



universität
wien

MASTERARBEIT

Titel der Masterarbeit

„Vergleichende Untersuchung zur Taxonomie
der Genera *Massilia* und *Telluria*“

verfasst von

Ivana Orthová, BSc

angestrebter akademischer Grad

Master of Science (MSc)

Wien, 2014

Studienkennzahl lt. Studienblatt:

A 066 830

Studienrichtung lt. Studienblatt:

Masterstudium Molekulare Mikrobiologie und Immunbiologie

Betreut von:

Univ.-Doz. Dipl.-Biol. Dr.rer.nat. Hans-Jürgen Busse

Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung	1
1. Die Genera <i>Massilia</i> und <i>Telluria</i>	2
2. Chemotaxonomische Methoden	4
2.1. Polyamine	4
2.2. Chinone	4
2.3. Polare Lipide	6
3. Molekularbiologische Methoden	7
3.1. 16S rRNA Gensequenzen	7
3.2. Sequenzen der Haushaltsgene	7
3.2.1. Haushaltsgen <i>gyrB</i>	8
3.2.2. Haushaltsgen <i>lepA</i>	8
3.3. 'Enterobacterial repetitive intergenic consensus' PCR	9
4. Ziele der vorliegenden Arbeit	10
4.1. Vergleichende taxonomische Untersuchungen von Spezies der Genera <i>Massilia</i> und <i>Telluria</i>	10
4.2. Taxonomische Eingliederung von E-JS-7, NS9, <i>Oxalobacteraceae</i> bacterium Ma	10
II. Material und Methoden	12
5. Medien, Puffer und Lösungen	13
6. Bakterienstämme und Isolate	15
7. Kultivierung der Bakterien	17
7.1. Überlebenstests	17

Inhaltsverzeichnis

7.2.	Herstellung von Kryokulturen	17
7.3.	Biomasse-Gewinnung zur Extraktion von Chinonen und polaren Lipiden	18
7.4.	Biomasse-Gewinnung zur Extraktion von Polyaminen	18
7.4.1.	Standardisierung des physiologischen Alters bei homogen wachsenden Kulturen	18
7.4.2.	Standardisierung des physiologischen Alters bei inhomogen wachsenden Kulturen	19
8.	Chemotaxonomische Methoden	20
8.1.	Extraktion und Analyse von Polyaminen	20
8.2.	Extraktion und Analyse von Chinonen	21
8.3.	Extraktion und Analyse von polaren Lipiden	22
9.	Molekularbiologische Methoden	26
9.1.	Extraktion genomischer DNA	26
9.2.	16S rRNA Untersuchungen	27
9.2.1.	PCR-Amplifikation der 16S rRNA Gene	27
9.2.2.	Auftrennung und Aufreinigung der 16S rRNA PCR-Produkte	28
9.2.3.	Sequenzierung der 16S rRNA Gene	28
9.2.4.	16S rRNA Sequenzähnlichkeitsmatrizes und Stammbäume . .	29
9.3.	Untersuchungen der Haushaltsgene	30
9.3.1.	Haushaltsgen <i>gyrB</i>	30
9.3.1.1.	Primerkonstruktion zur Amplifikation der <i>gyrB</i> Gene	30
9.3.1.2.	PCR-Amplifikation der <i>gyrB</i> Gene	32
9.3.1.3.	Auftrennung u. Aufreinigung der <i>gyrB</i> PCR-Produkte	33
9.3.2.	Haushaltsgen <i>lepA</i>	33
9.3.2.1.	Primerkonstruktion zur Amplifikation der <i>lepA</i> Gene	33
9.3.2.2.	Primerkonstruktion zur Amplifikation des <i>lepA</i> Gens von <i>M. plicata</i> DSM 17505 ^T	34
9.3.2.3.	PCR-Amplifikation der <i>lepA</i> Gene	38
9.3.2.4.	Auftrennung u. Aufreinigung der <i>lepA</i> PCR-Produkte	39
9.3.3.	Sequenzierung der <i>gyrB</i> und <i>lepA</i> Gensequenzen	39
9.3.4.	Erweiterung des <i>gyrB</i> und <i>lepA</i> Datensatzes	40
9.3.5.	<i>gyrB</i> und <i>lepA</i> Stammbäume und Sequenzähnlichkeitsmatrizes	40
9.4.	'Enterobacterial repetitive intergenic consensus' PCR	41
10.	Morphologische und physiologische Teilcharakterisierung der Isolate <i>Oxalobacteraceae</i> bacterium Ma und NS9	43

III. Ergebnisse und Diskussion	44
11. Wachstumscharakteristika und Überlebenstests	45
12. Taxonomische Untersuchung von Vertretern der Genera <i>Massilia</i> und <i>Telluria</i>	51
12.1. Chemotaxonomische Untersuchungen	51
12.1.1. Polyamine und Chinone	51
12.1.2. Polare Lipide	53
12.2. Molekularbiologische Untersuchungen	61
12.2.1. <i>gyrB</i> und <i>lepA</i> Sequenzähnlichkeiten	61
12.2.2. <i>gyrB</i> und <i>lepA</i> Stammbäume	68
12.2.3. 16S rRNA Sequenzähnlichkeiten	74
12.2.4. 16S rRNA Stammbäume	75
13. Differenzierung der Genera <i>Massilia</i> / <i>Telluria</i> , <i>Pseudoduganella</i> & <i>Duganella</i>	78
14. Isolat <i>Oxalobacteraceae</i> bacterium Ma	81
15. Isolat E-JS-7	96
16. Mitwirkung an der Beschreibung von <i>M. norwichensis</i> sp. nov.	108
17. <i>M. aerilata</i> DSM 19289 ^T Kolonietypen „A“ & „B“	109
17.1. Koloniemorphologie	109
17.2. Chemotaxonomische Untersuchungen	110
17.2.1. Chinone, polare Lipide und Polyamine	110
17.3. Molekularbiologische Untersuchungen	112
17.3.1. Analyse des partiellen <i>gyrB</i> Gens	112
17.3.2. 'Enterobacterial repetitive intergenic consensus' PCR	112
IV. Zusammenfassung	114
V. Literaturverzeichnis	121

VI. Anhang	130
A. 16S rRNA Stammbäume	131
B. <i>gyrB</i> und <i>lepA</i> Stammbäume	135
C. Manuskript	147
D. Curriculum vitae	168
E. Danksagung	169

Tabellenverzeichnis

2.1. Chemotaxonomisch bedeutsame Polyamine der <i>Proteobacteria</i>	5
6.1. Untersuchte Bakterienstämme und Isolate	16
8.1. Detektion polarer Lipide mittels Sprühreagenzien	24
9.1. Pipettierschema für PCR-Amplifikation der 16S rRNA Gene	27
9.2. PCR-Bedingungen bei der Amplifikation der 16S rRNA Gene	27
9.3. Zur Konstruktion der <i>gyrB</i> Primer ausgewählte Genfragmente von engeren und entfernteren Verwandten des Genus <i>Massilia</i>	31
9.4. Pipettierschema für PCR-Amplifikation partieller <i>gyrB</i> und <i>lepA</i> Gene	32
9.5. PCR-Bedingungen bei der Amplifikation partieller <i>gyrB</i> Gene	32
9.6. Zur Konstruktion der <i>lepA</i> Primer ausgewählte Genfragmente von engeren Verwandten des Genus <i>Massilia</i>	35
9.7. Zur Konstruktion der <i>lepA</i> Primer für <i>M. plicata</i> ausgewählte Gen- fragmente von entfernteren Verwandten des Genus <i>Massilia</i>	36
9.8. Zur Konstruktion der <i>lepA</i> Primer für <i>M. plicata</i> ausgewählte Gen- fragmente von engeren Verwandten des Genus <i>Massilia</i>	37
9.9. PCR-Bedingungen bei der Amplifikation partieller <i>lepA</i> Gene	38
9.10. Pipettierschema für PCR-Amplifikation der ERIC-Boxen	42
9.11. PCR-Bedingungen bei der Amplifikation der ERIC-Boxen	42
12.1. Chinonsysteme und Polyaminmuster untersuchter Stämme und Isolate	52
12.2. Polare Lipide in untersuchten Stämmen und Isolaten (1)	59
12.3. Polare Lipide in untersuchten Stämmen und Isolaten (2)	60
12.4. Ähnlichkeitsmatrix der partiellen <i>gyrB</i> Nukleotidsequenzen	63
12.5. Ähnlichkeitsmatrix der partiellen <i>lepA</i> Nukleotidsequenzen	64
12.6. Ähnlichkeitsmatrix der konkatenierten <i>gyrB</i> / <i>lepA</i> Nukleotidsequenzen	66
14.1. Ähnlichkeitsmatrix der partiellen LepA Aminosäuresequenzen	86
14.2. Ähnlichkeitsmatrix der konkatenierten GyrB/ LepA Aminosäurese- quenzen	87

Tabellenverzeichnis

15.1. Ähnlichkeitsmatrix der partiellen GyrB Aminosäuresequenzen 99

Abbildungsverzeichnis

12.1. Lipidprofile in <i>M. consociata</i> , <i>M. niastensis</i> , <i>M. aurea</i> , <i>M. timonae</i> & <i>T. mixta</i>	54
12.2. Lipidprofile in <i>M. albidiflava</i> , <i>M. dura</i> , <i>M. lutea</i> , <i>D. phyllosphaerae</i> & <i>T. chitinolytica</i>	55
12.3. Konkatenierter <i>gyrB</i> / <i>lepA</i> maximum-parsimony Stammbaum	70
12.4. Konkatenierter <i>GyrB</i> / <i>LepA</i> neighbour-joining Stammbaum	71
12.5. Konkatenierter <i>gyrB</i> / <i>lepA</i> maximum-likelihood Stammbaum	73
12.6. 16S rRNA maximum-parsimony Stammbaum	77
14.1. 16S rRNA maximum-parsimony Stammbaum unter Einbeziehung von NS9, <i>Oxalobacteraceae</i> bacterium Ma & E-JS-7	83
14.2. <i>gyrB</i> maximum-likelihood Stammbaum	89
14.3. <i>GyrB</i> neighbour-joining Stammbaum	90
14.4. Lipidprofile in <i>Oxalobacteraceae</i> bacterium Ma, NS9, <i>M. aerilata</i> & <i>T. mixta</i>	93
15.1. 16S rRNA maximum-likelihood Stammbaum unter Einbeziehung von NS9, <i>Oxalobacteraceae</i> bacterium Ma & E-JS-7	97
15.2. <i>LepA</i> neighbour-joining Stammbaum	102
15.3. <i>lepA</i> maximum-likelihood Stammbaum	103
15.4. Lipidprofile in E-JS-7, <i>T. chitinolytica</i> , <i>M. plicata</i> & <i>M. varians</i>	105
17.1. Lipidprofile in <i>M. aerilata</i> DSM 19289 ^T Kolonietypen „A” & „B”	111
17.2. Bandenmuster der ERIC-PCR in <i>M. aerilata</i> DSM 19289 ^T „A” & „B”	113
A.1. 16S rRNA maximum-likelihood Stammbaum	132
A.2. 16S rRNA neighbour-joining Stammbaum	133
A.3. 16S rRNA neighbour-joining Stammbaum unter Einbeziehung von NS9, <i>Oxalobacteraceae</i> bacterium Ma & E-JS-7	134
B.1. <i>gyrB</i> maximum-parsimony Stammbaum	136
B.2. <i>gyrB</i> neighbour-joining Stammbaum	137

