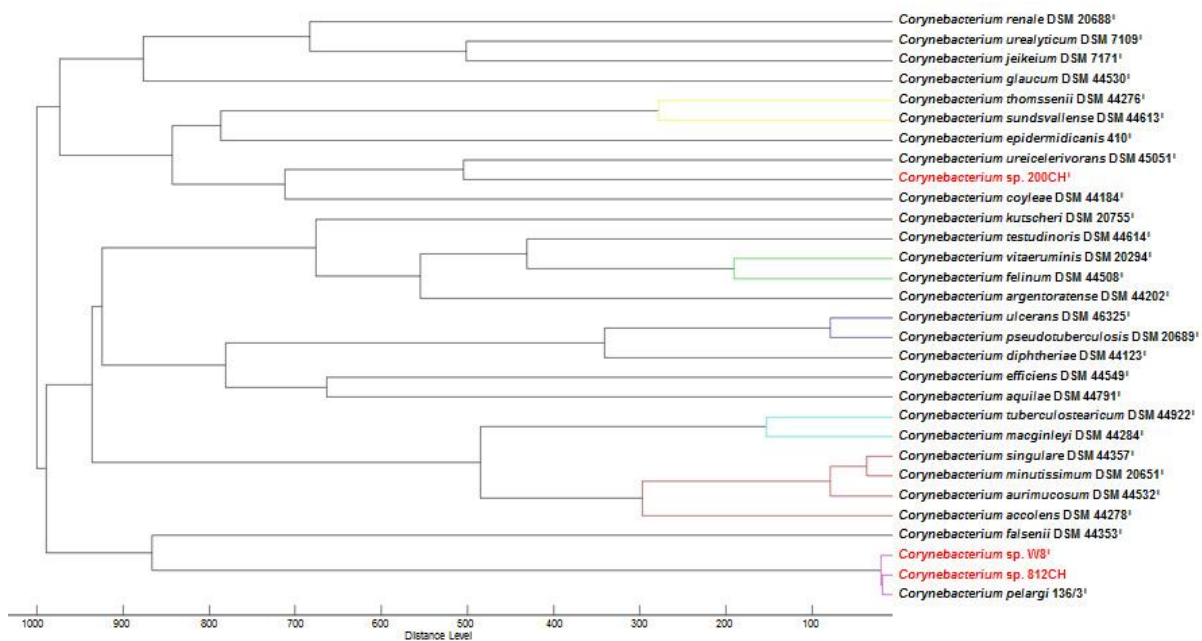
347 Maximum-Parsimony tree based on 16S rRNA gene-sequences showing the relatedness of the
348 strains W8^T, 200CH^T and 812CH to each other and to other corynebacterial-species. Only
349 reference species were included in the analysis that were sharing at least 95.0 % 16S rRNA
350 gene sequence similarity. *Mycobacterium rutilum* czh-117^T was used as an outgroup.
351 Bootstrap values (%) <70 based on 500 replicates are given at nodes.



353 **Supplementary figure S2:**

354 Neighbour Joining tree based on 16S rRNA gene-sequences showing the relatedness of the
355 strains W8^T, 200CH^T and 812CH to each other and to other corynebacterial-species. Only
356 reference species were included in the analysis that were sharing at least 95.0 % 16S rRNA
357 gene sequence similarity. *Mycobacterium rutilum* czh-117^T was used as an outgroup.
358 Bootstrap values (%) <70 based on 500 replicates are given at nodes.

359



Supplementary figure S3: Dendrogram based on MALDI TOF mass spectra of 200CH^T, *C. epidermidicanis* 410^T, W8^T, 812CH, *C. pelargi* 136/3^T and other corynebacterial species present in the Bruker taxonomy library.

<i>fusA</i>	W8 ^T	812CH	200CH ^T	<i>C. pelargi</i> 136/3 ^T	<i>C. epidermidicanis</i> 410 ^T
W8 ^T	-	90.7	82.6	90.9	82.5
812CH	96.3	-	84.3	95.6	82.4
200CH ^T	83.9	83.6	-	83.2	82.4
<i>C. pelargi</i> 136/3 ^T	96.0	99.4	84.0	-	82.3
<i>C. epidermidicanis</i> 410 ^T	88.9	88.0	87.4	88.0	-

Supplementary table S1: Similarities (%) in the partial *fusA* gene sequences (upper right triangle) and corresponding FusA protein sequences (lower left triangle) of strains W8^T, 812CH, 200CH^T, *C. pelargi* 136/3^T and *C. epidermidicanis* 410^T.

<i>rpoC</i>	W8 ^T	812CH	<i>C. pelargi</i> 136/3 ^T	<i>C. epidermidicanis</i> 410 ^T
W8 ^T	-	91.6	91.0	82.5
812CH	97.8	-	96.8	82.0
<i>C. pelargi</i> 136/3 ^T	97.6	98.4	-	82.3
<i>C. epidermidicanis</i> 410 ^T	90.2	90.0	89.8	-

Supplementary table S2: Similarities (%) in the partial *rpoC* gene sequences (upper right triangle) and corresponding RpoC protein sequences (lower left triangle) of strains W8^T, 812CH, *C. pelargi* 136/3^T and *C. epidermidicanis* 410^T.

<i>gyrA</i>	W8 ^T	812CH	<i>C. pelargi</i> 136/3 ^T	<i>C. epidermidicanis</i> 410 ^T
W8 ^T	-	87.6	87.5	82.0
812CH	95.0	-	99.5	81.5
<i>C. pelargi</i> 136/3 ^T	95.0	100	-	81.0
<i>C. epidermidicanis</i> 410 ^T	89.5	90.0	90.0	-

Supplementary table S3: Similarities in the partial *gyrA* gene sequences (upper right triangle) and corresponding GyrA protein sequences (lower left triangle) of strains W8^T, 812CH, *C. pelargi* 136/3^T and *C. epidermidicanis* 410^T.

	W8 ^T	<i>C. pelargi</i> 136/3 ^T	812CH	200CH ^T	<i>C. epidermidicanis</i> 410 ^T
Mannose	+	nd	+	+	+
Maltose	+	-	-	+	+
Glucose	+	+	+	+	+
Mannitol	-	nd	-	+	+
Saccharose	-	nd	-	+	-
Galactose	+	nd	-	+	-
Trehalose	+	-	+	+	+

Supplementary table S4: Fermentation of sugars in phenol-red broth by the strains 200CH^T, *C. epidermidicanis* 410^T, W8^T, 812CH, (this study) and *C. pelargi* 136/3^T [17]. +, positive; -, negative; nd, not determined. All strains are positive for production of acid from glucose and negative for production of acid from raffinose, melibiose, lactose, L+-arabinose, D-arabinose, melizitose, N-acetyl-D-glucosamine and rhamnase.