



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

„Untersuchung der Klassifizierung der bakteriellen
Begleitflora in veterinärmedizinischen Proben“

Verfasserin

Alexa Frischmann

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Naturwissenschaften (Mag.rer.nat.)

Wien, April 2011

Studienkennzahl lt. Studienblatt:

A 441

Studienrichtung lt. Studienblatt:

Genetik - Mikrobiologie

Betreuerin / Betreuer:

Doz. Dipl.-Biol. Dr. Hans-Jürgen Busse

Wer sich Steine zurechtlegen kann,
über die er stolpert,
hat Erfolg in den Naturwissenschaften.

Erwin Chargaff (1905-2002)

Inhaltsverzeichnis

I Allgemeiner Teil.....	3
1. Einleitung.....	3
1.1. Allgemeines	3
1.2. Methoden.....	8
2. Problemstellung.....	10
3. Material und Methoden.....	11
3.1 Bakterienstämme	11
3.2. Medien und Puffer.....	13
3.3. Herstellen der Biomasse und Konservierung	14
3.4. Primärtests.....	15
3.4.1. Gram-Färbung.....	15
3.4.2. KOH-Test	16
3.4.3. Test auf Urease, Nitrat-Reduktion, Oxidase, Katalase und SIM-Agar	16
3.4.4. Säureproduktion aus Zuckern	17
3.4.5. Sporenbildung	17
3.5. Molekularbiologische Untersuchungen	17
3.5.1. 16S rRNA PCR.....	18
3.5.2. ERIC PCR	18
3.5.3. REP PCR	19
3.5.4. BOX PCR	20
3.5.5. RAPD PCR.....	20
3.5.6. infB PCR.....	21
3.5.7. Cereulid PCR.....	22
3.5.8. 16S-23S ITS PCR	23
3.5.9. Restriktion der 16S-23S ITS.....	24
3.5.10. Visualisierung der PCR-Produkte	24
3.5.11. Aufreinigung und Sequenzierung der PCR Produkte	24
3.5.12. Bearbeitung der Sequenz und Suche nach dem nächsten Verwandten.....	24
3. 6. Chemotaxonomische Untersuchungen	25
3.6.1. Analyse der Chinone und polaren Lipide.....	25
3.6.2. Analyse der Polyamine	27
3.6.3. Analyse von Mykolsäuren.....	28
3.7. Analysen am Institut für angewandte Mikrobiologie Justus-Liebig-Universität Giessen.....	28
4. Ergebnisse und Diskussion	29
4.1. 16S rRNA und Sequenzierung.....	29
4.2. Isolat 256-I	29
4.3. Isolat 256-II, 408, 1000 und 2224	31
4.4. Isolat 410	38
4.5. Isolat 793	39
4.6. Isolat 886	42
4.7. Isolat 1600	44
4.8. Isolat 1656	46
4.9. Isolat 2236	48
4.10. Die Isolate 2289 und 2388	50
4.11 Isolat 2476	53

5. Zusammenfassung	63
6. Anhang	65
6.1. Sequenzen des 16S rRNA Gens der Isolate	65
6.2. Sequenzen des infB Gens und die translatierten Proteinsequenzen	69
7. Literatur	72
II Curriculum vitae.....	78
III Manuskripte	79
IV Danksagung	93

I Allgemeiner Teil

1. Einleitung

1.1. Allgemeines

Lebewesen werden in die drei Domänen *Bakteria*, *Archaea* und *Eukarya* eingeteilt.

Bakterien bilden gemeinsam mit den Archaea das Reich der Prokaryoten, diese sind vor allem dadurch charakterisiert, dass ihnen ein Zellkern und membranumhüllte Organellen fehlen. Im Gegensatz dazu stehen die Eukaryoten (Tiere, Pflanzen, Pilze, Protisten), welche einen echten Zellkern und auch membranumhüllte Organellen aufweisen. Es gibt einige Charakteristika (Madigan *et al.*, 2009), um Bakterien von Archaea zu unterscheiden. So haben Bakterien Peptidoglykan, wohingegen Archaea nur Pseudopeptidoglykan besitzen. Auch die Art der Lipide ist unterschiedlich; Bakterien besitzen Lipide mit einer polaren Gruppe, die über Glycerin mit Fettsäuren verbunden sind. Archaea hingegen weisen Etherverknüpfungen mit verzweigten Kohlenwasserstoffketten (Phytanylseitenkette) auf.

Bakterien haben Einfluss auf mehrere Bereiche des menschlichen Lebens wie Landwirtschaft, Energiegewinnung, Umwelt, Nahrung und Biotechnologie. So sind sie zum Beispiel nötig für die Herstellung von Milchprodukten wie Joghurt, aber auch für die Herstellung von Alkohol wie Wein oder Bier. Essig, Sauerkraut oder Salami erhalten ihren charakteristischen Geschmack durch das Vorhandensein von Bakterien. Sie spielen ebenfalls eine große Rolle in der Abwasserbehandlung. Darüber hinaus sind Bakterien, neben Pilzen, die Produzenten von Antibiotika (Madigan *et al.*, 2009).

Bakterien wurden erstmals von Antonie van Leeuwenhoek (1632-1723) beobachtet. Seit über 300 Jahren wurde versucht, Bakterien zu beschreiben und zu katalogisieren. Derzeit sind etwa 7000 Bakterien- und Archaea-Arten beschrieben. Allerdings wird vermutet, dass die meisten Bakterien noch unbekannt sind (Cypionka, 2011) Ein Problem hierbei ist sicherlich die „Unkultivierbarkeit“ einer Vielzahl von Bakterien. Das bedeutet, dass es bislang noch nicht möglich ist ihre „Umwelt“ so nachzuahmen, sodass sie sich im Labor auf Agarplatten oder anderem Medium vermehren können. Eine verlässliche Klassifizierung anhand morphologischer (Erscheinungsform, Größe, Begeißelung, Sporen, Gram-Verhalten) und stoffwechselphysiologischer (Verwertung von Kohlenstoff- und anderen Energiequellen; Wachstumsfaktoren wie Vitamine; Wachstum in Abhängigkeit von Temperatur, Salzkonzentration, pH) Merkmale ist nicht

möglich und muss daher auf Grund von molekularen Strukturen, wie dem 16S rRNA Gen erfolgen. Eine Klassifizierung ist nötig, damit Wissenschaftler, die mit den Mikroorganismen arbeiten, Ordnung in die große Mannigfaltigkeit der Mikroorganismen bekommen. Als „unkultivierbar“ geltende Bakterien werden oft mit Hilfe von den heute verwendeten Methoden nachgewiesen, ohne dass ein Anwachsen dieser Bakterien auf Agarplatten und ähnlichem nötig ist. Die Geschichte der Klassifikation von Bakterien zeigte, dass es Veränderungen gab, die in Korrelation zu neuen Techniken stehen (Schleifer, 2009). Der Beginn der bakteriellen Taxonomie liegt im späten 19. Jahrhundert, als Ferdinand Cohn 1872 die ersten sechs Genera beschrieb. Bis zum Beginn des 20. Jahrhundert wurden vor allem Charakteristika der Morphologie, Anforderungen an die Wachstumsbedingungen und pathogenes Potential zur Klassifizierung eingesetzt. Zu Beginn des 20. Jahrhunderts kamen biochemische und physiologische Untersuchungen hinzu, des weiteren wurden Enzyme untersucht und metabolische ‚Pathways‘ studiert (Schleifer 2009, Madigan *et al.*, 2009).

Die wohl wichtigste Struktur zur Klassifizierung ist heute zu Tage die rRNA Sequenz der kleinen ribosomalen Untereinheit (16S rRNA), bzw. die dafür kodierende DNA Sequenz. Die Sequenz der 16S rRNA, die etwa 1500Bp lang ist, kann die evolutionäre Beziehung, durch die Berechnung von Stammbäumen, von verschiedenen Organismen widerspiegeln (Cypionka, 2010). Die Vorteile der Verwendung des 16S rRNA kodierenden Gens sind vor allem dessen funktionelle Konstanz und die ubiquitäre Verbreitung; außerdem sind diese Sequenzen stark konserviert. Eine weitere Analyse, um ein Bakterium einer bestimmten Art zuzuordnen ist die DNA:DNA Hybridisierung; hier gilt bei einem Wert $>70\%$ Ähnlichkeit dass die zu untersuchenden Bakterien derselben Art angehören (Stackebrandt und Goebbel, 1994).

Auf Grund der Miteinbeziehung verschiedener Untersuchungen, unter anderem der oben beschriebenen, werden Bakterien in verschiedene Stämme eingeteilt. Bakterien werden weiter eingeteilt in Klassen, Ordnungen, Familien, Gattungen und Arten.

Jedes Lebewesen ist nahezu überall mit Bakterien besiedelt. So gibt es etwa 10mal so viele Bakterien am menschlichen Körper, als der Mensch Körperzellen hat (Sears, 2005). Die meisten Bakterien befinden sich auf der Haut und im Gastrointestinaltrakt. Die Gesamtheit dieser Bakterien wird als Normalflora bezeichnet. Bakterien dieser Normalflora lösen im Regelfall keine Krankheit aus, daher werden diese Bakterien auch

als Kommensale bezeichnet. Sofern die Immunität eines Lebewesens allerdings herabgesetzt ist, können sie auch Krankheiten hervorrufen (Cogen *et al.*, 2008).

Wenn ein Arzt bei der Behandlung eines Patienten den Verdacht hat, dass dieser an einer bakteriellen Infektionskrankheit leidet, so werden Proben des infizierten Gewebes oder Flüssigkeiten entnommen. Zu den gesammelten Materialien zählen Blut, Urin, Kot, Speichel, Auswurf und Eiter aus Wunden.

Eine Infektionskrankheit kann direkt durch den Nachweis des Erregers selbst, oder aber indirekt bestimmt werden, indem Antikörper nachgewiesen werden. Eine rasche Identifizierung des Krankheitserregers ist für eine rasche und effektive Behandlung nötig.

In der bakteriellen Routinediagnostik werden mit dem Probenmaterial zu aller erst Agarplattchen beimpft. Zunächst werden Medien für den allgemeinen Einsatz wie zum Beispiel Blutagar-Platten verwendet. Durch das Verwenden verschiedener Wachstumsmedien können die meisten klinisch bedeutsamen Mikroorganismen angezüchtet, isoliert und identifiziert werden. Auch das Betrachten der Keime unter dem Mikroskop ist wichtig, wobei durch die Kleinheit der Bakterien, meist nur einige Mikrometer, oft auch an die Grenzen der Lichtmikroskopie gestoßen wird. Bei Bakterien gibt es mehrere verschiedene Erscheinungsformen, so gibt es zum Beispiel Stäbchen, Kokken, gekrümmte Stäbchen, oder Spiralen. Die jeweilige Erscheinungsform kann sich allerdings im Zuge der Wachstumsphase ändern (Wainwright, 1997).

Weitere wichtige Analysen die in der Routinediagnostik verwendet werden sind verschiedene Färbetechniken wie zum Beispiel die Gram-Färbung, Methyleneblau oder Ziehl-Neelsen. Aber auch andere klinisch-diagnostische Tests wie Citratverwertung, Indoltest, Katalasetest, Nitratreduktion, Oxidasetest, Ureasetest sind essentiell für eine Identifizierung eines Bakteriums (Madigan *et al.*, 2009; Cypionka, 2010).

In der Routinediagnostik wird üblicherweise das zu untersuchende Material nur auf den Erreger der vermuteten Krankheit hin analysiert. Wenn ein Präparat mit der Aufschrift „Verdacht auf *Staphylococcus aureus* Infektion“ zur Untersuchung ins Labor kommt, wird spezifisch nur nach diesem Bakterium gesucht; alle anderen, ebenfalls in der Probe enthaltenen Bakterien werden vernachlässigt. Allerdings kann hierbei das Problem auftauchen, dass nach dem falschen Bakterium gesucht wird, da oft verschiedene Erreger in der Lage sind, dieselbe Krankheit auszulösen. Es ist auch

denkbar, dass diese nicht gesuchten Bakterien einen Einfluss auf das Entstehen der Krankheit, das Krankheitsbild und den Krankheitsverlauf haben können.

Die Literatur zum Thema Normalflorabakterien bei Tieren ist spärlich und zudem sehr alt, wie zum Beispiel die Publikation von Clapper und Meade (1963). In dieser Studie wurden die Mikroorganismen aus Nase und Rektum von 25 Beagles isoliert und charakterisiert. Bei den Isolatene aus der Nase isoliert wurden, dominierten koagulase negative Staphylokokken, diese waren in jeder Probe vorhanden (100%). *Streptococcus viridans* (92%) und *Neisseria* spp. (92%) kamen in nahezu jeder Probe vor, *Streptococcus lactis* (56%), *Bacillus* sp. (56%) sowie *Corynebacterium* sp. (40%) wurde in zirka der Hälfte der Proben nachgewiesen. Bei den Isolatene, die aus dem Rektum isoliert wurden (es wurden 2 Messungen zu unterschiedlichen Zeiten durchgeführt), dominierten *Escherichia coli* (86,3% bzw. 90,9%) und *S. viridans* (81,3% bzw. 90,9%). Die in den Proben nachgewiesenen Stämme von *S. lactis* (45,2% bzw. 86,3%), *Bacillus* sp. (22,7% bzw. 68,1%) und Enterococcus (77,2% bzw. 54,5%) sind in den zwei Messungen unterschiedlich oft identifiziert worden. *Aerobacter aerogenes* konnte bei beiden Messungen in weniger als der Hälfte der Proben nachgewiesen werden (31,5% bzw. 40,9%). Hoquet *et al.* (1985) zeigten dass bei Pferden im Rachen vor allem *Corynebacterium* spp. (79%), koagulase-negative Staphylokokken (63,1%), *Nocardia* spp. (53%), *Enterobacter agglomerans* (47%), sowie *Moraxella* spp. (37%) zu finden sind. Diese Autoren konnten auch zeigen, dass sich dieses Verhältnis bei dem Auftreten einer Rachenentzündung verändert. So dominierten bei einer Rachenentzündung dritten oder vierten Grades *Moraxella* spp. mit 87,5%. Beim Menschen gilt meist *Streptococcus* Gruppe A als Haupterreger der Rachenentzündung (Bisno *et al.*, 2002; Esposito *et al.*, 2004).

Im Gegensatz zu den wenigen Informationen bezüglich der Normalflora von Tieren, gibt es mehr Informationen bezüglich dieser bei Menschen. Die verschiedenen Floren am Menschen (wie zum Beispiel Haut, Schleimhaut und Darm) bestehen aus Bakterien, Pilzen und Archaea. Es leben circa 500 bis 1000 Bakterienarten im menschlichem Darm und etwa genauso viele auf der Haut (Guarner und Malagelada, 2003, Grice *et al.*, 2008). Auf der Haut fand Grice *et al.* (2008) vor allem Vertreter der Genera *Pseudomonas*, *Janthinobacterium*, *Serratia*, *Halomonas*, *Stenotrophomonas*, *Delftia* und *Comamonas* aber auch Arten von *Corynebacterium*, *Kocuria*, *Propionibacterium*,

Microbacterium und *Micrococcus*, sowie *Staphylococcus* und *Clostridium*. Im Gegensatz zur weit verbreiteten Meinung (Schleifer und Kloos, 1975; Wade *et al.*, 1982), dass auf der Haut vor allem *Staphylococcus epidermidis* zu finden ist, konnten Grice *et al.* (2008) in ihrer Arbeit nicht bestätigen. Auf Grund der Basis von 16S rRNA Sequenzanalysen wurden weniger als 5% der Flora als *S. epidermidis* identifiziert.

Im Darm sind die Bakterien zu 99% anaerobe Bakterien. Man findet zum Beispiel Vertreter der Genera *Bacteroides*, *Clostridium* oder *Escherichia*. Während im Magen und Dünndarm nur sehr wenige Bakterienarten zu finden sind, zeigt der Dickdarm eine große Artenvielfalt. Es ist ein komplexes und dynamisches mikrobielles Ökosystem mit einer hohen Dichte an Bakterien. Vor allem Bakterien, die zu folgenden Genera gehören werden gefunden: *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Eubacterium*, *Clostridium*, *Peptococcus*, *Peptostreptococcus* und *Ruminococcus*. Vertreter der Genera *Escherichia*, *Enterobacter*, *Enterococcus*, *Klebsiella*, *Lactobacillus* und *Proteus* gelten als subdominante Arten (Guarner *et al.*, 2003).

Obwohl die Normalflora meist eine konstante Zusammensetzung zeigt, gibt es einige Faktoren, die die relativen Anteile der Organismen verändern können. Dazu zählen unter anderem Klima, Körperstelle (zum Beispiel Lage, Feuchtigkeit), Krankenhausaufenthalte, Alter, neonatale Flora, Geschlecht, Beruf, Hygieneverhalten, Medikamenteneinnahme, oder ultraviolettes Licht (Roth und James, 1988).

Durch Versuche an Tieren, die in keimfreier Umgebung gehalten wurden, wurde die Funktion von Normalflorabakterien untersucht (Guarner und Malagelada, 2003).

Die Hauptfunktionen der Darmflora sind die metabolische Funktion, wozu zum Beispiel die Produktion von Vitamin K zählt, die trophische Funktion (Kontrolle der Epithelzellproliferation und –differenzierung) und die protektive Funktion gegen Pathogene (Guarner und Malagelada, 2003).

Die Haut hat die wichtige Aufgabe einer Barriere gegenüber pathogenen Keimen und verhindert auch ein Eintreten von toxischen Substanzen (Grice *et al.*, 2008). Sie verhindert außerdem ein unkontrolliertes Austreten von Feuchtigkeit. Die Haut zeigt eine Vielzahl an verschiedenen Nischen, die unterschiedliche pH-Werte, sowie unterschiedliche Temperatur, Feuchtigkeit und Talggehalt aufweisen. Außerdem gibt es unterschiedliche Hautstrukturen wie Haarfollikel, Talg- und Schweißdrüsen, wodurch unterschiedliche Habitate zustande kommen (Grice *et al.*, 2008).

1.2. Methoden

Heutzutage spielt in der Bakterientaxonomie die Sequenzanalyse der 16S rRNA Gene und die daraus resultierende Phylogenie eine entscheidende Rolle. Ursprünglich wurde das 16S rRNA Gen zur Untersuchung der Bakterienphylogenie ausgewählt, da es in allen Bakterien vorkommt, es überall die gleiche Funktion ausübt und stark konserviert ist (Woese, 1987). Da eine Vielzahl an Sequenzen in Datenbanken hinterlegt sind, können Sequenzvergleiche unter Verwendung von speziellen Suchmaschinen wie FASTA (Pearson und Lipman, 1988) oder EzTaxon (Chun *et al.*, 2007) leicht durchgeführt werden und so nächst verwandte Arten identifiziert werden.

Die im Rahmen dieser Arbeit größtenteils verwendeten Analysen sowie ihre Bedeutung für die Klassifizierung sollen im Folgenden näher beschrieben werden.

Für eine Verwandtschafts-Klärung werden gerne genomische Fingerabdruck-Methoden verwendet. Hierfür werden Methoden, wie die rep(repetitive)-PCR verwendet. Diese Methoden basieren auf der Verwendung von unspezifischen Primern, oder von Primer, die gegen repetitive Sequenzen des bakteriellen Genoms gerichtet sind. Die dadurch erhaltenen PCR-Produkte ergeben ein spezifisches Bandenmuster, mit dem genetische Verwandtschaft untersucht werden kann (Szczyka und Kaznowski, 2004).

Zu den rep-PCRs gehören die ERIC-PCR, die REP-PCR und die BOX-PCR (Wieser und Busse, 2000).

Nach der jeweiligen PCR und Auftrennung der Produkte im Agarosegel ergibt sich ein Bandenmuster, das häufig charakteristisch ist für Arten, oder zur Unterscheidung von eng verwandten Arten herangezogen werden kann.

ERIC steht für enterobacterial repetitive intergenic consensus. Bei der ERIC PCR werden Primer verwendet, deren Sequenz sich im gesamten Genom von Enterobakterien mehrfach wiederholt. Es hat sich aber gezeigt, dass sich diese repetitiven Sequenzen auch in anderen Gruppen von Bakterien wiederfinden (Versalovic *et al.*, 1991, Gillings und Holley, 1997).

REP steht für repetitive extragenic palindromic sequence. Die Primer sind so konstruiert, dass sie Sequenzen erkennen, die durchsetzt sind mit palindromischen, sich wiederholenden Sequenzen (Louws *et al.*, 1994).

Die BOX-PCR ist abgeleitet von dem boxA-Element. Dieses wurde ursprünglich bei *Streptococcus pneumoniae* untersucht. Das box Element besteht dort aus boxA, boxB und boxC. Es wurde gezeigt, dass boxA scheinbar konserviert ist bei verschiedenen bakteriellen Arten. Dagegen kommen boxB und boxC nur selten, wenn überhaupt, in anderen Bakterien als *S. pneumoniae* vor (Koeuth *et al.*, 1995). Die verwendeten Primer können im boxA-Element binden.

Polare Lipide sind Bestandteile der Membran und somit in allen Bakterien vorhanden. Nach der Extraktion der Lipide wird eine zweidimensionale Dünnschichtchromatographie durchgeführt, die Lipide werden anschließend mit spezifischen Sprühreagentien detektiert, um unterschiedliche Lipid-Komponenten spezifisch nachzuweisen (Busse *et al.*, 1996). Je nach untersuchtem Bakterium können familien- bis artspezifische Aussagen gemacht werden.

Chinone sind Bestandteile der bakteriellen Zytoplasmamembran und spielen eine wichtige Rolle in der Elektronentransportkette. Es werden zwei Grundtypen unterschieden: Menachinon mit einem Naphthol-Ring und Ubichinon mit einem Benzol-Ring. Weitere Unterscheidungsmerkmale sind die Länge der Isoprenoidseitenketten und das Vorkommen an gesättigten Isoprenoid-Einheiten. Ubichinon tritt ausschließlich bei Alpha-, Beta- und Gammaproteobacteria auf, Ubichinon 10 ist ein Markermolekül für die Alphaproteobacteria (Busse *et al.*, 1996). Mit Hilfe der Analyse der Chinone kann meist eine familien- bis gattungsspezifische Aussage getroffen werden (Mannheim *et al.*, 1978).

Polyamine sind Komponenten der meisten lebenden Zellen. Die Funktion von Polyaminen ist vor allem assoziiert mit der Biosynthese von Proteinen und Nukleinsäure. Außerdem können sie Membranen und Nukleinsäuren stabilisieren (Scherer und Kneifel, 1983). Hier gilt das Polyamin Hydroxyputrescin als ein charakteristisches Merkmal für die Beta-Proteobakterien (Busse *et al.*, 1996). Oft sind

Polyaminmuster aber Familien- und manchmal sogar Genus-spezifisch (Hamana und Matsuzaki, 1992).

2. Problemstellung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die neben dem vermuteten Erreger auftretenden, ungewöhnlich erscheinenden Kommensalen taxonomisch eingeordnet. Dazu wurden im Zeitraum von September 2008 bis Juli 2009 solche Kommensalen aus klinischen Proben isoliert und weiter bearbeitet. Zu diesem Zweck wurden partielle 16S rRNA Gensequenzanalysen durchgeführt. Bei Verdacht auf enge Verwandtschaft zu bekannten Arten, die sich aus nachfolgenden Sequenzvergleichen ergab, wurden diese Isolate dann mit dem entsprechenden Referenzstamm in geeignet erscheinenden phänotypischen Merkmalen verglichen, um Aussagen über die Spezies-Identität treffen zu können.

3. Material und Methoden

3.1 Bakterienstämme

Die zu untersuchenden Bakterienstämme wurden von Alexander Knoll, Institut für Bakteriologie, Mykologie und Hygiene (Veterinärmedizinische Universität Wien), zur Verfügung gestellt (Tab. 1). In Tab. 2 sind die verwendeten Referenzstämme aufgelistet.

Tabelle 1. Bakterienstämme, deren Ursprung und weitere Charakteristika. ¹ PYE: 0,3% Trypton/Pepton aus Casein, pankreatisch verdaut (Roth), 0,3% Hefeextrakt (Merck) pH 7,2.

Stamm	Ursprung	Medium	Kultivierungstemperatur	Diagnose, sofern bekannt
256	Nase, Pferd	PYE ¹	28°C	Vermutlich Nasenausfluss
408	Wunde, Pferd	PYE	28°C	Koppverletzung
410	Haut, Hund	PYE	28°C	Juckreiz
793	Kot, Schwein	PYE	28°C	Durchfall
886	Auge, Chamäleon	PYE	28°C	Augenentzündung
1000	Haut, Hund	PYE	28°C	Wunde
1600	Auge, Pferd	PYE	28°C	Hornhautverletzung
1656	Kot, Esel	PYE	28°C	Vermutlich Durchfall
2224	Nase, Hund	PYE	28°C	Vermutlich Schnupfen, Niesen, Nasenausfluss
2236	Kot, Gans	PYE	28°C	Vermutlich Durchfall
2289	Kot, Rind	PYE	28°C	Durchfall
2388	Kot, Affe	PYE	28°C	Durchfall
2476	Kot, Pferd	PYE	28°C	Durchfall

Tabelle 2. Informationen zu den verwendeten Referenzstämmen.

Abkürzungen: ATCC American Type Culture Collection, DSM Deutsche Sammlung Mikroorganismen, NCIMB National Collection of Industrial, Marine and Food Bacteria, CCUG Culture Collection University Göteborg, CCM Czech Collection of Microorganisms, und andere laborspezifische Bezeichnungen. ¹Blutagar: Columbia Agar Base, Oxoid CM0331 + 7% Schafsblut ² TSB Tryptic Soy Broth (BD Becton Dickinson, 211823), ³ Ballerstedt *et al.*, 2007

Organismus	Stammbezeichnung	Medium	Kultivierungstemperatur
<i>Acinetobacter johnsonii</i>	DSM 6963 ^T	PYE	28°C
<i>Bacillus cereus</i>	NS 58	PYE	37°C
<i>Bacillus cereus</i>	F 4810/72	PYE	37°C
<i>Bacillus cereus</i>	F 5881	PYE	37°C
<i>Bacillus cereus</i>	DSM 31 ^T	PYE	37°C
<i>Bacillus licheniformis</i>	533/1	PYE	37°C
<i>Bacillus licheniformis</i>	BAS 50	PYE	37°C
<i>Bacillus licheniformis</i>	HULTA 54/97	PYE	37°C
<i>Bacillus licheniformis</i>	DSM 13 ^T	PYE	37°C
<i>Bacillus pumilus</i>	DSM 27 ^T	PYE	37°C
<i>Brachybacterium paraconglomeratum</i>	DSM 46341 ^T	PYE	28°C
<i>Citrobacter freundii</i>	ATCC 8090 ^T	PYE	28°C
<i>Comamonas terrigena</i>	CCM 2409 ^T	PYE	28°C
<i>Corynebacterium bovis</i>	DSM 20582 ^T	Blutagar ¹ /TSB ²	37°C
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	DSM 44123 ^T	3,3x PYE	37°C
<i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>	DSM 20689 ^T	3,3x PYE	37°C
<i>Corynebacterium ulcerans</i>	DSM 46325 ^T	3,3x PYE	37°C
<i>Enterobacter cloacae</i>	ATCC 13047 ^T	PYE	28°C
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 13883 ^T	PYE	28°C
<i>Kurthia gibsonii</i>	DSM 20636 ^T	PYE	28°C
<i>Myroides odoratimimus</i>	CCUG 39352 ^T	PYE	28°C

<i>Myroides odoratus</i>	CCUG 7321 ^T	PYE	28°C
<i>“Phytobacter diazotrophicus”</i>	DSM 17806 ^T	PYE	28°C
<i>Pseudomonas putida</i>	DSM 50202 = DSM 291 ^{T3}	PYE	28°C
<i>Pseudomonas putida</i>	DSM 50222	PYE	28°C
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	S-41 ^T	PYE	28°C
<i>Staphylococcus succinus</i>	AMG-D1 ^T	PYE	28°C
<i>Staphylococcus xylosus</i>	KL 162 ^T	PYE	28°C
<i>Yokenella regensburgei</i>	70-115 ^T	PYE	37°C

3.2. Medien und Puffer

PYE

0,3% Trypton/Pepton aus Casein, pankreatisch verdaut (Roth)

0,3% Hefeextrakt (Merck)

pH 7,2

Für feste Nährböden wurde 1,5% Agar (Bacteriological Agar Oxoid) zugegeben.

3,3x PYE

0,99% Trypton/Pepton aus Casein, pankreatisch verdaut

0,99% Hefeextrakt

pH 7,2

Für feste Nährböden wurde 1,5% Agar zugegeben.

Tryptic Soy Broth (BD, Becton Dickinson, 211823). Für feste Nährböden wurde 1,5% Agar zugegeben.

Blutagar (Columbia Agar Base, Oxoid CM0331 + 7% Schafsblut)

MacConkey Agar (Oxoid CM507)

Saline: 0,89% NaCl

1x TAE (= Tris Acetat EDTA Puffer). Für den 1x TAE wurde vom 50x TAE [1 l: 242 g Tris (Roth), 57,1 ml Eisessig (Roth), 100 ml 0,5M EDTA-Ethylendiamintetraessigsäure (Fluka)] verdünnt.

Autoklaviert wurde bei 121°C und bei einem Druck von 1,5 bar für 15 min.

3.3. Herstellen der Biomasse und Konservierung

Die zu untersuchenden Stämme wurden zunächst auf Blutagar Platten kultiviert und anschließend auf geeignetem Medium und geeigneter Temperatur (Tab. 4) weiter gezüchtet.

Zur Anzucht von Biomasse wurden Vorkulturen (20 ml Medium) mit einer Einzelkolonie beimpft und solange bei der geeigneten Temperatur geschüttelt bis die Bakterien angewachsen waren (erkennbar durch Trübung des Mediums oder Flockenbildung). Davon wurde eine geeignete Menge entnommen (1-5 ml, je nach Intensität der Trübung bzw. Flockenbildung) um eine Hauptkultur (300 ml) zu beimpfen und unter denselben Bedingungen inkubiert. Die Zellen wurden anschließend durch Zentrifugation (30 min, 8000 upm, Umdrehungen pro Minute) geerntet. Anschließend wurde das Pellet in Saline (0,98% NaCl) resuspendiert und abermals zentrifugiert (10 min, 1200 upm). Der Überstand wurde verworfen und das entstandene Pellet wurde lyophilisiert. Anschließend stand die Biomasse für die Analysen bereit.

Für die Analyse der Polyamine wurde die Kultur beim Erreichen ihrer 70% maximalen optischen Dichte geerntet. Für diesen Wert musste zuvor eine Wachstumskurve erstellt werden. Bei flockig wachsenden Bakterien, bei denen dies nicht möglich war, wurden die 70% subjektiv abgeschätzt. Das Messen der OD₆₀₀ erfolgte mit einem BioPhotometer (Eppendorf).

Zur Reinheitskontrolle wurden Sterilausstriche der jeweiligen Kulturen gemacht.

Zur Konservierung wurden von den Stämmen Glycerinkulturen hergestellt. Zu diesem Zweck wurden von einer Flüssigkultur ca. 6 ml in Eppendorf-Reaktionsgefäßen für 10 min bei 12000 upm zentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 ml Cyropuffer (80,2 ml K₂HPO₄ und 19,8 ml KH₂PO₄) suspendiert und 0,8 ml 50%iges Glycerin wurde zugeben. Das Gemisch wurde für 30 min ins Eisbad gestellt und danach bei -80°C aufbewahrt. Alternativ wurden 1,5 ml Cyropuffer direkt auf eine bewachsene Agarplatte pipettiert und die Bakterien direkt auf der Platte im Puffer suspendiert, anschließend wurde 1 ml in ein Cryoröhrchen überführt. Die weitere Prozedur wurde, wie oben beschrieben, durchgeführt.

3.4. Primärtests

3.4.1. Gram-Färbung

Lösungen, die für die Gram-Färbung verwendet wurden:

Kristallviolett:

Lösung A: Kristallviolettstammlösung	20 ml
(13,87 g Kristallviolett (Merck, 1.15940) in 100 ml 96%igem Ethanol lösen)	
Lösung B: Ammoniumoxalat-Monohydrat (Merck 5063)	0,8 g
Dest. Wasser	80 ml

Lugol'sche Lösung:

2 g Kaliumiodid (Merck 1.05043.0500) und 1 g Iod (Merck 1.04761.0100) in 300 ml dest. Wasser lösen.

Safraninlösung:

2,5 g Safranin (Merck 1.15948) in 100 ml 96%igem Ethanol lösen (=Stammlösung).
Zum Gebrauch wird diese Stammlösung 1:10 mit dest. Wasser verdünnt.

Auf einem Objektträger wurde ein Tropfen Saline aufgebracht, in dem ein wenig Zellmaterial mit der Impföse bis zur Homogenität suspendiert wurde. Die Suspension wurde an der Luft getrocknet und anschließend einige Male durch die Bunsenbrennerflamme gezogen. Die hitzefixierten Bakterien wurden zunächst für 1 min mit Kristallviolett bedeckt, anschließend wurde der Farbstoff mit destilliertem Wasser abgespült. Danach wurde Lugol'sche Lösung aufgetropft und nach 1 min mit destilliertem Wasser abgespült. Um das Präparat zu entfärben wurde Ethanol/Aceton (1:1) aufgetropft und nach 30 sec mit destilliertem Wasser abgespült. Die anschließende Gegenfärbung erfolgte mit Safraninlösung für 10 sec. Das Präparat wurde abschließend mit destilliertem Wasser abgespült, mit einem Tuch getrocknet und anschließend unter dem Mikroskop ausgewertet.

3.4.2. KOH-Test

Ein Tropfen 3%ige KOH-Lösung wurde auf einen Objektträger getropft, anschließend wurde Zellmaterial in dem Tropfen suspendiert. Durch langsames Anheben der Impföse aus der Suspension heraus wurde überprüft, ob die Suspension viskos geworden ist. Falls dies der Fall war, deutete dies auf ein Gram-negatives Bakterium hin, da die Zellhülle bei dieser Behandlung lysiert wurde und DNA frei gesetzt wurde, wodurch die Suspension viskos wurde. Bei Gram-positive Bakterien hingegen blieb die Zellhülle stabil und die Suspension wurde nicht viskos.

3.4.3. Test auf Urease, Nitrat-Reduktion, Oxidase, Katalase und SIM-Agar

Nach dem Beimpfen und Inkubieren eines Urease-Agars (Oxoid CM53) wurde ein eventuell auftretender Farbumschlag zu pink als Nachweis für das Enzym Urease gewertet.

Bei der Testung auf Nitrat-Reduktion (Nitrat Bouillon Merck 1.10204 und 3 g Agar für 1 l) wurde nach dem Inkubieren ein wenig Griess-Ilosvay Reagenz (Merck, 1.09023.0500) auf die Agaroberfläche aufgetropft. Pink-Färbung war positiv zu bewerten, für die Fähigkeit des Bakteriums Nitrat zu Nitrit zu reduzieren.