Abbildungsverzeichnis

B.3. GyrB maximum-parsimony Stammbaum	138
B.4. GyrB maximum-likelihood Stammbaum	139
B.5. <i>lepA</i> maximum-parsimony Stammbaum	140
B.6. <i>lepA</i> neighbour-joining Stammbaum	141
B.7. LepA maximum-likelihood Stammbaum	142
B.8. LepA maximum-parsimony Stammbaum	143
B.9. Konkatenierter <i>gyrB</i> / <i>lepA</i> neighbour-joining Stammbaum	144
B.10. Konkatenierter GyrB/ LepA maximum-likelihood Stammbaum	145
B.11. Konkatenierter GyrB/ LepA maximum-parsimony Stammbaum	146

Teil I.
Einleitung

1. Die Genera *Massilia* und *Telluria*

Die Genera *Massilia* und *Telluria* gehören der Klasse der *Betaproteobacteria* an, genauer zur Familie der *Oxalobacteraceae*, wo sie basierend auf der 16S rRNA Phylogenie in der Nähe der Genera *Pseudoduganella*, *Duganella*, *Janthinobacterium*, *Herminiimonas* und *Herbaspirillum* (Kämpfer *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2012; Kong *et al.*, 2013) positioniert sind. Das Genus *Telluria* (Bowman *et al.*, 1993) wurde durch Reklassifizierung von aus dem Boden isolierten Spezies *Pseudomonas mixta* und *Pseudomonas chitinolytica* etabliert. Der Beschreibung des Genus *Telluria* nach sind *Telluria* Spezies Gram-negative, strikt aerobe, Oxidase-positive, bewegliche Stäbchen, welche in Paaren oder kurzen Ketten vorkommen und in älteren Kulturen zur Bildung von Filamenten neigen. Die Zellen akkumulieren in großem Ausmaß Poly- β -hydroxybutyrat. Die Hauptkomponente des Chinonsystems ist Ubichinon Q-8. Komplexe Polysaccharide wie Stärke und Xylan werden verwertet. Die Typstämme unterscheiden sich in ihrer Polysaccharidverwertung, hydrolysieren Aesculin, Casein, Gelatine, DNA, Tween40 und Tween60. Urease-Aktivität ist variabel. Arginindihydrolase-Aktivität ist nicht vorhanden. Der DNA G+C Gehalt liegt zwischen 67 - 72 mol%.

Das Genus *Massilia* (La Scola *et al.*, 1998) wurde anhand eines klinischen Isolats aus dem Blut eines 25-jährigen immunsupprimierten Patienten mit Meningoencephalitis beschrieben. Zur Typspezies *Massilia timonae* wurden seither weitere 22 Spezies dem Genus zugeordnet: *Massilia aerilata* (Weon *et al.*, 2008), *M. albidiflava* (Zhang *et al.*, 2006), *M. alkalitolerans* (Kämpfer *et al.*, 2011), *M. aurea* (Gallego *et al.*, 2006), *M. brevitalea* (Zul *et al.*, 2008), *M. consociata* (Kämpfer *et al.*, 2011), *M. dura* (Zhang *et al.*, 2006), *M. flava* (Wang *et al.*, 2012), *M. haematophila* (Kämpfer *et al.*, 2011), *M. jejuensis* (Weon *et al.*, 2010), *M. lurida* (Luo *et al.*, 2013), *M. lutea* (Zhang *et al.*, 2006), *M. namucuoensis* (Kong *et al.*, 2013), *M. niabensis* (Weon *et al.*, 2009), *M. niastensis* (Weon *et al.*, 2009), *M. oculi* (Kämpfer *et al.*, 2012a), *M. plicata* (Zhang *et al.*, 2006), *M. suwonensis* (Kämpfer *et al.*, 2011), *M. tieshanensis* (Du *et al.*, 2012), *M. umbonata* (Rodríguez-Díaz *et al.* 2014),

M. varians (Kämpfer *et al.*, 2011), *M. yuzhufengensis* (Shen *et al.*, 2013). Basierend auf der Beschreibung von La Scola *et al.* (1998) und Kämpfer *et al.* (2011) sind Mitglieder des Genus *Massilia* Gram-negative, aerobe, nicht sporenbildende und bewegliche Stäbchen. Die Hauptkomponente des Chinonsystems ist Q-8. Das Profil der polaren Lipide besteht hauptsächlich aus Diphosphatidylglycerol, Phosphatidylethanolamin und Phosphatidylglycerol. Säureproduktion aus Zuckern sowie Arginindihydrolase-, Urease-, Aesculin-, Oxidase- und Gelatinhydrolase-Aktivitäten sind variabel vorhanden. DNA G+C Gehalt liegt zwischen 62.4 - 68.9 mol%.

Ein Vergleich der Charakteristika von Vertretern der Genera *Massilia* und *Telluria* offenbart Übereinstimmungen bei morphologisch-cytologischen und physiologischen Merkmalen. Phylogenetisch ergab sich in 16S rRNA Stammbäumen unterschiedlich enge Verwandtschaft von Mitgliedern der beiden Genera. In Publikationen von Shen *et al.* (2013) und Wang *et al.* (2012) sind die Typstämme *T. chitinolytica* ACM 3522^T und *T. mixta* ACM 1762^T in 16S rRNA Stammbäumen von den Vertretern des Genus *Massilia* separiert. Dem entgegen konnte wiederholt gezeigt werden, dass Vertreter des Genus *Telluria* zusammen mit *M. plicata*, *M. dura*, *M. lutea* und *M. albidiflava* clustern (Kämpfer *et al.*, 2011, 2012a). Diese Unterschiede mögen sich in Abhängigkeit erfolgter manueller Bearbeitung der 16S rRNA Gensequenzen, der Größe des Datensatzes und dem gewählten statistischen Algorithmus zur Berechnung des Verwandtschaftsgrades ergeben. Jedenfalls entstand dadurch die Notwendigkeit, die taxonomische Position der Genera *Massilia* und *Telluria* zueinander basierend auf chemotaxonomischen und molekularbiologischen Analysen zu untersuchen und abzusichern.

2. Chemotaxonomische Methoden

2.1. Polyamine

Polyamine sind polykationische organische Verbindungen mit endständigen Aminogruppen (Tabor & Tabor, 1985). Unter den Lebewesen sind Polyamine ubiquitär verbreitet und an einer Reihe von fundamentalen biologischen Prozessen wie z.B. DNA Replikation, Transkription, Proteinsynthese, Regulation der Proteinaktivität sowie an der Stabilisierung von Membranen beteiligt (Cohen & Lichtenstein, 1960; Geiger & Morris, 1978; Tabor & Tabor, 1985; Bachrach, 2005). Bakterien sind in der Lage Polyamine aus der Umwelt aufzunehmen, sowie diese aus Aminosäuren, oder durch Umbau aus anderen Polyaminen zu synthetisieren (Tabor *et al.*, 1958; Tabor & Tabor, 1966). Die am häufigsten in Lebewesen vorkommenden Polyamine sind Putrescin, Spermidin und Spermin (Tabor & Tabor, 1985).

Das Muster der Polyamine stellt ein nützliches Merkmal zur Klassifizierung von Gram-negativen Bakterien, allen voran des Phylums *Proteobacteria* (Busse & Auling, 1988) dar. Bei den *Alphaproteobacteria* kommen vor allem die Polyamine Spermidin und *sym*-Homospermidin vor. Die Mehrheit der Vertreter der Klasse der *Betaproteobacteria* ist durch das Polyamin 2-Hydroxyputrescin charakterisiert, welches ausschließlich in dieser Klasse zu finden ist und zusammen mit Putrescin häufig die Hauptkomponenten im Muster der Polyamine darstellt (Busse & Auling, 1988; Busse, 2011). Weitere für das Phylum der *Proteobacteria* chemotaxonomisch bedeutsame Polyamine sind in der Tabelle 2.1 dargestellt. Zur Analyse des Musters der Polyamine werden Polyaminextrakte hergestellt und mittels HPLC ('High Performance Liquid Chromatography') analysiert. Identifizierung der Komponenten erfolgt im Vergleich zu den Retentionszeiten von Referenzen.

2.2. Chinone

Respiratorische Chinone sind Coenzyme der Elektronentransportkette der mitochondrialen Innenmembranen und bakteriellen Zellmembranen, wo sie als Elektronenüberträger an der ATP-Generierung beteiligt sind. Sie werden in die Hauptgruppen

Tabelle 2.1.: Chemotaxonomisch bedeutsame Polyamine der *Proteobacteria* (Kneifel *et al.*, 1986; Busse & Auling, 1988).

Name	Abkürzung	Formel
2-Hydroxyputrescin	HPUT	$\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{CHOH}-(\text{CH}_2)_2-\text{NH}_2$
Putrescin	PUT	$\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2)_4-\text{NH}_2$
1,3-Diaminopropan	DAP	$\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}_2$
Cadaverin	CAD	$\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2)_5-\text{NH}_2$
Spermidin	SPD	$\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}-(\text{CH}_2)_4-\text{NH}_2$
<i>sym</i> -Norspermidin	sNSPD	$\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}_2$
<i>sym</i> -Homospermidin	sHSPD	$\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2)_4-\text{NH}-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}_2$
Spermin	SPM	$\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}-(\text{CH}_2)_4-\text{NH}-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}_2$
<i>sym</i> -Norspermin	sNSPM	$\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}_2$

der Naphthochinone und Benzochinone eingeteilt, welche wie ihr Name schon sagt über ein Naphthol- bzw. ein Benzol-Ring verfügen, an welchem eine Isoprenoidseitenkette hängt. Die Hauptgruppe der Naphthochinone wird weiter in die Chinon-Typen alpha-Phyllochinone und Menachinone unterteilt. Benzochinone sind weiter in Plastochinone, Rhodochinone und Ubichinone untergliedert (Collins & Jones, 1981).

Klassifizierung anhand von respiratorischen Chinonen basiert auf dem Ring (Naphthol- bzw. Benzol-Ring) und seinen Derivaten (Demethylmenachinon (DMK) und Rhodochinon (RQ)), sowie der Länge und dem Sättigungsgrad der Isoprenoidseitenketten (Mannheim *et al.*, 1978; Collins & Jones, 1981; Busse *et al.*, 1996). Gram-positive Bakterien sind durch Menachinone und ihre Derivate Dihydromenachinon und Demethylmenachinon charakterisiert. Bei den Gram-negativen sind ebenfalls Menachinone, weiters deren Derivat Demethylmenachinon und Ubichinone zu finden (Collins & Jones, 1981). Letztere sind innerhalb der Bakterien ausschließlich bei Vertretern der *Alpha*-, *Beta*- und *Gammaproteobacteria* zu finden (Collins & Jones, 1981; Busse *et al.*, 1996). Hierbei ist meistens Ubichinon-10 (Q-10), aber auch Q-11 und Q-9 für die *Alphaproteobacteria* als Hauptkomponente charakteristisch. In der Klasse der *Betaproteobacteria* ist ausschließlich Ubichinon-8 (Q-8) als Hauptkomponente zu finden. Die dominierenden Komponenten innerhalb der *Gammaproteobacteria* sind mit Ausnahme des Genus *Legionella* mit Q-10,-11,-12,-13 (Lambert & Moss, 1989) üblicherweise Ubichinone -7, -8 oder -9 (Collins & Jones, 1981; Busse *et al.*, 1996). Zur Analyse des Chinonsystems werden Chinonextrakte hergestellt, welche mittels HPLC analysiert werden. Die Identifikation von Chinonen erfolgt anhand der Retentionszeiten von Referenzen.

2.3. Polare Lipide

Polare Lipide sind Bausteine von Biomembranen und somit in allen Lebewesen vorhanden. Am häufigsten in bakteriellen Membranen vorkommende polare Lipide sind Glycerophospholipide wie Phosphatidylglycerol, Diphosphatidylglycerol, Phosphatidylethanolamin, Phosphatidylcholin, Phosphatidylserin, Phosphatidylinositol und Glycerophosphoglykolipide (Lechevalier *et al.*, 1977; Imhoff *et al.*, 1982; Fischer *et al.*, 1973; Kates, 1990). Diese bestehen aus einem polaren Kopf aus Glycerin und einer Phosphatgruppe, an welcher ein Aminoalkohol (Ethanolamin, Cholin), ein mehrwertiger Alkohol (Inositol), eine Aminosäure (z.B. Serin) oder ein Zucker (z.B. Mannose) kovalent gebunden sein kann. Am polaren Kopf sind Fettsäureketten verestert, welche sich in ihrer Länge, dem Vorkommen von Hydroxygruppen, Verzweigungen und ihrem Sättigungsgrad unterscheiden können. Durch verschiedene polare Gruppen und Fettsäureketten ergeben sich Unterschiede in der Polarität der Lipide, welche bei einer Auftrennung in eher polaren Lösungsmitteln in der Regel zum unterschiedlichen chromatographischen Verhalten führen. Nach zweidimensionaler chromatographischer Auftrennung erfolgt die Charakterisierung und Identifikation der polaren Lipide anhand von funktionellen Gruppen durch Sprühreagenzien, sowie anhand des Laufverhaltens verglichen mit Referenzsubstanzen (Tindall, 1990a; Busse *et al.*, 1996). Je nach untersuchter Bakteriengruppe können familien- bis speziesspezifische Aussagen getroffen werden (Busse *et al.*, 1996).

3. Molekularbiologische Methoden

3.1. 16S rRNA Gensequenzen

Bei den 16S rRNA Genen handelt es sich um stark konservierte Gene, welche in der genomischen DNA in Operonen organisiert sind und nach erfolgter Transkription als Strukturkomponenten von Ribosomen dienen. Da sie Bestandteile einer komplexen molekularen Maschinerie, dem Ribosom, darstellen, konnten sich im Laufe der Evolution nur wenige Mutationen anhäufen (Woese, 1987). 16S rRNA Gene weisen deshalb eine starke Konservierung auf, welche die Entwicklung von universellen eubakteriellen Primern möglich machte (Lane *et al.*, 1985; Lane, 1991), um das nahezu vollständige 16S rRNA Gen zu amplifizieren und nachfolgend zu sequenzieren. Basierend auf den erhaltenen Sequenzen und entsprechenden Referenzen kann dann üblicherweise eine phylogenetische Eingliederung bis zur taxonomischen Ebene des Genus, oder seltener auch bis zur Spezies erfolgen (Fox *et al.*, 1992; Janda & Abbott, 2007).

Die Hilfe der 16S rRNA Gensequenzen können Sequenzähnlichkeitsmatrizes und phylogenetische Stammbäume erstellt werden. Bei den Stammbaumberechnungen kann zwischen zwei Typen von Bäumen unterschieden werden, dem phylogenetischen und dem Konsensusbaum. Der phylogenetische Stammbaum stellt durch die Länge der horizontalen Äste den phylogenetischen Abstand zwischen den untersuchten Taxa dar. Der Konsensusbaum hingegen zeigt die wahrscheinlichsten Verzweigungspunkte an. Die Höhe der Wahrscheinlichkeit wird hierbei in bootstrap Werten (in %) angegeben.

3.2. Sequenzen der Haushaltsgene

Haushaltsgene kommen in jeder Bakterienzelle vor, da sie für grundlegende Zellvorgänge kodieren, welche fürs Leben essentiell sind. Dabei kann es sich um Gene handeln, welche z.B. bei der Zellteilung, DNA Replikation oder Genexpression, Energiegenerierung oder im Metabolismus eine Rolle spielen. Aufgrund ihrer fürs Überleben wichtigen Funktionen akkumulierten Haushaltsgene im Laufe der Evolu-

3. Molekularbiologische Methoden

tion wenige Mutationen. Diese Gene sind daher konserviert, weisen dabei aber bei weitem nicht so hohen Grad an Konservierung auf wie 16S rRNA Gene. Dadurch besitzen diese Gene gegenüber den 16S rRNA Genen eine höhere Auflösung auf der taxonomischen Ebene des Genus und der Spezies, wodurch sie sich zur Beantwortung von Fragestellungen auf diesen taxonomischen Ebenen eignen können (Young *et al.*, 2008; Papke *et al.*, 2011; Weon *et al.*, 2011). Voraussetzung für die Analyse sind spezifische Primer, um in einer Polymerasekettenreaktion (PCR) die entsprechenden Gene amplifizieren zu können. Da die Haushaltsgene bei weitem nicht so stark wie die 16S rRNA Sequenz konserviert sind, gibt es üblicherweise keine universellen Primer zur Amplifizierung, wodurch meist nur gruppenspezifische Primer konstruiert werden können. Im Rahmen dieser Arbeit sollten Primerpaare zur partiellen Amplifikation der Gene *gyrB* und *lepA* konstruiert werden.

3.2.1. Haushaltsgen *gyrB*

Das *gyrB* Gen kodiert für die β -Untereinheit der DNA-Gyrase (Typ II Topoisomerase). DNA-Gyrasen sind Heterotetramere, welche aus jeweils zwei α - und β -Untereinheiten bestehen und eine essentielle Rolle bei der Replikation und Transkription spielen, indem sie positive Überspiralisierungen, welche während der Entwindung von doppelsträngiger DNA durch Helikasen entstehen, relaxieren (Watt & Hickson, 1994). Die Funktion der α -Untereinheit, welche durch das *gyrA* Gen kodiert wird, ist die Bindung von DNA, das Einfügen eines doppelsträngigen DNA-Bruchs und dessen Verschließen nach erfolgter Rotation. Die Proteinuntereinheit B der Gyrase bindet den Cofaktor Mg^{2+} , katalysiert die ATP-Hydrolyse und liefert somit die Energie für den ds-DNA Bruch. Ohne diese von der DNA-Gyrase durchgeführte Relaxation von Überspiralisierungen würde die DNA Replikation zum Stillstand kommen und Zellproliferation wäre nicht mehr möglich (Berger & Wang, 1996). Wiederholt konnte gezeigt werden, dass sich Topoisomerasegene, wie das *gyrB* Gen, für Biodiversitätsanalysen und mikrobielle Identifikation bis zur taxonomischen Ebene der Spezies eignen (Huang, 1996; Wang *et al.*, 2007; Peeters & Willems, 2011).

3.2.2. Haushaltsgen *lepA*

Die 'leader peptidase' (LepA) ist ein Elongationsfaktor 4 der Proteinbiosynthese, welches die Translokation von t-RNA's im Ribosom rückgängig machen kann und somit am Korrekturlesemechanismus während der Proteinbiosynthese beteiligt ist (Qin *et al.*, 2006). Das LepA Protein wird zur akkuraten und effizienten Translation von Proteinen unter bestimmten Stressbedingungen, z.B. bei einer erhöhten Ionen-

3.3. 'Enterobacterial repetitive intergenic consensus' PCR

konzentration, benötigt. Dieser Elongationsfaktor ist in allen Bakterien zu finden und weist eine relativ hoch konservierte Proteinsequenz auf (Qin *et al.*, 2006), wodurch Primer-Entwicklung möglich war.

Die erhaltenen partiellen *gyrB* und *lepA* Gensequenzen sollten anschließend benutzt werden, um verwandtschaftliche Verhältnisse in Form von Sequenzähnlichkeiten und Stammbäumen darzustellen. Da es sich bei den *gyrB* und *lepA* Haushaltsgenen um proteinkodierende Gene handelt und der genetische Code degeneriert ist, sollten nicht nur Nukleotidsequenz-basierte Stammbäume und Sequenzähnlichkeitsmatrizes erstellt werden, sondern selbige Analyse auch nach Translation der korrespondierenden Nukleotidsequenzen durchgeführt werden.