Mit Hilfe des SIM-Agars (Oxoid CM 435) wurde die Bildung von Sulfid, Indol sowie die Beweglichkeit getestet. Mit der Impfnadel wurde ein wenig Zellmaterial von einer Agarplatte entnommen und damit der SIM-Agar beimpft, sodass ein vertikaler Kanal entstand. Sofern das Bakterium beweglich war, wurde „Auswanderung“ aus diesem Kanal festgestellt. Die Produktion von Indol wurde durch Auftropfen des Kovacs Reagenz (Merck 1.09293.0100) getestet. Eine Verfärbung nach rosa zeigte das Vorhandensein des Enzyms Tryptophanase an. Sofern das Medium sich schwarz verfärbte, war der Test auf Bildung von Sulfid positiv.

Oxidase wurde mit Hilfe der Merck Teststreifen (1.13300.0001) getestet. Eine Verfärbung des Teststreifens bedeutete, dass das Bakterium das Enzym Cytochromoxidase besaß.

Katalase wurde durch Auftropfen von Wasserstoffperoxid auf eine Einzelkolonie getestet. Sofern sich Gasbläschen bildeten, besaß das Bakterium das Enzym Katalase.

3.4.4. Säureproduktion aus Zuckern

Test auf Säureproduktion wurde in Phenolrotbouillon (Merck) getestet. Dazu wurde eine Serie von Eprovetten mit Phenolrotbouillon und je einem Zucker (sterilfiltriert, 1 M, 20 µl) mit einer Suspension des zu untersuchenden Bakterienstammes (50 µl) in Saline beimpft. Bei Entstehung von Säure schlug die Farbe des Indikators von rot nach gelb um. Dies galt als Nachweis von Säureproduktion.

3.4.5. Sporenbildung

Für die Testung auf Sporenbildung wurde die Bakteriensuspension für 10 min auf 80°C erhitzt, um vegetative Zellen abzutöten, und anschließend auf geeignetem Agar erneut ausgestrichen und bei geeigneter Temperatur inkubiert. Sofern in der Probe Sporen enthalten waren, keimten diese aus und wuchsen zu einer Kolonie an.

Eine weitere Methode zum Nachweis von Sporen war das Betrachten unter dem Mikroskop, da Sporen eine andere Lichtbrechung haben, war ein charakteristisches Erscheinungsbild gegeben. Da Mangan (0,01% $\text{MnSO}_4 \cdot \text{xH}_2\text{O}$, Merck) die Sporenbildung zusätzlich fördert, wurde es dem Medium vor diesen Untersuchungen zugegeben.

3.5. Molekularbiologische Untersuchungen

Die für die molekularbiologischen Untersuchungen benötigte DNA erhielt man, indem vier Impfösen des Zellmaterials von einer Agarplatte in ein Eppendorf Reaktionsgefäß mit 150 µl Saline überführt wurden. Die Suspension wurde in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und anschließend für 4 min auf 62°C erhitzt. Dieser Vorgang wurde vier Mal wiederholt, wodurch die Zellen aufgebrochen wurden. Anschließend wurde das Eppendorf Reaktionsgefäß für 10 min bei 13.000 upm zentrifugiert, der Überstand, der die gelöste DNA enthielt, wurde abgehoben und bis zur Verwendung bei -20°C eingefroren.

3.5.1. 16S rRNA PCR

Tabelle 3. Reaktionsgemisch zur Amplifizierung der 16S rRNA kodierenden Sequenz mittels PCR

5x Buffer (GoTaq Promega)	10 µl
MgCl ₂ (Promega)	4 µl
dNTPs (Bioron)	1 µl
Primer 1492r (VBC Biotech)	0,5 µl
Primer 27f (VBC Biotech)	0,5 µl
Polymerase Tag (Promega)	1 µl
Template	2 µl
H ₂ O ad 50µl	31 µl

Denaturierung: 95°C 1 min

Annealing: 64°C 1 min

Elongation: 72°C 1 min

Final Elongation: 72°C 5 min

35 Zyklen.

Sequenz der Primer (Lane, 1991)

1492r: 5' GGT TAC CTT GTT ACG ACT T 3'

27f: 5' AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG 3'

3.5.2. ERIC PCR

Tabelle 4. Reaktionsgemisch für die ERIC PCR

5x Buffer (GoTaq Promega)	5 µl
MgCl ₂ (Promega)	2 µl
dNTPs (Bioron)	0,5 µl
Primer 1R (VBC Genomics)	0,25 µl
Primer 2 (VBC Genomics)	0,25 µl
Polymerase Tag (Promega)	0,12 µl
Template	2 µl
H ₂ O ad 25µl	14,88 µl

Start: 94°C 7 min
 Denaturierung: 94°C 1 min
 Annealing: 50°C 1 min
 Elongation: 65°C 8 min
 Final Elongation: 65°C 15 min
 30 Zyklen.

Sequenz der Primer (Louws *et al.*, 1994)

1R: 5' ATG TAA GCT CCT GGG GAT TCA C 3'
 2I: 5' AAG TAA GTG ACT GGG GTG AGC G 3'

3.5.3. REP PCR

Tabelle 5. Mengen Reaktionsgemisch für die REP PCR

5x Buffer (GoTaq Promega)	5 µl
MgCl ₂ (Promega)	6 µl
dNTPs (Bioron)	1 µl
Primer 1R (VBC Biotech)	0,5 µl
Primer 2I (VBC Biotech)	0,5 µl
Polymerase Tag (Promega)	0,5 µl
Template	2 µl
H ₂ O ad 50µl	34,5 µl

Start: 95°C 7 min
 Denaturierung: 94°C 1 min
 Annealing: 44°C 1 min
 Elongation: 65°C 8 min
 Final Elongation: 65°C 16 min
 30 Zyklen.

Sequenz der Primer (Louws *et al.*, 1994)

REP 1R 5'-IIIIICGICGICATCIGGC-3'

REP 2I 5'-ICGICTTATCIGGCCTAC-3'

3.5.4. BOX PCR

Tabelle 6. Reaktionsgemisch für die BOX PCR

5x Buffer (GoTaq Promega)	2,5 µl
MgCl ₂ (Promega)	1,5 µl
dNTPs (Bioron)	0,5 µl
Primer BOX-A1R (VBC Biotech)	0,5 µl
Polymerase Tag (Promega)	0,5 µl
Template	3 µl
H ₂ O ad 25µl	16,5 µl

Start: 95°C 7 min

Denaturierung: 94°C 1 min

Annealing: 53°C 1 min

Elongation: 65°C 8 min

Final Elongation: 65°C 16 min

30 Zyklen.

Sequenz des Primer (Louws *et al.*, 1994)

Primer BOX-A1R: 5' CTA CGG CAA GGC GAC GCT GAC G 3'

3.5.5 RAPD PCR

Tabelle 7. Reaktionsgemisch für die RAPD PCR

5x Buffer (GoTaq Promega)	5 µl
MgCl ₂ (Promega)	2 µl
dNTPs (Bioron)	0,5 µl
Primer (VBC Biotech)	2 µl
Polymerase Tag (Promega)	0,12 µl
Template	1 µl
H ₂ O ad 25µl	14,38 µl

Start: 94°C 5 min
 Denaturierung: 94°C 1 min
 Annealing: 32°C 1 min
 Elongation: 72°C 10 min
 45 Zyklen.

Sequenz der Primer (Langer, 2009)

Nr. 18 5'-GTT ACA TCA GTG C-3' (Tm °C 32,4)

Nr. 23 5'-AAG TTT GTT TGC-3' (Tm °C 32,9)

Auf Grund ähnlicher Annealing-Temperatur konnten zwei Ansätze gleichzeitig in einer PCR-Maschine durchgeführt werden.

3.5.6. infB PCR

Tabelle 8. Reaktionsgemisch zur Amplifizierung der infB kodierenden Sequenz mittels PCR

5x Buffer (GoTaq Promega)	15 µl
MgCl ₂ (Promega)	6 µl
dNTPs (Bioron)	1,5 µl
Primer 1186F (Sigma)	0,5 µl
Primer 1833R (Sigma)	0,5 µl
Polymerase Tag (Promega)	0,25 µl
Template	2 µl
H ₂ O ad 75µl	49,25 µl

Es wurde folgendes PCR Programm von Nørskov-Lauritsen *et al.*, (2004) durchgeführt.

Start: 95°C 5 min
 Denaturierung: 94°C 30 sec
 Annealing: 51°C 60 sec
 Elongation: 72°C 90 sec
 Final Elongation: 72°C 5 min
 30 Zyklen.

Sequenz der Primer (Hedegaard *et al.*, 1999)

1186F-Primer: 5' ATY ATG GGH CAY GTH GAY CAY GGH AAR AC3'

1833R-Primer: 5' TAT CCG ACG CCG AAC TCC GRT TNC GCA TNG CNC GNA
YNC GNC C 3'

Y = C od. T

H = A, C od. T

R = A od. G

3.5.7. Cereulid PCR

Tabelle 9. Reaktionsgemisch zur Amplifizierung des Cereulid-produzierenden Gens

5x Buffer (GoTaq Promega)	10 µl
MgCl ₂ (Promega)	3 µl
dNTPs (Bioron)	4 µl
Primer CesF1 (Sigma)	0,5 µl
Primer CesR2 (Sigma)	0,5 µl
Primer 1492r (VBC Biotech)	0,5 µl
Primer 27f (VBC Biotech)	0,5 µl
Polymerase Tag (Promega)	0,25 µl
Template	1 µl
H ₂ O ad 50µl	29,75 µl

Start: 95°C 15 min

Denaturierung: 95°C 1 min

Annealing: 53°C 75 sec

Elongation: 72°C 50 sec

Denaturierung: 95°C 1 min

Annealing: 58°C 75 sec.

Elongation: 72°C 50 sec

Final Elongation: 72°C 5 min

5+25 Zyklen.

Sequenz der Primer (Ehling-Schulz *et al.*, 2005)

CesF1 5' GGT GAC ACA TTA TCA TAT AAG GTG 3'

CesR2 5' GTA AGC GAA CCT GTC TGT AAC AAC A 3'

Zur Kontrolle wurde diese PCR zusätzlich mit den internen 16S rRNA Gen Primern (27f und 1492r) durchgeführt.

3.5.8. 16S-23S ITS PCR

Tabelle 10. Reaktionsgemisch zur Amplifizierung des 16S-23S intergenischen ‚spacer‘ Region

5x Buffer (GoTaq Promega)	10 µl
MgCl ₂ (Promega)	3,5 µl
dNTPs (Bioron)	1 µl
Primer F (Invitrogen)	1 µl
Primer R (Invitrogen)	1 µl
Polymerase Tag (Promega)	0,5 µl
Template	1,5 µl
H ₂ O ad 50µl	31,5 µl

Denaturierung: 94°C 15 sec

Annealing: 60°C 30 sec

Elongation: 72°C 2 min

Denaturierung: 94°C 15 sec

Annealing: 60°C 30 sec

Elongation: 72°C 2 min 2 sec

5+30 Zyklen.

Sequenz der Primer (Ramirez *et al.*, 2008)

F-Primer: 5' CGT TCT CGG GTC TTG TAC AC 3'

R-Primer: 5' CGC AGG TTT GCA CGT CCT TCA TCG 3'

3.5.9. Restriktion der 16S-23S ITS

Für die Restriktion der ITS wurde die PCR mit dem doppelten Volumen durchgeführt (Tab. 10), um ausreichend PCR Produkt zu erhalten, das den Verdau mit verschiedene Restriktionsenzyme (HindIII, EcoRI und HhaI) erlaubte.

Zur Amplifizierung wurden folgende Geräte verwendet: MWG-Biotech-Primus, Multigene Labnet und Mastercycler Eppendorf.

3.5.10. Visualisierung der PCR-Produkte

Von dem PCR Produkt wurden 5 µl auf einem 1,5%igen Agarose-Gel (Roth, in 1x TAE) aufgetrennt (BioLab DNA sub Cell TM Kammer; Laufpuffer: 1x TAE). Anschließend wurde das Gel für 15 min im Ethidium-Bromid-Bad (0,25 µg/ml, Roth) gefärbt und genauso lange in Wasser entfärbt. Die Analyse erfolgte anschließend mit einem BioRad Geldokumentationsgerät und der Quantity One Software.

3.5.11. Aufreinigung und Sequenzierung der PCR Produkte

Die Aufreinigung und Sequenzierung der 16S rRNA und der infB Produkte übernahm das Labor von Friederike Hilbert, Institut für Fleischhygiene, Veterinärmedizinische Universität Wien. Für die Aufreinigung wurde der Gel Extraction Kit der Firma peqLab verwendet. Die Sequenzierung wurde mit Hilfe des Big Dye Terminator v 3.1. Cycle Sequencing Kit und dem Applied Biosystems 310 ABI Prism Genetic Analyser bestimmt.

3.5.12. Bearbeitung der Sequenz und Suche nach dem nächsten Verwandten

Die Sequenzen wurden in Chromas LITE Version 2.01 (http://www.technelysium.com.au/chromas_lite.html) bearbeitet. Die Bearbeitung war nötig, falls die automatische Auswertung der Peaks, die jeweils einem Nukleotid entsprechen, nicht ideal war. In diesem Fall wurde durch visuelle Betrachtung der Peaks einem Nukleotid zugeordnet. Die Suche nach den nächsten Verwandten erfolgte mit Hilfe von EzTaxon server 2.1 (www.eztaxon.org) sowie mit FASTA EMBL-EBI (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/sss/fastafasta/>).

Die Gensequenz konnte mit Hilfe von Gene Runners 3.05 Hastings Software Inc. 1994 in die Proteinsequenz translatiert werden. Mit Hilfe von ClustalW

(<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) konnten Sequenz miteinander verglichen werden.

3. 6. Chemotaxonomische Untersuchungen

3.6.1. Analyse der Chinone und polaren Lipide

a) Die Extraktion der Chinone (Tindall, 1990; Altenburger *et al.*, 1996) fand unter möglichst vollständiger Stickstoffatmosphäre statt und Lichteinstrahlung wurde möglichst vermieden. Für die Analyse der Chinone wurden zunächst 100 mg lyophilisierte Biomasse in ein Fläschchen mit flachem Boden eingewogen. Nach Zugabe eines Magnetrührkerns, sowie 3 ml einer Mischung aus Hexan (Roth) und Methanol (Roth) (1:2; v/v) wurde das Fläschchen kurz mit Stickstoff begast und gut verschlossen. Anschließend wurde es auf dem Magnetrührer für 30 min gerührt. Danach wurde das Fläschchen ins Eisbad gestellt, bis eine Phasentrennung zu beobachten war. Durch Zufügen von 1 ml eiskaltem Hexan wurde ein Mischungsverhältnis Methanol: Hexan 1:1 erreicht. Anschließend wurde für 5 min bei 3000 upm zentrifugiert. Das Zelldebris war für die Analyse der polaren Lipide aufzubewahren.

Die obere Phase (Hexan) wurde mit einer Pasteurpipette abgehoben und in ein Glasröhrchen überführt. Zur weiteren Extraktion wurde 2 ml eiskaltes Hexan und 2 ml 0,3% NaCl in das Zentrifugenröhrchen hinzugefügt, sodass eine Mischung Hexan:Methanol:0,3% NaCl 1:1:1 entstand. Die Probe wurde erneut bei 3000 upm für 5 min zentrifugiert. Die obere Phase wurde mit der ersten Hexanphase vereinigt. Die Hexanphase wurde nun mit Stickstoff eingedampft. Die restliche Mischung (Methanol, NaCl) wurde zusammen mit dem Zelldebris für die Analyse der polaren Lipide verwendet.

Für die HPLC Analyse wurde 150 µl des Laufmittels (Methanol:Chlorbutan (Merck) 9:1) der HPLC zu der Probe hinzugefügt. Die Chinone wurden mit einem „High Performance Liquid Chromatography“ (HPLC) System analysiert, ausgestattet mit den folgenden Komponenten: JASCO LG-1580-02, JASCO PU-2080 PLUS Intelligent HPLC Pump, JASCO UV-2075 ÜLUS Intelligent UV/VIS Detector und einem CMA/260 Degaser, sowie einer Hypersil ODS RP 18 Säule (250 4,6 mm, 5 µm Partikel).

b) Für die Analyse der polaren Lipide (Tindall, 1990; Ventosa *et al.*, 1993 und Worliczek *et al.*, 2007) konnte mit der verbleibenden Methanolphase der Chinon-Analyse gearbeitet werden. Dafür wurde die Methanolphase mit dem Zellmaterial (die ebenfalls von der Analyse der Chinone vorhanden war) vereinigt, dann wurden 5,5 ml einer Mischung Chloroform (Roth):Methanol (2,5:5 v/v) hinzugefügt. Das nun entstandene Gemisch hatte ein Mischungsverhältnis Chloroform:Methanol:0,3% NaCl (1:2:0,8 v/v/v).

Wurde die vorangehende Analyse der Chinone ausgelassen, kam folgendes Schema zum Tragen. 100 mg Biomasse wurden eingewogen. Diese Biomasse wurde in 2 ml 0,3% NaCl suspendiert und dann wurde 5 ml Methanol und 2,5 ml Chloroform zugegeben.

Diese Mischung wurde nun mit Stickstoff begast und für 15 min auf 80°C erhitzt, wobei gelegentlich geschüttelt wurde. Die Mischung wurde anschließend auf Raumtemperatur abgekühlt und dabei gerührt. Kam es nach der Abkühlphase erneut zu einer Phasentrennung (was auf Reste von Hexan zurückzuführen war) wurde noch eine kleine Menge Methanol hinzugefügt um die Phasentrennung aufzuheben. Anschließend wurden durch Zentrifugation bei 3000 upm für 5-10 min die festen Zellbestandteile pelletiert. Der Überstand wurde in ein neues Röhrchen überführt, in dem sich schon 5 ml einer Mischung Chloroform:0,3% NaCl (1:1 v/v) befand. Dies wurde vermischt und anschließend für 5 min bei 3000 upm zentrifugiert. Anschließend wurde die untere Chloroformphase abgehoben und in ein Röhrchen überführt. Dabei wurde darauf geachtet, dass kein Material von der Grenzphase mitaufgesaugt wurde. Die abgehobene Chloroformphase wurde in einem Stickstoffstrom bis zur Trocknen eingedampft werden. Die polaren Lipide wurden in 150 µl einer Mischung Chloroform:Methanol (2:1; v/v) gelöst.

Zur Analyse wurden 8 µl auf eine Dünnschichtplatte (10x10 cm, Merck, 1.05554) aufgetragen. Die Platte wurde nun in der ersten Dimension (Chloroform:Methanol:Wasser 65:25:4; v/v/v) entwickelt. Nach dem Trocknen der Platte wurde sie in der zweiten Dimension (Chloroform:Methanol:Essigsäure(Roth):Wasser 80:12:15:4; v/v/v/v) entwickelt. Nach dem Trocknen wurde die Platte mit den entsprechenden Sprühreagenzien besprüht und bei der geeigneten Temperatur entwickelt.

Für die Detektion aller Lipide wurde in Methanol gelöste Molybdätophosphorsäure (5 g in 100 ml, Merck) verwendet. Die Entwicklung erfolgte bei 120-160°C.

Aminogruppenhaltige Lipide wurden mit in Ethanol gelösten Ninhydrin (0,2 g Ninhydrin in 100 ml, Riedel-de Haen) bei 120°C sichtbar gemacht (rosafarbene Flecken).

Molybdenum Blue (Sigma) wurde zur Detektion von Phospholipiden herangezogen. Die Entwicklung erfolgte bei Raumtemperatur.

Zur Detektion von zuckerhaltigen Lipiden wurde in Ethanol gelöstes α -Naphthol verwendet (0,6 g α -Naphthol wurden in 4 ml Ethanol gelöst, anschließend wurden 3,75 ml davon entnommen und mit 10 ml Chloroform und 12 ml Methanol vermischt. Von dieser Mischung wurden 21 ml mit 13 ml konz. Schwefelsäure, 81 ml Ethanol und 8 ml H₂O gemischt). Die Entwicklung erfolgte bei 100°C, die entsprechenden Lipide erschienen rötlich-violett.

3.6.2. Analyse der Polyamine

Zur Analyse der Polyamine (Altenburger *et al.*, 1997; Busse und Auling, 1988) wurden ca. 40 mg der lyophilisierten Biomasse eingewogen. Dazu kamen 1 ml Perchlorsäure (0,2M) und 1 μ mol (Gram-negative Bakterien) bzw. 20 nmol (Gram-positive Bakterien) interner Standard (1,8 Diaminooctan, 20 μ mol/ml bzw. 0,4 μ mol/ml) pro 40 mg Biomasse. Die Zellsuspension wurde für 30 min bei 100°C inkubiert, wobei nach 15 min zu schütteln war. Anschließend wurde die Zellsuspension in ein Eppendorfreaktionsgefäß überführt und für 10 min bei 12000 upm zentrifugiert, um Zellreste zu pelletieren. Vom Überstand wurden 200 μ l in ein Pyrexröhrchen überführt, und mit 300 μ l Natriumcarbonat-Lösung (100 mg/ml, Roth) und 800 μ l Dansylchloridlösung (7,5 mg/ml Aceton) vermischt. Das Röhrchen wurde fest verschlossen und für 20 min bei 60°C inkubiert. Anschließend wurden 100 μ l Prolinlösung (50 mg/ml) hinzugefügt und für weitere 10 min bei 60°C inkubiert. Nach dem Abkühlen auf 4°C wurden die dansylierten Polyamine durch Zugabe von 100 μ l Toluol und kurzes, kräftiges Schütteln extrahiert. Die in der Toluolphase gelösten Polyamine wurden anschließend mittels HPLC (reversed phase Säule: 4,6 x 250 mm, RP18, Hypersil octyldecyl silan, Partikelgröße 5 μ m) analysiert. Als Eluent wurde ein Gradient Acetonitril/H₂O von 40/60-100/0 in 50 min, Flussrate 1 ml/min bei 40°C verwendet. Die Anregungswelle lag bei 360 nm und die Fluoreszenz der dansylierten Polyamine wurde bei 520 nm gemessen. Auf Grund der Retentionszeiten wurden die Polyamine identifiziert. Die jeweiligen Anteile der Polyamine wurde unter Miteinbeziehung der Korrekturfaktoren (Hydroxyputrescin: 2,8; Putrescin: 1,4;

Diaminopropan: 1,8; Cadaverin: 1,2; Spermidin: 1,0 und Spermin: 0,8) in $\mu\text{mol/g}$ Trockengewicht in Relation zur Konzentration des internen Standards berechnet.

3.6.3. Analyse von Mykolsäuren

Für die Analyse der Mykolsäure (Minnikin *et al.*, 1975 mit Modifikationen) wurden 50 mg lyophilisierte Biomasse eingewogen und mit 5 ml Methanol, 5 ml Toluol (AppliChem) und 200 μl 98% Schwefelsäure vermischt. Das Gemisch wurde geschüttelt und anschließend bei 50°C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden 2 ml Hexan hinzugefügt, es wurde erneut geschüttelt und danach wurde die Hexanphase mit den darin enthaltenen Mykolsäuren abgehoben und in ein anderes Röhrchen transferiert. Die Hexanphase wurde mit Stickstoff bis zur Trockenen eingedampft. Für die Analyse wurde 1 ml Hexan hinzugefügt und davon wurden 200 μl auf eine DC-Kieselgelplatte (kleine Platte: HPTLC-Fertigplatten RP-19 F254 S 10x10 cm von Merk oder große Platte: DC-Fertigplatten Kieselgel 60 F-254 20x10 cm) aufgetragen.

Das Laufmittel setzte sich aus Chloroform:Methanol:Wasser 65:25:4 (v/v/v) zusammen. Der Lauf wurde abgebrochen sobald die Laufmittelfront ca. $\frac{3}{4}$ der Platte erreicht wurde. Die Mykolsäuren wurden durch Besprühen mit Molybdätophosphorsäure bei 120°C detektiert.

3.7. Analysen am Institut für angewandte Mikrobiologie Justus-Liebig-Universität Giessen

Die Analyse der Fettsäuren (Kämpfer & Kroppenstedt, 1996), DNA:DNA Hybridisierung (Ziemke *et al.*, 1998) sowie zusätzliche physiologische Analysen (Kämpfer *et al.*, 1991) für die Beschreibung der neuen Art *Corynebacterium epidermidicanis* wurden im Labor von Prof. Peter Kämpfer durchgeführt.

4. Ergebnisse und Diskussion

4.1. 16S rRNA und Sequenzierung

Nach der Amplifizierung des 16S rRNA kodierenden Gens wurde eine Sequenzierung von Frau Hilbert Friederikes Labor (Veterinärmedizinische Universität Wien, Institut für Fleischhygiene) durchgeführt. Anschließend wurden Sequenzvergleiche durchgeführt.

4.2. Isolat 256-I

Das Isolat 256-I wuchs bei 28°C auf PYE-Agar und -Bouillon. Die partielle Sequenzierung des 16S rRNA kodierenden Gens ergab ein Fragment mit 503 Nukleotiden. Mit 100% Sequenzähnlichkeit zeigte das Isolat die nächste Verwandtschaft zu *Pseudomonas putida* (DSM 291^T). Bei der Analyse des Chinonsystems zeigte das Isolat 256-I die Hauptkomponenten Ubichinon Q-9 (99,5%), sowie geringe Anteile von Q-8 (0,5%). Dieses Ergebnis steht in guter Übereinstimmung mit Literaturdaten (Oyaizu und Komagata, 1983). Diese Autoren zeigten, dass alle Arten des Genus *Pseudomonas*, die auch heute noch in diesem Genus klassifiziert sind, durch die Hauptkomponenten Q-9 charakterisiert sind. Das Profil der polaren Lipide des Isolats 256-I war aus den Hauptkomponenten Diphosphatidylglycerol, Phosphatidylglycerol, Phosphatidylethanolamin sowie geringen Anteilen eines unidentifizierten Phospholipids (PL1), zwei unidentifizierten Aminolipide (AL2, AL3), einem unidentifizierten Aminophospholipid (APL1), einem Lipid, das mit keinem der verwendeten spezifischen Sprühreagentien reagierte (L2) sowie zwei gelbe Pigmentflecken zusammengesetzt (Abb. 1a). Insgesamt stand dieses Lipidprofil in guter Übereinstimmung mit denjenigen der zwei Referenzstämmen *P. putida* DSM 50202^T (Abb. 1b) und *P. putida* DSM 50222 (Abb. 1c). Allerdings konnte das Isolat 256-I auf Grund des Vorkommens des Lipids L2 und der zwei gelben Pigmentflecken von den zwei Referenzstämmen unterschieden werden. Außerdem fehlte dem Isolat 256-I das unidentifizierte Aminolipid AL1 sowie das Lipid L1, die in *P. putida* DSM 50202^T detektiert wurden und das Lipid L3 das im Profil von *P. putida* DSM 50222 vorhanden war. Auch wenn sich Isolat 256-I auf Grund des Lipidprofils eindeutig von den zwei Referenzstämmen unterschied, so waren diese Unterschiede insgesamt geringer als zu anderen Arten des Genus *Pseudomonas*, wie *Pseudomonas knackmussii* (Stolz *et al.*, 2007), *Pseudomonas psychrotolerans* oder *Pseudomonas oleovorans* (Hauser *et al.*, 2004). Daher bestätigen diese Ergebnisse die engere Verwandtschaft des Isolats 256-I

zu *P. putida*, wie durch die hohe 16S rRNA Gensequenzähnlichkeit zum Typstamm von *P. putida* schon angedeutet war.

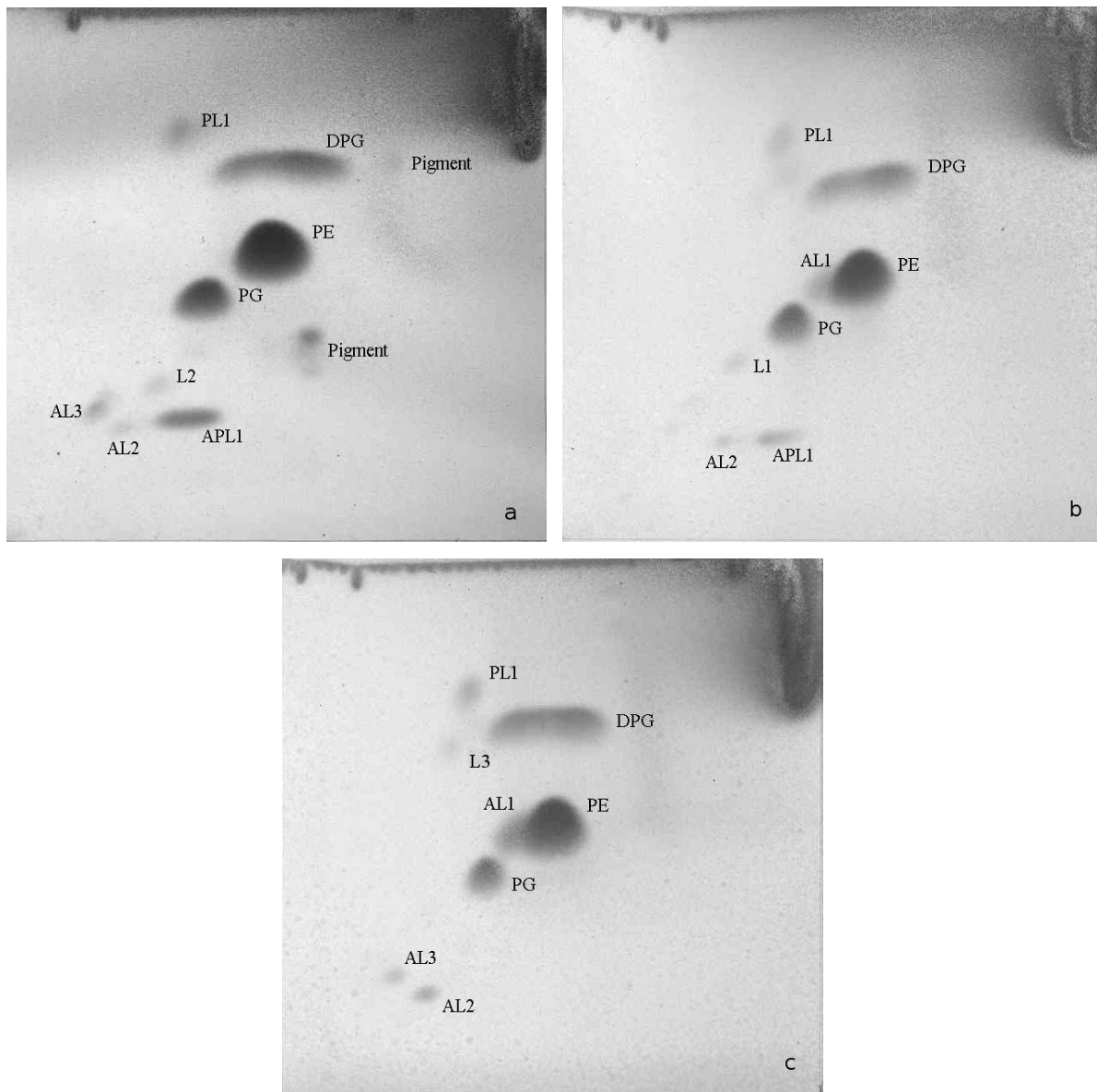


Abbildung 1. Profile der polaren Lipid. (a). Isolat 256-I, (b). *P. putida* DSM 50202^T, (c). *P. putida* DSM 50222. Abkürzungen: DPG Diphosphatidylglycerol, PE Phosphatidylethanolamin, PG Phosphatidylglycerol, AL1-3 unbekanntes Aminolipid, APL1 unbekanntes Aminophospholipid, L1-3 unbekanntes Lipid, PL1 unbekanntes Phospholipid.

Der Vergleich der genomischen Fingerabdrücke nach ERIC-, BOX- und REP-PCR zeigte zu *P. putida* DSM 50222 sehr geringe (in der ERIC PCR eine Bande bei 1200Bp)

und zu *P. putida* DSM 50202^T überhaupt keine Ähnlichkeiten (Abb. 2a-c). Daher konnte mittels dieses Ansatzes die Spezieszugehörigkeit nicht abgesichert werden.

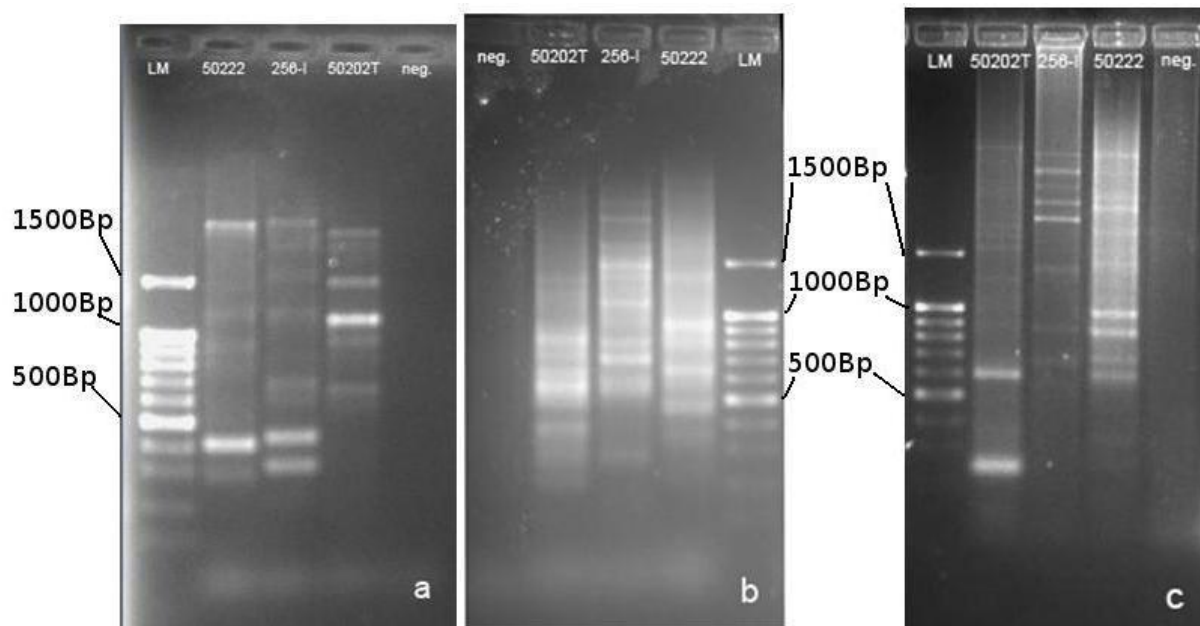


Abbildung 2. Genomische Fingerabdrücke nach ERIC-(a), BOX- (b), und REP-PCR (c) des Isolats 256-I und der Referenzstämmen *P. putida* DSM 50202^T und *P. putida* DSM 50222. Abkürzungen: LM Längenmarker, neg. negativ-Kontrolle.

Allerdings weisen sowohl die Unterschiede im Lipidmuster als auch in den genomischen Fingerprints darauf hin, dass es sich bei dem Isolats 256-I um eine bisher unbeschriebene, mit *P. putida* verwandte Art handelt. Eine zuverlässige Zuordnung zur Spezies *P. putida* kann in diesem Fall nur über eine DNA:DNA Hybridisierung erfolgen.