3.3. 'Enterobacterial repetitive intergenic consensus' PCR

Bei der ERIC-PCR handelt es sich um eine genomische Fingerabdruckmethode, welche ursprünglich bei Vertretern der Familie *Enterobacteriaceae* Anwendung fand (Hulton *et al.*, 1991). Mittlerweile konnte mehrfach gezeigt werden, dass ERIC-Boxen auch bei anderen eubakteriellen Gruppen vorhanden sind (Versalovic *et al.*, 1991; Gillings & Holley, 1997) und sich auch hier eignen, enge Verwandtschaftsverhältnisse auf der Ebene der Spezies oder manchmal auch von Stämmen derselben Spezies zu klären (Jeršek *et al.*, 1999; Wieser & Busse, 2000). Die Methode basiert auf dem Vorkommen von ERIC-Boxen, hoch konservierten imperfekten Palindromen von ca. 127 Bp, welche im Genom mehrmals verstreut vorliegen und an welche ERIC-Primer binden können. Je nach Abstand zweier ERIC-Boxen entstehen während der PCR verschieden lange Amplifikate. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung der unterschiedlich langen PCR-Produkte ergeben sich bei unterschiedlichen Spezies in der Regel verschiedene Bandenmuster, gleiche Bandenmuster sind ein Indiz für Stämme einer Spezies.

4. Ziele der vorliegenden Arbeit

4.1. Vergleichende taxonomische Untersuchungen von Spezies der Genera *Massilia* und *Telluria*

Eines der Hauptziele dieser Arbeit war, zu zeigen, ob das chemotaxonomische Merkmal wie das Muster der polaren Lipide als Differenzierungsmerkmal von Vertretern des Genus *Massilia* zu den Vertretern des Genus *Telluria* dienen kann. Im Übrigen sollten ausgewählte Vertreter der Genera *Telluria* und *Massilia* chemotaxonomisch durch Ermittlung ihrer Chinonsysteme und Muster der Polyamine charakterisiert werden. Zur Erläuterung der phylogenetischen Position von Vertretern der beiden Genera zueinander sollten Primerpaare zur partiellen Amplifikation von Haushaltsgenen entwickelt werden. Anhand von Sequenzunterschieden in diesen Genen sollten die separaten phylogenetischen Positionen auf der taxonomischen Ebene des Genus unterstützt oder angegriffen werden. Hierfür sollten basierend auf den partiellen Nukleotid- und Aminosäuresequenzen der Haushaltsgene DNA-Gyrase B-Untereinheit (*gyrB*) und dem ribosomalen Elongationsfaktor 4 der Proteinbiosynthese (*lepA*) Stammbäume berechnet werden. Zusätzlich sollten Sequenzähnlichkeitsmatrizes erstellt werden, um die Verwandtschaft zwischen einzelnen Stämmen durch prozentuale Sequenzähnlichkeiten in diesen Genen aufzuzeigen.

4.2. Taxonomische Eingliederung der Isolate E-JS-7, NS9 und *Oxalobacteraceae* bacterium Ma

Ein weiteres Hauptziel der vorliegenden Arbeit war, die Isolate E-JS-7, *Oxalobacteraceae* bacterium Ma und NS9 phylogenetisch einzuordnen und chemotaxonomisch zu charakterisieren. Zur chemotaxonomischen Charakterisierung sollte das Muster der Polyamine, die Chinonsysteme und Profile der polaren Lipide analysiert und vergleichend mit Vertretern des Genus *Massilia* untersucht werden. Durch die Ähnlichkeiten in den 16S rRNA, *gyrB* und *lepA* Nukleotidsequenzen und in den zwei

4.2. Taxonomische Eingliederung von E-JS-7, NS9, *Oxalobacteraceabacterium* Ma

letztgenannten Genen auch in den korrespondierenden Aminosäuresequenzen sollten die nächst Verwandten ermittelt werden. Die phylogenetische Position dieser Isolate sollte anhand von Stammbäumen basierend auf den partiellen 16S rRNA, *gyrB* und *lepA* Gensequenzen aufgezeigt werden.

Von *M. aerilata* DSM 19289^T wurden zwei verschiedene Kolonietypen, welche mit „A“ und „B“ bezeichnet wurden, isoliert (Prof. P. Kämpfer, Institut für Angewandte Mikrobiologie, Justus-Liebig Universität, Gießen, Deutschland). Üblicherweise handelt es sich bei der Koloniemorphologie um ein speziesspezifisches Merkmal. Daher sollte gezeigt werden, ob es sich bei den Kolonietypen um unterschiedliche oder um dieselbe Spezies handelt. Um diese Fragestellung zu beantworten sollte das *gyrB* Haushaltsgen von beiden Kolonietypen partiell sequenziert und die Sequenzen verglichen werden. Zusätzlich sollte eine ERIC-PCR durchgeführt werden, mit deren Hilfe unterschiedliche Spezies und seltener, Stämme derselben Spezies nachgewiesen werden können (Wieser & Busse, 2000).

Teil II.

Material und Methoden

5. Medien, Puffer und Lösungen

Pepton-Yeast-Extract (PYE) Medium

3.0 g Trypton/ Pepton aus pankreatisch verdauten Casein (Roth)

3.0 g Hefeextrakt (Merck)

gelöst in 1 l dH₂O

1/10 Pepton-Yeast-Extract (PYE) Medium

0.3 g Trypton/ Pepton aus pankreatisch verdauten Casein (Roth)

0.3 g Hefeextrakt (Merck)

gelöst in 1 l dH₂O

Der pH-Wert beider Medien wurde mit einer 1N NaOH Lösung auf 7.2 ± 0.05 eingestellt. Für feste Medien wurde 1.5 g Agar und für Weichagar 0.3 g Agar (Bacteriological Agar, Oxoid) pro Liter zugesetzt und die Medien bei 121 °C und 1.5 bar für 15 min autoklaviert.

6x DNA Ladepuffer

0.25 % (w/v) Bromphenolblau (Riedel-de Haën)

40.0 % (w/v) Sucroslösung

Aufbewahrung erfolgte bei 4 °C.

Kryopuffer (zur Herstellung von Glycerinkulturen)

100.0 ml 0.5 M di-Kaliumhydrogenphosphat (Roth)

100.0 ml 0.5 M Kaliumdihydrogenphosphat (Roth)

Beide Lösungen wurden miteinander so vermischt, dass ein pH von 7.4 erreicht wurde. Danach wurde der Kryopuffer bei 121 °C und 1.5 bar für 15 min autoklaviert.

Molybdatophosphorsäure-Sprühreagenz

5.0 g Molybdatophosphorsäure-Hydrat (Merck)

100.0 ml Ethanol p.a.

Aufbewahrung erfolgte lichtgeschützt bei RT .

5. Medien, Puffer und Lösungen

α -Naphthol-Sprühreagenz

Lösung A:

150.0 ml α -Naphthol (Roth)

850.0 ml Chloroform/ Methanol 25:30 (v/v)

Lagerung bei 4 °C

Lösung B:

40.5 ml Ethanol p.a.

4.0 ml dH₂O

6.5 ml konz. Schwefelsäure

10.5 ml an Lösung A wurden mit dem gesamten Volumen der Lösung B vermischt.
Das Sprühreagenz wurde bei RT und lichtgeschützt aufbewahrt.

Ninhydrin-Sprühreagenz

0.2 g Ninhydrin (Riedel-de Haën)

gelöst in 100.0 ml Ethanol p.a.

Aufbewahrung erfolgte lichtgeschützt bei RT .

10x TRIS-Borat-EDTA-Puffer

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

55.0 g Borsäure p.a. (Roth)

9.3 g Ethylendiamintetraessigsäure p.a. (EDTA) (Roth)

gelöst in 1 l dH₂O

6. Bakterienstämme und Isolate

Das Isolat *Oxalobacteraceae* bacterium Ma wurde von R. Kaden (Nationales Veterinärinstitut, Uppsala, Schweden) zur Verfügung gestellt. Das Isolat NS9 stammte aus der institutseigenen Sammlung. Alle weiteren in dieser Arbeit untersuchten Stämme sowie das Isolat E-JS-7 wurden von P. Kämpfer (Institut für Angewandte Mikrobiologie, Justus-Liebig Universität Gießen, Deutschland) zur Verfügung gestellt. Ein Überblick über die in dieser Arbeit untersuchten Stämme und Isolate, ihre Isolierungsquelle sowie das verwendete Kultivierungsmedium finden sich in Tabelle 6.1.

6. Bakterienstämme und Isolate

Tabelle 6.1.: Im Rahmen dieser Arbeit untersuchte Stämme und Isolate. Abkürzungen: PYE, Pepton-Yeast-Extract; KACC, Korean Agricultural Culture Collection; CCTUG, Culture Collection University of Göteborg; CIP, Collection of the Institute Pasteur; DSM, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen.

Stamm / Isolat	Agartyp	Isolierungsquelle	beschrieben von	16S rRNA Zugangs-Nr.
<i>M. abdidiflava</i> CIP 109189 ^T	1/10 PYE	schwermetallbelasteter Boden, Nanjing, Südostchina	Zhang <i>et al.</i> , 2006	AY965999
<i>M. aurea</i> AP13 ^T	1/10 PYE	Trinkwasser, Sevilla, Spanien	Gallego <i>et al.</i> , 2006	AM231588
<i>M. consociata</i> CCTUG 58010 ^T	PYE	Blut, 48-jähriger Patient, Göteborg, Schweden	Kämpfer <i>et al.</i> , 2011	FN814307
<i>M. haematophila</i> CCTUG 38318 ^T	PYE	Blut, 23-jähriger Patient mit diversen Krankheiten	Kämpfer <i>et al.</i> , 2008	AM774589
<i>M. dura</i> CCTUG 52213 ^T	PYE	schwermetallbelasteter Boden, Nanjing, Südostchina	Zhang <i>et al.</i> , 2006	AY965998
<i>M. lutea</i> CIP 109190 ^T	1/10 PYE	schwermetallbelasteter Boden, Nanjing, Südostchina	Zhang <i>et al.</i> , 2006	AY966001
<i>M. niabensis</i> KACC 12632 ^T	1/10 PYE	Luft, Suwon-Region, Südkorea	Weon <i>et al.</i> , 2009	EU808006
<i>M. nastensis</i> KACC 12599 ^T	PYE	Luft, Suwon-Region, Südkorea	Weon <i>et al.</i> , 2009	EU808005
<i>M. placata</i> DSM 17505 ^T	1/10 PYE	schwermetallbelasteter Boden, Nanjing, Südostchina	Zhang <i>et al.</i> , 2006	AY966000
<i>M. timonae</i> CCTUG 45783 ^T	PYE	Blut, 25-jähriger immunsupprimierter Patient, Marseille, Frankreich	La Scola <i>et al.</i> , 1998	U54470
<i>M. varians</i> CCTUG 35299 ^T	PYE	Auge, 90-jähriger Patient, Tronsö, Norwegen	Kämpfer <i>et al.</i> , 2008	AM774587
<i>D. phyllosphaerae</i> T54 ^T	1/10 PYE	Blattoberfläche von Weisklee, Deutschland	Kämpfer <i>et al.</i> , 2010	FR852575
NS9	PYE	Luft, Sainsbury Centre for Visual Arts, Norwich, Großbritannien	Orthová <i>et al.</i> , 2014	HG798294
E-JS-7	1/10 PYE	Aquarium-Wasser einer Blutegefarm, Deutschland	Gläser, 2012	KJ1183018
<i>Oralbacteraceae</i> bacterium Ma	1/10 PYE	Tonerde aus Bergwerk, Westerwald, Deutschland	Kaden, 2009	GQ451844
<i>M. aeritata</i> DSM 19289 ^T , „A“ & „B“	1/10 PYE	Luft, Suwon-Region, Südkorea	Weon <i>et al.</i> , 2008	EF688526
<i>T. chinobrytica</i> CIP 104069 ^T	1/10 PYE	lehmiger Boden mit Krebsstierschalen, Bet Dagan, Israel	Bowman <i>et al.</i> , 1993	KJ1183020
<i>T. mizata</i> CCTUG 35206 ^T	1/10 PYE	Schwarzerde, Lockyer Valley, Queensland, Australien	Bowman <i>et al.</i> , 1993	KJ1183019

7. Kultivierung der Bakterien

7.1. Überlebens-tests

Die Stämme wurden auf PYE und 1/10 PYE Agar im drei-Sektoren-Verdünnungsausstrich ausplattiert, bei 28 °C, 40 % relativer Feuchte inkubiert und in regelmäßigen Abständen unter Entnahme von ein paar Kolonien auf Wachstum getestet. Beurteilung des Wachstums erfolgte mit freiem Auge als auch unter der Stereolupe (Nikon SMZ-U, Vergrößerung 1:10).

7.2. Herstellung von Kryokulturen

Zur Herstellung von Kryokulturen wurden die Stämme passagiert und nach zweitägiger Inkubation bei 28 °C, 40 % relativer Feuchte jeweils eine 1/4 Impföse an Zellmaterial entnommen und in je einem Cryobank™-System Kryoröhrchen (Mast Diagnostica) resuspendiert. Anschließend wurden die Kryoröhrchen kurz auf Eis gestellt und bei -80 °C eingefroren. Kontrolle der Reinheit und Überlebensfähigkeit erfolgte nach zehntägiger Aufbewahrung bei -80 °C durch Auskratzen eines Eisstücks und Ausplattieren auf PYE Agar. Bei den Stämmen *M. lutea* CIP 109190^T und *M. niabensis* KACC 12632^T führte das sofortige Einfrieren bei -80 °C zu keinen lebensfähigen Kryokulturen. Diese Stämme wurden unter Benutzung eines Nalgene™ Isopropanol Kryocontainers (Thermo Scientific) zuerst für 1 Std. auf -20 °C gestellt, anschließend für ca. 1 Tag bei -80 °C schrittweise eingefroren und danach analog bei -80 °C aufbewahrt. Reinheit und Überlebensfähigkeit der Kryokulturen wurde nach zehntägiger Aufbewahrung bei -80 °C nach nahezu vollständigem Auftauen bei 37 °C und anschließendem Ausplattieren und Inkubation auf PYE bzw. 1/10 PYE Agar bei 28 °C nachgewiesen.

7.3. Biomasse-Gewinnung zur Extraktion von Chinonen und polaren Lipiden

Der Gehalt an polaren Lipiden und Chinonen wird nicht bedeutend vom physiologischen Alter der Zellen beeinflusst. Daher spielte die Dauer der Kultivierung bei der Anzucht der Biomasse zur späteren Extraktion von polaren Lipiden und Chinonen eine untergeordnete Rolle. Die Biomasse aller untersuchten Stämme wurde in 20 ml PYE Vorkulturen und im Folgenden in 300 ml PYE Bouillon bei 28 °C, 40 % relativer Feuchte und 205 UPM angezüchtet.

7.4. Biomasse-Gewinnung zur Extraktion von Polyaminen

7.4.1. Standardisierung des physiologischen Alters bei homogen wachsenden Kulturen

Bei in homogener Suspension wachsenden Stämmen erfolgte die Standardisierung des physiologischen Alters anhand von Messungen der optischen Dichte (OD). Hierfür wurden die Stämme AP13^T, DSM 17505^T, CIP 104069^T, CIP 109189^T, ¹CIP 109190^T, CCUG 58010^T, CCUG 35206^T, KACC 12599^T, *Oxalobacteraceae* bacterium Ma, NS9 und T54^T in 30 ml PYE Vorkulturen bei 28 °C, 40 % relativer Feuchte und 205 UPM über Nacht kultiviert, anschließend auf 100 ml PYE Hauptkulturen überimpft und in 1 - 2-stündigen Abständen die OD₆₀₀ im Spektralphotometer (Eppendorf) bestimmt, bis keine Zunahme der OD₆₀₀ mehr erkennbar war (stationäre Phase). Ausgehend von dieser maximalen optischen Dichte wurden 65 % - 75 % des OD₆₀₀ Wertes als geeigneter Bereich für die Ernte der nächsten Kultur gewählt. Mit Hilfe der Formel

$$\frac{200}{70\% OD_{600\text{nm}}} = \text{benötigtes Volumen (ml)}$$

wurde das ungefähre zur Anzucht der Biomasse benötigte Kulturvolumen ermittelt und die Biomassen anschließend unter analogen Kultivierungsbedingungen angezogen.

¹Stamm CIP 109190^T bildet zu Beginn der Kultivierung in der PYE Bouillon Flocken, verliert diese aber im Laufe der Kultivierung, sodass OD_{600nm} Messungen vorgenommen werden konnten.

7.4.2. Standardisierung des physiologischen Alters bei inhomogen wachsenden Kulturen

Standardisierung des physiologischen Alters anhand von Messungen der OD ist bei flockenden und/ oder Schlieren-bildenden Kulturen nicht möglich. Daher wurde bei den Stämmen DSM 19289^T „A“ und „B“, CCUG 52213^T sowie E-JS-7 ein optischer Vergleich zur Ermittlung der spätexponentiellen Wachstumsphase durchgeführt. Dazu wurden parallel zwei 200 ml PYE Hauptkulturen mit 10 ml bzw. 5 ml der Vorkultur beimpft und bei 28 °C, 40 % relativer Feuchte und 205 UPM so lange inkubiert, bis mit dem freien Auge nur noch ein leichter Unterschied in der Trübung zu sehen war. Anschließend wurde die Kultur mit optisch geringerer Dichte geerntet. Zum Zeitpunkt der Ernte sollte die dichter bewachsene Kultur bereits die stationäre Phase erreicht haben, während sich die weniger dichte Kultur noch im Wachstum bzw. in der spätlogarithmischen Phase befinden sollte.

Die Biomassen zur Extraktion von Polyaminen, polaren Lipiden und Chinonen wurden bei 8000 UPM, 4 °C für 30 min pelletiert (Zentrifuge SORVALL RC6+, Rotortyp LEX F12-6x500, Thermo Scientific) und der Überstand abdekantiert. Nach einem Waschschrift in ca. 20 ml 0.87 % (w/v) NaCl Lösung wurde die Biomasse bei 13000 UPM, 4 °C für 7 min zentrifugiert. Bei den Stämmen CIP 104069^T und CCUG 52213^T sowie dem Isolat E-JS-7 erfolgte unter diesen Bedingungen keine optimale Pelletierung. Abhilfe schaffte hier Zentrifugation bei 10000 UPM, 4 °C für 30 min und bei 15000 UPM, 4 °C für 15 min beim Waschschrift. Die erhaltenen Biomasse-Pellets wurden bei -20 °C aufbewahrt und nach Bestätigung der Reinheit durch Ausstriche auf PYE Agar durch Lyophilisation (TELSTAR Cryodos) konserviert.

8. Chemotaxonomische Methoden

8.1. Extraktion und Analyse von Polyaminen

Extraktion der Polyamine wurde nach der erstmals von Scherer & Kneifel (1983) angewandten Methode sowie in Annäherung an die Protokolle von Busse & Auling (1988) sowie Altenburger *et al.* (1997) durchgeführt und erfolgte aus lyophilisierter Biomasse, welche in der spätlogarithmischen Wachstumsphase geerntet wurde. Dazu wurden 40 mg (\pm 10 mg) in ein Pyrexröhrchen mit einer Teflondichtung eingewogen und mit 50 μ l internem Standard 1,8-Diaminooctan (20 μ mol/ ml; Sigma) in der Endkonzentration 1 μ mol/ ml pro 40 mg Biomasse versetzt¹. Anschließend wurden 1 ml 0.2 M HClO₄ (Merck) zugesetzt. Nach Verschließen des Röhrchens wurde die Zellsuspension für 30 min bei 100 °C (Heizer Bioer) inkubiert. In der Halbwertzeit wurde zum Durchmischen kurz geschüttelt. Nach Abkühlen der Röhrchen auf Raumtemperatur wurde die Zellsuspension in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und das Zelldebris bei 13000 UPM, 4 °C für 7 min (Zentrifuge Hermle Z 233 MK-2) pelletiert. Anschließend wurden vom Überstand 200 μ l in ein Pyrexröhrchen transferiert und mit 300 μ l Na₂CO₃-Lösung (100 mg/ ml) versetzt. Danach wurden 800 μ l Dansylchloridlösung² (7.5 mg/ ml Aceton) versetzt. Anschließend wurde das Röhrchen dicht verschlossen und nach kurzem Schwenken, für 20 min bei 60 °C inkubiert. Während der Inkubation mit Dansylchlorid wurden die Polyamine dansyliert. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurden zum Abbinden des überschüssigen Dansylchlorids aus der Reaktionslösung 100 μ l Prolinlösung (50 mg/ ml H₂O) zugegeben und die Ansätze für weitere 10 min bei 60 °C inkubiert. Nach Abkühlen auf 4 °C wurden die dansylierten Polyamine durch Zugabe von 100 μ l Toluol p.a. (AppliChem) durch kurzes, kräftiges Schütteln extrahiert und bis zur HPLC Analyse bei 4 °C aufbewahrt.