4.3. Isolat 256-II, 408, 1000 und 2224

Die Isolate 256-II, 408, 1000 und 2224 wurden in diese Arbeit miteinbezogen, da sie gleich visuell auf Grund ihres rhizoiden Koloniewachstum der *Bacillus cereus* Gruppe zugeordnet werden konnten. Zu dieser Gruppe gehören *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus weihenstepanensis*, *Bacillus anthracis* und *Bacillus mycoides*. *B. cereus* ist bekannt als Lebensmittelverderber. Diese Eigenschaft wird dadurch vermittelt, dass dieser Keim zwei verschiedene Toxine bilden kann. Zum einen produziert er ein hitzelabiles Enterotoxin, das beim Menschen zur Diarrhöe führt, sowie das hitzestabile emetische Toxin Cereulid, das Erbrechen hervorruft (Ehling-Schulz *et al.*, 2004). Daher wurden Isolate, die durch rhizoides Koloniewachstum gekennzeichnet

waren, auf ihre Fähigkeit Cereulid zu produzieren untersucht. Vorerst wurde aber ihre Verwandtschaft zu *B. cereus* über die 16S rRNA Gensequenzanalysen und Vergleiche der genomischen Fingerabdrücke untersucht. In diese Untersuchungen wurden teilweise auch einige *B. cereus* Stämme (4810, 5881 und NS 58) mit einbezogen, die Cereulid positiv sind. Diese Stämme wurden von Mirja Salkinoja-Salonen (Universität Helsinki) zur Verfügung gestellt.

Die 16S rRNA Gensequenz des Isolates 408 zeigte in 690 Basen eine 100%ige Übereinstimmung mit *B. cereus* ATCC 14579^T. Das Isolat 256-II wies ein 98,9%ige Ähnlichkeit mit *B. thuringiensis* ATCC 10792^T in 423 Basen auf. Das Isolat 1000 hatte in 420 Basen eine Übereinstimmung mit *B. cereus* ATCC 14579^T (99,5%) und das Isolat 2224 zeigte in 602 Basen eine Ähnlichkeit mit *B. thuringiensis* ATCC 10792^T (99,6%).

Bei der Testung auf die Fähigkeit Cereulid zu produzieren sollte ein Fragment des korrespondierenden Gens mittels PCR nachgewiesen werden, wie von Ehling-Schulz *et al.* (2005) beschrieben. Allerdings konnte bei keinem der Isolate dieses Gen nachgewiesen werden. Die Positiv-Kontrolle (*B. cereus* NS 58) zeigte bei ca. 1400Bp ein PCR Produkt der erwarteten Größe (Abb. 3).

In dem BOX-Fingerabdruck (Abb. 4) zeigten alle *B. cereus* Stämme eine Bande bei ca. 1100Bp, aber von allen getesteten Stämmen zeigten nur die Isolate 408 und 2224 eine weitere Ähnlichkeit zum Typstamm von *B. cereus*, nämlich eine Bande bei >1500Bp (geschätzte 2300Bp). Zusätzlich war beim Isolat 408 auch noch eine Bande von ca. 900Bp sichtbar, die auch beim Typstamm von *B. cereus* sichtbar war. Bei den anderen Isolaten gab es nur wenige Ähnlichkeiten. Ebenso gab es bei der ERIC-PCR nur wenig Ähnlichkeit zwischen dem Typstamm und den Isolaten (Abb. 5).

Es gab zwar einige Übereinstimmungen, allerdings waren diese nicht ausreichend spezifisch, um auf Speziesidentität schließen zu können.

Da die Isolate alle eine hohe (>98,5%) 16S rRNA Gensequenzähnlichkeit zur Vertretern der *B. cereus* Gruppe zeigten aber eine Speziesidentität nicht nachgewiesen werden konnte wurden Vergleiche der 16S-23S rRNA intergenischen Sequenzen (ITS) durchgeführt.

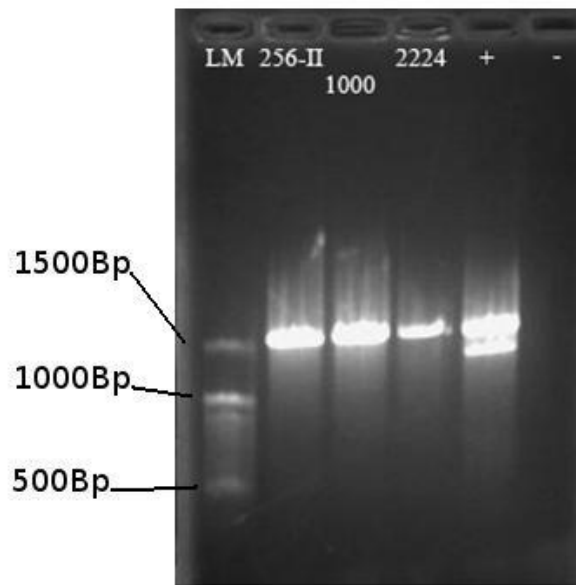


Abbildung 3. Cereulid-PCR. *Bacillus*-Isolate 256-II, 1000 und 2224, sowie die Positivkontrolle *B. cereus* NS58 und negativer Kontrolle ohne genomische DNA in der PCR. Abkürzungen: LM Längenmarker, neg Negativ-Kontrolle.

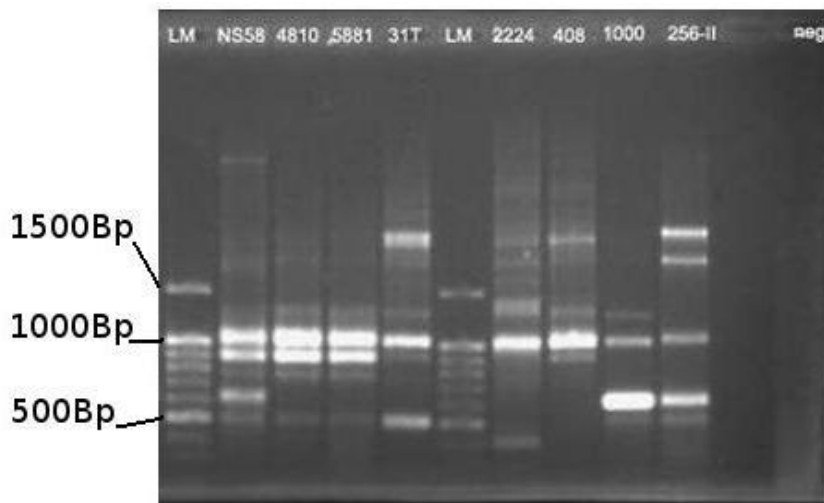


Abbildung 4. Genomische Fingerdrücke nach BOX-PCR. *Bacillus*-Isolate 256-II, 408, 1000 und 2224, *B. cereus* DSM 31^T und die Cereulid-positiven Stämme *B. cereus* NS58, 4810 und 5881. Abkürzungen: LM Längenmarker, neg. Negativ-Kontrolle.

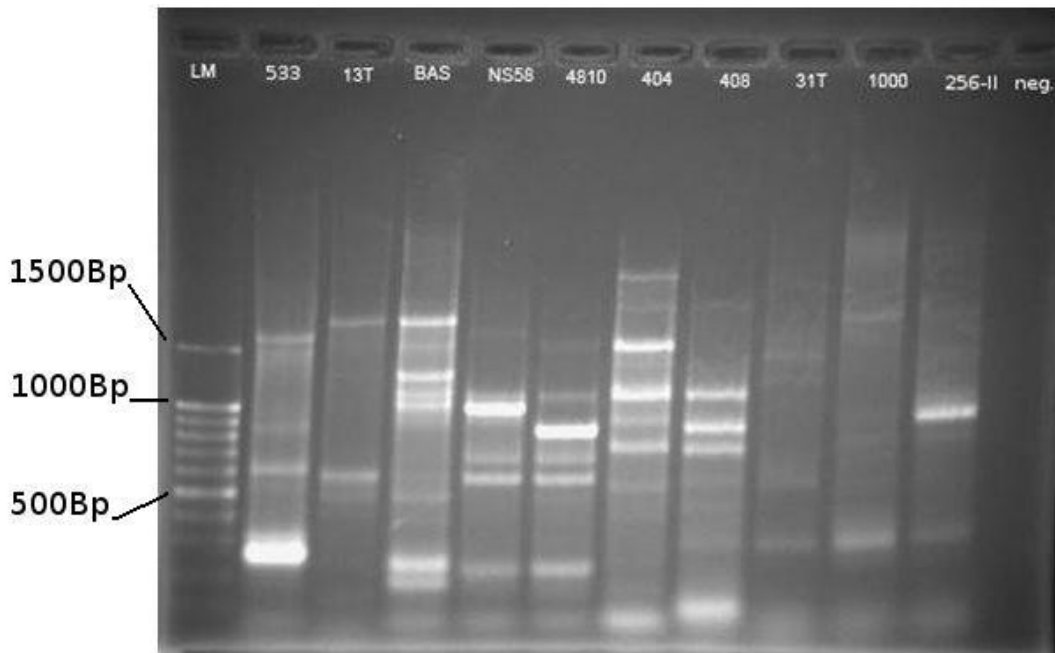


Abbildung 5. Genomische Fingerabdrücke nach ERIC-PCR mit den *Bacillus*-Isolaten 404, 408, 1000 und 256-II, *B. cereus* DSM 31^T, den Cereulid-positiven Stämmen NS 58, 4810, und den *B. licheniformis* Stämmen 533, BAS und 13^T. Das Isolat 404 wurde zu Beginn der Arbeit fälschlicherweise für *B. cereus* gehalten. Abkürzungen: LM Längenmarker, neg. negativ-Kontrolle.

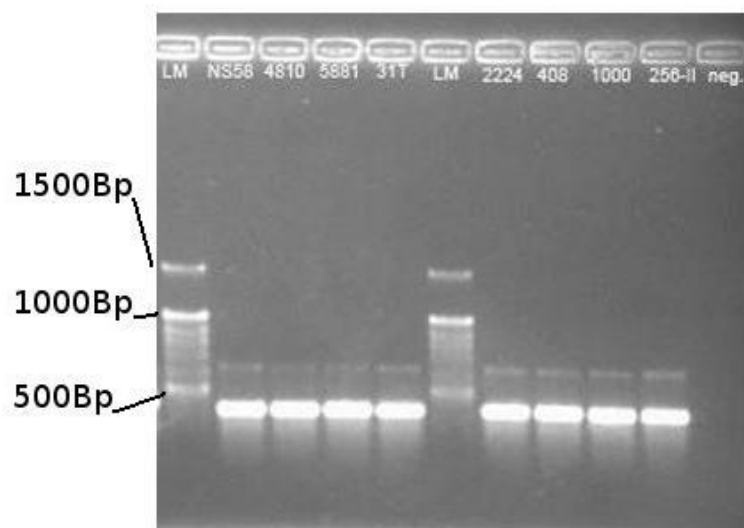


Abbildung 6. Ergebnisse der Amplifizierung der ITS der den Isolaten 2224, 408, 1000, 256-II, *B. cereus* DSM 31^T, sowie der *B. cereus* Stämme NS58, 4810 und 5881. Abkürzungen: LM Längenmarker, neg. Negativ-Kontrolle.

Die ITS zeigt eine hohe Größen-Variabilität (178-2488nt: Ramirez *et al.*, 2008). Es wird zwischen zwei Klassen unterschieden, den kurzen ITS und den langen ITS. Letztere könne tRNA-kodierende Gene enthalten und zeigen meist eine größere Sequenzvariabilität (Cherif *et al.*, 2003).

Der verwendete ‚forward‘-Primer bindet 164Bp vor dem 3‘ Ende des 16S rRNA Gens und der ‚reverse‘-Primer bindet 71Bp vor 5‘Ende des 23S rRNA Gens. Um Sequenzunterschiede aufzuzeigen wurden die PCR Produkte mit den Restriktionsenzymen HindIII, EcoRI und HhaI verdaut. Diese Restriktionsenzyme wurden schon von Henderson *et al.* (1994) verwendet, um Unterschiede zwischen *B. cereus* und *B. anthracis* aufzuzeigen.

Die Amplifizierung der ITS erbrachte für alle Isolate zwei PCR-Produkte. Eine Bande hatte die Größe von ca. 680Bp und die zweite Bande von ca. 420Bp (Abb. 6). Unter Berücksichtigung der Primer-Bindestellen ergibt sich daher für die zwei ITS die Größe von ca. 450 bzw. 190Bp.

Bei dem anschließenden Verdau konnte aber für keines der Enzyme eine Restriktion gefunden werden. Allerdings war die größere Bande nun nicht mehr sichtbar. Das könnte darauf hinweisen, dass diese Bande in kleine Restriktionsfragmente verdaut wurde, die dann nicht mehr sichtbar waren. Unterschiede zwischen *B. cereus*, *B. licheniformis* und *B. thuringiensis* konnten nicht festgestellt werden. Nach dem Verdau hatten die Banden aller Isolate und die Referenzen die gleiche Größe. Es war lediglich zu erkennen, dass der Verdau scheinbar funktioniert hatte, da die sichtbare Bande nun kleiner war (Abb. 7).

Eine weitere Möglichkeit, um auf Unterschiede zwischen den Isolaten aufzuzeigen, wäre die ITS-Sequenzierung gewesen. Auch hierzu gibt es eine Arbeit von Nübel *et al.* (2004) sowie Cherif *et al.* (2003). Es wurde gezeigt, dass es ‚Ein-Nukleotid Polymorphismen‘ (SNP single nucleotide polymorphism) auftreten. In der Studie wurde gezeigt, dass die Position 121 (A) sowie 213-214 (TT) in der großen ITS spezifisch ist für *B. anthracis*, während Position 75 kreuz-reagiert mit *B. cereus*.

Bei den RAPD-Analysen wurde neben den Isolaten 256-II, 408, 1000 und *B. cereus* (NS 58, 4810, 5881, 31^T) auch Stämme von *B. pumilus* DSM 27^T und *B. licheniformis* (BAS, 533, HULTA und DSM 13^T). Auch ist zu bemerken, dass bei diesen Analysen auch das

Isolat 404 untersucht wurde, da zu Beginn der Arbeit vermutet wurde, dass es sich um einen Stamm von *B. cereus* handelt.



Abbildung 7. ITS verdaut mit Hha1 der Referenzstämmen (Typstamm *B. cereus* 31^T, NS58, 4810, 5881) sowie der Proben 256-II, 408, 1000 und 2224. Abkürzungen: LM. Längenmarker, undig. unverdaute ITS als Kontrolle.

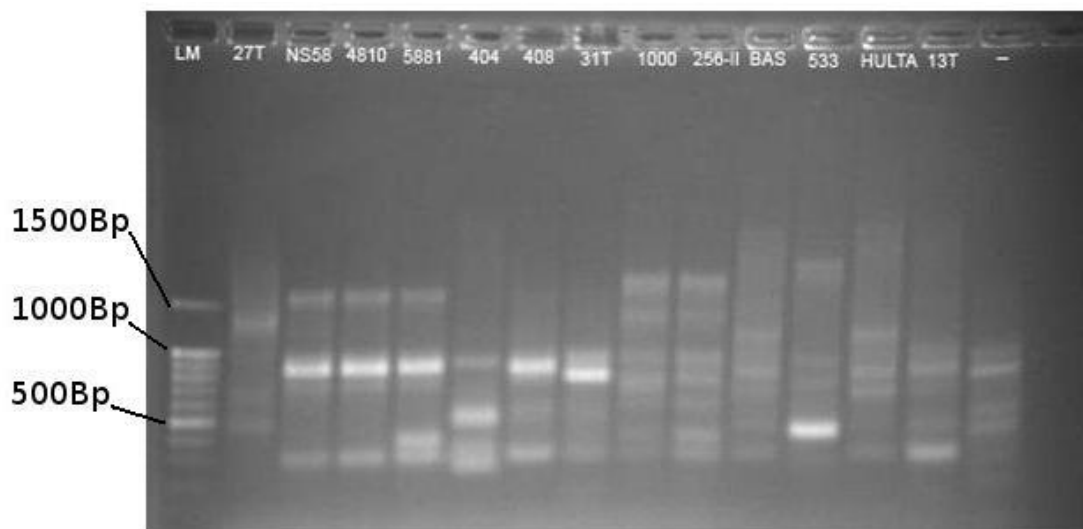


Abbildung 8. Genomische Fingerabdrücke nach RAPD-PCR mit den Stämmen *B. pumilus* DSM 27^T, *B. cereus* NS 58, 4810, 5881, DSM 31^T sowie *B. licheniformis* BAS, 533, HULTA und DSM 13^T) sowie der Isolate 256-II, 408 und 1000 unter Einsatz von Primer 18. Das Isolat 404 wurde zu Beginn der Arbeit fälschlicherweise für *B. cereus* gehalten. Abkürzungen: LM. Längenmarker, neg. Negativ-Kontrolle.

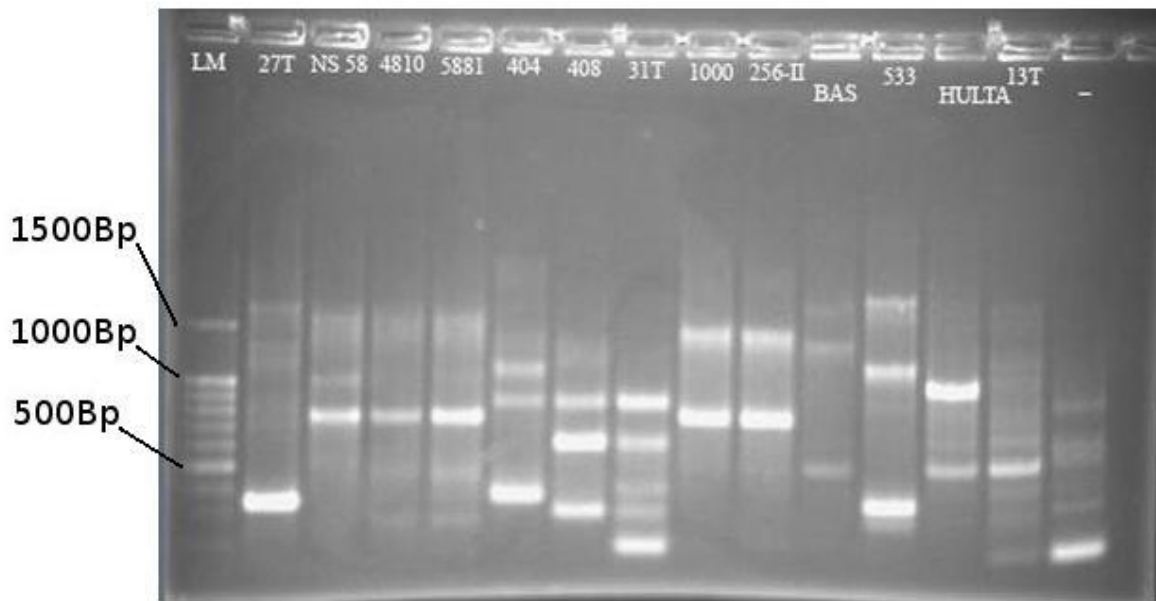


Abbildung 9. RAPD mit Primer 23 der Referenzstämmen (*B. pumilus* DSM 27^T, *B. cereus* NS 58, 4810, 5881, DSM 31^T, *B. licheniformis* BAS, 533, HULTA und DSM 13^T) sowie der Isolate 256-II, 408, 1000 und 2224. Das Isolat 404 wurde zu Beginn der Arbeit fälschlicherweise für *B. cereus* gehalten. Abkürzungen: LM. Längenmarker, neg. Negativ-Kontrolle.

Aufgrund der RAPD Analyse mit dem Primer 18 (Abb. 8), wurde durch die identischen Bandenmuster angedeutet, dass es sich bei den *B. cereus* Stämmen NS 58 und 4810 um klonale Verwandte handeln könnte und der Stamm *B. cereus* 5881 zeigte einen sehr ähnlichen Fingerabdruck, es gab aber eine zusätzliche Bande (bei ca. 400Bp). Die Fingerabdrücke der Isolate 1000 und 256-II sahen nahezu ident aus.

Bei der RAPD Analyse mit dem Primer 23 (Abb. 9) widerlegte aber eine klonale Verwandtschaft zwischen den Isolaten NS 58 und 4810, da im Stamm NS 58 eine zusätzliche Bande sichtbar war. Allerdings gab es auch hier eine große Ähnlichkeit zwischen den *B. cereus* Stämmen NS 58, 4810 und 5881. Identische Fingerabdrücke wurden für die Isolate 1000 und 256-II gefunden.

Auf Grund der hier durchgeführten Analysen, können die Isolat 256-II, 408, 1000 und 2224 nicht mit Sicherheit einer der Art aus der *B. cereus*-Gruppe zugeordnet werden nicht zuletzt deshalb, weil nur *B. cereus* als Referenzstamm zur Verfügung stand. Allerdings zeigten die genomischen Fingerabdrücke nach BOX-PCR auffällige

Ähnlichkeiten zwischen den Isolaten und dem Typstamm von *B. cereus*. Es wäre denkbar, dass auch zu diesen Arten Ähnlichkeiten zu beobachten wären. Bei allen anderen genomischen Fingerabdrücken konnten keine oder nur sehr wenig Ähnlichkeiten gefunden werden. Kim *et al.* (2001) konnte ebenfalls mittels BOX-PCR eindeutige Unterschiede zwischen den Arten der *B. cereus*-Gruppe finden.

Es wäre sehr interessant, eine Möglichkeit zu finden um diese Arten eindeutig zu unterscheiden, da vor allem *B. cereus* und *B. anthracis* auch humanpathogene Eigenschaften besitzen, da ihre Krankheitsbilder aber sehr unterschiedlich sind, wäre eine Unterscheidungsmöglichkeit wichtig für eine frühzeitige geeignete Therapie. Somit scheint die BOX-PCR hier eine Möglichkeit zu sein.

In der Geschichte gab es allerdings auch Arbeiten, die den Status, als separate Arten in Frage stellen (Somerville und Jones 1972, Ash *et al.*, 1991, Helgason *et al.*, 2000).

4.4. Isolat 410

Das Isolat wuchs bei 28°C auf PYE-Agar und -Bouillon. Es handelte sich um kleine runde weiße Kolonien, die sich bei der Gram-Färbung Gram-positiv verhielten. Die Sequenzierung des 16S rRNA kodierenden Gens ergab ein Fragment mit 1425 Nukleotide. Auf Grund des Sequenzvergleiches ließ sich darauf schließen, dass es sich um eine neue Art des Genus *Corynebacterium* handelt. Die Sequenzähnlichkeitswerte identifizierten als nächste Verwandten *Corynebacterium diphtheriae* DSM 44123^T (96,8%), *Corynebacterium ulcerans* DSM 46325^T (96,8%) und *Corynebacterium pseudotuberculosis* DSM 20689^T (96,8%).

Die vollständige Charakterisierung und Beschreibung des Isolats als neue Art des Genus *Corynebacterium*, *Corynebacterium epidermidicanis* findet sich am Ende dieser Arbeit in Form eines Manuskripts, das bei 'International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology' eingereicht werden wird.

4.5. Isolat 793

Das Isolat wuchs bei 28°C auf PYE-Agar und -Bouillon. Die Sequenzierung des partiellen 16S rRNA kodierenden Gens ergab ein Fragment von 718 Nukleotiden. Der nächste Verwandte war mit 98,0% Sequenzähnlichkeit *Comamonas terrigena* IAM 12052^T. Weitere Verwandten waren mit 97,7% Sequenzähnlichkeit *Comamonas composti* und *Comamonas odontotermitis* mit 97,4% Sequenzähnlichkeit. Bei der Analyse des Chinonsystems zeigte das Isolat 793 als Hauptkomponente Ubichinone Q-8 (99,6%) und geringe Anteile von Q-9 (0,4%). Dieses Ergebnis steht in guter Übereinstimmung mit Literaturdaten (Etchebehere *et al.*, 2001, Tamaoka *et al.*, 1987). Diese Autoren konnte zeigen, dass alle Stämme des Genus *Comamonas* Q-8 als Hauptkomponente (>90%) haben. Das Profil der polaren Lipide des Isolats 793 (Abb. 10a) war aus den Hauptkomponenten Diphosphatidylglycerol, Phosphatidylglycerol, Phosphatidylethanolamin sowie Anteile eines unidentifizierten Aminophospholipid (APL1) und zwei Lipiden (L4, L5), die mit keinem der verwendeten spezifischen Sprühreagentien reagierten, zusammengesetzt. Das Lipidprofil des Referenzstammes *C. terrigena* CCM 2409^T (Abb. 10b) zeigte einige Übereinstimmungen, wie das Vorkommen von Diphosphatidylglycerol, Phosphatidylglycerol, Phosphatidylethanolamin, sowie einem unbekanntem Aminophospholipid (APL1). Allerdings zeigte der Stamm *C. terrigena* CCM 2409^T einige differenzierende Charakteristika wie die unbekanntem Lipide L1, L2 und L3. Außerdem zeigte der Referenzstamm ein unbekanntes Phospholipid (PL1), wobei dieses Phospholipid auf Grund des chromatographischen Verhaltens ident sein könnte mit dem unbekanntem Lipid L4 des Isolats 793.

Nachdem es keine Literatur zum Genus *Comamonas* bezüglich polarer Lipide gibt, werden Informationen der polaren Lipide der nächst verwandten Genera *Achromobacter*, *Pusillimonas* und *Alcaligenes* miteinbezogen.

In Abbildung 11 (a-c) sind die Lipidprofile von *Achromobacter xylosoxidans* KM 543^T, *Alcaligenes faecalis* DSM 30030^T sowie von *Pusillimonas noertemannii* BN9^T dargestellt.

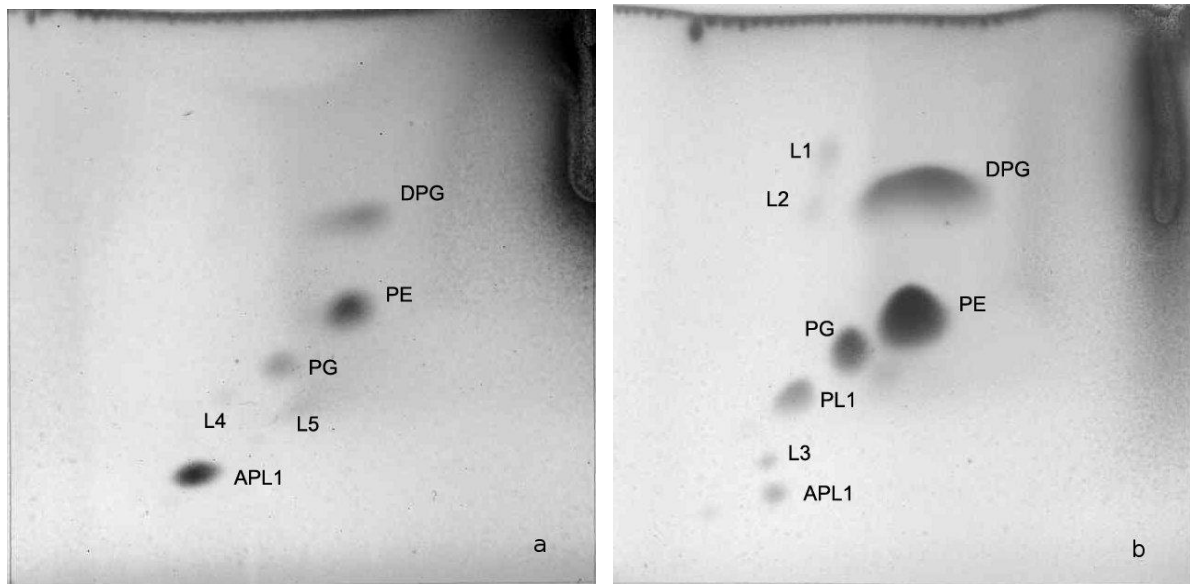


Abbildung 10. Profil der polaren Lipide. (a). Isolat 793. (b). *C. terrigena* CCM 2409^T.
Abkürzungen: DPG Diphosphatidylglycerol, PE Phosphatidylethanolamin, PG Phosphatidylglycerol, APL1 unbekanntes Aminophospholipid, L1-5 unbekanntes Lipid, PL1 unbekanntes Phospholipid.

Beim Vergleich dieser Arten mit dem Isolat 793, kann festgestellt werden, dass alle die Komponenten Diphosphatidylglycerol, Phosphatidylethanolamin und Phosphatidylglycerol aufweisen. Aufgrund des chromatographischen Verhaltens von APL1 aus den Extrakten des Isolats 793 und der Referenz *C. terrigena* CCM2409^T besteht der Verdacht, dass es sich dabei um das gleiche Aminophospholipid handelt, wie das für *Pusillimonas noertemannii* BN9^T, *Achromobacter xylosoxidans* KM 543^T und *Alcaligenes faecalis* DSM 30030^T beschriebene APL1. Um dies allerdings zu verifizieren müsste eine ‚Mixplatte‘ der Lipid-Extrakte gemacht werden. Bei einer ‚Mixplatte‘ werden zwei oder mehr Lipidextrakte auf dieselbe Platte aufgetragen, um das chromatographische Verhalten verschiedener Spots besser miteinander vergleichen zu können. Falls in diesem Fall in der Gegend wo APL1 erwartet wird nur ein Spot sichtbar wird, verhärtet sich der Verdacht, dass es sich um dasselbe Lipid handelt. Ebenso sollte mit Hilfe einer ‚Mixplatte‘ analysiert werden ob L4 oder L5 des Isolats 794 vielleicht mit L4 von *Pusillimonas noertemannii* BN9^T übereinstimmt.

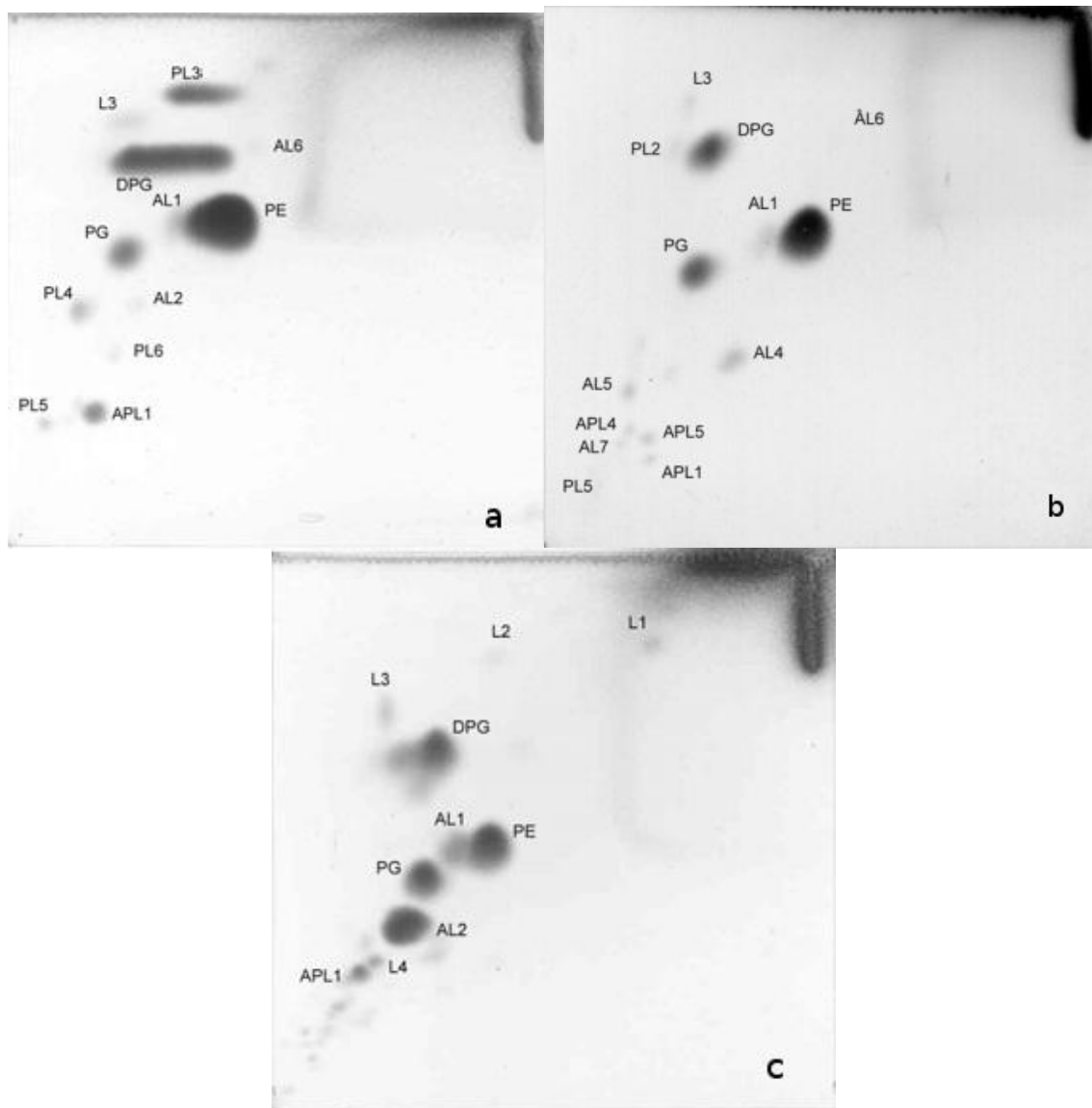


Abbildung 11. Profil der polaren Lipide. (a). *Achromobacter xylosoxidans* KM 543^T (Stolz *et al.*, 2005), (b). *Alcaligenes faecalis* DSM 30030^T (Stolz *et al.*, 2005) (c). *Pusillimonas noertemannii* BN9^T(Stolz *et al.*, 2005). Abkürzungen: DPG Diphosphatidylglycerol; PE Phosphatidylethanolamin; PG Phosphatidylglycerol; L1-4 unbekannte Lipide; AL1-2,4-7 unbekannte Aminolipide; APL1, 4, 5 unbekannte Aminophospholipide; PL2-6 unbekannte Phospholipide.

Abschließend ist zu bemerken, dass das Isolat 793 nur 98% 16S rRNA-Ähnlichkeit zu *C. terrigena* IAM 12052^T aufweist. Dieser Wert kann als Beweis für die Zugehörigkeit zu Genus *Comamonas* gewertet werden. Die Analyse der Chinone passt in das Bild des Genus. Im Lipidprofil besteht eine insgesamt große Ähnlichkeit zu *C. terrigena*; allerdings sind im Profil der Lipide zu dem Isolat 793 Unterschiede zu erkennen. Diese Unterschiede sind aber weniger signifikant als die, die zu Vertretern der Genera

Achromobacter, *Alcaligenes*, *Pusillimonas* bestehen. Daher sind die Lipiddaten als zusätzliches Indiz für die Zugehörigkeit des Isolates 793 zum Genus *Comamonas* zu werten. Die Unterschiede im Lipidprofil zu *C. terrigena* könnten darauf hindeuten, dass es sich beim Stamm 793 um den Vertreter einer neuen Art des Genus *Comamonas* handelt.