Zur HPLC ('High Performance Liquid Chromatography') Analyse wurden ca. 10 μ l des Polyaminextrakts injiziert. Als Eluent diente ein linearer Gradient aus

¹Beim internen Standard handelt es sich um ein Polyamin in definierter Konzentration, mit dessen Hilfe die Menge der sich in der Reaktionslösung befindlichen Polyamine berechnet werden kann.

²5-Dimethylaminonaphthalin-1-sulfonylchlorid (AppliChem)

Acetonitril/ dH₂O von 40/ 60 bis 100/ 0 bei einer Flussrate von 1 ml/ min bei 40 °C in 50 min über eine 4.6 x 250 mm RP-18 Hypersil octyldecyl silan Säule, Partikelgröße 5 µm. Die dansylierten Polyamine wurden bei 360 nm zur Fluoreszenz angeregt und das emittierte Licht bei 520 nm gemessen. Identifikation von Polyaminen erfolgte durch Vergleiche von Retentionszeiten gegen Referenzpolyamine. Die Mengen der identifizierten Polyamine wurden in Relation zur Menge des eingesetzten internen Standards unter Benutzung von Korrekturfaktoren berechnet. Die Benutzung von Korrekturfaktoren war notwendig, da die Peak-Flächen der Polyamine nicht in linearer Relation zur Polyaminmenge stehen. Die Korrekturfaktoren waren bei 2-Hydroxyputrescin (HPUT)= 2.8; Putrescin (PUT)= 1.4; 1,3-Diaminopropan (DAP)= 1.8; Cadaverin (CAD)= 1.2; Spermidin (SPD): 1.0; Spermin (SPM)= 0.8 und *sym*-Norspermidin (sNSPD)= 1. Mengenangabe der Polyamine erfolgte in µmol/ g Trockengewicht.

8.2. Extraktion und Analyse von Chinonen

Die Extraktion von Chinonen erfolgte nach den Methoden von Tindall (1990b) und Altenburger *et al.* (1996). Da es sich bei den Chinonen um lichtempfindliche Verbindungen handelt, welche an der Luft oxidieren können, wurden alle Schritte soweit möglich in einer Stickstoffatmosphäre und im Dunkeln durchgeführt. Zur Extraktion von Chinonen wurden ca. 100 mg lyophilisierter Biomasse in ein Pyrexröhrchen eingewogen, mit dem Spatel zerkleinert und mit 2 ml Methanol p.a. versetzt. Anschließend wurde das Röhrchen zum Suspendieren des Zellmaterials kurz geschwenkt. Danach wurde 1 ml n-Hexan zugesetzt, ein Rührkern in das Röhrchen gegeben und der Inhalt kurz mit Stickstoff begast und das Röhrchen dicht mit einem Schraubverschluss mit innenliegender Teflondichtung verschlossen. Anschließend wurde die Suspension für 30 min bei ca. 250 UPM auf einem Magnetrührer im Dunkeln gerührt. Danach wurde das Fläschchen zur Phasentrennung in ein Eisbad gestellt und abgedunkelt. Nach einsetzender Phasentrennung wurde 1 ml eiskaltes n-Hexan zugesetzt und die Mischung bei 3000 UPM, 4 °C in Corex Glaszentrifugationsröhrchen für 5 min zur besseren Phasentrennung zentrifugiert. Anschließend wurde die obere Hexanphase mit einer Pasteurpipette abgehoben und in ein Pyrexröhrchen transferiert. Zur restlichen methanolischen Phase wurden zur weiteren Extraktion 2 ml eiskaltes n-Hexan sowie 2 ml 0.3 % (w/v) NaCl-Lösung zugesetzt. Da es sich bei den Chinonen um hydrophobe Verbindungen handelt, verstärkte die Zugabe einer hydrophilen Lösung den Übergang in die hydrophobe Hexanphase. Danach wurde die Mischung bei 3000 UPM, 4 °C für 5 min zentrifugiert und die Hexanphase mit

8. Chemotaxonomische Methoden

der ersten Hexanfraktion vereint. Die restliche untere Phase wurde bis zur Extraktion von polaren Lipiden bei 4 °C gelagert. Die Chinonextrakte wurden unter einem Stickstoffstrom bis zur Trockene eingengt und bis zur HPLC Analyse bei -20 °C gelagert.

Kurz vor der Analyse wurden die Chinone durch Zugabe von 150 µl einer Mischung aus 1-Chlorbutan und Methanol 1:9 (v/v), gelöst und mittels HPLC detektiert. Das HPLC System enthielt die Komponenten JASCO LG-1580-02, JASCO PU-2080 PLUS Intelligent HPLC Pump, JASCO UV-2075 ÜLUS Intelligent UV/VIS Detector, einen CMA/260 Degaser, sowie eine Hypersil ODS RP-18 Säule (250 4.6 mm, 5 µm Partikel). Als Laufmittel diente 1-Chlorbutan-Methanol 1:9 (v/v). Detektion der Chinone erfolgte bei 269 nm, ihre Identifikation im Vergleich mit Referenzen. Zur Berechnung der Chinonanteile wurden %-Flächenwerte der chinonspezifischen Peaks im Chromatogramm herangezogen.

8.3. Extraktion und Analyse von polaren Lipiden

Die Extraktion von polaren Lipiden erfolgte in Anlehnung an die Protokolle von Tindall (1990b) und Altenburger *et al.* (1996). Die zur Extraktion von Chinonen verwendete Methode erlaubte die Isolierung von polaren Lipiden aus der bei 4 °C aufbewahrten methanolischen Phase mit Zelldebris, welche 2 ml Methanol und 2 ml 0.3 % (w/v) NaCl enthielt. Zur Extraktion von polaren Lipiden wurden 2.5 ml Chloroform p.a. und 3.5 ml Methanol p.a. zugesetzt. Anschließend wurde die Mischung kurz mit Stickstoff begast und unter gelegentlichem Schütteln 15 min bei 80 °C zur Extraktion inkubiert. Danach wurde das Fläschchen auf einen Magnetprüher gestellt und die Mischung unter Rühren auf Raumtemperatur abgekühlt. Zur Kontrolle der durch Hexanreste verursachten und bei der anschließenden Pelletierung des Zelldebris störenden Phasentrennung wurde die Mischung nach dem Abkühlen kurz stehen gelassen. Falls es zu einer Phasentrennung kam, wurde der Hexanphase entsprechendes Volumen an Methanol zugesetzt, was nach Vermischen die Hexanphase verschwinden ließ. Danach wurde das Zelldebris durch Zentrifugation im Corex Zentrifugationsröhrchen bei 3000 UPM, 4 °C für 10 min vom Überstand getrennt. Daraufhin wurde der Überstand in ein Fläschchen mit einem Schraubverschluss, welches 5 ml einer Mischung aus Chloroform:0.3 % (w/v) NaCl im Verhältnis 1:1 enthielt, überführt. Die Mischung wurde anschließend kurz und kräftig geschüttelt, in ein Corex Zentrifugationsröhrchen transferiert und bei 3000 UPM, 4 °C für 5 min zur Phasentrennung zentrifugiert. Durch die Zentrifugation wurde

8.3. Extraktion und Analyse von polaren Lipiden

eine Separierung in drei Phasen erhalten: In eine obere, wässrige Phase, die Proteinschicht und eine untere, Chloroform-hältige Phase. Die untere Phase, welche die gelösten polaren Lipide enthielt, wurde mit einer Pasteurpipette abgehoben und in ein Pyrexröhrchen transferiert. Eine Verunreinigung mit Proteinen sollte dabei vermieden werden. Die in der Chloroformphase gelösten polaren Lipide wurden unter einem Stickstoffstrom bis zur Trockene eingengt, anschließend in 150 µl einer Mischung aus Chloroform:Methanol 2:1 (v/v) gelöst und bis zur zweidimensionalen dünnschichtchromatographischen Analyse bei - 20 °C aufbewahrt.

Die Analyse der Profile der polaren Lipide erfolgte auf 10x 10 cm zugeschnittenen Aluminium-Dünnschichtplatten mit einer Kieselgelbeschichtung (DC-Fertigfolien Alu-gram[®]Sil G/UV₂₅₄, MN Macherey Nagel). Zum Standardisieren der Laufstrecken auf 80 mm wurden die Platten von jeder Seite aus im Abstand von 10 mm vom Rand mit einer Linie versehen und die Probe auf einen möglichst kleinen Eckpunkt mit einer Hamiltonspritze aufgetragen. Anschließend wurde die Platte zur Auftrennung der polaren Lipide in eine Chromatographiekammer gestellt und in der ersten Dimension [Chloroform: Methanol:dest.Wasser; 65:25:4; (v/v/v)] so lange aufgetrennt, bis die Lauffront die Einzeichnung 10 mm unterhalb des gegenüberliegenden Randes erreicht hatte. Danach wurde die Platte für 15 min getrocknet, um 90° gedreht und in der zweiten Dimension [Chloroform:Methanol:Eisessig:dest. Wasser; 80:12:15:4; (v/v/v/v)] aufgetrennt, bis die Lauffront die Einzeichnung erreichte. Nach dem Trocknen für 30 min wurden die aufgetrennten polaren Lipide mittels verschiedener Sprühreagenzien visualisiert (Tab. 8.1).

Tabelle 8.1.: Zur Detektion von polaren Lipiden verwendete Sprühreagenzien. Aufgrund der Toxizität der Sprühreagenzien wurden sämtliche Platten ausschließlich unter dem Abzug besprüht. Die Entwicklung erfolgte mit Ausnahme der mit Molybdennunblau besprühten Platten in Wärmeschränken. *Die Entwicklungszeit ist vom Stamm abhängig, bei den untersuchten Spezies der Genera *Massilia* und *Telluria* war eine Entwicklungszeit von ca. 15 min notwendig. **Flecken können erscheinen und wieder verblasen.