Um eine zuverlässige Klärung des Artstatus des Isolats 793 zu erhalten, müssten Fingerabdruck-PCR durchgeführt werden. Falls diese auch kleine Klärung bezüglich des Artstatus bringt, könnte anschließend nur eine DNA:DNA Hybridisierung mit *C. terrigena* eine sichere Zuordnung klären.

4.6. Isolat 886

Das Isolat wuchs bei 28°C auf PYE-Agar und -Bouillon. Die partielle Sequenzierung des 16S rRNA kodierenden Gens ergab ein Fragment von 624 Nukleotide. Mit 100% Sequenzähnlichkeit zeigte das Isolat die nächste Verwandtschaft zu *Acinetobacter johnsonii* DSM 6963^T. Weitere nah Verwandte waren *Acinetobacter haemolyticus* DSM 6962^T mit 99,8% Sequenzähnlichkeit und *Acinetobacter beijerinckii* 58a^T mit ebenfalls 99,8% Sequenzähnlichkeit. Bei der Analyse des Chinonsystems zeigte das Isolat 886 die Hauptkomponente Q-9 (78%) und signifikante Anteile von Q-8 (22%). Dieses Ergebnis steht in Übereinstimmung mit Literaturdaten (Song *et al.*, 2008). Hier wurde gezeigt, dass für die Arten des Genus *Acinetobacter* ein Chinonsystem mit Q-8 und Q-9 charakteristisch ist. Das Profil der polaren Lipide des Isolats 886 (Abb. 12a) zeigte die Hauptkomponenten Diphosphatidylglycerol, Phosphatidylglycerol, Phosphatidylethanolamin, sowie geringe Anteile von vier unbekannte Phospholipide (PL1, PL2, PL3, PL4), zwei unbekannte Aminophospholipide (APL1, APL2), ein unbekanntes Aminolipid (AL1) und zwei Lipide, die mit keinem der verwendeten spezifischen Sprühreagentien reagierten (L1, L2). Das Lipidprofil des Referenzstammes *A. johnsonii* DSM 6963^T (Abb. 12b) war nahezu ident, es fehlte lediglich das Phospholipid PL2, das Aminolipid AL1 und das unbekannte Lipide L2. Der Typstamm DSM 6963^T besaß hingegen das unbekannte Aminolipid AL2.

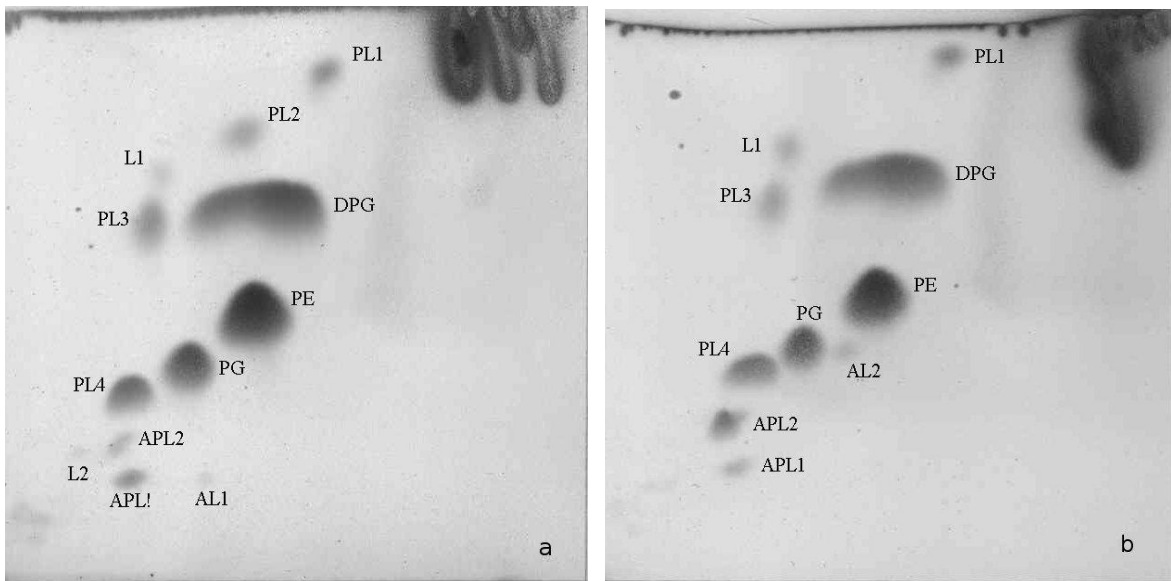


Abbildung 12. Profil der polaren Lipide. Isolat 886 (a). *Acinetobacter johnsonii* DSM 6963^T (b). Abkürzungen: DPG Diphosphatidylglycerol, PE Phosphatidylethanolamin, PG Phosphatidylglycerol, AL1-2 unbekanntes Aminolipid, APL 1-2 unbekanntes Aminophospholipid, PL 1-4 unbekanntes Phospholipid, L 1-2 unbekanntes Lipid.

Der Vergleich der genomischen Fingerabdrücke nach BOX- (Abb. 13a) und REP-PCR (Abb. 13b) zeigte nur geringe Ähnlichkeiten. Bei der BOX-PCR konnten ähnliche Banden bei ~1600Bp und ~1000Bp erkannt werden, wohingegen bei REP-PCR keine ähnlichen Banden zu erkennen waren. Daher konnte mittels dieses Ansatzes die Spezieszugehörigkeit nicht abgesichert werden.

Zusammenfassend ist zu bemerken, dass eine Identifizierung des Isolats auf Grund der Vorhandenen Daten schwierig ist, vor allem auf Grund des Fehlens weiterer Referenzen wie *A. beijerinckii* und *A. haemolyticus*. Da die Sequenzähnlichkeiten zu diesen beiden Stämmen sehr hoch ist. Auf Grund der Analysen der Lipide und Chinone kann darauf geschlossen werden, dass es sich vermutlich um eine Art des Genus *Acinetobacter* handelt. Allerdings sollte auch von den zwei oben genannten Arten *A. beijerinckii* und *A. haemolyticus* Fingerabdruck-Analysen durchgeführt werden und auch die polaren Lipide untersucht werden. Falls nach diesen Untersuchungen keine Artzugehörigkeit geklärt werden kann, sollte eine DNA:DNA Hybridisierung durchgeführt werden, um dies spezifisch klären zu können.

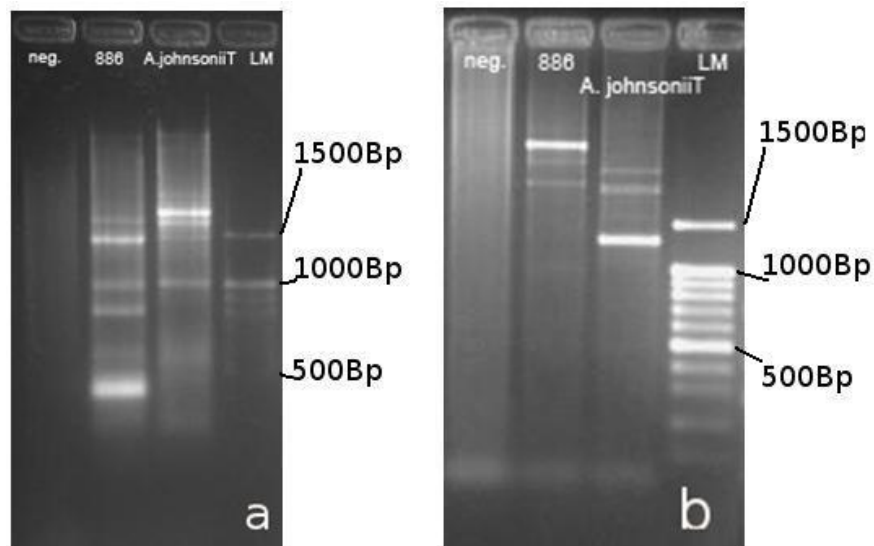


Abbildung 13. Genomische Fingerabdrücke nach BOX-(a) und REP-PCR (b) von dem Isolat 886 und dem Referenzstamm *A. johnsonii* DSM 6963^T. Abkürzungen: LM Längenmarker, neg. negativ-Kontrolle.

4.7. Isolat 1600

Das Isolat 1600 wuchs bei 28°C auf PYE-Agar und -Bouillon. Die partielle Sequenzierung des 16S rRNA kodierenden Gens ergab *Staphylococcus xylosus* ATCC 29971^T als nächsten Verwandten mit 99,8% Sequenzidentität in 638 Basen. Weitere nah Verwandte waren *Staphylococcus saprophyticus* ATCC 15305^T und *Staphylococcus succinus* AMG-D1^T. Dieses Ergebnis deutete eine Verwandtschaft auf Speziesebene an. Zur Bestätigung dieses Verdachts wurden die genomischen Fingerabdrücke dieses Isolates nach BOX-, REP- und ERIC-PCR (Abb. 14a-c) mit denen von *S. xylosus* KL 162^T, *S. succinus* AMG-D1^T und *S. saprophyticus* S-41^T verglichen.

BOX-PCR ergab bei allen untersuchten Stämmen nur wenige Produkte (3-5) und das Isolat 1600 zeigte eine mit *S. xylosus* KL 162^T übereinstimmende Bande bei ca. 900Bp (Abb. 14a). Die Bande im Fingerabdruck von *S. xylosus* KL 162^T mit der Größe >1500Bp, (geschätzte 1600Bp) fehlte bei dem Isolat 1600. Die Bande bei 900Bp im Fingerabdruck von *S. xylosus* KL 162^T war deutlicher ausgeprägt als beim Isolat 1600.

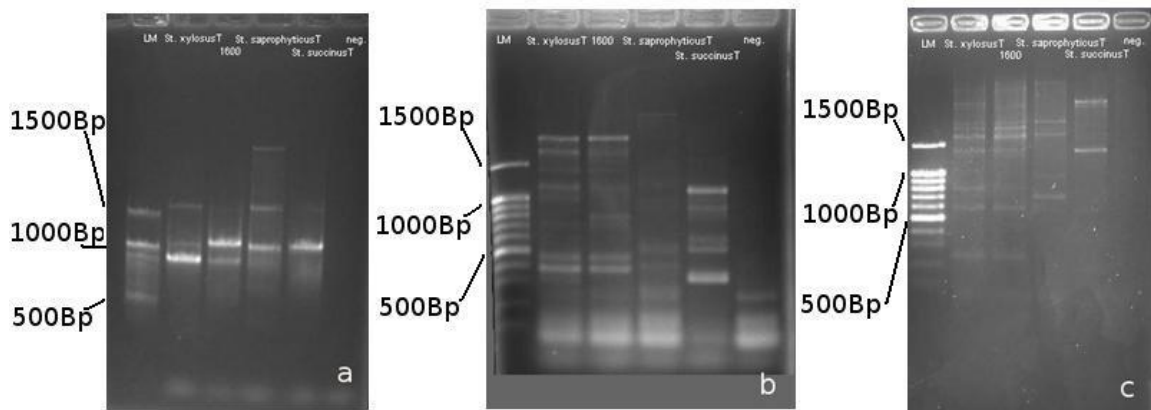


Abbildung 14. Genomische Fingerabdrücke nach BOX- (a) ERIC- (b) und REP-PCR (c) des Isolats 1600 und den Referenzen *S. xylosus* KL 162^T, *S. succinus* AMG-D1^T und *S. saprophyticus* S-41^T. Abkürzungen: LM Längenmarker, neg. negativ-Kontrolle.

Diese Ergebnisse zeigen, dass keine klonale Verwandtschaft zwischen *S. xylosus* KL 162^T und dem Isolat 1600 besteht. Bei dieser Fingerprint Methode konnte auch gezeigt werden, dass die Stämme *S. succinus* AMG-D1^T und *S. saprophyticus* S-41^T eine gemeinsame Bande (bei 1000Bp) hatten, wohingegen diese beiden Stämme bei der ERIC- und REP-PCR keine gemeinsamen Banden aufwiesen. Die ERIC-PCR generierten Fingerabdrücke von *S. xylosus* KL 162^T und dem Isolat 1600 wiesen eine hohe Ähnlichkeit miteinander auf (Abb. 14b) und in der REP-PCR konnte zwischen den beiden Stämmen kein eindeutiger Unterschied gefunden werden (Abb. 14c). In der ERIC-PCR waren besonders die zwei Banden über 1500Bp (geschätzte 1700 und 1900Bp) und die zwei Banden bei ca. 400 und 450Bp zu nennen. Ebenso war die Identifizierung auf Grund des REP-PCR-Bildes (Abb. 14c) eindeutig. Bei diesem Gel gab es auch einige Banden über 1500Bp die ident waren, außerdem waren die Banden bei 600Bp und 250Bp zu erwähnen. Aufgrund dieser Ergebnisse kann Isolat 1600 als Stamm von *S. xylosus* angesehen werden.

4.8. Isolat 1656

Das Isolat 1656 wuchs bei 28°C auf PYE-Agar und -Bouillon. Die partielle Sequenzierung des 16S rRNA kodierenden Gens ergab ein Fragment mit 640 Nukleotiden. Mit 100% Sequenzähnlichkeit zeigte das Isolat die nächste Verwandtschaft mit *Solibacillus silvestris* HR3-23^T.

Bei der Analyse des Chinonsystems zeigte das Isolat 1656 Menachinone MK-7 als Hauptkomponente (85%) sowie moderate Anteile MK-6 (15%). Dieses Ergebnis steht in guter Übereinkunft mit Literaturdaten (Alberts *et al.*, 2007; Rheims *et al.*, 1999). Diese Autoren zeigten, dass *Solibacillus silvestris* (ursprünglich als *Bacillus silvestris* klassifiziert) MK-7 als Hauptkomponente hat sowie geringe Anteile an MK-6 und MK-8 (84:4:1). Das Profil der polaren Lipide des Isolats 1656 war aus den Hauptkomponenten Diphosphatidylglycerol, Phosphatidylethanolamin, Phosphatidylglycerol, sowie geringen Anteilen eines unidentifizierten Aminolipids (AL1), eines unbekanntes Phospholipids (PL1) sowie zwei Lipiden (L1, L2) zusammengesetzt, die mit keinem der verwendeten Sprühreagentien reagierten (Abb. 15a). Dieses Ergebnis steht wiederum im Widerspruch mit den Literaturdaten zu *S. silvestris*. Das Profil der polaren Lipide von *S. silvestris* enthält Phosphatidylethanolamin, Phosphatidylglycerol, Diphosphatidylglycerol, Phosphatidylserin und ein unbekanntes Phospholipid (Rheims *et al.*, 1999). Phosphatidylserin konnte bei dem Isolat 1656 nicht festgestellt werden. Allerdings wurden bei *S. silvestris* nur geringe Anteile von Phosphatidylserin nachgewiesen und daher ist es denkbar, dass die Anteile dieses Lipids in Isolat 1656 unter der Detektionsgrenze lagen.

In der Arbeit von Albert *et al.* (2007) wurde die Art *Virdibacillus arvis* neu beschrieben, darin ist ebenfalls ein Vergleich zur Art *S. silvestris*. Interessant ist, dass das unbekanntes Phospholipid PL1 auch bei *V. arvis* DSM 16317^T vorkommt (ebenfalls PL1; Abb. 15b). Unter Umständen handelt es sich beim unbekanntes Aminolipid AL1 des Isolats 1656 um das unbekanntes Aminophospholipid APL1 von *V. arvi* DSM 16317^T, und die Detektion der Phosphatgruppe des Lipids war unter der Detektionsgrenze; auf Grund des chromatographischen Verhaltens dieser beiden Lipide könnte angenommen werden, dass es sich um dasselbe Lipid handelt. Ansonsten wurden in beiden Profilen die Hauptkomponenten Diphosphatidylglycerol, Phosphatidylglycerol und Phosphatidylethanolamin nachgewiesen.

Außerdem wurde festgestellt, dass das Bakterium nach Erhitzen auf 80°C und erneuten Ausstreichen und Inkubieren nicht erneut anwuchs. Somit konnten mittels dieses

Ansatzes keine Sporen nachgewiesen werden, obwohl diese Fähigkeit ein Merkmal von *S. silvestris* ist (Rheims *et al.*, 1999).

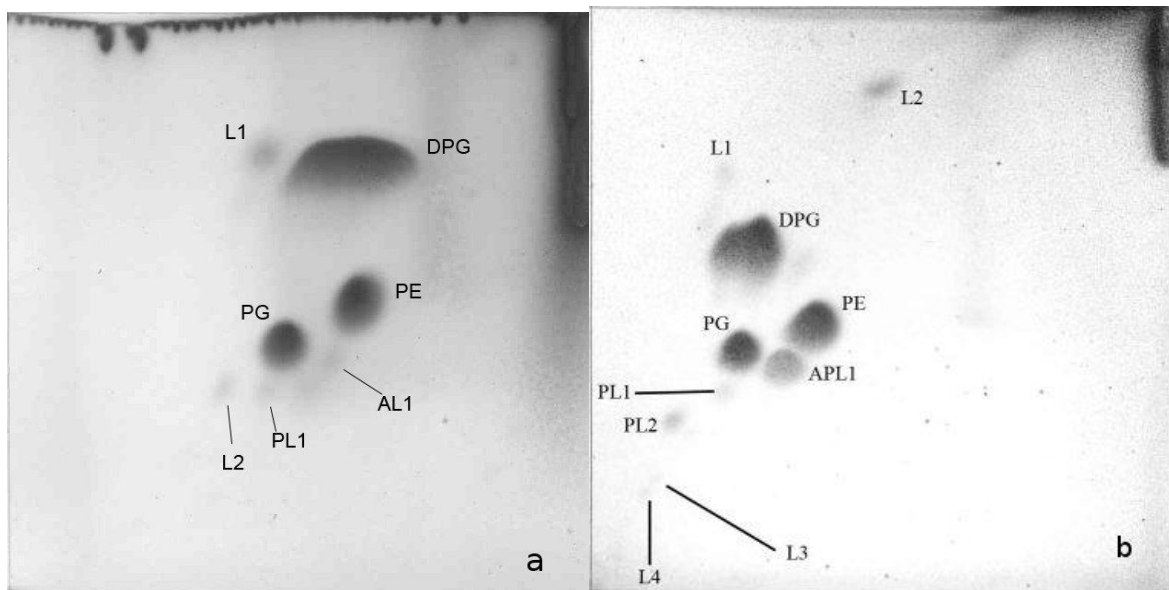


Abbildung 15. Profil der polaren Lipides des Isolats 1656 (a) und *V. arvi* DSM 16317^T (b; Albert *et al.*, 2007). Abkürzungen: DPG Diphosphatidylglycerol, PE Phosphatidylethanolamin, PG Phosphatidylglycerol, PL1-2 unbekanntes Phospholipid, AL1 unbekanntes Aminophospholipid, L1-4 unbekannte Lipide.

Das Ergebnis der Chinon-Analyse ist zwar in Übereinstimmung mit den Literaturdaten des Genus *Solibacillus*, allerdings ist dies noch kein zwingender Beweis für die Zugehörigkeit zu diesem Genus, da die meisten aeroben Endosporenbildner MK-7 als Hauptkomponenten zeigen. Auch mit Hilfe der Analyse der polaren Lipide, kann die Genuszugehörigkeit nicht eindeutig geklärt werden, da *S. silvestris* Phosphatidylserin aufweist, dieses konnte beim Isolat 1656 allerdings nicht nachgewiesen werden. Des Weiteren zeigt das Isolat 1656 keine Sporen, was jedoch ein Charakteristikum des Genus *Solibacillus* darstellt. Mit diesen Ergebnissen kann das Isolat 1656 nicht mit Sicherheit der Art *S. silvestris* zugeordnet werden. Dafür sollten zunächst Fingerprint-Methoden wie BOX-, ERIC- und REP-PCR mit dem Typstamm *S. silvestris* durchgeführt werden. Diese konnte im Rahmen der Arbeit aber nicht durchgeführt werden, da keine Referenz für *S. silvestris* zur Verfügung stand.

4.9. Isolat 2236

Das Isolat 2236 wuchs bei 28°C auf PYE-Agar und -Bouillon. Die partielle Sequenzierung des 16S rRNA kodierenden Genes ergab ein Fragment von 608 Nukleotiden. Mit 99,5% Sequenzähnlichkeit zeigte das Isolat die nächste Verwandtschaft mit *Kurthia gibsonii* NCIMB 9758^T und mit 96,5% Ähnlichkeit mit *K. zopfii* NBRC 101529^T. Bei der Analyse des Chinonsystems zeigte das Isolat 2236 die Hauptkomponenten Menachinone MK-7 (87%) sowie moderate Anteile von MK-6 (13%). Dieses Resultat steht in Einklang mit Literaturdaten (Alberts *et al.*, 2007, Shaw und Keddie, 1983). Diese Autoren zeigten, dass im Genus *Kurthia* ein Chinonsystem mit der Hauptkomponente MK-7 charakteristisch ist.

Das Profil der polaren Lipide des Isolats 2236 (Abb. 16a) war aus den Hauptkomponenten Diphosphatidylglycerol, Phosphatidylglycerol, Phosphatidylethanolamin, sowie geringer Anteile von dreier Aminophospholipiden (APL1-3) und einem Lipid (L1) das mit keinem der verwendeten Sprühreagentien reagierte. Dieses Profil ist somit ident mit dem Lipid-Profil des verwendeten Referenzstamms *K. gibsonii* DSM 20636^T (Abb. 16b).

Allerdings zeigten Goodfellow und Collins (1979), dass das Profil der polaren Lipide der Vertretern des Genus *Kurthia* nur Diphosphatidylglycerol, Phosphatidylglycerol und Phosphatidylethanolamin enthält. Allerdings war *K. gibsonii* zu diesem Zeitpunkt nicht beschrieben. In dieser Studie wurden nur die polaren Lipide der Art *K. zopfii* untersucht. In den darauf folgenden Untersuchungen (Alberts *et al.*, 2007; Shaw und Keddie 1983) sind keine Abbildungen der Lipide mehr vorhanden, auf Grund dessen die Lipide verglichen werden könnten.

Außerdem wurde festgestellt, dass das Isolat 2236 keine Endosporen bilden kann, was ebenfalls mit den Literaturdaten übereinstimmt (Alberts *et al.*, 2007; Shaw und Keddie 1983).

Der Vergleich der genomischen Fingerabdrücke nach ERIC-, BOX- und REP-PCR zeigte einige Gemeinsamkeiten zwischen dem Isolat 2236 und *K. gibsonii* DSM 20636^T (Abb. 17 a-c).

So zeigte sich im BOX-Fingerabdruck eine gemeinsame Bande bei ~1000Bp, im REP-PCR Fingerabdruck eine gemeinsame Bande bei ~1250Bp und im ERIC-Fingerabdruck zwei gemeinsame Banden, bei ~550Bp und ~1250Bp.

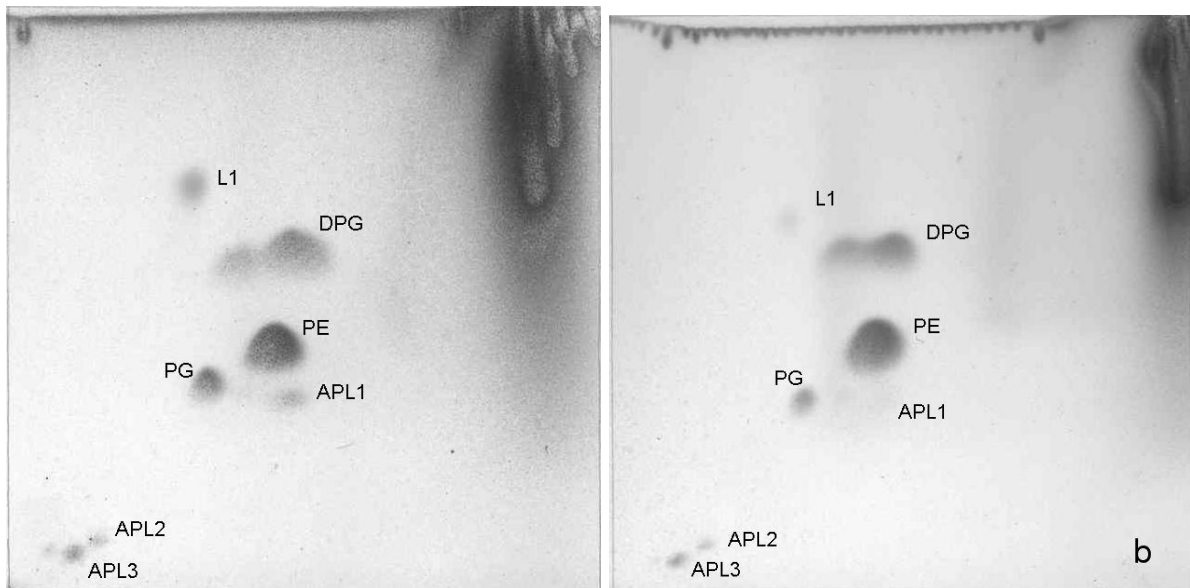


Abbildung 16. Das Profil der polaren Lipide des Isolats 2236 (a) und des Typstamms *K. gibsonii* DSM 20636 ^T(b). Abkürzungen: DPG Diphosphatidylglycerol, PE Phosphatidylethanolamin, PG Phosphatidylglycerol, APL1-3 unbekannte Aminophospholipide, L1 unbekanntes Lipid.

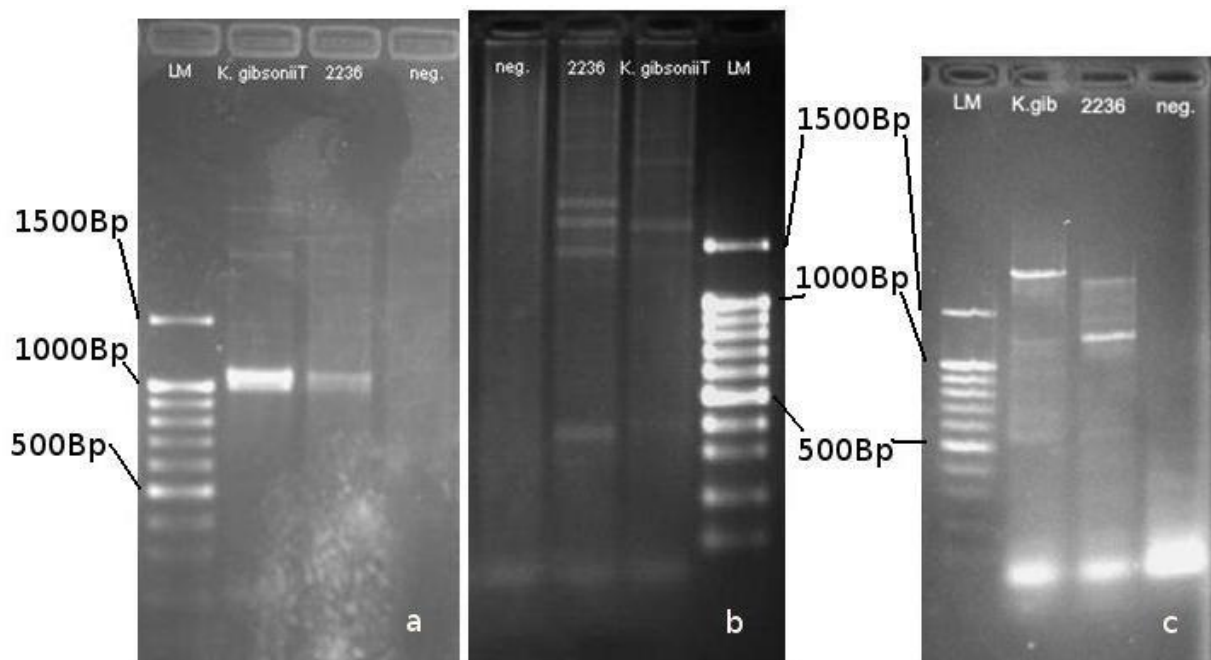


Abbildung 17. Genomischen Fingerabdrücke nach BOX- (a), REP- (b) und ERIC-PCR (c) vom Isolat 2246 und *K. gibsonii* DSM 20636 ^T. Abkürzungen: LM Längenmarker, neg. negativ-Kontrolle.

Auf Grund der gesammelten Daten, kann festgestellt werden, dass das Isolat 2236 zum Genus *Kurthia* gehört. Das Profil der polaren Lipide zwischen dem Isolat 2236 und dem verwendeten Stamm *K. gibsonii* DSM 20636^T ist ident. Ebenso stimmt das Chinonsystem überein. Die Gemeinsamkeiten bei den genomischen Fingerabdrücken BOX, REP und ERIC, lassen auch darauf schließen, dass das Isolat 2236 zum Genus *Kurthia* gehört.

4.10. Die Isolate 2289 und 2388

Die Isolate 2289 und 2388 wuchsen bei 28°C auf PYE-Agar und -Bouillon. Die partielle Sequenzierung des 16S rRNA kodierenden Gens ergab für das Isolat 2289 ein Fragment von 717 Nukleotiden und für Isolat 2388 ein Fragment mit 627 Nukleotiden. Mit 99,5% Sequenzähnlichkeit zeigte das Isolat 2289 die nächste Verwandtschaft mit *Myroides odoratimimus* CCUG 39352^T und *Myroides profundus* D25^T (98,7% Sequenzähnlichkeit), gefolgt von 93,2% Sequenzähnlichkeit zu *M. odoratus* ATCC 4651^T. Das Isolat 2388 zeigte mit 97,7% Sequenzähnlichkeit die nächste Verwandtschaft mit *M. odoratimimus* CCUG 39352^T, sowie *M. profundus* D25^T (ebenfalls 97,7% Sequenzähnlichkeit), mit *Myroides pelagicus* SM1^T gab es eine Sequenzähnlichkeit von 93,1% und 92,7% Sequenzähnlichkeit mit *M. odoratus* ATCC 4651^T. Bei der Analyse des Chinonsystems zeigten beide Isolat MK-6. Dieses Ergebnis steht in guter Übereinstimmung mit Literaturdaten (Vancanneyt *et al.*, 1996). Diese Autoren zeigten, dass die Arten des Genus *Myroides*, durch MK-6 charakterisiert sind. Das Profil der polaren Lipide des Isolats 2289 war aus den Hauptkomponenten Phosphatidylethanolamin, sowie drei unidentifizierten Aminophospholipide (APL1-3), einem unidentifizierten Aminolipid (AL1), einem unidentifizierten Glykolipid (GL1), einem unbekanntem Phospholipid (PL1), sowie sechs Lipiden (L1-6), die mit keinem der verwendeten Sprühreagentien reagierte, zusammengesetzt (Abb. 18a). Das Profil des Isolats 2388 war ident mit jenem des Isolats 2289 (nicht gezeigt).

Insgesamt waren die Lipidprofile der zwei Isolate sowie der zwei Referenzstämme sehr ähnlich. Charakteristisch für die Isolate waren die zwei Lipide APL1 und L6, die allerdings in nur sehr geringen Anteilen nachgewiesen werden konnten. Alle anderen Lipide wurden sowohl in den Isolaten als auch den Referenzstämmen nachgewiesen. Einzigartig für *M. odoratimimus* CCUG 39352^T war L8, das aber auch nur in sehr geringen Menge detektiert wurde, und für *M. odoratus* CCUG 7321^T die zwei Lipidkomponenten APL2 und AL2, ebenfalls nur in sehr geringen Konzentrationen.

Auffällig in den Lipidprofilen von *M. odoratimimus* CCUG 39352^T war die vergleichsweise geringe Konzentration von PE und von *M. odoratus* CCUG 7321^T die geringe Konzentration von L5.

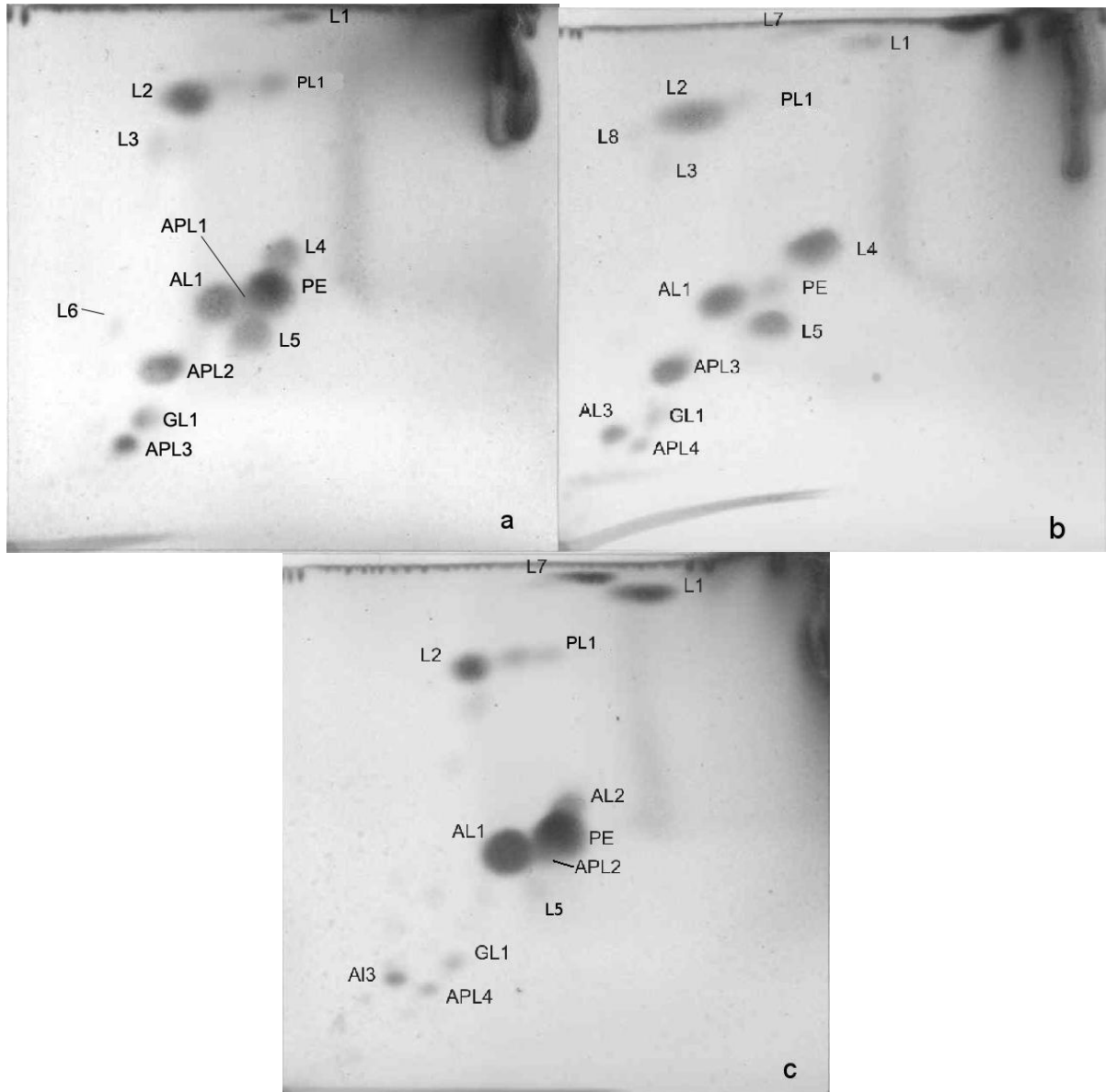


Abbildung 18. Profile der polaren Lipide. (a) Isolat 2289 (ident mit dem Isolat 2388); (b) *M. odoratimimus* CCUG 39352^T; (c). *M. odoratus* CCUG 7321^T. Abkürzungen: PE Phosphatidylethanolamin, APL1-4 unbekanntes Aminophospholipid, AL 1-3 unbekanntes Aminolipid, L1-8 unbekanntes Lipid, GL1 unbekanntes Glykolipid, PL1 unbekanntes Phospholipid.

Der Vergleich der genomischen Fingerabdrücke nach BOX-PCR (Abb. 19a) zeigte, dass die Isolate 2289 und 2388 zu *M. odoratimimus* CCUG 39352^T sehr große

Ähnlichkeiten aufwiesen. Es gab drei idente starke Banden bei >1500Bp (geschätzte 2200Bp), bei ~800Bp sowie bei ~350Bp hatte. Weiterhin waren in den Fingerabdrücken dieser drei Stämme noch zwei schwache Banden zu sehen (~700Bp und ~630Bp) Die Bande bei ~350Bp trat allerdings auch bei *M. odoratus* CCUG 7321^T auf.

In den REP-PCR Fingerabdrücken konnte keine auffälligen Ähnlichkeiten beobachten werden, weder zwischen den Isolaten 2289 und 2388 noch zu den Referenzstämmen (Abb. 19b).

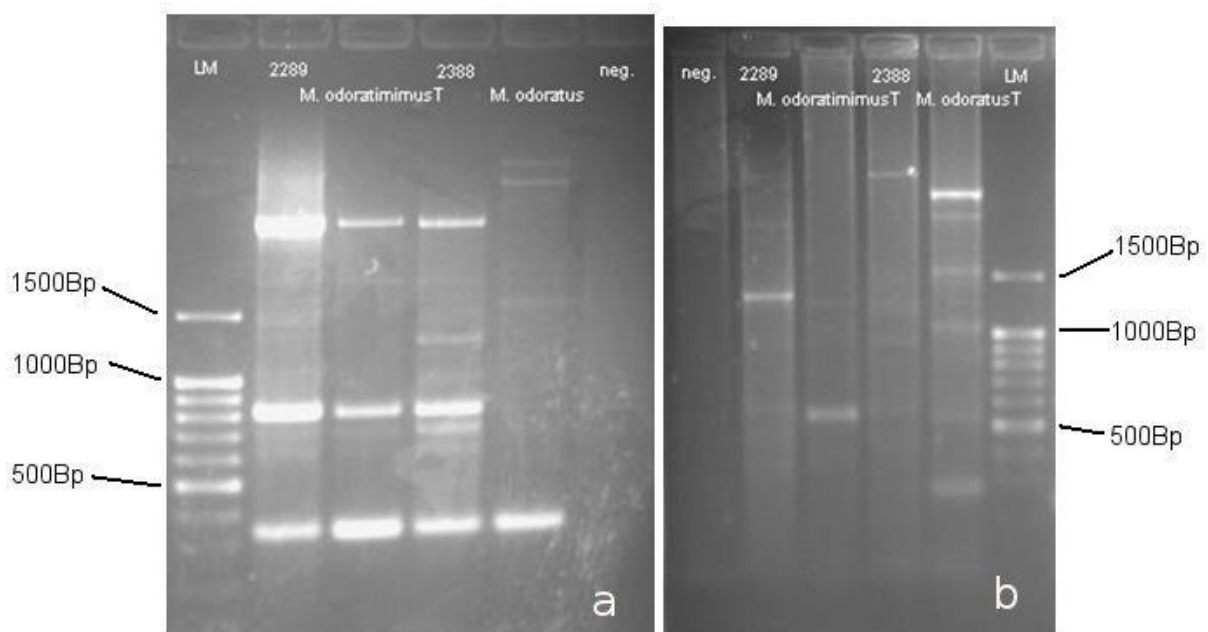


Abbildung 19. Genomische Fingerabdrücke der Isolate 2289 und 2388 sowie der Referenzstämmen *M. odoratimimus* CCUG 39352^T und *M. odoratus* CCUG 7321^T nach BOX-PCR (a) und REP-PCR (b). Abkürzungen: LM Längenmarker, neg. negativ-Kontrolle.

Die Profile der polaren Lipide der Isolate 2289 und 2388 sind den Profilen von *M. odoratimimus* CCUG 39362^T und *M. odoratus* CCUG 7321^T ähnlich. Allerdings gibt es auch Lipide die für die jeweilige Art bzw. für die Isolate charakteristisch sind. Die BOX-PCR zeigt sehr große Ähnlichkeiten zwischen den Isolaten 2289, 2388 und *M. odoratimimus* CCUG 39352^T auf Grund dessen angenommen werden kann, dass die Isolate 2289 und 2388 der Art *M. odoratimimus* angehören. In dieser PCR sind drei sehr charakteristische Banden sowohl bei den Isolate als auch *M. odoratimimus* zu erkennen. *M. odoratus* CCUG 7321^T zeigt nur eine idente Bande zu den Isolaten 2289 und 2388.

4.11 Isolat 2476

Das Isolat 2476 wuchs bei 28°C auf PYE-Agar und -Bouillon. Die Sequenzierung des nahezu vollständigen 16S rRNA kodierenden Gens ergab ein Fragment mit 1449 Nukleotiden. Mit 98,4% Sequenzähnlichkeit zeigte das Isolat die nächste Verwandtschaft mit ‚*Phytobacter diazotrophicus*‘ DSM17806^T (da der Name bisher noch nicht validiert wurde, besitzt er auch noch keine Gültigkeit und wird daher in Anführungszeichen gesetzt) gefolgt von *Yokenella regensburgei* GTC 1377^T (97,4% Sequenzähnlichkeit), *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883^T (96,9% Sequenzähnlichkeit), *Citrobacter freundii* ATCC 8090^T (96,7% Sequenzähnlichkeit) und *Enterobacter cloacae* ATCC 13047^T (96,4% Sequenzähnlichkeit). Bei der Analyse des Chinonsystems zeigte das Isolat 2476 das Ubichinon Q-8, sowie geringe Spuren von MK-8. Dieses Ergebnis steht in guter Übereinstimmung mit Literaturdaten (Yokota *et al.*, 1992). Hier wurde gezeigt, dass Vertreter der Familie *Enterobacteriaceae* Ubichinon-8 als Hauptkomponente haben.

Aufgrund der relative hohen 16S rRNA Gensequenzähnlichkeiten zum Isolat 2476 wurde auch die oben genannten Referenzspezies in die weiteren Analysen miteinbezogen.

Das Profil der polaren Lipide zeigte beim Isolat 2476 (Abb. 20a) die Hauptkomponenten Diphosphatidylglycerol, Phosphatidylethanolamin, Phosphatidylglycerol, sowie ein unidentifiziertes Aminolipid (AL1) und drei Lipide, die mit keinem der verwendeten spezifischen Sprühreagentien reagierte (L1-3). ‚*P. diazotrophicus*‘ DSM17806^T, der die nächst verwandte Art darstellt zeigte Diphosphatidylglycerol, Phosphatidylethanolamin, Phosphatidylglycerol sowie die unbekannte Lipide L1 und L3 als gemeinsame Lipide (Abb. 20b). Zusätzlich wies dieser Referenzstamm drei weitere unidentifizierte Lipide (L4-6) auf, die mit keinem der verwendeten Sprühreagentien reagierte. *Y. regensburgei* 70-115^T (Abb. 20c) wies Diphosphatidylglycerol, Phosphatidylethanolamin und Phosphatidylglycerol auf, und ein unbekanntes Lipid (L4), dass auch im Profil von ‚*P. diazotrophicus*‘ DSM 17806^T vorkam. Die weiteren Referenzen *K. pneumoniae* ATCC 13883^T (Abb. 20d), *C. freundii* ATCC 8090^T (Abb. 20e) sowie *E. cloacae* ATCC 13047^T (Abb. 20f) zeigten außer den Hauptkomponenten Diphosphatidylglycerol, Phosphatidylethanolamin, Phosphatidylglycerol und dem unbekanntem Lipid L1 keine Gemeinsamkeiten zu dem Isolat 2476.

Zur Standardisierung wurde von Busse und Auling (1988) empfohlen, für Polyaminanalysen Biomasse zu verwenden, die bei ca. 70% (spät-exponentielles physiologisches Alter) der maximal erreichbaren optischen Dichte geerntet wurde. Daher wurden auch hier die Polyaminanalysen an spät-exponentieller Biomasse durchgeführt. Bei der Analyse der Polyamine zeigten alle Stämme einen relativ hohen Anteil an 1,3-Diaminopropan. Vor allem das Isolat 2476 wies über 60% 1,3-Diaminopropan auf. Auch in *E. cloacae* ATCC 13047^T, *C. freundii* ATCC 8090^T und ‚*P. diazotrophicus*‘ DSM 17806^T wurden mehr als 50% 1,3-Diaminopropan nachgewiesen. Lediglich *K. pneumoniae* ATCC 13883^T und *Y. regensburgeri* 70-115^T zeigten deutlich geringere Konzentrationen an 1,3-Diaminopropan (Tab. 11). Zum Vergleich sind in Tabelle 12 die Ergebnisse von Hamana (1995) zusammengefasst. In der Arbeit von Hamana (1995) wurden für die Extraktion der Polyamine die Bakterienstämme auf zwei unterschiedlichen Medien (‚nutrient broth‘ NB und Medium 199) wachsen gelassen. Wobei hierbei das NB-Medium, dem in dieser Arbeit verwendeten PYE ähnlicher ist. Das NB-Medium besteht aus 0,5% Fleischextrakt, 1,5% Pepton, 0,5% NaCl und 0,5% K₂HPO₄. Das Medium 199 enthält unter anderem 21 Aminosäuren und 17 Vitamine, und ist somit dem in dieser Arbeit verwendeten PYE unähnlicher. In der Studie wurden Zellen der spät-exponentiellen sowie Zellen aus der stationären Phase untersucht. Auch in dieser Arbeit wurden die Zellen der stationären Phase untersucht.

Bei der Analyse der Polyamine aus stationären Zellen konnte ein interessantes Phänomen beobachtet werden (Tab. 11). Bei den Referenzstämmen *Y. regensburgeri* 70-115^T, *K. pneumoniae* ATCC 13883^T und *E. cloacae* ATCC 13047^T konnte ein Ansteigen von Cadaverin in stationären Zellen beobachtet werden. Auch bei der Wiederholung dieser Analysen mit frisch angezogener Biomasse wurde dieses Phänomen bestätigt. Bei dem Isolat 2476 sowie ‚*P. diazotrophicus*‘ DSM 17806^T und *C. freundii* ATCC 8090^T wiederum konnte dies nicht beobachtet werden.

Im Polyaminmuster (extrahiert aus spät-exponentieller Biomasse) zeigte das Isolat 2476 die Hauptkomponente 1,3-Diaminopropan, moderate Anteile an Putrescin und nur Spuren der Polyamine Cadaverin, Spermidin und Spermin.

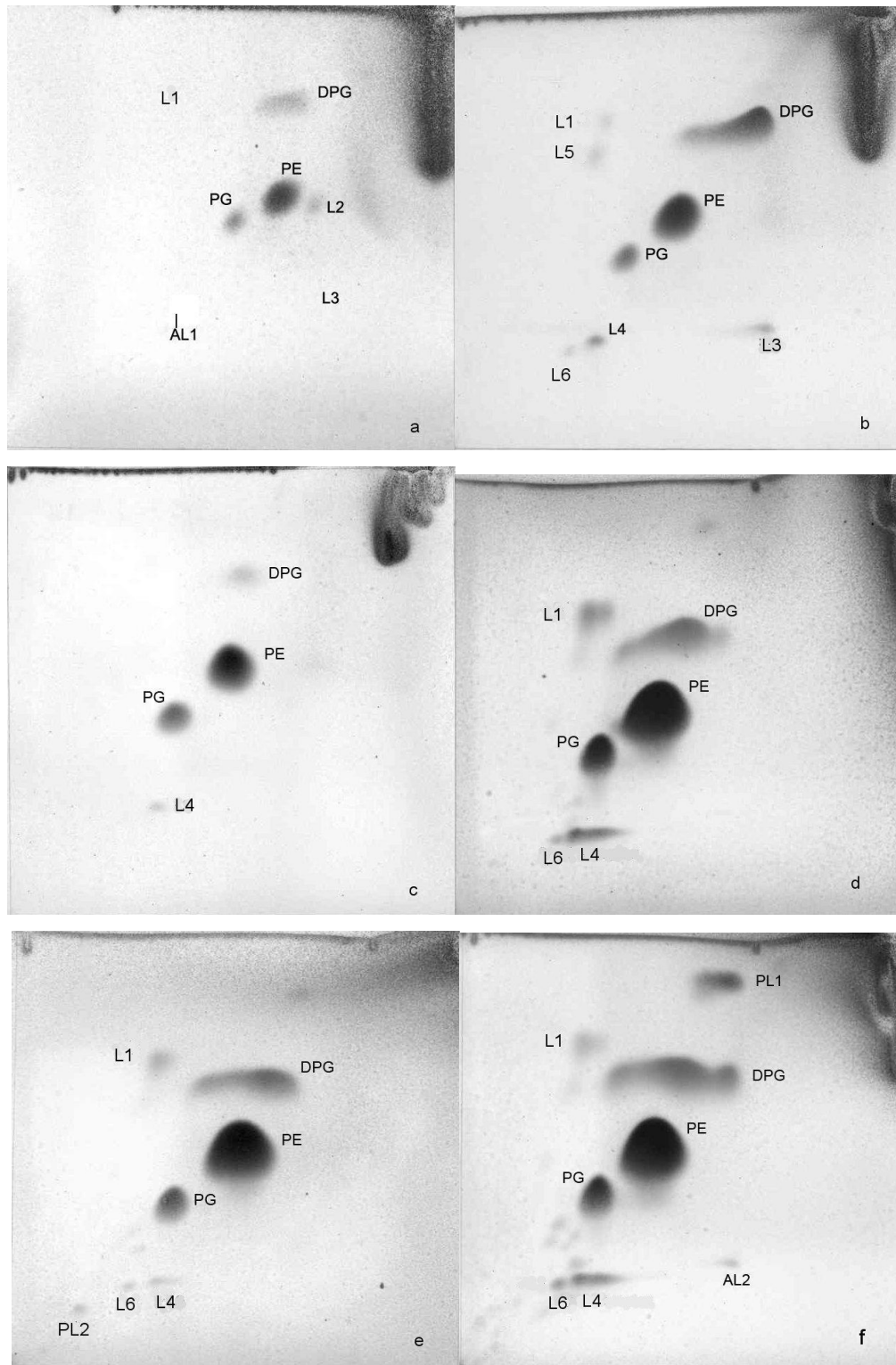


Abbildung 20. Profile der polaren Lipide. (a) Isolat 2476. (b) *P. diazotrophicus* DSM 17806^T. (c) *Y. regensburgi* 70-115^T. (d) *K. pneumoniae* ATCC 13883^T. (e) *C. freundii* ATCC 8090^T. (f) *E. cloacae* ATCC 13047^T. Abkürzungen: DPG Diphosphatidylglycerol, PE Phosphatidylethanolamin, PG Phosphatidylglycerol, AL1 unbekanntes Aminolipid, PL1-2 unbekannte Phospholipide, L1-6 unbekannte Lipide.

Wie auch schon oben erwähnt, ist das Ergebnis der Polyaminanalyse nicht in Einklang mit den Ergebnissen von Hamana (1995), er konnte lediglich bei *K. pneumoniae* einen höheren Wert (23,8% bei Wachstum auf NB-Medium) an 1,3-Diaminopropan zeigen, bei den anderen untersuchten Stämmen, die auch in dieser Arbeit verwendet wurden (*Y. regensburgensis*, *C. freundii* und *E. cloacae*) konnte er 1,3-Diaminopropan in nur sehr geringen Spuren nachweisen (4,6%-0,2%). Allerdings konnte er zeigen, dass zum Beispiel *Erwinia nigrifluens* MAFF 301435 1,3-Diaminopropan als Hauptkomponente hat, genauso wie drei untersuchten Arten der Gattung *Proteus* (*P. mirabilis* JCM 1669^T, *P. penneri* JCM 3948^T und *P. vulgaris* IAM1025). *Klebsiella oxytoca* JCM 1665^T, *Serratia marcescens* IAM 12142^T und *Tatumella ptyseos* JCM 1686^T zeigen ebenfalls 1,3-Diaminopropan als Hauptkomponente. Die Mehrheit der untersuchten Stämme zeigen allerdings nur Spuren dieses Polyamins. Das zeigt, dass in der Familie der *Enterobacteriaceae* das Vorhandensein und die Menge des Polyamins Diaminopropan sehr variiert, sowohl in Abhängigkeit des physiologischen Alters der Biomasse, aber auch des verwendeten Mediums.

In Tabelle 13 sind die Ergebnisse von weiteren Untersuchungen zum Phänotyp zusammengefasst. Bei diesen Untersuchungen waren alle Ergebnisse des Isolats 2476 ident mit jenen von ‚*P. diazotrophicus*‘ DSM 17806^T. Das Isolat verhielt sich Gram-negativ und war in der Lage auf MacConkey-Agar zu wachsen. Es war in der Lage Citrat zu verwerten und das Enzyme Katalase wurde nachgewiesen, während die Enzyme Oxidase und Urease fehlten. Das Isolat war beweglich, reduzierte Nitrat zu Nitrit, bildete Indol aber nicht Sulfid. Das Bakterium war nicht hämolysierend. Aus allen getesteten Zuckern (Maltose, Sorbit, Laktose, Trehalose) produzierte das Isolat 2476 Säure.

Der Vergleich des genomischen Fingerabdrucks ERIC (Abb. 21a), zeigte drei idente Banden zwischen dem Isolat 2476 und dem Referenzstamm ‚*P. diazotrophicus*‘ DSM 17806^T (500Bp, ~300Bp, 180Bp). Zu den anderen Referenzstämmen gab es keine identen Banden. Bei der REP-PCR (Abb. 21b) gab es eine ähnliche Bande zwischen dem Isolat 2476 und ‚*P. diazotrophicus*‘ DSM 17806^T bei ~950Bp während es zu den anderen Stämmen keine Übereinstimmungen gab.

Tabelle 11. Ergebnisse der Polyaminanalyse vom Isolat 2476, *K. pneumoniae* ATCC 13883^T, *C. freundii* ATCC 8090^T, *E. cloacae* ATCC 13047^T, ‚*P. diazotrophicus*‘ DSM 17806^T, *Y. regensburgeri* 70-115^T. Abkürzungen: DAP Diaminopropan, PUT Putrescin, CAD Cadaverin, SPD Spermidin, SPM Spermin. Abkürzungen: 70%: geerntet bei 70% der maximal erreichbaren optischen Dichte, Ü/N: Übernachtkultur (100%).

	DAP	PUT	CAD	SPD	SPM
<i>K. pneumoniae</i> ^T 70%	15,0 µmol/g 26,9%	29,0 µmol/g 52,1%	3,0 µmol/g 5,4%	5,0 µmol/g 9,0%	3,7 µmol/g 6,6%
<i>K. pneumoniae</i> ^T Ü/N	8,9 µmol/g 18,5%	46,7 µmol/g 46,7%	13,5 µmol/g 28,1%	2,1 µmol/g 4,4%	1,1 µmol/g 2,3%
<i>K. pneumoniae</i> ^T Ü/N	12,0 µmol/g 14,9%	20,4 µmol/g 25,5%	44,9 µmol/g 56,0%	1,9 µmol/g 2,4%	0,9 µmol/g 1,1%
<i>C. freundii</i> ^T 70%	43,4 µmol/g 52,9%	37,2 µmol/g 45,4%	0,2 µmol/g 0,2%	1,1 µmol/g 1,3%	0,2 µmol/g 0,2%
<i>C. freundii</i> ^T Ü/N	21,2 µmol/g 42,4%	28,4 µmol/g 56,8%	0,1 µmol/g 0,1%	0,3 µmol/g 0,6%	0
<i>C. freundii</i> ^T Ü/N	25,9 µmol/g 40,6%	37,9 µmol/g 59,4%	0	0	0
<i>E. cloacae</i> ^T 70%	45,2 µmol/g 50,6%	28,94 µmol/g 32,4%	1,6 µmol/g 1,8%	8,5 µmol/g 9,5%	5,2 µmol/g 5,8%
<i>E. cloacae</i> ^T Ü/N	29,8 µmol/g 68,6%	4,9 µmol/g 11,2%	6,9 µmol/g 15,8%	1,7 µmol/g 3,9%	0,3 µmol/g 0,7%
<i>E. cloacae</i> ^T Ü/N	24,4 µmol/g 44,9%	15,2 µmol/g 27,8%	11,8 µmol/g 21,6%	2,2 µmol/g 4,0%	0,9 µmol/g 1,7%
<i>P. diazotrophicus</i> ^T 70%	47,8 µmol/g 52,1%	38,2 µmol/g 41,6%	0,5 µmol/g 0,58%	4,1 µmol/g 4,5%	1,1 µmol/g 1,2%
<i>P. diazotrophicus</i> ^T Ü/N	22,4 µmol/g 43,8%	40,5 µmol/g 40,1%	2,4 µmol/g 4,7%	3,8 µmol/g 7,4%	2,0 µmol/g 3,9%
<i>P. diazotrophicus</i> ^T Ü/N	23,7 µmol/g 44,6%	22,7 µmol/g 37,1%	2,8 µmol/g 4,6%	5,3 µmol/g 8,7%	3,1 µmol/g 5,1%
Isolat 2476 70%	51,6 µmol/g 62,5%	24,1 µmol/g 29,2%	0,5 µmol/g 0,7%	4,9 µmol/g 5,9%	1,4 µmol/g 1,7%
Isolat 2476 Ü/N	25 µmol/g 54,7%	15,8 µmol/g 34,6%	2,0 µmol/g 4,4%	1,5 µmol/g 3,3%	1,4 µmol/g 3,1%

Isolat 2476 Ü/N	17,6 µmol/g 33,9%	24,4 µmol/g 47,0%	4,0 µmol/g 7,7%	3,2 µmol/g 6,2%	2,7 µmol/g 5,2%
<i>Y. regensburgeri</i> ^T 70%	7,4 µmol/g 17,3%	22,9 µmol/g 53,6%	6,5 µmol/g 15,2%	5,8 µmol/g 13,6%	0,1 µmol/g 0,2%
<i>Y. regensburgeri</i> ^T Ü/N	7,2 µmol/g 18,1%	12,8 µmol/g 32,2%	13,8 µmol/g 34,7%	5,9 µmol/g 14,8%	0,1 µmol/g 0,3%

Tabelle 12. Polyaminanalyse von *E. cloacae* IAM1562, *C. freundii* IAM 12471^T, *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae* JCM 1662^T, *Y. regensburgeri* JCM 2403^T (Hamana 1995). Abkürzungen: A-SPD Acetylspermidin, DAP Diaminopropan, PUT Putrescin, CAD Cadaverin, SPD Spermidin.

	Medium	A-SPD	DAP	PUT	CAD	SPD
<i>E. cloacae</i> IAM1562	199	-	0,01 µmol/g 0,2%	1,4 µmol/g 34,1%	1,9 µmol/g 46,2%	0,8 µmol/g 19,5%
	NB	1,1 µmol/g 49,8%	0,01 µmol/g 0,5%	0,6 µmol/g 27,1%	0,2 µmol/g 9,0%	0,3 µmol/g 13,6%
<i>C. freundii</i> IAM 12471 ^T	199	-	-	0,5 µmol/g 38,5%	0,8 µmol/g 61,5%	-
	NB	0,1 µmol/g 4,1%	0,02 µmol/g 0,8%	0,5 µmol/g 20,7%	1,6 µmol/g 66,1%	0,2 µmol/g 8,3%
<i>K. pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> JCM 1662 ^T	199	-	0,06 µmol/g 4,6%	0,1 µmol/g 7,8%	1,1 µmol/g 85,9%	0,02 µmol/g 1,6%
	NB	0,2 µmol/g 3,2%	1,5 µmol/g 23,8%	0,9 µmol/g 14,3%	3,0 µmol/g 47,6%	0,7 µmol/g 11,1%
<i>Y. regensburgeri</i> JCM 2403 ^T	199	-	-	0,2 µmol/g 33,3%	0,4 µmol/g 66,6%	-
	NB	0,3 µmol/g 9,3%	0,1 µmol/g 3,1%	0,8 µmol/g 25,0%	1,6 µmol/g 50,0%	0,4 µmol/g 12,5%

Tabelle 13. Phänotypische Merkmale des Isolats 2476 im Vergleich zu den Referenzstämmen *P. diazotrophicus* DSM 17806^T, *C. freundii* ATCC 8090^T, *K. pneumoniae* ATCC 13883^T, *E. cloacae* ATCC 13047^T und *Y. regensburgeri* 70-115^T. Abkürzungen: + positiv, - negativ.

	2476	<i>P.</i> <i>diazotrophicus</i>	<i>C.</i> <i>freundii</i>	<i>K.</i> <i>pneumoniae</i>	<i>E.</i> <i>cloacae</i>	<i>Y.</i> <i>regensburgeri</i>
Gram-Verhalten	-	-	-	-	-	-
Citrat-Verwertung	+	+	+	+	+	+

MacConkey	+ pink	+ pink	+ pink	+ pink	+ pink	- hellrosa
Katalase	+	+	+	+	+	+
Oxidase	-	-	-	-	-	-
Urease	-	-	-	+	-	-
Nitrat-Reduktion	+	+	+	+	+	+
Indol-Bildung	+	+	-	-	-	-
Beweglichkeit	+	+	+	-	+	-
Sulfid-Bildung	-	-	+	-	-	-
Hämolyse	-	-	-	-	-	-
Säureproduktion						
aus	+	+	+	+	+	+
Maltose	+	+	+	+	+	-
Sorbit	+	+	+	+	+	-
Laktose	+	+	+	+	+	+
Trehalose						

Die Sequenzanalyse von sogenannten ‚house-keeping‘ Genen ist ein neuerer Ansatz in der Bakterientaxonomie, um besonders Verwandtschaften innerhalb eines Genus aber auch intraspezifische Verwandtschaften zu untersuchen. Eines dieser ‚house-keeping‘ Gene ist das *infB*, das für den Translationsinitiationsfaktor IF-2 kodiert. In einer umfassenden Studie zur Identifizierung von *Enterobacteriaceae* Stämmen konnten Hedegaard *et al.* (1999) zeigen, dass die Sequenzen dieses Gens ein brauchbares Mittel zur Aufdeckung von engen Verwandtschaften innerhalb der Familie sind. Es konnte gezeigt werden, dass diese Sequenz sowohl konservierte Segmente enthält aber auch variable Bereiche, und für Untersuchungen der Verwandtschaftsbeziehungen verwendet werden kann. Daher wurde auch vom Isolat 2476 und den Referenzstämmen eine partielle Sequenz des *infB* Genes PCR-amplifiziert und dann sequenziert.

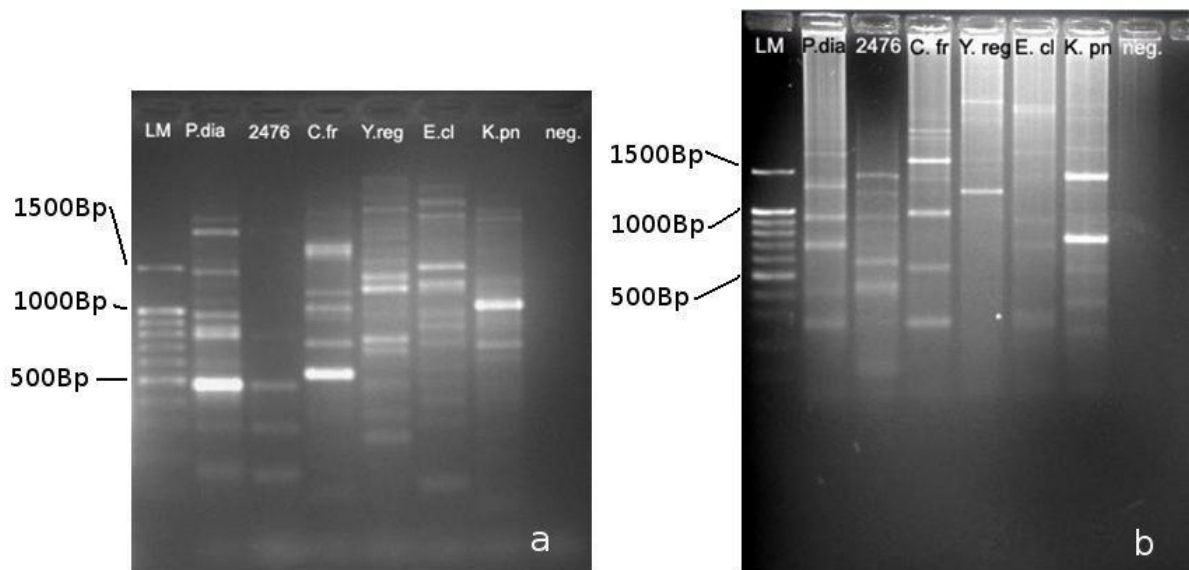


Abbildung 21. Genomische Fingerabdrücke nach (a) ERIC- und (b) REP-PCR des Isolats 2476 und der Referenzstämmen *P. diazotrophicus* (*P.dia*) DSM 17806^T, *Y. regensburgensis* (*Y. reg*) 70-115^T, *K. pneumoniae* (*K. pn*) ATCC 13883^T, *C. freundii* (*C.fr*) ATCC 8090^T und *E. cloacae* (*E. cl*) ATCC 13047^T. Abkürzungen: LM Längenmarker, neg. negativ-Kontrolle.

Tabelle 14. Distanzmatrix beim Vergleich der *infB*-DNA (510 Nukleotide) von dem Isolat 2476 und den Referenzen *P. diazotrophicus* DSM 17806^T (*P.dia*), *E. cloacae* ATCC 13047^T (*E.cl*), *K. pneumoniae* ATCC 13883^T (*K. pn*), *C. freundii* ATCC 8090^T (*C. fr*) und *Y. regensburgensis* 70-115^T (*Y. reg*).

<i>infB</i> DNA	2476	<i>P. dia</i>	<i>E. cl</i>	<i>K. pn</i>	<i>C. fr</i>	<i>Y. reg</i>
2476	100%	98%	87%	88%	87%	83%
<i>P. dia</i>		100%	88%	89%	88%	84%
<i>E. cl</i>			100%	88%	90%	84%
<i>K. pn</i>				100%	89%	85%
<i>C. fr</i>					100%	85%
<i>Y. reg</i>						100%

Tabelle 15. Distanzmatrix beim Vergleich der infB-Proteinsequenz von dem Isolat 2476 und den Referenzen ‚*P. diazotrophicus*‘ DSM 17806^T (P.dia), *E. cloacae* ATCC 13047^T (E.cl), *K. pneumoniae* ATCC 13883^T (K. pn), *C. freundii* ATCC 8090^T (C. fr) und *Y. regensburgi* 70-115^T (Y. reg).

infB Protein	2476	P. dia	E. cl	K. pn	C. fr	Y. reg
2476	100%	96%	95%	95%	95%	80%
P. dia		100%	95%	95%	95%	83%
E. cl			100%	98%	97%	85%
K. pn				100%	98%	87%
C. fr					100%	87%
Y. reg						100%

Die erhaltene Sequenz hatte eine Länge von 510 Basen (s. Anhang). Außerdem wurde die Gensequenz mit Hilfe des Gene Runners 3.05 Hastings Software Inc. 1994 in die Proteinsequenz translatiert (zu finden im Anhang). Diese Translation ist sehr wichtig, da auf Grund der Wobble-Hypothese, das dritte Nukleotid meist nicht von entscheidender Bedeutung ist für die Umschreibung in eine Aminosäure. Somit ist es im Rahmen der Erwartung, dass es in DNA Sequenz-Vergleichen größere Unterschiede gefunden werden als in der entsprechenden Aminosäuresequenz.

Beim Vergleich der DNA- und Protein-Sequenz (Tab. 14, 15) war in beiden Fällen die höchste Sequenzähnlichkeit zwischen dem Isolat 2476 und ‚*P. diazotrophicus*‘ DSM 17806^T gegeben. *Y. regensburgi* 70-115^T zeigte dagegen die geringsten Ähnlichkeiten sowohl in der DNA- als auch der Aminosäuresequenz.

Allerdings ist in Tabelle 14 und 15 zu sehen, dass dreimal eine größere Unähnlichkeiten in der Proteinsequenz gegeben ist. Die Ähnlichkeit des infB-Genes zwischen dem Isolat 2476 und ‚*P. diazotrophicus*‘ DSM 17806^T zeigte in der DNA-Sequenz 98% Sequenzähnlichkeit aber in der Proteinsequenz, wo man eine noch höhere Ähnlichkeit erwarten würde, nur 96%. Das gleiche Phänomen tritt beim Vergleich zwischen dem Isolat 2476 und *Y. regensburgi* 70-115^T und beim Vergleich zwischen ‚*P.*

diazotrophicus' DSM 17806^T und *Y. regensburgei* 70-115^T auf. Das zeigt, dass in diesem Fall die Unähnlichkeiten zwischen dem Isolat und diesen Arten nicht an der oben genannten dritten Position zu finden sind.

Auf Grund der hier gesammelten Daten zeigte das Isolat die meisten Ähnlichkeiten zu '*P. diazotrophicus*' DSM 18706^T. Vor allem die Ähnlichkeiten in dem genomischen Fingerabdruck ERIC zeigt die Zugehörigkeit zu '*P. diazotrophicus*'. Ebenso ist bei der Analyse der physiologischen Merkmale (Tab. 13) die größte Ähnlichkeit zu dieser Art gegeben. Auch das Polyaminmuster des Isolats 2476 ist dem von '*P. diazotrophicus*' DSM 18706^T sehr ähnlich, allerdings unterscheidet es sich auch nicht signifikant von dem von *C. freundii*. Die größten Unterschiede zwischen dem Isolat 2476 und '*P. diazotrophicus*' DSM 17806^T sind in den Profilen der polaren Lipide zu finden, wobei das mit Bedacht zu beurteilen ist, da hier vielleicht mit mehr Lipid-Extrakt ein ähnlicheres Profil zu sehen wäre.

5. Zusammenfassung

Tabelle 16. Zusammenfassung der Isolate, deren Ursprung, dem nächsten Verwandten, sowie durchgeführte Analysen.