Reagenz	Spezifität	Entwicklungs- temperatur	Zeitspanne	positive Reaktion
Molybdätophosphor- säure	alle polare Lipide	140 °C	variabel, auch bis zu 45 min*	grauschwarze Flecken auf gelben Hintergrund
Nimhydrin	Verbindungen mit einer Aminogruppe	100 °C	5-10 min**	rosarote Flecken auf hellrosa Hintergrund
Molybdennunblau	Verbindungen mit einer Phosphatgruppe	Raumtemperatur	in 1-2 min Schritten	dunkelblaue Flecken auf blauen Hintergrund
α -Naphthol	Zucker	100 °C 140 °C	ca. 10 min danach Einbrennen innerhalb von wenigen min	Glykolipide: rotviolette Flecken; Sphingolipide: grünliche Flecken auf hellorangenen Hintergrund; nach dem Einbrennen sind übrige polare Lipide grauschwarz

8.3. Extraktion und Analyse von polaren Lipiden

Mit dem Sprühreagenz Molybdato-phosphorsäure wurden zuerst alle in der Probe befindliche polare Lipide detektiert und die Menge des Extrakts so angepasst, dass eine optimale Detektion möglich war (üblicherweise 6-8 μ l). Erst danach erfolgte die Detektion der funktionellen Gruppen dieser Lipide und somit ihre genauere Charakterisierung. Zur Detektion von Amino- und Phosphatgruppen wurde das Extrakt erneut wie oben beschrieben chromatographisch zweidimensional aufgetrennt. Zuerst erfolgte die Visualisierung der Aminogruppen wie in der Tabelle 8.1 beschrieben. Die Umrisse der rosaroten, Ninhydrin-positiven Flecken wurden auf Klarsichtfolien abgepaust. Danach wurde die Platte zur Detektion von Phosphatgruppen mit MolybdenumBlue besprüht und die blauen, MolybdenumBlue-positiven Flecken ebenfalls deckungsgleich auf die Folie übertragen. Durch Abgleichen dieser Folie mit der Molybdato-phosphorsäure-Platte mit sämtlichen polaren Lipiden erfolgte schließlich die Zuordnung gemäß dem Färbeverhalten. Da bei den Vertretern des Genus *Massilia* bislang keine Glykolipide (Kämpfer *et al.*, 2011, 2008, 2012a) nachgewiesen wurden, wurde auf diese nur stichprobenartig beim Isolat NS9 getestet. Hierfür wurde der Extrakt der polaren Lipide wie oben beschrieben aufgetrennt und mit α -Naphthol, wie in der Tabelle 8.1 angegeben, besprüht und die polaren Lipide detektiert.

9. Molekularbiologische Methoden

9.1. Extraktion genomischer DNA

Isolation genomischer DNA erfolgte aus allen in dieser Arbeit untersuchten Stämmen und Isolaten mit Hilfe des ULTRAClean™ Microbial DNA Isolation Kits (Mo Bio). Dazu wurden die Stämme passagiert und nach dreitägiger Inkubation jeweils eine volle Impföse an Zellmaterial entnommen und im Eppendorf-Reaktionsgefäß in 300 µl der Microbead-Lösung suspendiert. Anschließend wurde jede Probe in je ein MicroBead-Röhrchen transferiert, mit 50 µl MD 1 Lösung versetzt und für 20 min bei 65 °C und 750 UPM (Thermo-Shaker Kisker) inkubiert. Danach wurden die Röhrchen im Vortexadaptor (Mo Bio) zum Zellaufbruch für 10 min bei Stufe 10 (Vortex-Genie 2, Scientific Industries) geschüttelt und das Zelldebris anschließend bei 10000 UPM und Raumtemperatur für 1 min (Zentrifuge Eppendorf 5418) pelletiert. Der Überstand wurde in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß transferiert, mit 100 µl MD 2 Lösung versetzt, zum Durchmischen kurz geschüttelt und danach für 5 min bei 4 °C inkubiert. Dabei entstehende Präzipitate wurden anschließend durch Zentrifugation für 1 min bei 10000 UPM pelletiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß transferiert, mit 900 µl MD 3 Lösung versetzt und kurz geschüttelt. Danach wurden 650 µl des DNA Extrakts in das zum Kit gehörende Säulchen mit Filter, welches in ein Sammelröhrchen gesetzt wurde, transferiert und die DNA durch Zentrifugation bei 10000 UPM für 30 s an den Filter gebunden. Der Durchlauf wurde verworfen. Je nach Menge des DNA Extrakts waren 2 - 3 Zentrifugationen notwendig. Zu der an den Filter gebundenen DNA wurden 300 µl ethanolhaltiger MD 4 Waschlösung gegeben und diese bei 10000 UPM für 30 s abzentrifugiert. Der Durchlauf wurde verworfen und die Röhrchen zur möglichst vollständigen Ethanolentfernung erneut bei 10000 UPM für 30 s zentrifugiert. Danach wurde das Filtersäulchen in ein neues Sammelröhrchen transferiert und die genomische DNA nach Zugabe von 50 µl MD 5 Lösung durch Zentrifugation bei Raumtemperatur und 10000 UPM für 1 min eluiert. Anschließend wurde der DNA Extrakt 1:5 mit dH₂O verdünnt und für spätere Anwendungen bei -20 °C aufbewahrt.

9.2. 16S rRNA Untersuchungen

9.2.1. PCR-Amplifikation der 16S rRNA Gene

Die PCR-Amplifikation von 16S rRNA Genen erfolgte mit Hilfe des für die Domäne der *Bacteria* universellen Primerpaares 27f und 1492r (Lane, 1991).

Sequenz des 27f Primers: 5'-AGAGTTTGATCCMTGGCTCAG-3'

Sequenz des 1492r Primers: 5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3'

Bei der 16S rRNA PCR verwendete Komponenten und Bedingungen, unter welchen die Amplifikation erfolgte, sind in der Tabelle 9.1 und 9.2 zusammengefasst.

Tabelle 9.1.: Pipettierschema für PCR-Amplifikation der 16S rRNA Gensequenzen. Verwendet wurde das Kit REDTaq® ReadyMix™ PCR Reaction Mix with MgCl₂ (Sigma-Aldrich®) welches 20 mM Tris-HCl, pH 8.3; 100 mM KCl; 3 mM MgCl₂; 0.002 % Gelatine; 0.4 mM dNTP Mix und 0.06 U/ µl DNA Taq Polymerase enthielt. Die Primerkonzentration betrug jeweils 50 pmol/ µl (Invitrogen™, Life Technologies). Als Template diente gereinigte genomische DNA.

Komponenten	Volumen/Ansatz
dH ₂ O	26.2 µl
REDTaq-Mix	30.0 µl
Primer 27f	0.65 µl
Primer 1492r	0.65 µl
DNA	2.5 µl
	Σ 60.0 µl

Tabelle 9.2.: PCR-Bedingungen bei der Amplifikation von 16S rRNA Genen im MultiGene™ Gradient PCR Thermal Cycler (Labnet International, Inc.).

PCR-Phasen	Temperatur	Dauer
Anfangsdenaturierung	95 °C	5 min
Denaturierung	94 °C	1:30 min
Primerhybridisierung	55 °C	1:30 min
Elongation	72 °C	5 min
Finale Elongation	72 °C	10 min
Anzahl der Zyklen	30	

9.2.2. Auftrennung und Aufreinigung der 16S rRNA PCR-Produkte

Der Erfolg der 16S rRNA Amplifikation wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüft. Hierfür wurden 5 µl des PCR-Produktes bei 200 V für 30 min in einem 2 %igen Agarose-Gel in einer (Bio-Rad) Kammer mit 1x TBE Laufpuffer aufgetrennt. Als Größenstandard dienten 5 µl GeneRuler™ 100 Bp Plus DNA Ladder (Thermo Scientific). Zur Visualisierung des PCR-Produktes wurde das Agarose-Gel für 20 min in der Ethidiumbromid-Lösung (2.5 µg/ ml; ROTH) inkubiert und für 10 min im Wasserbad entfärbt. Darstellung der Produktbande erfolgte im Chemi-Doc XRS Geldokumentationsgerät (Bio-Rad) unter Benutzung der Quantity One Software.

Danach wurde das PCR-Produkt mit Hilfe des Kits Wizard®SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) aufgereinigt. Dazu wurde ein dem Volumen an PCR-Produkt entsprechendes Volumen an Membran-bindender Lösung zur PCR-Reaktion zugesetzt und die Mischung auf ein SV Säulchen mit Membran und Sammelröhrchen aufgetragen. Nach Inkubation für 1 min bei Raumtemperatur wurde bei 13000 UPM für 1 min zentrifugiert (Zentrifuge HERMLE, Typ Z 160M) und der Durchfluss verworfen. Das an die Membran gebundene PCR-Produkt wurde in zwei Schritten gewaschen. Hierfür wurden 700 µl Membranwaschlösung zugesetzt und diese bei 13000 UPM und Raumtemperatur für 1 min abzentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und die Membran mit 500 µl Membranwaschlösung durch Zentrifugation bei 13000 UPM für 5 min erneut gewaschen. Danach wurde das Säulchen zum vollständigen Entfernen der Ethanol-basierten Waschlösung erneut zentrifugiert. Zur Elution des PCR-Produktes wurde das Filter-Säulchen in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß gesetzt und nach Zugabe von 50 µl dH₂O und Inkubation für 3 min bei Raumtemperatur durch Zentrifugation bei 13000 UPM, für 1 min aus dem Filter eluiert.

Das aufgereinigte PCR-Produkt wurde anschließend gelelektrophoretisch überprüft. Dazu wurden 2 µl vom aufgereinigten PCR-Produkt mit 2 µl dH₂O und 1 µl 6x DNA Ladepuffer vermengt und unter analogen Bedingungen, wie oben beschrieben, gelelektrophoretisch aufgetrennt und visualisiert. Bis zum Einsenden zum Sequenzieren wurde das PCR-Produkt bei -20 °C aufbewahrt.

9.2.3. Sequenzierung der 16S rRNA Gene

Zum Sanger-Sequenzieren wurde der Firma LGC Genomics eine Mischung aus 10 µl des aufgereinigten PCR-Produkts, 0.6 µl 50 pmol/ µl Primer und 4.4 µl dH₂O über-

sandt. 16S rRNA Gene besitzen eine Länge von ca. 1500 Bp, wobei eine Sequenzierung ca. 1000 Bp mit korrekter Abfolge liefert. Um eine möglichst vollständige Sequenz zu erhalten, wurde das PCR-Produkt mit jeweils dem 27f Vorwärts- und 1492r Rückwärtsprimer eingeschickt. Die Korrektheit der Basenabfolge der erhaltenen Sequenzen wurde im Programm Chromas Lite Version 2.01 (Technelysium Pty Ltd 2005) visuell überprüft und entsprechend an den Enden gekürzt. Anschließend wurde eine Sequenz unter Benutzung des (bioinformatics.org/sms/rev_comp.html; Stothard, 2000) Servers in ihre revers-komplementäre Orientierung umgewandelt und die Sequenzen miteinander in BioEdit Version 7.0.9.0 (Hall, 1999) verglichen und zusammengefügt.