Organismus	Ursprung	Nächster Verwandter (nt vom 5' Ende)	Fingerdruck-PCR	Polare Lipide	Chromosystem	Weiteres
256-I	Nase, Pferd	100% <i>Pseudomonas putida</i> DSM 291 ^T (503nt)	ERIC-PCR: sehr geringe Ähnlichkeiten zu <i>P. putida</i> DSM 50222, BOX und REP: keine Ähnlichkeiten	DPG, PE, PG, AL2-3, APL1, PL1, L2, Pigmente	Q-9, Q-8	-
256-II	Nase, Pferd	98,9% <i>Bacillus thuringiensis</i> ATCC 10792 ^T (423nt)	BOX und RAPD: geringe Ähnlichkeit zu <i>B. cereus</i> 31T, ERIC: keine Ähnlichkeiten	-	-	ITS und Verdau: keine Charakterisierung möglich; Cereleuid-PCR: neg
408	Wunde, Pferd	100% <i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579 ^T (690nt)	BOX und RAPD: geringe Ähnlichkeit zu <i>B. cereus</i> 31 ^T , ERIC: keine Ähnlichkeiten	-	-	ITS und Verdau: keine Charakterisierung möglich; Cereleuid-PCR: neg
410	Haut, Hund	96,8% <i>Corynebacterium diptheriae</i> DSM 44123 ^T (1425nt) 96,8% <i>Corynebacterium ulcerans</i> DSM 46325 ^T	Siehe Publikation	Siehe Publikation	Siehe Publikation	Siehe Publikation
793	Kot, Schwein	96,8% <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> DSM 20689 ^T	-	DPG, PE, PG, APL1, L4-5	Q-8, Q-9	-
886	Auge, Chamäleon	98% <i>Comamonas terrigena</i> IAM 12052 ^T (718nt) 99,8% <i>Acinetobacter johnsonii</i> DSM 6963 ^T (624nt)	BOX- und REP-PCR: geringe Ähnlichkeit zu <i>A. johnsonii</i> DSM 6963 ^T	DPG, PE, PG, AL1, APL1-2, PL1-4, L1-2	Q-8, Q-9	-
1000	Haut, Hund	99,5% <i>Bacillus cereus</i> ATCC 4579 (420nt)	BOX und RAPD: geringe Ähnlichkeit zu <i>B. cereus</i> 31 ^T , ERIC: keine Ähnlichkeiten	-	-	ITS und Verdau: keine Charakterisierung möglich; Cereleuid-PCR: neg
1600	Auge, Pferd	99,8% <i>Staphylococcus xylosum</i> ATCC 29971 ^T (638nt)	ERIC-, REP- und BOX-PCR: sehr große Ähnlichkeit zu <i>S. xylosum</i> KL 162 ^T in	-	-	-
1656	Kot, Esel	100% <i>Solibacillus silvestris</i> HR3-23 ^T (640nt)	-	DPG, PE, PG, AL1, PL1, L1-2	MIK-7, MIK-6	Sporentestung: neg.
2224	Nase, Hund	99,6% <i>Bacillus thuringiensis</i> ATCC 10792 ^T (602nt)	BOX und RAPD: geringe Ähnlichkeit zu <i>B. cereus</i> 31T, ERIC: keine Ähnlichkeiten	-	-	ITS und Verdau: keine Charakterisierung möglich; Cereleuid-PCR: neg
2236	Kot, Gans	99,5% <i>Kurthia gibsonii</i> NCIMB 9758 ^T (608nt)	ERIC-, REP- und BOX-PCR: mäßige Ähnlichkeit zu <i>K. gibsonii</i> 20636 ^T	DPG, PE, PG, APL1-3, L1	MIK-7, MIK-6	Sporentestung: neg.
2289	Kot, Rind	99,5% <i>Myroides odoratimimus</i> CCUG39352 ^T (717nt)	BOX-PCR: sehr große Ähnlichkeit zu <i>M. odoratimimus</i> CCUG 39352 ^T . REP-PCR: keine Ähnlichkeit	PE, APL1-3, AL1, GL1, L1-6	MIK-6	-
2388	Kot, Affe	97,7% <i>Myroides odoratimimus</i> CCUG39352 ^T (627nt) 98,4% <i>Phytobacter diazotrophicus</i> DSM 17806 ^T (1449nt) 97,4% <i>Yokenella regensurgeti</i> GTC 1377 ^T	BOX-PCR: sehr große Ähnlichkeit zu <i>M. odoratimimus</i> CCUG 39352 ^T . REP-PCR: keine Ähnlichkeit	PE, APL1-3, AL1, GL1, L1-6	MIK-6	-
2476	Kot, Pferd	96,7% <i>Citrobacter freundii</i> ATCC 8090 ^T 96,9% <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883 ^T 96,4% <i>Enterobacter cloacae</i> ATCC 13047 ^T	ERIC-PCR: große Ähnlichkeiten zu <i>P. diazotrophicus</i> DSM 17806 ^T , REP-PCR: geringe Ähnlichkeiten zu <i>P. diazotrophicus</i> DSM 17806 ^T	DPG, PE, PG, L1-3, AL1	Q-8, MIK-8	Polyamine: Diaminopropan als Hauptkomponente; in fB: größte Ähnlichkeit zu <i>P. diazotrophicus</i> DSM 17806 ^T , div. physiologische Untersuchungen; größte Ähnlichkeit <i>P.</i>

Abkürzungen: DPG Diphosphatidylglycerol, PE Phosphatidylethanolamin, PG Phosphatidylglycerol, APL unbekanntes Aminophospholipid, AL unbekanntes Aminolipid, PL unbekanntes Phospholipid, GL unbekanntes Glykolipid, L unbekanntes Lipid, Q Ubichinon, MK Menachinon.

Basierend auf 16S rRNA Gensequenzanalysen konnte für die Bakterienstämme 256-II, 408, 1000 und 2224 gezeigt werden, dass sie zur *B. cereus*-Gruppe gehören. Der PCR-Nachweis für Cereulid (*B. cereus* spezifisches hitzestabiles Toxin) war negativ. Daher können diese Stämme zumindest vorerst als harmlos angesehen werden. Eine zuverlässige Identifizierung auf Artebene konnte mit den verwendeten Techniken allerdings nicht erreicht werden.

Die Isolate 1600 (*S. xylosus*), 2289 (*M. odoratimimus*), 2388 (*M. odoratimimus*) konnten auf Grund der Ergebnisse der Fingerabdrücke eindeutig einer bestimmten Art zugeordnet werden.

Für das Isolat 410 hatte schon die Analyse des 16S rRNA Gens angedeutet, dass es sich um eine neue Art des Genus *Corynebacterium* handelt. Die weiteren Ergebnisse der durchgeführten Analysen bestätigten dies und die gesammelten Daten wurden in einem Manuskript zusammengefasst, das im Anhang zu finden ist. Ein Teil dieser Untersuchungen wurde von den in der Autorenliste aufgeführten Kollegen durchgeführt. Die Isolate 256-I, 793, 886, 2236 und 1656 konnten mit Hilfe der verwendeten Analysen nicht zu einer bestimmten Art zugeordnet werden. Die Zuordnung zu den Gattungen *Pseudomonas* (256-I), *Comamonas* (793), *Acinetobacter* (888), *Kurthia* (2236) und *Solibacillus* (1656) kann aber als abgesichert gelten.

Es ist gut zu erkennen, dass die verwendeten Methoden ausreichen, um in vielen Fällen eine Artzugehörigkeit aufzuzeigen. Allerdings wären in anderen Fällen weitere Untersuchungen nötig gewesen, die Isolate zuverlässig einer Art zuzuordnen. In diesen Fällen kann aber auch nicht ausgeschlossen werden, dass das jeweilige Isolat zu einer noch nicht beschriebenen Art gehört was dann natürlich eine Identifizierung auf Artniveau unmöglich macht.

Allgemein ist über die Normalflora beim Menschen viel bekannt. Für Tiere ist zu diesem Thema allerdings kaum Literatur zu finden. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen deuten aber nicht an, dass sich die Normalflora beim Tier substantiell von der beim Menschen unterscheidet.

6. Anhang

6.1. Sequenzen des 16S rRNA Gens der Isolate

256 I 503nt

TTAGACTAGTACTTCTGGTGC AACCCACTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCC
GGGAACGTATTACCCGGCATTCTGATTCGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCACGCAGTCG
AGTTGCAGACTGCGATCCGGACTACGATCGGTTTTGTGAGATTAGCTCCACCTCGCGGCTTG
CAACCCCTGTACCGACCATTTGTAGCAGTGTGTAGCCAGGCCGTAAGGCCATGATGACTT
GACGTCATCCCCACCTTCTCCGGTTTTGCACCCGGCAGTCTCCTTAGAGTGCCCCACCATAACG
TGCTGGTAACTAAGGACAAGGGTTGCGCTCGTTACGGGACTTAACCCAACATCTCACGCACG
AGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTGTCAGAGTTCCCGAAGGCACCAATCCATCTCTGGAA
AGTTCTCTGCATGTCAAGGCCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAACCACATGCT

256 II 423nt

CTTAGCGAAANAGATTGAGAGCTTGCTCCCCAGAAGTTAGCGGGACGGGTGAGTAACACGT
GGGTAACCTGCCATAAAGACTGGGATAACTCCGGGAAAACCGGGCTAATACCGGATAACATTT
TGAAGTGCATGGTTGCAAATGAAAGCGGGCTTCGGCTGTCACTTATGGATGGACCCGCTG
CATTAGCTAGTTGGTGAAGTAAAGGCTCACCAAGGCANCGATGCGTAGCCGACTGAGAGGGT
GATCGGCCACACTGGGACTGAGACACNGNCCANACTTCTCCGGGAGGCAGCANNAGGGAANT
CTTCCGCAATGNACNAAANTCTGACTGGANCNCCNCGCNTGAATCAANGATCNNTTCCNNN
TCNAAAAACNCAGTNTNTNNGGANCNACNNTCNCNTNNTNCAAA

404 699nt

CCCTGGTAGTCCATGCCGTAACCGTTGGGCACTAGGTTTGGGGACCATTCCACGGTTTCG
GCGCCGCAGCTAACGCATTAAGTGC CCCCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTC
AAAGGAATTGACGGGGCCCGCACAAAGCGGGCGAGCATCGGATTAATTCGATGCAACGC
GAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATGTTCTCGATCGCCGTAGAGATACGGTTTTCCCTTT
GGGGCGGTTTACAGGTTGTCATGGTTGTCTGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTA
AGTCCCACAACGAGCGCAACCCCTCGTTCATGTTGCCAGCACGTAATGGTGGGACTCAT
GGGAGACTGCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGAGGACGACGTCAAATCATCATGCCCTT
TATGCTTGGGCTTACGCATGTACAATGGCCGTTACAATGGGTTGCGATACTGTGAGG
TGGAGCTAATCCCAAAAAGCCGCTCTCAGTTCCGATTTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATG
AAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAACGCTCGGGTGAATACGTTCCCGGGCCT
TGTACACACCCCGCTCAAGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAGT
TTGTGGGGGAGCCGTCGAAGTGGGACCAGCGATTGGA

408 690nt

GGGAGCAAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCACGCCGTAACCGATGAGTGCTAAGTGT
TAGAGGGTTTCCGCCCTTTAGTGTGAAGTTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTA
CGGCCGCAAGGCTGAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGCACAAAGCGTGGAGCATGT
GGTTTAATTCGAAGCAACGCCAAGAACCTTACCAGGCTTGACATCCTCTGAAAACCCCTA
GAGATAGGGCTTCTCCTTCGGGAGCAGAGTGACAGGTTGTCATGGTTGTCTGTCAGCTCG
TGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTGATCTTAGTTGCCATC
ATTAAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAAACCGGAGGAAGGTGGGATGACG
TCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACGGTACAAAG
AGCTGCAAGACCCGAGGTGGAGCTAATCTCATAAAAACCGTTCAGTTCCGATTTGTAGG
CTGCAACTCGCCTACATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCCGGGTG
AATACGTTCCCGGGCTTGTACACACCCCGTCAACACCCCGTCAACACCCGAGAGTTTGTAAACCCGA
AGTCGGTGGGGTAACCTTTTTGGAGCCAGC

410 1425nt

AACGCTGGCGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGGAAAGGCCCTGCTGCGGGGTACTCGAGTGGCG
AACGGGTGAGTAACAGCTGGGTGATCTGCCTGCACCTTGGGATAAGCCTGGGAACTGGGTCTAATACT
GAATATTACCATGCTTTAGTGTGTGGTGGAAAGCTTTTGGCGTGTGGGATGAGCTCGCGGCTATCA
GCTTGTGGTGGGGTAAATGGCCTACCAAGGCGTCGACGGGTAGCCGGCTGAGAGGGTGTACGGCCACAT
TGGGACTGAGATACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCC
TGATGACGACGACCGCGTGGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAACCTCTTTCGACAGGGACGAAGCGT
TATGTGACGGTACCTGTATAAGAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGC
GAGCGTTGTCCGAATTAAGTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGTGGTTTGTGCGTGTCTGTGAAATCCCGG
GGCTTAACCTTCGGGCGTGCAGGGGATACGGGCATAACTTGAGTGTGTAGGGGAGACTGGAATTCCTGGT
GTAGCGGTGAAATGCCAGATATCAGGAGGAACACCCGATGGCGAAGGCAGGTCTCTGGGCAGTAACTGAC
GCTGAGGAGCGAAAGCATGGGTAGCGGAACAGGATTAAGTACCTTGGTAGTCCATGCTGTAAACCGTGGGC
GCTAGGTGTAGGGTCTTCCACGACTTCTGTGCGTAGCTAACGCATTAAGCGCCCCGCTGGGGAGTAC
GGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGCACAAAGCGCGGAGCATGTGGATTAATTCG
ATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGGCTTACATACATCAGATAGGCGTAGAGATACGTCCTCCCTGTG
GTTGGTGTACAGGTGGTGCATGGTTGTCTGCTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGA
GCGCAACCCCTTGTCTTATGTTGCCAGCACGTCATGGTGGGACTCATGAGAGACTGCCGGGTTAACTCG
GAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGTCCAGGGCTTCACACATGCTACATGGT
GGTACAACGCGTTGCCAGCCTGTGAGGGTGAGCTAATCGTGAAGCCGGCCTCAGTTCGGATTGGGGTC
TGCAACTCGACCCATGAAGTCCGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAACCGTCCGGTGAATACGTTCC
CGGGCCTTGTACACACCCCGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAGT

TGGGGGGAGCTGTCTGAAGGTGGGAT

689 469nt

CCTCCTTGAAGTCAGCGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTACCTATA
AGACTGGGATAACTTCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATAATATGTTTCACCTCATGGT
GAAACAGTGAAAGACGGTCTCTGTGTCACTTATAGATGGACCCCGCGCATTAGCTAGT
TGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGTATCGGCC
ACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGAATCTTCCGC
AATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAA
ACTCTGTGTGAAGGGAAGAACAAGTACGTTAGTAACTGAACgTACCTTGACGGTACCTTA
CCAGAAAGCCACGGCTAACTACNTGCCAGCAGCCATCGGATAATACGCTAGTGGC

793 718nt

GAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGTCA
AATGGTTGTTGGGTTTTTCATTGACTCAGTAACGAAGCTAACCGGTGAAGTTGACCGCCTG
GGGAGTACGGCCCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGG
ATGATGTGGTTTTAATTCGATGCAACCGGAAAAACCTTACCACCTTTGACATGGCAGGAA
TCCTTTAGAGATAGAGGAGTGTCTGAAAAGAGAACCTGCACACAGGTGCTGCATGGCTGTC
GTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTGCCATTA
GTTGCTACGAAAGGGCCTCTAATGGGACTGCCGGTGCAAACCGGAGGAAGTTGGGGAT
GACGTCAGTCCCTCATGGCCCTTATAGGTGGGGCTACACACGTCATACAAATGGGTGGTAC
AAAGGTTGCCCAACCCCGGAGGGGAGCTAATCCCATAAAGCCAGTCTAGTCCGGATCG
CAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGCATGTCAC
GGTGAATACGTTCCCGGTTCTTGTACACACCGCCGTCACACCATGGGAGCGGGTCTCGC
CAGAAGTAGGTAGCTAACCGCAAGGAGGGCGCTTACCACGGCGGGTTCTGACTGG

886 624nt

GTAGACTACCTACTTCTGGTGCAACAAATTCCCATGGTGTGACGGCGGTGTGTACAAGGCC
CGGGAACGTATTCACCGCGCATTTCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCATGGAGTC
GAGTTGCAGACTCCAATCCGACTACGATCGGCTTTTTGAGATTAGCATCCTATCGCTAGGTA
GCAACCCCTTGTACCGACCATTGTAGCAGTGTGTAGCCCTGGTCTGTAAGGGCCATGATGACT
TGACGTGCTCCCGCCTTCTCCAGTTTGTCACTGGCAGTATCCTTAAAGTTCCCGGCTTAAC
CCGCTGGCAAATAAGGAAAAGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAAATCTCACGACAC
GAGCTGACGACAGCCATGACAGCCTGTATGTAAGTTCGCCAAGGCACCAATCCTCTGGA
AAGTCTTACTATGTCAAGACAGGTAAGGTTCTTCCGCTGTCATCGAATAAAAACCACATGC
TCCACCGCTTGTGCGGGCCCGCTCAATTCATTTGAGTTTGTCTTGGCAACCGTACTCCCCA
GGCGNCTACTTATCGCGTTAGTGTGCGCCCTAAAGCCTCAAAGGCCCAACGGCTANT

942 703nt

TTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAACGTTGGGCACTAGGTGTGGGGACATTCAC
GTTTTCCCGCCGTAGCTAACGCATTAAGTGCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTA
AAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGGCAGCATGTGATTAATTCGATG
CAACCGGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATGCACTGGACGGCTGCAGAGATGTGGCTTT
CTTTGGACTGGTGCACAGGTGGTGCATGGTGTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGG
TTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTCGTTCTATGTTGCCAGCAGCTGATGGTGGGGACT
CATAGGAGACTGCCGGGTCAACTFCGGAGGAAGGTGGGACGACGTCAAATCATCATGCC
CCTTATGTCTTGGGCTTCAAGCATGCTACAATGGTCCGTACAATGGGTTGCGAAACTGTG
AGGTGGAGCGAATCCCAAAAAGCCGGCCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCC
ATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAACGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGG
CCTTGTACACACCGCCGTCAAAGTACAGAAAGTTCGGTAAACCCGAAGCCAGTGGCCCAT
CCTCGTGAGGGAGCTGTCTGAAGGTGGGATCGGTGATTGGGACT

1000 420nt

GGGTGTTACAACTCTCGTGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCA
CCGCGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCAGCTTCATGTAGGCGAGTTGCAGCC
TACAATCCGAACCTGAGAACGGTTTTATGAGATTAGCTCCACCTCGCGGCTTTCAGCTCT
TTGTACCGTCCATTTAGTACAGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTGACG
TCATCCCCACCTTCTCCGGTTTTGTACCGGCAGTCACCTTAGAGTGCCCAACTTAATGA
TGGCAACTAANATCAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCAACATCTCACGACACG
AACTGACNACAACCATGCACCACCTGTNACTCTGTTCNNAANGAGAAGNNCNTATNTCT

1600 638nt

GGTAACGCTGGCGCGCTGCCTAATACATGCAGTCGAGCGAACGGATAAGGAGCTTGCTCC
TTTGAAGTTAGCGGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTACCTATAAGACTGGGAT
AACTTCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATAACATTTAGAACCAGTATGGTTCTAAAGTGA
AAGATGGTTTTGTATCACTTATAGATGGACCCCGCCGATTTAGCTAGTTGGTAAGGTA
ACGGCTTACCAAGGCGAGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTGTATCGGCCACACTGGAAC
TGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGAATCTTCCGCAATGGGCGAA
AGCCTGACGGGAACCGGAGTGAAGTGTGAGTGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAACCTGTATT
TAGGGAAGAACAATGTGTAAGTAACTGTGCACATCTTACCGGTACCTAATCAGAAAGCC
ACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGGTAAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAAAT
ATTGGGCGTAAAGCGCGGTAGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCACGGCTCAA

CCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAACTTGAGTGCA

1656 640nt

CNACGCTGGCGGGTGCCTATACATGCAGTCGAGCGGAANTTTTATTGGTGCCTGCACCT
TTAAAAATTTAGCGGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTACCTTATAGATTGGGA
TAACTCCGGGAAACCGGGCTAATACCGAATAATACTTTTAAACATGTTTGAAGTTG
AAAGACGGTTTTCGGCTGTCACTATAAGATGGACCCCGCGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGG
TAACGGCTCACCAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGG
ACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTCCACAATGGACG
AAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCTGAGTGAAGAAGGATTTTCGGTTCGTAAAACCTCTGTT
GCAAGGGAAGAACAAGTAGCGTAGTAACCTGGCGCTACCTTGACGGTACCTTGTAGAAA
CCACGGCTAAGTACGTGCCAGCAGCCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAA
TTATTGGGCTAAAGCGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCT
AACCGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAACTTGAGTGCA

1729 643nt

CAACGCTGGCGGGTGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGATGAAATTTTCTTCGGAAAATGGAT
TAGCGGGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCTATAGAGAGGGATAGCCTTCGGAA
AGGGAGATTAATACCTCATAATATCCTAGTATCGCATGATACATGGATTAAAGGAGCAATCCG
CTATAGGATGGACCCCGCGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAGGGCAGCAT
GCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACATGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACG
GGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGGAAACCTGATGCAGCAACGGCGCGTGAGT
GATGACGGTCTTCGGATTGTAAAAGCTCTGTCTTTAGGGACGATAATGACGGTACCTAAGGAGG
AAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAT
TTACTGGCGTAAAGGGAGCGTAGGCGGATCTTTAAGTGGGATGTGAAATACTCGGGCTCAAC
CTGGGGGCTGCATTCCAAACCTGGGGATCTAGAGTACAGGAGGGGAGAGTGGAATTCCTAGTGT
AGCGGTGAAATGC

1769 664nt

TGACGCTGGCGGAGGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGGGATGGGTGCTTGACCTAAT
CTTAGCGGGGACGGGTGAGTAATGCTTAGGAATCTGCCATTTAGTGGGGGACAACATTC
CGAAAGGGATGCTAATACCGCATACGTCTACGGGAGAAAGCAGGGGATCTTCGGACCTT
GCGCTAAATGATGAGCCTAAGTCGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCTACCAAGGC
GACGATCTGTAGCGGGTCTGAGAGGATGATCCGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAG
ACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGCGGGAAGCCTGATCCAGCCA
TGCCCGGTGTGTGAAGAAGGCCTTTGGTTGTAAAGCACTTTAAGCGAGGAGGAGGCTAC
CTGGATTAAACTCTAGGATAGTGGACGTTACTCGCAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGT
GCCAGCAGCCGCGGTAAATACAGAGGGTGCAGCGTAAATCGGATTTACTGGGCGTAAAGC
GTGCGTAGGCGGCTGATTAAGTCGGATGTGAAATCCCTGAGCTTAACCTTAGGAATGCAAT
TCGATACTGGTCAGCTAGAGTATGGGAGAGGATGGTAGAATTCAGGTTAGCGGTGAAA
TGC

2224 602nt

GCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGAATGGATTGAGAGC
TTGCTCTNATGAAGTTAGCGGGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCATAAGA
CTGGGATAACTCCGGGAACCGGGCTAATACCGGATAATATTTGAACTGCATGGTTTCG
AAATTGAAAGGCGGCTTCGGCTGTCACTTATGGATGGACCCGCGTCCGATTAGCTAGTTG
GTGAGGTAACGGCTCACCAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCAC
ACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGCAA
TGGACGAAAGTCTGACGAGCAACCGCCGCTGAGTGATGAAGGCTTTTCGGTTCGTA
TCTGTTGTAGGGAAGAACAAGTGTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAAC
CAGAAAGCCACGGCTAATACGTGCCAGCAGCCGCGTAAATACGTAGGTGGCAAGCGTTA
TCCGGAATTTATGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCC
ACGGCTCAACNTG

2236 608nt

GCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGAATGACGAGAAGCTTGCTTCT
CTGATTTAGCGGGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTGCCCTACAGATCGGGATAA
CTCAGGGAACCTGGGCTAATACCGGATAATCCTTCGAATCACATGGTTTGAAGTTGAAA
GGCGCTTCGGCGTCACTGTAGGATGGGCCCGCGTGCAATAGCTAGTTGGTGGGGTAAAG
GCCTACCAAGGCAACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACATTGGGACTGA
GACACGGCCAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTCCACAATGGACGAAAAGT
CTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGTTTTCGGATCGTAAAACCTCTGTTGTAAG
GGAAGAACAAGTACGTTAGGAAATGAACGTACCTTGACGGTACCTTATTAGAAAAGCCAG
GCTAATACGTGCCAGCAGCCGCGTAAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATT
GGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCG
TGGAGGGTCATTG

2289 717nt

GCTGGCGGCGGCTAACACATGCANGTCGAGGGGTAGAAAAGCTTGCTTTTTTGGAG
ACCGGGCAGGGTGAGTAACCGTATGCAACCTACCTTATACAGGGGAATAGCCGAAG
AAATTCGGATTAATGCTCCATGGTTTATCGATATGGCATCGTATTGATAATAAGATTTA
TCGGTATAAGATGGGCATGCGTATCATTAGCTAGTTGGTGGTAAACGGCATAACCAAGGC
AACGATGATTAGGGTCTGAGAGGGAGATCCCCACACTGGTACTGAGACACGGACCCAG

ACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGAAGGAATATTGGTCAATGGAGGCAACTCTGAACCAGCCA
TGCCGCGTGCAGGATGACGGTCTATGGATTGTAACTGCTTTTGTACAGGAAGAAACCT
CCCTACAGTAGGGACTTGACGGTACTGTAAGAATAAGGATCGGCTAACTCCCGTCCAGC
AGCCGCGGTAATACGGAGGATCCGAGCGTTATCCGGAATTTATTGGGTTTAAAGGGTTCG
TAGGCGGNNTTATNAAGTCAGTGGTAAATTTCTAGCTTAACTAGGACACTGCCATTGA
TACTGCNTAGCNTTGAATAATATGGAAGTAACTAGAATATGTNANTGTANCNGNTGAAAT
GCTTANATATTACATGNAATACCAATTGCNAAGGCAGGTTACTACNTATTTNTTNNNCCC

2388 627nt

GCTAGCGGCGCCTACACATGCAGTCGAGGGGTAGAAGAAGCTTGCTTTTTTGGAGAC
CGGCGCACGGGTGAGTAAACGCGTATGCAACCTACCTTATACAGGGGAATAGCCCGAAGAA
ATTCCGATTAATGCTCCATGGTTTATCGATATGGCATCGTATTGATAATAAAGATTTATC
GGTATAAGATGGGCATGCGTATCATTAGCTAGTTGGTGTGGTAAACGGCATAACCAAGGCAA
CGATGATTAGGGTCTCTGAGAGGGAGATCCCCACACTGGTACTGAGACACGGACCAGAC
TCTACGGGAGGCAGCAGTGAAGGAATATTGGTCAATGGAGGCAACTCTGAACCAGCCATG
CCGCGTGCAGGATGACGGTCTTATGGATTGTAACTGCTTTTGTACAGGAAGAAACCTCC
CTACGAGTAGGGACTTGACGGTACTGTAAGAATAAGGATCGGCTAACTCCCGTCCAGCAG
CCGCGGTAATACGGAGGATCCGAGCGTTATCCGGAATTTATTGGGTTTAAAGGGTTCGTAG
GCGGTCAGATAAGTCAGTGGTAAATTTCTTAGCTTAACTAGGACACGGCCATTGATACT
GTTTGACTTTGAATAGTATGGAAGTAACTA

2443 690nt

GCTGGCGCGTGTCTAACACATGCAAGTCGTAACGGACCGCTTGGGCGCTTTGCGT
TGGGTTGGTTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGAGTAACTGCCCTTCTTCGGGA
TAACGTTCCGAAACGGATGCTAATACCGGGTATTTACCTCGCATCGCATGGTGTGGGGTG
GAAAGTTTTTTCTGGTGGGGATGGGCTCGCGCCTATCAGCTTGTGGTGGGGTGAIG
GCCTACCAAGGCTTTGACGGGTAACCGCCTGAGAGGGTGACCGGTACATTGGGACTGA
GATACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTGCACAATGGGCGAAAGC
CTGATGCAGCGACGCGCGTGAAGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAACCTCTTTCGCTCA
TGGTCAAGGCTAGTTTTTGTCTAGTTGAGGGTAGTGGGTAAGAAGCGCCGGCTAACTA
CGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAAGGCGCGAGCGTGTCCGGAATTTATTGGGCGTAA
AGGCTTGTAGGCGCTTGTCCGCTCTGCCGTGAAAACCCACAGCTTAACTGTGGGCTTG
CGGTGGGTACGGGCTGGCTTGTAGTGGGTAGGGGAGACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTG
GAATGCNCAATATCAGGAGGAACACCGGTGGC

2476 1449nt

TGGCGGCAGGCTAACACATGCAAGTCTAACGGTAGCACAGAGGAGCTTGCTCCTCGTGTGAC
GAGTGGCGGACGGGTGAGTAATGCTGCGGAAACTGCCCGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAA
CGGTAGCTAATACCGCATAGTGTGCGAAGACCAAGAGGGGGACCTTCGGGCTCTTGCATC
GGATGTGCCAGATGGGATTATCTTGTGGTGGGTAATGGCTCACCAAGGCGACTATCCCTA
TCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCANCTGGATCTGAGACACGGTCCAGACTCACTACGGGAG
GCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAG
AAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTCAGCGGAGAGGAAGGCTATACGGTTAATAACCGTGT
GATTGACGTTACCCGCAAGAGAAGCACCCTTAACTCCGTGCCAGCAGCGCTGTAATACAGA
GGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCTGTCAAGTCGGA
TGTGAAATCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATTCGAAACTGGCAGGCTTGAGTCTTGTAGA
GGGGGGTAGAATTCAGGTGTAGCGGTGAAATCGGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGA
AGCGGCCCTCGGATGGCAAGACTGACCTCAGTGCAGAAAGCGTGGGGAGCAACAGGATTAG
ATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACAGTGTGACTTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCT
TCCGGAGCTAACCGGTTAAGTCGACCGCTGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAATG
AATTGACGGGGCCCGCAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGATGCAACCGCAAGAAACC
TTACCTGGTCTTGACATCCAGGAATTCGGCAGAGATGCTTAGTGCCTTCGGGAACCGTGAG
ACAGGTGCTGCATGGCTGTCTGACTCGTGTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAG
CGCAACCTTATCCTTTGTTGCCAGCGTCCGGCCGGAACTCAAAGGAGACTGCCAGTGATA
AACTGGAGGAAGTGGGGATGACGTCAAGTCAATCATGGCCCTTACGACCAGGGCTACACACGT
GCTACAATGGCATATACAAGAGAAGCGACCTCGGAGAGCAAGCGGACCTCATAAAGTATGT
CGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGGAT
CAGAATGCCACGGTGAATACGTTCCCGGCTTGTACACACCGCCCTCACACCATGGGAGTG
GGTTGCAAAAGAAGTAGGTAGCTTAACTTCGGGAGGGCGCTTACCCTTTGTGATTCATGAC

2511 655nt

CCGGCAGCGCGGACTTCCGGTCTGGCGGCGA
GTGGCGAACGGGTGAGTAATGTATCGGAACGTGCCTAGTAGCGGGGGATAACTACGCGAA
AGCGTAGCTAATACCGCATACGCCCTTCGGGGGAAAGCGGGGGACCTTCGGGCTCGCAC
TATTAGAGCGCCGATATCGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCTCACCAAGGCGAGC
ATCCGTAGCTGGTTTGGAGGACGACCGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTC
CTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTGGACAATGGGGCAACCTGATCCAGCCATCCC
GCGTGTGCGATGAAGGCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTTGGCAGGAAAGAAACGGCCTTG
GATAATACCTGAGGCAACTGACGGTACCTGCAGAATAAGCACCAGGCTAACTACGTGCCAG
CAGCCGCGGTAATACGTTAGGAGGACGACCGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTC
CAGGCGGTTCCGGAAAGAAAGATGTGAAATCCCAGAGCTTAACTTTGGAAGTGCATTTTTA
ACTACCGGCTAGAGTGTGTGAGGGAGGTTGAATTCGCGTGTAGCANTGAAATGCNT
AAAGATGCGGAGGANCCCNATGGC

2535 719nt

CCGGTGA AAGCAGAGCTTGCTCTGTGGA
TCAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGAGCAACCTGCCCGGACTCTGGGATAAGCGCT
GGAAACGGCGTCTAATACTGGATACGAGCTGCGACCGCATGGTCAGCAGTTGGAAAGATT
TTTCGGTCTGGGATGGGCTCGCGGCCTATCAGCTTGTGGTGAGGTAATGGCTACCAAG
GGTTCGACGGGTAGCCCGCTGAGAGGGTGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCC
AGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCCTGATGCAG
CAACGCCCGGTGAGGGACGACGGCCCTTCGGGTTGTA AACTCTTTAGCAGGGAAGAAGC
GAAAGTGACGGTACCTGCAGAAAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCCGGTAAT
ACGTAGGGCGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGGCGTTTGTCT
CGCTCTGCTGTGAAATCTGGGGGCTCAACCCCCAGCCTGCAGTGGGTACGGGCAGACTAG
AGTGCAGTAGGGGAGATTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGGAATGCNCANATATCAGGAGG
AACACCGATGGCGAAGGCAGATCTCTGGGCCCTAACTGACNCTNAGGAGCNAAAGGNTN
GGGGAGCAAACAGGCTTANATACCCTGGTAT

6.2. Sequenzen des infB Genes und die translatierten Proteinsequenzen

K. pneumoniae

CACGTCGAAACCGACAACGGCATGATCACCTTCCTGGATACCCCGGGCC
ACGCCGCGTTTACCTCCATGCGTGCTCGTGGCGCGCAGGCGACGGATATCGTGGTTCTGG
TGGTGGCGGCAGACGACGGCGTGATGCCGAGACTATCGAAGCTATCCAGCACGCTAAAG
CGGCGCAGGTACCGGTGTAGTAGCGGTGAACAAGATCGATAAGCCAGAAGCCGATCCGG
ATCGCGTGAAGAACAAGTGTCCAGTACGGCATCCTGCCGGAAGAGTGGGGCGGCGAGA
GCCAGTTCGTCCACGTTTCCCGGAAAGCGGGTACCGGCATCGACGACCTGCTGGACGCGA
TCCTGCTGCAGGCTGAAGTCTTGAGCTGAAAGCGGTCGCAACGGTATGGCGAGCGGCG
CGGTCATCGAATCCTTCCCTTGATAAAGTTCGTGGTCCGGTAGCTACCGTCTGTTCCGCG
AAGGTACTCTGCACAAGGGCGACATTGTTCTGTGCGGCTTC

→HVETDNGMITFLDTPGHAAFTSMRARGAQATDIVVLVVAADDGVMPQTIEAIQHAKAAQVP
VVVAVNKIDKPEADPDRVKNELSQYGI LPEEWGGESQFVHVSAKAGTGIDLLDAILLQAEVL
ELKAVRNGMASGAVIESFLDKGRGPVATV LVRREGTLHKGDIVLCGF

C. freundii

CACGTTGAAACTGACAACGGTATGATCACCTTCCTGGATACCCCGGGTC
ACGCCGCGTTTACCTCCATGCGTGCTCGTGGTGTCTCAGGCAACGGATATCGTTGTTCTGG
TTGTTGCAGCAGACGACGGCGTGATGCCACAGACCATCGAAGCTATCCAGCACGCGAAAG
CGGCGGGTGTGCCGGTGGTGGTGCAGTCAACAAAATCGATAAGCCGGAAGCGGATCCGG
ATCGCGTTAAAAACGAACTGTCCAGTACGGCATCATGCCGGAAGAGTGGGGCGGCGAGA
GCCAATTCGTTACGTTTCTGCNAAAGCGGGTACCGGTATCGACNAGCTGCTGGACGCTA
TCCTGCTGCAGGCCGAAGTACTGGAAGTGAAGCTGTGCGTAAAGGTATGGCGAGCGGTTG
CGGTTATCGAATCCTTCCCTGGATAAAGTTCGTGGTCCGGTTGCTACCGTACTGGTGCCTG
AAGGTACGCTGCACAAGGGCGACATCGTACTGTGTGGCTTC

→HVETDNGMITFLDTPGHAAFTSMRARGAQATDIVVLVVAADDGVMPQTIEAIQHAKAAGVP
VVVAVNKIDKPEADPDRVKNELSQYGI MPEEWGGESQFVHVSAKAGTGIDLLDAILLQAEVLE
LKAVRNGMASGAVIESFLDKGRGPVATV LVRREGTLHKGDIVLCGF

E. cloacae

CACGTAGAAACCGACAACGGTATGATCACCTTCCTGG
ATACCCAGGCCACGCCGCTTTACCTCAATGCGTGCTCGTGGTGTCTCAGGCGACAGATA
TCGTTGTTCTGGTGTGTTGCTGCAGACGATGGCGTGATGCCACAGACCATCGAAGCTATCC
AGCACGCGAAAGCGGCGGGTGTCCCGGTTGTGGTTGCAGTGAACAAGATCGATAAGCCAG
AAGCGGATCCAGATCGTGTAAAAACGAACTGTCCAGTACGGCATCCTGCCAGAAGAGT
GGGGCGGTGAAAGCCAGTTTGTACACGTGTCTGCNAAAGCAGGTAAGTGTATCGACNAGC
TGCTGGACGCGATCCTGCTGCAGGCTGAAGTCTGAGAGCTGAAAGCGATCCGTAAACGGTA
TGGCGAGCGGCGGGTTATCGAATCCTTCCCTGGATAAAGCCGTTGGCCCGGTGGCTACCG
TTCTGGTTCGCGAAGGTACACTGCATAAAGCGGATATCCTCTGTGTGGTTTTT

→HVETDNGMITFLDTPGHAAFTSMRARGAQATDIVVLVVAADDGVMPQTIEAIQHAKAAGVP
VVVAVNKIDKPEADPDRVKNELSQYGI LPEEWGGESQFVHVSAKAGTGIDLLDAILLQAEVLE
LKAIRNGMASGAVIESFLDKGRGPVATV LVRREGTLHKGDIVLCGFY

2476

CACGTCGAAACCGAAAACGGCATGATCACCTTCCTGGATACCCCGGG
CCACGCCGCGTTTACCGCATGCGTGACAGTGGTGCAGGCAACGGATATCGTGGTCTCT
GGTTGTGGCTGCTGACGATGGCGTGATGCCGCAACAATCGAAGCTATCCAGCACGCAAA
AGCGGCGCAAGTACCGGTTGTTGTTGCAGTGAACAATAATCGATAAGCCAGAAGCGGATCC
GGATCGCGTTAAGAATGAATTGTCCCAATACGGCATTATGCCGGAAGAGTGGGGCGGCGA
AAGCCAGTTCGTTATGATGATGCAAAAAGCGGGTACCGGTATCGACNAACTGCTCGACGC
TATCCTGCTGCAGANTGAGGTTCTTGAGCTGAAAGCTATCCGTAACCGGTATGGCGAGCGG
TGTTGTGATCNAATCCTTCCCTGGATAAAGTTCGTGGTCCGGTTGCTTCCGTTCTGGTACG
CGAAGGTACTCTGCATAAAGCGGATATCGTTCTGTGTGGCTTT

→HVETENGMITFLDTPGHAAFTAMRARGAQATDIVVLVVAADDGVMPTIEAIQHAKAAQVP
 VVVAVNKIDKPEADPDRVKNELSQYGIMPEEWGGESQFVHVSAGAGTGIDLLDAILLQAEVLEL
 KAIRTGMASGVVI SFLDKGRGPVAVSLVREGTLHKGDIVLCGF

P. diazotrophicus

CACGTCGAAACCGAAAACGGCATGATCACCTTCCTGGATACCCCG
 GGCACGCCGCGTTTACC CGCATGCGTGCACGTGGTGCAGGCAACGGATATCGTGGTT
 CTGGTTGTGGCTGCTGACGATGGCGTGATGCCGCAAAACAATCGAAGCTATCCAGCACGCA
 AAAGCGGCGCAGGTACC GGTTGTTGTTGCAGTGAACAAAATCGATAAGCCAGAAGCGGAT
 CCGGATCGCGTTAAGAATGAATTGTCCCAGTACGGCATATGCCGGAAGAGTGGGGCGGC
 GAAAGCCAGTTCGTTTCATGTATCTGCAAAAGCGGGTACCGGTATCGACGAAGTCTCGAC
 GCTATCCTGCTGCAGGCTGAGGTTCTTGAGCTGAAAGCTATCCGTACCGGTATGGCGAGC
 GGTGTTGTGATCGAATCCTTCCTGGATAAAGGTCGTGGTCCGGTTGCTTCCGTTCTGGTA
 CGCGAAGTACTCTGCATAAAGCGGATATCGTTCTGTGTGGCTTT

→HVETENGMITFLDTPGHAAFTAMRARGAQATDIVVLVVAADDGVMPTIEAIQHAKAAQVP
 VVVAVNKIDKPEADPDRVKNELSQYGIMPEEWGGESQFVHVSAGAGTGIDLLDAILLQAEVL
 ELKAIRTGMASGVVIESFLDKGRGPVAVSLVREGTLHKGDIVLCGF

Y. regensburgei

CACGTAGANCCGATAACGGCATGATCACCTTCCTGGATACCCCGG
 CCACGCCGCGTTTACCTCTATGCGTGCCTCGTGGTGCAGGCGACGGANATCGTGGTTCT
 GGTGTCGCGGCTGACGATGGCNTGATGCCACAGACCATTGAAGCAATCCAGCACGCNAA
 AGCGGCGCAGGTCCCTCTGGTAGTTGCAGTCAACAAAATCNATAAACCGGANGCTGACCT
 GGATCGCGTTAAAAACNAACTGTCTCAGTACGGCNTTATGCCGAGGAGTGGGGCGGCGA
 AGCGCAGTTCATCCAGTATCTGCAAAAGCAGGTACCGGTATTGATGACCTGCAGAACGC
 TATCCTGCTGCAGGCTGAAGTTCTGGAGCTGANAGCGGTTCCGCAAAAGGTATGGCAAGCGG
 TGCAGTCAACNAATCCTTCCTGGATAAAGGTCNTGGTCCGGTGGCAACCGTTCTGGTTCCG
 CGAAGGTACNCTGANCAAAAGGCNACNTCTTCTNTGTGGCTTC

→HVDNGMITFLDTPGHAAFTSMRARGAQATIVVLVVAADDGMPQTIEAIQHAKAAQVPLVVA
 VNKIKPADLDRVKNLSQYGMPEEWGGEAQFIPVSAKAGTGIDLLNAILLQAEVLELAVRKG
 ASGAVISFLDKGGPVATVLVREGTLKGLCGF

clustalw.aln

CLUSTAL W (1.81) multiple sequence alignment

```

_C._freundii      HVETDNGMITFLDTPGHAAFTSMRARGAQATDIVVLVVAADDGVMPTIEAIQHAKAAQV
_E._clocae       HVETDNGMITFLDTPGHAAFTSMRARGAQATDIVVLVVAADDGVMPTIEAIQHAKAAQV
_2476            HVETENGMITFLDTPGHAAFTAMRARGAQATDIVVLVVAADDGVMPTIEAIQHAKAAQV
_P._diazotrophicus HVETENGMITFLDTPGHAAFTAMRARGAQATDIVVLVVAADDGVMPTIEAIQHAKAAQV
_K._pneumoniae  HVETDNGMITFLDTPGHAAFTSMRARGAQATDIVVLVVAADDGVMPTIEAIQHAKAAQV
_Y._regensburgei --HVDNGMITFLDTPGHAAFTSMRARGAQATIVVLVVAADDG--MPQTIEAIQHAKAAQV
                  ..:*****:***** :*:*.* *. ***** *
```

```

_C._freundii      PVVVAVNKIDKPEADPDRVKNELSQYGIMPEEWGGESQFVHVSAGAGTGIDLLD-AILLQ
_E._clocae       PVVVAVNKIDKPEADPDRVKNELSQYGILPEEWGGESQFVHVSAGAGTGIDLLD-AILLQ
_2476            PVVVAVNKIDKPEADPDRVKNELSQYGIMPEEWGGESQFVHVSAGAGTGIDLLD--AILL
_P._diazotrophicus PVVVAVNKIDKPEADPDRVKNELSQYGIMPEEWGGESQFVHVSAGAGTGIDLLDAILLQ
_K._pneumoniae  PVVVAVNKIDKPEADPDRVKNELSQYGILPEEWGGESQFVHVSAGAGTGIDLLDAILLQ
_Y._regensburgei PLVVAVNKIKP--ADLDRVKNLSQYG--MPEEWGGEAQFIPVSAKAGTGIDLLNAILLQ
*:*****.  ** ***** . :*****:**: ***** * :*
```

```

_C._freundii      AEVLELKA VRKGMASGAVIESFLDKGRGPVATVLVREGTLHKGDIVLCGF
_E._clocae       AEVLELKAIRNGMASGAVIESFLDKGRGPVATVLVREGTLHKGDILCGFY
_2476            QEVLELKAIRTGMASGVVIES-FLDKGRGPVAVSLVREGTLHKGDIVLCGF
_P._diazotrophicus AEVLELKAIRTGMASGVVIESFLDKGRGPVAVSLVREGTLHKGDIVLCGF
_K._pneumoniae  AEVLELKA VRKGMASGAVIESFLDKGRGPVATVLVREGTLHKGDIVLCGF
_Y._regensburgei AEVLELAVRKG--MASGAVISFLDKG-GPVATVLVREGTLKG---LCGF
                  ***** . : :. :. : ***** *****:*****: :
```

```

_2476      CACGTCGAAAACCGAAAACGGCATGATCACCTTCCTGGATACCCCGGGCCACGCCGCGTTT
_P._diazotrophicus  CACGTCGAAAACCGAAAACGGCATGATCACCTTCCTGGATACCCCGGGCCACGCCGCGTTT
_K._pneumoniae     CACGTCGAAAACCGAAAACGGCATGATCACCTTCCTGGATACCCCGGGCCACGCCGCGTTT
_C._freundii       CACGTTGAAACTGACAACGGTATGATCACCTTCCTGGATACCCCGGGTCACGCCGCGTTT
E._cloacae        CACGTAGAAAACCGAAAACGGTATGATCACCTTCCTGGATACCCCGGGCCACGCCGCGTTT
_Y._regensburgei  CACGTAGAMNCCGATAACGGCATGATCACCTTCCTGGATACCCCGGGCCACGCCGCGTTT
*****

_2476      ACCGCGATGCGTGCACGTGGTGGCGAGGCAACGGATATCGTGGTTCTGGTTGTGGCTGCT
_P._diazotrophicus  ACCGCGATGCGTGCACGTGGTGGCGAGGCAACGGATATCGTGGTTCTGGTTGTGGCTGCT
_K._pneumoniae     ACCTCCATGCGTGCCTCGTGGCGCGCAGGCGACGGATATCGTGGTTCTGGTGGTGGCGCA
_C._freundii       ACCTCCATGCGTGCCTCGTGGTGCCTCAGGCAACGGATATCGTGGTTCTGGTTGTGCAGCA
E._cloacae        ACCTCAATGCGTGCCTCGTGGTGCCTCAGGCGCACAGATATCGTGGTTCTGGTTGTGCAGCA
_Y._regensburgei  ACCTCTATGCGTGCCTCGTGGTGCCTCAGGCGACGGANATCGTGGTTCTGGTTGTCCGGCT
***

_2476      GACGATGGCGTGATGCCGCAAAACAAATCGAAGCTATCCAGCACGCAAAAGCGGCGCAAGTA
_P._diazotrophicus  GACGATGGCGTGATGCCGCAAAACAAATCGAAGCTATCCAGCACGCAAAAGCGGCGCAAGTA
_K._pneumoniae     GACGACGGCGTGATGCCGCGAGACTATCGAAGCTATCCAGCACGCTAAAGCGGCGCAAGTA
_C._freundii       GACGACGGCGTGATGCCACAGACCATCGAAGCTATCCAGCACGCGAAAGCGGCGGCTGTG
E._cloacae        GACGATGGCGTGATGCCACAGACCATCGAAGCTATCCAGCACGCGAAAGCGGCGGCTGTG
_Y._regensburgei  GACGATGGCGTGATGCCACAGACCATCGAAGCTATCCAGCACGCGAAAGCGGCGGCTGTG
*****

_2476      CCGGTTGTTGTTGCAGTGAACAAAATCGATAAGCCAGAAGCGGATCCGGATCCGGTTAAG
_P._diazotrophicus  CCGGTTGTTGTTGCAGTGAACAAAATCGATAAGCCAGAAGCGGATCCGGATCCGGTTAAG
_K._pneumoniae     CCGGTGGTAGTAGCGGTGAACAAGATCGATAAGCCAGAAGCGGATCCGGATCCGGTGAAG
_C._freundii       CCGGTGGTGGTGCAGTGAACAAAATCGATAAGCCGGAAGCGGATCCGGATCCGGTTAAA
E._cloacae        CCGGTTGTTGTTGCAGTGAACAAGATCGATAAGCCAGAAGCGGATCCAGATCGTGTAAA
_Y._regensburgei  CCTCTGGTACTTGCAGTGAACAAAATCNATAAACCGGANGCTGACCTGGATCCGGTTAAA
**

_2476      AATGAATTGTCCCAATACGGCATTATGCCCGAAGAGTGGGGCGGCAAGCCAGTTCGTT
_P._diazotrophicus  AATGAATTGTCCCAATACGGCATTATGCCCGAAGAGTGGGGCGGCAAGCCAGTTCGTT
_K._pneumoniae     AACGAACTGTCCCAATACGGCATTCTGCCGGAAGAGTGGGGCGGCGAGCCAGTTCGTT
_C._freundii       AACGAACTGTCCCAATACGGCATTATGCCCGAAGAGTGGGGCGGCGAGCCAAATTCGTT
E._cloacae        AACGAACTGTCCCAATACGGCATTCTGCCGGAAGAGTGGGGCGGTAAGCCAGTTCGTT
_Y._regensburgei  AACNAACTGTCTCAGTACGCCNTTATGCCCGAGCAGTGGGGCGGCAAGCCAGTTCATC
**

_2476      CATGTATCTGCAAAAAGCGGATACCGGTATCGACNAACTGCTCGACGCTATCCTGCTGCAG
_P._diazotrophicus  CATGTATCTGCAAAAAGCGGATACCGGTATCGACNAACTGCTCGACGCTATCCTGCTGCAG
_K._pneumoniae     CACGTTTCCGCGAAAAGCGGATACCGGCATCGACGACCTGCTCGACGCGATCCTGCTGCAG
_C._freundii       CACGTTTCTGCNAAAAGCGGATACCGGTATCGACNAGCTGCTGGACGCTATCCTGCTGCAG
E._cloacae        CACGTGCTGCNAAAAGCAGCTACTGGTATCGACNAGCTGCTGGACGCGATCCTGCTGCAG
_Y._regensburgei  CCAGTATCTGCAAAAAGCAGCTACTCGGTATTCGACCTGCTGAACGCTATCCTGCTGCAG
*

_2476      ANTGAGGTTCTTGAGCTGAAAGCTATCCGTACCGGTATGGCGAGCGGTTGTGATCNAA
_P._diazotrophicus  ANTGAGGTTCTTGAGCTGAAAGCTATCCGTACCGGTATGGCGAGCGGTTGTGATCNAA
_K._pneumoniae     GCTGAAAGTTCTTGAGCTGAAAGCGGTCGCCAACGGTATGGCGAGCGGCGGTCATCGAA
_C._freundii       GCCGAACTACTGGAAGTGAAGCTGTGGTAAAGGTATGGCGAGCGGTCGGTTATCGAA
E._cloacae        GCTGAAAGTTCTGGAGCTGAAAGCGGATCCGTAACGGTATGGCGAGCGGCGGTTATCGAA
_Y._regensburgei  GCTGAAAGTTCTGGAGCTGANAGCGGTTCCGAAAGGTATGGCAAGCGGTCAGTATCNAA
**

_2476      TCCTTCCTGGATAAAGGTCGTGGTCCGGTTGCTTCCGTTCTGGTACCGGAAGGTACTIONG
_P._diazotrophicus  TCCTTCCTGGATAAAGGTCGTGGTCCGGTTGCTTCCGTTCTGGTACCGGAAGGTACTIONG
_K._pneumoniae     TCCTTCCTGGATAAAGGTCGTGGTCCGGTACGCTACCCTTCTGGTCCGGAAGGTACTIONG
_C._freundii       TCCTTCCTGGATAAAGGTCGTGGTCCGGTTGCTACCCTACTGGTCCGGAAGGTACTIONG
E._cloacae        TCCTTCCTGGATAAAGGTCGTGGTCCGGTACCCTTCTGGTCCGGAAGGTACTIONG
_Y._regensburgei  TCCTTCCTGGATAAAGGTCGTGGTCCGGTGGCAACCGTTCGTTCCGGAAGGTACTIONG
*****

_2476      CATAAAGGCGATATCGTTCTGTGTGGCTTT
_P._diazotrophicus  CATAAAGGCGATATCGTTCTGTGTGGCTTT
_K._pneumoniae     CACAAGGGCGACATGTTCTGTGTGGCTTC
_C._freundii       CACAAGGGCGACATCGTACTGTGTGGCTTC
E._cloacae        CATAAAGGCGATATCNCTCTGTGTGGTTTC
_Y._regensburgei  ANCAAAGGCGACNTCNCTTCTGTGTGGCTTC
**

```

7. Literatur

Albert, R. A., Archambault, J., Lempa, M. & [Enter number of additional authors] other authors (2007). Proposal of *Viridibacillus* gen. nov. and reclassification of *Bacillus arvi*, *Bacillus arenosi* and *Bacillus neidei* as *Viridibacillus arvi* gen. nov., comb. nov., *Viridibacillus arenosi* comb. nov. and *Viridibacillus neidei* comb. nov. *Int J Syst Bacteriol* **57**, 2729-2737.

Altenburger, P., Kämpfer, P., Akimov, V. N., Lubitz, W. & Busse, H. J. (1997). Polyamine distribution in actinomycetes with group B peptidoglycan and species of the genera *Brevibacterium*, *Corynebacterium* and *Tsukamurella*. *Int J Syst Bacteriol* **47**, 270-277.

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

Ash, C., Farrow, J. A., Dorsch, M., Stackebrandt, E. & Collins, M. D. (1991). Comparative analysis of *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and related species on the basis of reverse transcriptase sequencing of 16S rRNA. *Int J Syst Bacteriol* **41**, 343-346.

Ballerstedt, H., Volkers, R. J., et al. (2007). Genomotyping of *Pseudomonas putida* strains using *P. putida* KT2440-based high-density DNA microarrays: implications for transcriptomics studies. *Appl Microbiol Biotechnol* **75**, 1133-42.

Bisno, A.L., Gerber, M.A., Gwaltney, J.M., Kaplan, E.L. & Schwartz, R.H. (2002). Practice Guidelines for the Diagnosis and Management of Group A Streptococcal Pharyngitis. *Clin Infect Dis* **35**, 113-125.

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

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

Cherif, A., Borin, S., Rizzi, A., Ouzari, H., Boudabous, A. & Daffonchio, D. (2003). *Bacillus anthracis* diverges from related clades of the *Bacillus cereus* group in 16S-23S ribosomal DNA intergenic transcribed spacers containing tRNA genes. *Appl Environ Microbiol* **69**, 33-40.

Chun, J., Lee, J.-H., Jung, Y., Kim, M., Kim, S., Kim, B. K. & Lim, Y. W. (2007). EzTaxon: a web-based tool for the identification of prokaryotes based on 16S ribosomal RNA gene sequences. *Int J Syst Evol Microbiol* **57**, 2259-2261.

Clapper, W. E. & Meade, G. H. (1963). NORMAL FLORA OF THE NOSE, THROAT, AND LOWER INTESTINE OF DOGS. *J Bacteriol* **85**, 643-648.

Cogen, A.L., Nizet, V. & Gallo, R.L. (2008). Skin microbiota: a source of disease or defence? *Br J Dermatol* **158**, 442-455.

Cypionka, H. (2010). Grundlagen der Mikrobiologie, 4. Edition, Springer Heidelberg.

Ehling-Schulz, M., Fricker, M. & Scherer, S. (2004). Identification of emetic toxin producing *Bacillus cereus* strains by a novel molecular assay. *FEMS Microbiol Lett* **232**, 189-195.

Ehling-Schulz, M., Vukov, N., Schulz, A., Shaheen, R., Andersson, M., Martlbauer, E. & Scherer, S. (2005). Identification and partial characterization of the nonribosomal peptide synthetase gene responsible for cereulide production in emetic *Bacillus cereus*. *Appl Environ Microbiol* **71**, 105-113.

Esposito, S., Blasi, F., Bosis, S., Droghetti, R., Faelli, N., Lastrico, A. & Principi, N. (2004). Aetiology of acute pharyngitis: the role of atypical bacteria. *J Med Microbiol* **53**, 645-51.

Etchebehere, C., Errazquin, M. I., Dabert, P., Moletta, R. & Muxi, L. (2001). *Comamonas nitratorans* sp. nov., a novel denitrifier isolated from a denitrifying reactor treating landfill leachate. *Int J Syst Evol Microbiol* **51**, 977-983.

Gillings, M. & Holley, M. (1997). Repetitive element PCR fingerprinting (rep-PCR) using enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC) primers is not necessarily directed at ERIC elements. *Lett Appl Microbiol* **25**, 17-21.

Goodfellow, M. & Collins, M.D. (1979). Fatty Acid and Polar Lipid Composition in the Classification of *Kurthia*. *J Appl Microbiol* **48**, 269-276.

Grice, E.A., Kong, H.H., Renaud, G., Young, A.C., Bouffard, G.G., Blakesley, R.W., Wolfsberg, T.G., Turner, M.L & Segre J.A. (2008). A diversity profile of the human skin microbiota. *Genome Research* **18**, 1043-1050.

Guarner, F. & Malagelada J.R. (2003). Gut flora in health and disease, *Lancet* **361**, 512-519.

Hamana K. & Matsuzaki S. (1992). Polyamines as a chemotaxonomic marker in bacterial systematics. *Crit Rev Microbiol.***18**, 261-83.

Hauser, E., Kämpfer, P. & Busse, H.-J. (2004). *Pseudomonas psychrotolerans* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* **54**, 1633-1637.

Hedegaard, J., Steffensen, S. A., Nørskov-Lauritsen, N., Mortensen, K. K. & Sperling-Petersen, H. U. (1999). Identification of *Enterobacteriaceae* by partial sequencing of the gene encoding translation initiation factor 2. *Int J Syst Bacteriol* **49**, 1531-1538.

Helgason, E., Okstad, O. A., Caugant, D. A., Johansen, H. A., Fouet, A., Mock, M., Hegna, I. & Kolsto, A. B. (2000). *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis* -one species on the basis of genetic evidence. *Appl Environ Microbiol* **66**, 2627-2630.

- Henderson, I., Duggleby, C.J. & Turnbull P.C.B. (1994).** Differentiation of *Bacillus anthracis* from other *Bacillus cereus* group bacteria with the PCR. *Int J Syst Bacteriol* **44**, 99-105.
- Hoquet, F., Higgins, R., Lessard, P., Vrins, A. & Marcoux, M. (1985).** Comparison of the bacterial and fungal flora in the pharynx of normal horses and horses affected with pharyngitis. *Can Vet J* **26**, 342-346.
- Kämper, P. & Kroppenstedt, R. M. (1996).** Numerical analysis of fatty acid patterns of coryneform bacteria and related taxa. *Can J Microbiol* **42**, 989-1005.
- Kämper, P., Steiof, M. & Dott, W. (1991).** Microbiological characterization of a fuel-oil contaminated site including numerical identification of heterotrophic water and soil bacteria. *Microb Ecol* **21**, 227-251.
- Kim, W., Hong, Y., Yoo, J., Lee, W., Choi, C. & Chung, S. (2001).** Genetic relationships of *Bacillus anthracis* and closely related species based on variable-number tandem repeat analysis and BOX-PCR genomic fingerprinting. *FEMS Microbiol Lett*, **207**, 21-27.
- Koeth, T., Versalovic, J. & Lupski, J. R. (1995).** Differential subsequence conservation of interspersed repetitive *Streptococcus pneumoniae* BOX elements in diverse bacteria. *Genome Res* **5**, 408-418.
- Lane, D. J. (1991).** 16S/23S rRNA sequencing. In Stackebrandt, pp. 115-175. Edited by M. E. & Goodfellow, *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*, Chistester: Wiley.
- Langer, S. (2009).** Proposal for molecular tools for the epidemiology of Contagious Bovine Pleuro Pneumoniae and classification of unknown *Mycoplasma* sp. isolated from *Struthio camelus*. *Diplomarbeit*.
- Louws, F. J., Fulbright, D. W., Stephens, C. T. & de Bruijn, F. J. (1994).** Specific genomic fingerprints of phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas* pathovars and strains generated with repetitive sequences and PCR. *Appl Environ Microbiol* **60**, 2286-2295.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., Dunlap, P.V. & Clark, D.P. (2009).** *Biology of Microorganisms*, 12th edition, Pearson, Benjamin Cummings, San Francisco.
- Mannheim, W., Stieler, W. & Zabel, R. (1978).** Taxonomic Significance of Respiratory Quinones and Fumarate Respiration in *Actinobacillus* and *Pasteurella*, *Int J Syst Bacteriol* **28**, 7-13
- Minnikin, D. E., Alshamaony, L. & Goodfellow, M. (1975).** Differentiation of *Mycobacterium*, *Nocardia*, and related taxa by thin-layer chromatographic analysis of whole-organism methanolysates. *J Gen Microbiol* **88**, 200-204.

- Norskov-Lauritsen, N., Christensen, H., Okkels, H., Kilian, M. & Bruun, B. (2004).** Delineation of the genus *Actinobacillus* by comparison of partial infB sequences. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**, 635-644.
- Nubel, U., Schmidt, P. M., Reiss, E., Bier, F., Beyer, W. & Naumann, D. (2004).** Oligonucleotide microarray for identification of *Bacillus anthracis* based on intergenic transcribed spacers in ribosomal DNA. *FEMS Microbiol Lett* **240**, 215-23.
- Oyaizu, H. & Komagata, K. (1983).** Grouping of *Pseudomonas* species on the basis of cellular fatty acid composition and the quinone system with special reference to the existence of 3-hydroxy fatty acids. *J Gen Appl Microbiol* **29**, 17-40.
- Pearson, W.R. and Lipman, D.J. (1988).** Improved tools for biological sequence comparison. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 2444-2448.
- Ramirez, A. S., Naylor, C. J., Pitcher, D. G. & Bradbury, J. M. (2008).** High inter-species and low intra-species variation in 16S-23S rDNA spacer sequences of pathogenic avian mycoplasmas offers potential use as a diagnostic tool. *Vet Microbiol* **128**, 279-287.
- Rheims, H., Fruhling, A., Schumann, P., Rohde, M. & Stackebrandt, E. (1999).** *Bacillus silvestris* sp. nov., a new member of the genus *Bacillus* that contains lysine in its cell wall. *Int J Syst Bacteriol* **49**, 795-802.
- Scherer, P. & Kneifel, H. (1983).** Distribution of Polyamines in Methanogenic Bacteria. *J Bacteriol* **154**, 1315-1322.
- Schleifer, K.H. (2009).** Classification of *Bacteria* and *Archaea*: Past, present and future. *Syst Appl Microbiol* **32**, 533-543.
- Schleifer, K.H. & Kloos, W.E. (1975).** Isolation and Characterization of Staphylococci from Human Skin. *Int J Syst Bacteriol* **25**, 50-61.
- Sears, C.L. (2001).** A dynamic partnership: Celebrating our gut flora. *Anaerobe* **11**, 247-251.
- Shaw, S. & Keddie, R. M. (1983).** A numerical taxonomic study of the genus *Kurthia* with a revised description of *Kurthia zopfii* and a description of *Kurthia gibsonii* sp. nov. . *Syst Appl Microbiol* **4**, 253-276.
- Somerville, H.J. and Jones, M.L. (1972).** DNA Competition Studies within the *Bacillus cereus* Group of Bacilli. *J Gen Microbiol* **73**, 257-265.
- Song, J., Choo, Y.-J. & Cho, J.-C. (2008).** *Perlucidibaca piscinae* gen. nov., sp. nov., a freshwater bacterium belonging to the family *Moraxellaceae*. *Int J Syst Evol Microbiol* **58**, 97-102.
- Stackebrandt, E. & Goebbel, B.M. (1994).** Taxonomic Note: A Place for DNA-DNA Reassociation and 16s rRNA Sequence Analysis in the Present Species Definition in Bacteriology. *Int J Syst Bacteriol* **44**, 846-849.

Stolz, A., Busse, H.J. & Kämpfer, P. (2007). *Pseudomonas knackmussii* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* **57**, 572-576.

Stolz, A., Burger, S., Kuhm, A., Kampfer, P. & Busse, H. J. (2005). *Pusillimonas noertemannii* gen. nov., sp. nov., a new member of the family *Alcaligenaceae* that degrades substituted salicylates. *Int J Syst Evol Microbiol* **55**, 1077-81.

Szczuka, E. & Kaznowski, A. (2004). 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* **42**, 220-228.

Tamaoka, J., Ha, D. & Komagata, K. (1987) Reclassification of *Pseudomonas acidovorans* den Dooren de Jong 1926 and *Pseudomonas testosteroni* Marcus and Talalay 1956 as *Comamonas acidovorans* comb. nov. and *Comamonas testostersni* comb. nov., with an Emended Description of the Genus *Comamonas*, *Int J Syst Bacteriol* **37**, 52-59.

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

Vancanneyt, M., Segers, P., Torck, U., Hoste, B., Bernardet, J.-F., Vandamme, P. & Kersters, K. (1996). Reclassification of *Flavobacterium oderatum* (Stutzer 1929) Strains to a New Genus, *Myroides*, as *Myroides odoratus* comb. nov. and *Myroides odoratimimus* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* **46**, 926-932.

Ventosa, A., Marquez, M. C., Kocur, M. & Tindall, B. J. (1993). Comparative study of "*Micrococcus* sp." strains CCM 168 and CCM 1405 and members of the genus *Salinicoccus*. *Int J Syst Bacteriol* **43**, 245-248.

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

Wade, J.C., Schimpff, S.C., Newman, K.A. & Wiernik P.H. (1982). *Staphylococcus epidermidis*: An Increasing Cause of Infection in Patients with Granulocytopenia. *Ann Int Med* **4**, 503-508.

Wainwright, M. (1997). Extreme pleomorphism and the bacterial life cycle: A forgotten controversy. *Perspectives Biol Med*, **40**, 407-414

Wieser, M. & Busse, H.J. (2000). Rapid identification of *Staphylococcus epidermidis*, *Int J Syst Evol Microbiol* **50**, 1087-1093.

Woese, C. (1987). Microbiological Reviews. *Bacterial Evolution* **51**, 221-271.

Worliczek, H. L., Kampfer, P., Rosengarten, R., Tindall, B. J. & Busse, H. J. (2007). Polar Lipid and fatty acid profiles - Re-vitalizing old approaches as a modern tool for the classification of mycoplasmas. *Syst Appl Microbiol* **30**, 355-370.

Yokota, A., Akagawa-Matsushita, M., Hiraishi, A., Katayama, Y., Urakami, T. & Yamasato, K. (1992). Distribution of quinone systems in microorganisms: Gram-negative eubacteria. *Bull JFCC* **8**, 136–171.

Ziemke, F., Hofle, M. G., Lalucat, J. & Rossello-Mora, R. (1998). Reclassification of *Shewanella putrefaciens* Owen's genomic group II as *Shewanella baltica* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* **48 Pt 1**, 179-186.

II Curriculum vitae

Name: Alexa Frischmann
Geburtsdatum: 8. Juli 1985
Geburtsort: Klagenfurt
Nationalität: Österreich

Ausbildung:

- 1991-1995 Volksschule Wien
- 1995-2003 AHS, neusprachlich
- Juni 2003 Matura
- 2003-2004 Studium der Lebensmittel- und Biotechnologie Universität für Bodenkultur
- ab 2004 Studium der Biologie Universität Wien
Spezialisierung: molekulare Mikrobiologie
Wahlfächer: systematische Mikrobiologie und Parasitologie
- ab 2009 Diplomarbeit im Labor H.-J. Busse, Veterinärmedizinische Universität Wien
- Sept. 2009 Tutor bei den Übungen „Molekulare Systematik“, Universität Wien
- Sept. 2010 Tutor bei den Übungen „Molekulare Systematik“, Universität Wien

III Manuskripte

Posterpräsentationen:

„Classification of bacterial commensals isolated from veterinary specimens“, Alexa Frischmann, Alexander Knoll, Friederike Hilbert and Hans-Jürgen Busse. 3. Gemeinsamen Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM) und der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM), Hannover, Deutschland, März 2010.

„Examinations to clarify species identity of bacterial commensals in veterinary clinical specimens“, Alexa Frischmann, Friederike Hilbert and Hans-Jürgen Busse. 32. Jahrestagung der ÖGHMP, Wien, Österreich, Mai 2010.

Publikationen:

***Fontibacter flavus* gen. nov., sp. nov., a new member of the family Cytophagaceae, isolated from a hot spring in Taiwan.** P. Kämpfer, C.-C. Young, W. M. Chen, P. D. Rekha, K. Fallschissel, N. Lodders, J. H. Chou, F. T. Shen, Alexa Frischmann, H.-J. Busse, and A. B. Arun, Int J Syst Evol Microbiol (2009).

***Gordonia humi* sp. nov., isolated from soil in Taiwan.** Peter Kämpfer, Chiu-Chung Young, Jiunn-Nan Chu, A. Frischmann, H.-J. Busse, A. B. Arun, Fo-Ting Shen, and P. D. Rekha, Int J Evol Microbiol (2010).

***Jeotgalicoccus coquinae* sp. nov. and *Jeotgalicoccus aerolatus* sp. nov. isolated from poultry houses.** E. Martin, K. Klug, A. Frischmann, H.-J. Busse, P. Kämpfer, and U. Jäckel, Int J Evol Microbiol (2010).

***Corynebacterium epidermidicanis* sp. nov.** In progress. (2011)

'Manuscript in progress'

***Corynebacterium epidermidicanis* sp. nov., isolated from a dogs skin**

Alexa Frischmann¹, Alexander Knoll¹, Friederike Hilbert², Aleksandra Anna Zasada³, Peter Kämpfer⁴ and Hans-Jürgen Busse¹

¹ Institut für Bakteriologie, Mykologie und Hygiene, Veterinärmedizinische Universität, A-1210 Wien, Austria

² Institut für Fleischhygiene, Fleischtechnologie und Lebensmittelwissenschaften, Veterinärmedizinische Universität, A-1210 Wien, Austria.

³ Department of Bacteriology, National Institute of Hygiene, 00-791 Warsaw, Poland.

⁴ Institut für Angewandte Mikrobiologie, Justus-Liebig-Universität Giessen, D-35392 Giessen, Germany

Abstract

A Gram-positive, pleomorphic, oxidase-negative, non-motile isolate from the skin of a dog, designated strain 410^T, was subjected to comprehensive taxonomic characterization. Comparison of the 16S rRNA gene sequence showed highest similarities to *Corynebacterium diphtheriae*, *Corynebacterium pseudotuberculosis*, and *Corynebacterium ulcerans* (96.1-96.7%). The quinone system consisted predominantly of MK-8(H₂) and MK-9(H₂). The polar lipid profile of strain 410^T contained the major compounds diphosphatidylglycerol, phosphatidylglycerol, phosphatidylinositol, two unidentified phospholipids and four unidentified glycolipids. The polyamine pattern was composed of the major amines spermidine and spermine. In the fatty acid profile predominantly straight chain, saturated and mono-unsaturated fatty acids were detected (C_{18:1}ω9c, C_{16:1}ω7c, C_{16:0}). These chemotaxonomic traits are in agreement with those reported for representatives of the genus *Corynebacterium*. Strain 410^T was tested negative for diphtheria toxin. Physiological traits as well as unique traits in the polar lipid profile distinguished strain 410^T from the next related species. These data suggest that strain 410^T is representing a novel species of the genus *Corynebacterium* for which we propose the name *Corynebacterium epidermidicanis*. The type strain is 410^T (DSM XXXXX^T = LMG YYYYY^T).

Currently, the genus *Corynebacterium* comprises more than 80 recognized species of which six were proposed only in 2010 including *Corynebacterium epidermidicanis*

(Funke *et al.* 2010), *Corynebacterium marinum* (Du *et al.*, 2010), *Corynebacterium mustelae* (Funke *et al.*, 2010), *Corynebacterium pilbarensis* (Aravena-Roman *et al.*, 2010), *Corynebacterium pyruviciproducens* (Tong *et al.*, 2010), *Corynebacterium stationis* (Bernard *et al.*, 2010). The majority of representatives of the genus contain short chain mycolic acids (22-38 carbons; Collins *et al.*, 1982a) but in five species mycolic acids are absent including *Corynebacterium amycolatum*, *Corynebacterium atypicum*, *Corynebacterium caspium*, *Corynebacterium ciconiae* and *Corynebacterium kroppenstedtii* (Collins *et al.*, 1988; 1998; 2004; Fernández-Garayzábal *et al.*, 2004; Hall *et al.*, 2003). The quinone system is composed of dihydrogenated menaquinones with eight or nine isoprenoic units in the side chain [MK-8(H₂), MK-9(H₂) or a mixture of both] (Collins & Jones, 1981). The fatty acid profiles predominantly consist of straight chain saturated and mono-unsaturated fatty acids but some species also contain tuberculostearic acid (Collins *et al.*, 1982b). The peptidoglycan type is A1 γ with the diagnostic diaminoacid *meso*-diaminopimelic acid (Schleifer and Kandler, 1972). Though several species of the genus are well-known as pathogens of human and animals including mammals and birds, species have been also isolated from other sources such as activated sludge and soil.

In the course of a study dealing with the classification of bacterial isolates from primary cultures of veterinary specimens of patients with different diseases considered to be commensals strain 410^T attracted our attention. Strain 410^T was isolated from the skin of a dog with pruritus after primary cultivation on blood agar. Colonies of this strain were found in significant counts among predominant colonies of β -haemolytic streptococci and *Proteus* strains (identified during routine diagnosis). The strain was grown aerobically on PYE agar (0.3% peptone from casein, 0.3% yeast extract, 1.5% agar, pH 7.2) or the corresponding broth medium at 28°C. Gram-behaviour was examined by staining as described by Gerhardt *et al.* (1994) and KOH-lysis test as described by Moaledji (1986). Cell morphology was observed under a Leitz, Dialux 20 microscope at x1000 magnification. In both tests the Gram-behaviour was positive. The cells exhibited a pleomorphic shape (coccoid and rod-shaped) and were about 1 μ m in length.

The 16S rRNA gene sequence was amplified as described by Buczolits *et al.* (2008) using the universal primers 27f and 1492r (Lane, 1991) but GoTaq[®] Flexi DNA Polymerase (Promega) was used in PCR. Sequencing was carried out as described

by Hilbert *et al.* (2010). The nearly complete sequence (1425 bases) was compared to gene bank entries using the EzTaxon server (Chun *et al.*, 2007) and FASTA (Pearson & Lipman, 1988). The nearest relatives were *C. diphtheriae* NCTC 11397^T (96.7 and 96.3% similarity, respectively), *C. pseudotuberculosis* CIP 102968^T (96.6 and 96.3% similarity, respectively) and *C. ulcerans* NCTC 7910^T (96.7 and 96.1% similarity, respectively) but only relatively low similarities (95.3 or 95.1%) were found with *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032^T. These data did not suggest affiliation of strain 410^T to any recognized species. Multiple alignment with sequences of type strains sharing 95% or higher in FASTA comparison was performed using CLUSTAL_X (Thompson *et al.*, 1997) and manually edited for ambiguous bases and gaps using BioEdit (Hall, 1999). The phylogenetic position of strain 410^T was examined by maximum likelihood, maximum parsimony and neighbour joining algorithms implemented in the PHYLIP package (Felsenstein, 2009). Surprisingly, in the maximum likelihood (Fig. 1) and in the neighbour joining (results not shown) trees *C. glutamicum* was identified as the nearest relative of strain 410^T with bootstrap supports >70% whereas it formed a separate branch in the maximum parsimony tree (results not shown). The indicated relatedness of strain 410^T to *C. glutamicum* ATCC 13032^T may be related to the fact that after aligning and editing the sequences similarity between the two strains increased to 96.0% which is in the range (95.7 – 96.3%) found with *C. diphtheriae* NCTC 11397^T, *C. pseudotuberculosis* CIP 102968^T and *C. ulcerans* NCTC 7910^T after sequence editing.

For production of biomass subjected to analyses of quinones, polar lipids and polyamines strain 410^T was grown at 28°C in PYE broth (0.3% peptone from casein, 0.3% yeast extract, pH 7.2) and the reference strains in 3.3xPYE broth (0.99% peptone from casein, 0.99% yeast extract, pH 7.2). Polar lipids and quinones were extracted and analysed applying the integrated procedure reported by Tindall (1990a, b) and Altenburger *et al.* (1996). Polyamines were extracted as reported by Busse & Auling (1988) and Altenburger *et al.* (1997). For HPLC analyses of quinones and polyamines the equipment was used reported by Stolz *et al.* (2007).

The polyamine pattern was composed of spermidine [0.70 µmol (g dry weight)⁻¹], spermine [0.59 µmol (g dry weight)⁻¹], putrescine [0.36 µmol (g dry weight)⁻¹], 1,3-diaminopropane [0.05 µmol (g dry weight)⁻¹] and cadaverine [0.01 µmol (g dry

weight)⁻¹]. This polyamine pattern is in line with characteristics reported for several *Corynebacterium* species (Altenburger *et al.*, 1997).

The quinone system of strain 410^T was composed of MK-8(H₂) (70%), MK-9(H₂) (26%) and MK-7(H₂) (4%) and does support affiliation to the genus *Corynebacterium*. Strain 410^T exhibited a complex polar lipid profile (Fig. 1). The major compounds were diphosphatidylglycerol, phosphatidylglycerol, phosphatidylinositol, four unidentified glycolipids (GL1- GL4), and two unidentified phospholipids (PL1-2). Minor amounts of four unidentified polar lipids (L1, L2, L3 and L4) not stainable with specific spray reagents such as molybdenum blue, ninhydrin or α -naphthol, were detected as well. Phosphatidylinositol-mannosides, reported to be present in several *Corynebacterium* species (Fudou *et al.*, 2002; Yassin *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2004) and also shown to be present in the reference species examined in the course of this study (Fig. 1), could not be detected. Obviously, this lipid species is not generally found in *Corynebacterium* species or its amounts are below the detection limits as recently shown for *Corynebacterium lubricantis* (Kämpfer *et al.*, 2009). Strain 410^T showed major differences in its polar lipid profile compared to its close relatives *C. diphtheriae*, *C. pseudotuberculosis* and *C. ulcerans*. It did not show the presence of phosphatidylinositol-mannoside, glycolipids GL 2, GL3 and GL4 were not detectable in any of the three reference species and glycolipid GL1 was only detected in *C. diphtheriae*.

Production of biomass, extraction and analysis of fatty acids was carried out as described by Kämpfer & Kroppenstedt (1996). The fatty acid profile was composed predominantly of straight chain, saturated and mono-unsaturated fatty acid and major fatty acids were C_{18:1}w9c , C_{16:1} w7c /C_{15:0} iso 2-OH and C_{16:0}. Tuberculostearic acid could not be detected. This fatty acid profile was qualitatively quite similar to that of *C. diphtheriae* NCTC 11397^T but significant qualitative difference in the contents of several fatty acids were detected between the two strains.

Due to the close relatedness of strain 410^T to *C. diphtheriae* production of diphtheriae toxin was analysed. The toxigenicity testing was done according to Manual for the Laboratory Diagnosis of Diphtheria by A. Efstratiou and P.A.C. Maple, WHO, Copenhagen 1994 (conventional test) and Engler *et al.*, 1997. In both, conventional and modified Elek test no indication for toxigenicity was detected. These results were also confirmed in PCR-based assay (results not shown) applying primers for specific detection of the 'A' portion of the toxin gene (Pallen *et al.* 1994) and primers for

amplification of a 910 bp DNA fragment overlapping the two diphtheria toxin genes (Hauser *et al.* 1993).

The results from 16S rRNA gene analyses, and differences in phenotype (polar lipid profiles and physiology) it is obvious that strain 410^T is different from *C. diphtheriae*, *C. pseudotuberculosis*, *C. ulcerans* and *C. glutamicum* and from other *Corynebacterium* species as well. In conclusion, strain 410^T is a representative of a novel species of the genus *Corynebacterium* for which we propose the name *Corynebacterium epidermidicanis*.

Description of *Corynebacterium epidermidicanis* sp. nov.

e.pi.der.mi.di.ca'nis. L. n. epidermis -idis, the surface-skin; L. n. canis -is, a dog; N.L. gen.

n. *epidermidicanis*, of the skin of a dog.

Cells are coccoid to pleomorphic rods, that are non-motile with Gram-positive behaviour, and oxidase negative. Good growth occurs on PYE agar and blood agar but not on MacConkey agar and its able to grow under anaerobic conditions. The strain forms on PYE agar creamy-whitish, non-translucent colonies with a diameter of approximately 0.5mm. The lipid profile consists of the major compounds diphosphatidylglycerol, phosphatidylglycerol, phosphatidylinositol, three glycolipids (GL2, GL3, and GL4), moderate amounts of two phospholipids (P1, P2), a glycolipid (GL1) and minor amounts of three polar lipids (L1, L2, L3, and L4). Major polyamines are spermine and spermidine. The quinone system is composed of MK-8(H₂) and MK-9(H₂).The fatty acid profile contains large amounts of C_{18:1}ω_{9c}, C_{16:1} ω_{7c} /15:0 iso 2-OH and C_{16:0}. Tuberculostearic acid is absent.

Acetate, propionate, fumarate, L-aspartate, L-histidine and L-serine, and weakly D-trehalose are assimilated but N-acetyl-D-galactosamine, N-Acetyl-D-glucosamine, L-arabinose, p-arbutin, D-cellobiose, gluconate, α-D-melibiose, L-rhamnose, D-ribose, sucrose, salicin, D-xylose, adonitol, i-inositol, maltitol, D-mannitol, D-sorbitol, putrescine, *cis*-aconitate, *trans*-aconitate, adipate, 4-aminobutyrate, azelate, citrate, glutarate, DL-3-hydroxybutyrate, itaconate, mesaconate, oxoglutarate, suberate, L-alanine, β-alanine, L-leucine, L-ornithine, L-phenylalanine, L-proline, L-tryptophane, 3-hydroxybenzoate, 4-hydroxybenzoate and phenylacetate are not. Acid is not produced from glucose, lactose, sucrose, D-mannitol, dulcitol, salicin, adonitol, inositol, sorbitol, L-arabinose, raffinose, rhamnose, maltose, D-xylose, trehalose,

cellobiose, methyl-D-glucoside, erythritol, melibiose, D-arabitol and D-mannitol. Esculine, oNP- β -D-galactopyranoside, pNP- β -D-glucuronide, pNP- α -D-glucopyranoside, pNP- β -D-glucopyranoside, pNP- β -D-xylopyranoside, Bis-pNP-phosphate, pNP-phenyl-phosphonate, pNP-phosphoryl-choline, 2-Deoxythymidine-5'-pNP-phosphate, L-Glutamate- α -3-carboxy-pNA are not hydrolysed.

The type strain of the new species, *Corynebacterium epidermidicanis* is strain 410^T (= DSM XXXXX = LMG YYYYY) was isolated in Austria from the skin of a dog suffering from pruritus .

Acknowledgements

We are grateful to Jean Euzéby for advice in etymology and nomenclature.

References

- Altenburger, P., Kämpfer, P., Makristathis, A., Lubitz, W. & Busse, H.-J. (1996).** Classification of bacteria isolated from a medieval wall painting. *J Biotechnol* **47**, 39–52.
- Altenburger, P., Kämpfer, P., Akimov, V. N., Lubitz, W. & Busse, H.-J. (1997).** Polyamine distribution in actinomycetes with group B peptidoglycan and species of the genera *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, and *Tsukamurella*. *Int J Syst Bacteriol* **47**, 270–277.
- Aravena-Roman, M., Spröer, C., Sträubler, B., Inglis, T. & Yassin, A. F. (2010).** *Corynebacterium pilbarensense* sp. nov., a non-lipophilic corynebacterium isolated from a human ankle aspirate. *Int J Syst Evol Microbiol* **60**, 1484 - 1487.
- Bernard, K. A., Wiebe, D., Burdz, T., Reimer, A., Ng, B., Singh, C., Schindle, S. & Pacheco, A. L. (2010).** Assignment of *Brevibacterium stationis* (ZoBell and Upham 1944) Breed 1953 to the genus *Corynebacterium*, as *Corynebacterium stationis* comb. nov., and emended description of the genus *Corynebacterium* to include isolates that can alkalize citrate. *Int J Syst Evol Microbiol* **60**, 874-879.
- Buczolits, S., Schumann, P., Valens, M., Rosselló-Mora, R. & Busse, H.-J. (2008).** Identification of a bacterial strain isolated from the liver of a laboratory mouse as *Microbacterium paraoxydans* and emended description of the species *Microbacterium paraoxydans* Laffineur et al. 2003. *Indian J Microbiol* **48**, 243–251
- Chen, H.-H., Li, W.-J., Tang, S.-K., Kroppenstedt, R.M., Stackebrandt, E., Xu, L.-H. & Jiang, C.-L. (2004).** *Corynebacterium halotolerans* sp. nov., isolated from saline soil in the west of China. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**, 779–782.
- Chun, J., Lee, J. H., Jung, Y., Kim, M., Kim, S., Kim, B. K. & Lim, Y. W. (2007).** **EzTaxon**: a web-based tool for the identification of prokaryotes based on 16S ribosomal RNA gene sequences. *Int J Syst Evol Microbiol* **57**, 2259–2261.
- Collins, M. D., Burton, R. A. & Jones, D. (1988).** *Corynebacterium amycolatum* sp. nov., a new mycolic acid-less *Corynebacterium* species from human skin. *FEMS Microbiol Lett* **49**, 349–352.
- Collins, M. D., Goodfellow, M. & Minnikin, D. E. (1982a).** A survey of the structures of mycolic acids in *Corynebacterium* and related taxa. *J Gen Microbiol* **128**, 129 - 149.
- Collins, M.D., Goodfellow, M. & Minnikin, D. E. (1982b).** Fatty acid composition of some mycolic acid-containing coryneform bacteria. *J Gen Microbiol* **128**, 2503-2509.

- Collins, M. D., Falsen, E., Akervall, E., Sjöden, B. & Alvarez, A. (1998).** *Corynebacterium kroppenstedtii* sp. nov., a novel corynebacterium that does not contain mycolic acids. *Int J Syst Bacteriol* **48**, 1449–1454.
- Collins, M. D., Hoyles, L., Foster, G. & Falsen, E. (2004).** *Corynebacterium caspium* sp. nov., from a Caspian seal (*Phoca caspica*). *Int J Syst Evol Microbiol* **54**, 925–928.
- Collins, M. D. & Jones, D. (1981).** The distribution of isoprenoid quinone structural type in bacteria and their taxonomic implications. *Microbiol Rev* **45**, 3 16-354.
- Du, Z.-J., Jordan, E. M., Rooney, A. P., Chen, G.-J. & Austin, B. (2010).** *Corynebacterium marinum* sp. nov. isolated from coastal sediment. *Int J Syst Evol Microbiol* **60**, 1944 - 1947.
- Engler, K. H., T. Glushkevich, I. K. Mazurova, R. C. George, and A. Efstratiou. (1997).** A modified Elek test for detection of toxigenic corynebacteria in the diagnostic laboratory. *Journal of clinical microbiology* **35**, 495-8.
- Felsenstein, J. (2009).** PHYLIP (phylogeny inference package) version 3.69. Distributed by the author. Department of Genome Sciences, University of Washington, Seattle, USA.
- Fernández-Garayzábal, J. F., Collins, M. D., Hutson, R. A., González, I., Fernández, E. & Domínguez, L. (1998).** *Corynebacterium camporealensis* sp. nov., associated with subclinical mastitis in sheep. *Int J Syst Bacteriol* **48**, 463–468.
- Fernández-Garayzábal, J. F., Vela, A. I., Egido, R., Hutson, R. A., Lanzarot, M. P., Fernández-García, M. & Collins, M. D. (2004).** *Corynebacterium ciconiae* sp. nov., isolated from the trachea of black storks (*Ciconia nigra*). *Int J Syst Evol Microbiol* **54**, 2191–2195.
- Fudou, R., Jojima, Y., Seto, A., Yamada, K., Kimura, E., Nakamatsu, T., Hirashi, A. & Yamanaka, S. (2002).** *Corynebacterium efficiens* sp. nov., a glutamic-acid-producing species from soil and vegetables. *Int J Syst Evol Microbiol* **52**, 1127–1131.
- Funke, G., Englert, R., Frodl, R., Bernard, K. A. & Stenger, S. (2010).** *Corynebacterium canis* sp. nov., isolated from a wound infection caused by a dog bite. *Int J Syst Evol Microbiol*; **60**, 2544 – 2547.
- Funke, G., Frodl, R. & Bernard, K. A. (2010).** *Corynebacterium mustelae* sp. nov., isolated from a ferret with lethal sepsis. *Int J Syst Evol Microbiol* **60**, 871 - 873.
- Funke, G., von Graevenitz, A., Clarridge, J. E., III & Bernard, K. A. (1997).** Clinical microbiology of coryneform bacteria. *Clin Microbiol Rev* **10**, 125–159.
- Gerhardt, P., Murray, R. G. E., Wood, W. A. & Krieg, N. R. (editors) (1994).** *Methods for General and Molecular Bacteriology*. Washington, DC: American Society for Microbiology.

Hall, T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser* **41**, 95–98.

Hall, V., Collins, M. D., Hutson, R. A., Lawson, P. A., Falsen, E. & Duerden, B. I. (2003). *Corynebacterium atypicum* sp. nov., from a human clinical source, does not contain corynomycolic acids. *Int J Syst Evol Microbiol* **53**, 1065–1068.

Hauser, D., M. R. Popoff, M. Kiredjian, P. Boquet, and F. Bimet. (1993). Polymerase chain reaction assay for diagnosis of potentially toxinogenic *Corynebacterium diphtheriae* strains: correlation with ADP-ribosylation activity assay. *J Clin Microbiol* **31**, 2720-2723.

Hilbert, F., Scherwitzel, M., Paulsen, P. & Szostak, P. (2010). Survival of *Campylobacter jejuni* under conditions of atmospheric oxygen tension with the support of *Pseudomonas* spp. *Appl Environ Microbiol* **76**, 5911-5917.

Kämpfer, P. & Kroppenstedt, R. M. (1996). Numerical analysis of fatty acid patterns of coryneform bacteria and related taxa. *Can J Microbiol* **42**, 989-1005.

Kämpfer, P., Steiof, M. & Dott, W. (1991). Microbiological characterization of a fuel-oil contaminated site including numerical identification of heterotrophic water and soil bacteria. *Microb Ecol* **21**, 227-251.

Kämpfer, P., Buczolits, S., Albrecht, A., Busse, H.-J. & Stackebrandt, E. (2003). Towards a standardized format for the description of a novel species (of an established genus): *Ochrobactrum gallinifacis* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* **53**, 893–896.

Kämpfer, P., Lodders, N., Warfolomeow, I., Falsen, E. & Busse, H.-J. (2009). *Corynebacterium lubricantis* sp. Nov., isolated from a coolant lubricant. *Int J Syst Evol Microbiol* **59**, 1112-1115.

Lane, D. J. (1991). 16S/23S rRNA sequencing. In *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*, pp. 115–175. Edited by Stackebrandt, E. & Goodfellow, M.. Chichester. : Wiley.

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

Pallen, M. J., A. J. Hay, L. H. Puckey, and A. Efstratiou. (1994) Polymerase chain reaction for screening clinical isolates of corynebacteria for the production of diphtheria toxin. *Journal of clinical pathology* **47**, 353-6.

Pearson, W. R. & Lipman, D. J. (1988). Improved tools for biological sequence comparison. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 2444–2448.

Renaud, F. N. R., Aubel, D., Riegel, P., Meugnier, H. & Bollet, C. (2001). *Corynebacterium freneyi* sp. nov., a-glucosidase-positive strains related to *Corynebacterium xerosis*. *Int J Syst Evol Microbiol* **51**, 1723–1728.

Stolz, A., Busse, H.-J. & Kämpfer, P. (2007). *Pseudomonas knackmussii* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* **57**, 572–576.

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

Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. & Higgins, D. G. (1997). The **CLUSTAL_X** windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* **24**, 4876–4882.

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

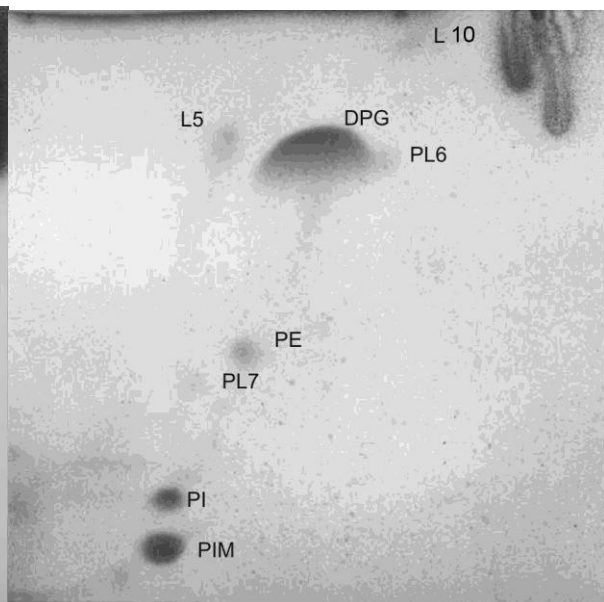
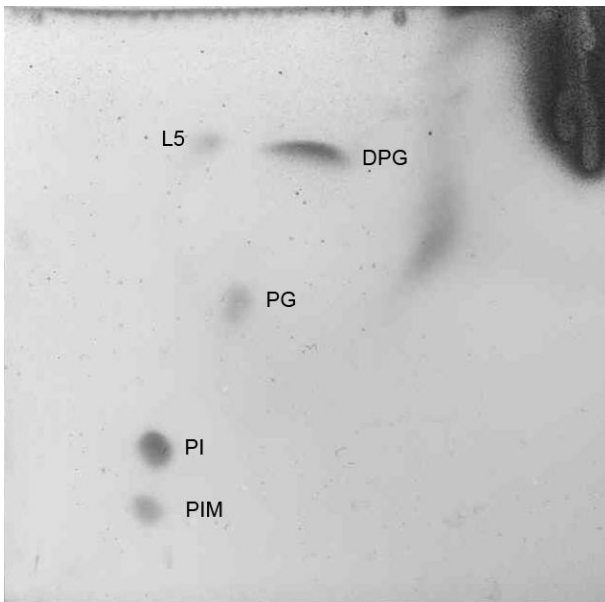
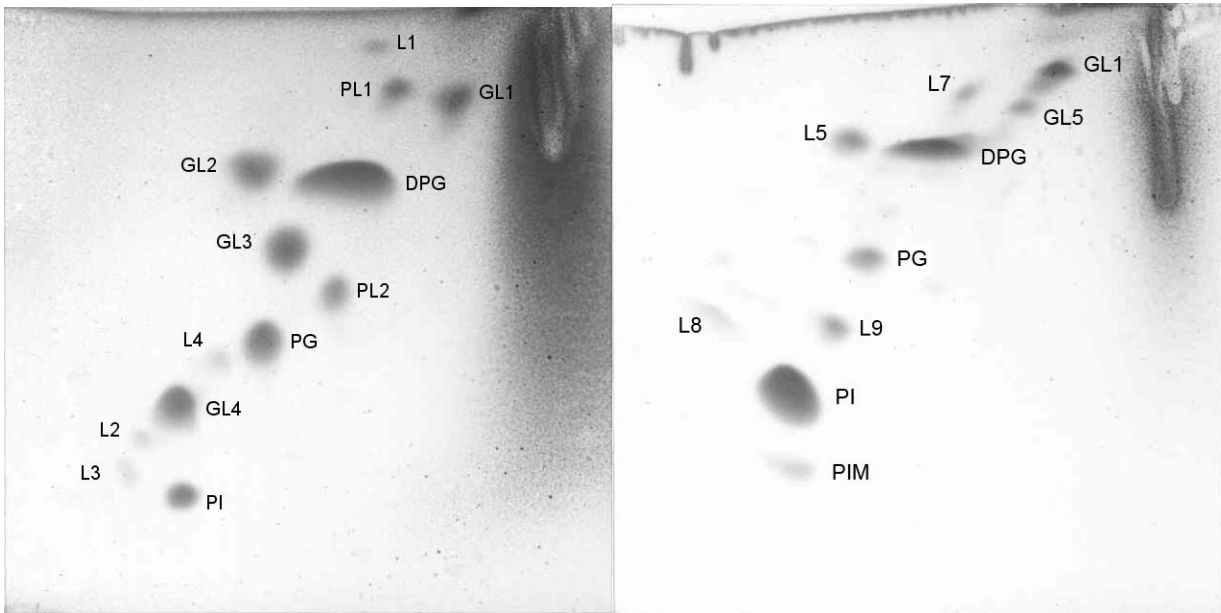
Tindall, B. J. (1990b). A comparative study of the lipid composition of *Halobacterium saccharovorum* from various sources. *Syst Appl Microbiol* **13**, 128–130.

Tong, J., Liu, C., Summanen, P. H., Xu, H. & Finegold, S. M. (2010). *Corynebacterium pyruviciproducens* sp. nov., a pyruvic acid producer. *Int J Syst Evol Microbiol* **60**, 1135 - 1140.

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

Strain 410^T

Corynebacterium diphtheriae



Corynebacterium pseudotuberculosis

Corynebacterium ulcerans

↑
2nd dimension →
1st dimension

Fig.1. Polar lipid profile of the strains 410^T, *C. diphtheriae* DSM 20524^T, *C. pseudotuberculosis* DSM 20689^T and *C. ulcerans* DSM 46325^T after two-dimensional TLC and detection with molybdatophosphoric acid. DPG, diphosphatidylglycerol; PG, phosphatidylglycerol; PI, phosphatidylinositol; PIM, phosphatidylinositol-mannoside; GL1-5, unidentified glycolipids, L1-7, unidentified lipids; PL1-3, unidentified phospholipids.

Table 1. Cellular fatty acid composition of *C. diphtheriae* NCTC 11397^T (1) and strain 410^T (2)

Fatty acid	1	2
C _{14:0}	1.8	
C _{15:0}		0.7
Iso C _{15:0}		1.0
C _{15:1} ω6c		1.0
C _{16:1} ω5c		3.1
C _{16:1} ω7c and/or 15:0 iso 2-	36.3	25.3
OH		
anteiso C _{17:1} ω9c		1.5
C _{16:0}	42.6	18.0
C _{18:1} ω9c	15.4	30.6
C _{18:1} ω7c		2.6
C _{17:0} ω8c		7.9
C _{17:0} ω6c		3.2
C _{18:0}	3.4	1.3

Table 2. Physiological test results of strains *C. diphtheriae* NCTC 11397^T (1) and 410^T (2)

Test	1	2
Hydrolysis of: pNP-α-D-glucopyranoside	(+)	-
Assimilation of:		
D-Ribose	(+)	-
D-Trehalose	-	(+)
Acetate	(+)	+
Propionate	-	+
Fumarate	-	+
L-Aspartate	(+)	+
L-Histidine	-	+
L-Serine	-	+

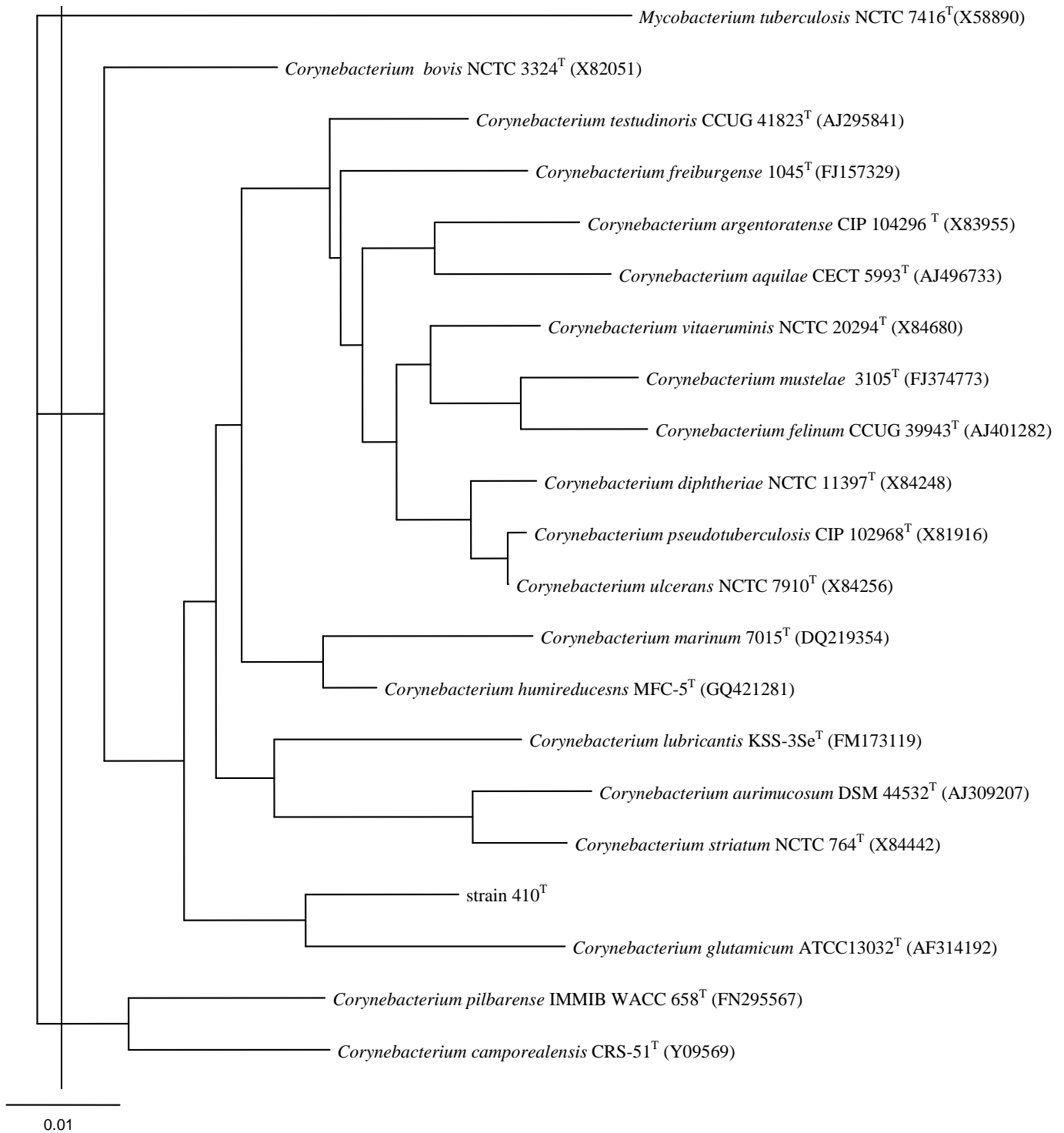


Fig. 2: Maximum likelihood tree based on 16S rRNA gene sequences showing the relatedness of strain 410^T to selected *Corynebacterium* species. *Mycobacterium tuberculosis* NCTC 7416^T (X58890) was used as an outgroup. Percentage bootstrap values >70% based on 100 replicates are given at nodes. Bar, 0.1 substitutions per nucleotide position.

IV Danksagung

Zu allererst möchte ich mich bei meinem Betreuer Univ.-Doz. Dr. Hans-Jürgen Busse bedanken, der bei mir das Interesse an der Taxonomie geweckt hat und es mir ermöglicht hat in diesem Bereich meine Diplomarbeit schreiben zu können. Ebenso gebührt mein Dank Univ.-Prof. Dr. Renate Rosengarten für die Möglichkeit an ihrem Institut zu arbeiten.

Weiteres danke ich Univ.-Prof. Dr. Friederike Hilbert und Mag. Alexander Knoll für die große Unterstützung im Laufe der praktischen Arbeit, sowie Peter Kämpfer für die zahlreichen Analysen.

Der größte Dank gilt meinen Eltern Elke und Ernst Frischmann, die mir die Möglichkeit des Studiums erst ermöglicht haben und mich immer unterstützt haben.

Ein weiteres Dankeschön gilt meinem Freund Thomas, meiner Schwester Dani und allen weitere Freunde und Studienkollegen (Betty, Eva, Rachel, Eve, Ruth, Klaus...) die auch in den „schweren“ Zeiten für mich da waren.

Ursi, Karin und allen weitere Laborkollegen möchte ich auch danken, da durch viele Gespräche sowohl Freundschaften entstanden sind, als auch viele Labor-Probleme gemeinsam gelöst wurden.