9.2.4. 16S rRNA Sequenzähnlichkeitsmatrizes und Stammbäume

Die Verwandtschaft von *T. chitinolytica* und *T. mixta* zu den Spezies des Genus *Massilia* wurde anhand von prozentualen 16S rRNA Sequenzähnlichkeiten untersucht. Hierfür wurden 16S rRNA Gensequenzen aus den Datenbanken extrahiert, sodass der Datensatz 2 *Telluria*, 23 *Massilia* sowie weitere näher verwandte Stämme umfasste. Die Sequenzen wurden in BioEdit verglichen und durch das Entfernen von Insertionen, Deletionen und mehrdeutigen Positionen, sowie ihre Kürzung auf eine gemeinsame Länge von 1330 Bp bearbeitet. Mit diesem Datensatz wurden anschließend Sequenzähnlichkeitsmatrizes anhand von BioEdit (Hall, 1999) erstellt. Zur Untersuchung der phylogenetischen Verwandtschaft der Spezies *T. mixta* CCUG 35206^T und *T. chitinolytica* CIP 104069^T zu den Vertretern des Genus *Massilia* wurden mit dem 16S rRNA Datensatz Stammbäume anhand der Algorithmen maximum-likelihood, maximum-parsimony und neighbour-joining unter Benutzung von MEGA 5.2.2 (Tamura *et al.*, 2011) berechnet.

Die Ermittlung von nächst Verwandten der Isolate NS9, *Oxalobacteraceae* bacterium Ma und E-JS-7 erfolgte durch Sequenzabgleiche ihrer rohen partiellen 16S rRNA Gensequenzen gegen die Datenbank auf EzTaxon (<http://eztaxon-e.ezbiocloud.net/>; Kim *et al.*, 2012). Zusätzlich wurden die 16S rRNA Sequenzen verwandter Stämme aus der ENA Datenbank extrahiert, sodass der Datensatz 25 Typstämme der Genera *Massilia* und *Telluria* umfasste. In BioEdit (Hall, 1999) wurden die Sequenzen unter Benutzung von Clustal W (Thompson *et al.*, 1994) abgeglichen. Nach erfolgter manueller Bearbeitung durch das Entfernen von Insertionen, Deletionen und zwei-deutigen Positionen wurden die Sequenzen auf eine gemeinsame Länge von 1327 Bp gekürzt. Anschließend wurden in BioEdit (Hall, 1999) Sequenzähnlichkeitsmatrizes erstellt. Des Weiteren wurde der gleiche Datensatz zur Berechnung von phyloge-

netischen Stammbäumen anhand der Algorithmen maximum-likelihood, neighbour-joining und maximum-parsimony unter Benutzung von MEGA 5.2.2 (Tamura *et al.*, 2011) herangezogen. Als 'outgroup' diente die 16S rRNA Sequenz von *Burkholderia cenocepacia* LMG 16656^T (AF148556).

9.3. Untersuchungen der Haushaltsgene

Zum Zeitpunkt der Primerentwicklung im März 2012 standen keine Sequenzdaten für Haushaltsgene von Vertretern des Genus *Massilia* zur Verfügung. Beim Primerdesign wurde daher auf Sequenzen der Haushaltsgene von Spezies verwandter Genera, welche ebenfalls der Familie der *Oxalobacteraceae* angehören, wie *Herbaspirillum*, *Collimonas*, *Janthinobacterium*, *Herminiimonas* sowie auf weiter entfernt verwandte Spezies der Genera *Ralstonia*, *Cupriavidus*, *Burkholderia* und *Bordetella* zurückgegriffen. Auswahl dieser Genera beruhte auf der Arbeitshypothese, dass Genbereiche, welche zwischen nah und weiter verwandtschaftlich entfernten Genera konserviert waren, auch beim Genus *Massilia* konserviert sein sollten und sich somit zum Primerdesign eignen würden. Durch eine Sequenzähnlichkeitssuche gegen die EMBL/Standard Datenbank unter Benutzung des FASTA Programms (Pearson & Lipman, 1988) auf der Webseite des EBI (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/sss/fasta/>) konnten Sequenzen von Haushaltsgenen ausgeforscht werden, selbst wenn die Sequenz des Gens an sich nicht bekannt war, aber eine genomische Sequenz des Organismus bereits vorlag. Anschließend wurde nach möglichst konservierten Sequenzbereichen gesucht, welche als Primer dienen würden. Anhand von genomischen Fragmenten aus der 'shotgun' Sequenzierung der *Massilia* Typspezies *M. timonae* konnte die Primerbindung der entwickelten Primer überprüft werden.

9.3.1. Haushaltsgen *gyrB*

9.3.1.1. Primerkonstruktion zur Amplifikation der *gyrB* Gene

Die Primersequenzen zur partiellen Amplifikation des *gyrB* Gens wurden anhand des FASTA Abgleichs der partiellen kodierenden Sequenz des *gyrB* Gens von *Burkholderia cepacia* Vr46, AY996864 gegen die EMBL Standard/ Nukleotidsequenzdatenbank auf EBI (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/sss/fasta/>; Pearson & Lipman, 1988) konstruiert. Dazu wurden aus der Ergebnisliste des FASTA Abgleichs näher und weiter zum Genus *Massilia* verwandte Stämme als Basis für die Primerentwicklung ausgewählt (Tab. 9.3).

Tabelle 9.3.: Zur Primerkonstruktion ausgewählte *gypB* Genfragmente von engeren und entfernteren Verwandten des Genus *Massilia*. Unterschiede in den Sequenzen sind durch fett gedruckte Buchstaben dargestellt.

Zugangs-Nr.:	Stamm	Sequenzbereich des Vorwärtsprimers	Sequenzbereich des Rückwärtsprimers
AY996864	<i>Burkholderia cepacia</i> Vi-46	5'-TCGTTCCCTGAACAACGGCGG-3'	5'-TCGGTTCATGATGATGATGCGG-3'
CU633749	<i>Cupriavidus taiwanensis</i> LMG 19424 ^T	5'-TCGTTCCCTGAACAACGGCGG-3'	5'-TCGGTTCATGATGATGATGCGG-3'
AEI75373	<i>Cupriavidus necator</i> N-1 ^T	5'-TCGTTCCCTGAACAACGGCGG-3'	5'-TCGGTTCATGATGATGATGCGG-3'
ABF06889	<i>Cupriavidus metallidurans</i> CH34 ^T	5'-TCGTTCCCTGAACAACGGCGG-3'	5'-TCGGTTCATGATGATGATGCGG-3'
FP885897	<i>Ralstonia solanacearum</i> CFBP 2957	5'-TCGTTCCCTGAACAACGGCGG-3'	5'-TCGGTTCATGATGATGATGCGG-3'
ABR88535	<i>Xanthinobacterium</i> sp. Marseille	5'-TCCTTCCCTCAATAACGGCGG-3'	5'-TCGGTTCATGATGATGATGCGG-3'
CU207211	<i>Herrniumonas arsenicoxydans</i>	5'-TCCTTCCCTCAACAATGGCGG-3'	5'-TCGGTTCATGATGATGATACGG-3'

9. Molekularbiologische Methoden

Daraus ergab sich das *gyrB* Primerpaar:

*gyrB*_f: 5'-TCG/CTTCCTG/CAAC/TAAT/CGGCG-3'

*gyrB*_r: 5'-TCGGTCATGATGATGATG/ACGG-3'

Bezogen auf die *gyrB* Sequenz AY996864 von *Burkholderia cepacia* Vr46 bindet der Vorwärtsprimer im Bereich der Nukleotidpositionen 271 - 289 und der Reverse im Bereich zwischen 1161 - 1181. Die theoretische Produktlänge beträgt inklusive Primer 910 Bp.

9.3.1.2. PCR-Amplifikation der *gyrB* Gene

Zur Vervielfältigung des partiellen *gyrB* Gens verwendete Amplifikationsbedingungen sowie das verwendete Pipettierschema sind in der Tabelle 9.4 bzw. 9.5 aufgelistet.

Tabelle 9.4.: Pipettierschema für PCR-Amplifikation partieller *gyrB* und *lepA* Gene. Verwendet wurde das Kit REDTaq[®] ReadyMix[™] PCR Reaction Mix with MgCl₂ (Sigma-Aldrich[®]) welches 20 mM Tris-HCl, pH 8.3; 100 mM KCl; 3 mM MgCl₂; 0.002 % Gelatine; 0.4 mM dNTP Mix und 0.06 U/ µl DNA Taq Polymerase enthielt. Primer stammten von Sigma-Aldrich[®], ihre Menge pro Ansatz betrug jeweils 10 pmol/ µl.

Komponenten	Volumen/Ansatz
dH ₂ O	21.0 µl
REDTaq	25.0 µl
Primer <i>gyrB</i> _f	1.0 µl
Primer <i>gyrB</i> _r	1.0 µl
DNA	2.0 µl
	Σ 50.0 µl

Tabelle 9.5.: PCR-Bedingungen bei der Amplifikation des partiellen *gyrB* Gens im MultiGene[™] Gradient PCR Thermal Cycler (Labnet International, Inc.).

PCR-Phasen	Temperatur	Dauer
Anfangsdenaturierung	94 °C	5 min
Denaturierung	94 °C	1 min
Primerhybridisierung	58.9 °C	45 s
Elongation	72 °C	1 min
Finale Elongation	72 °C	5 min
Anzahl der Zyklen	25	

Die gelelektrophoretische Untersuchung der PCR-Produkte wurde auf einem 2 %igen Agarose-Gel (Agarose NEE0; Roth) in 1x TBE für 55 min bei 200 V unter

Verwendung des GeneRuler™ 100 Bp Plus DNA Ladder Größenstandards (Thermo Scientific) durchgeführt. Danach wurden die PCR-Produkte mit Hilfe der Ethidiumbromid-Färbung (2.5 µg/ ml; ROTH) für 20 min gefärbt und für 10 min im Wasserbad inkubiert. Die Visualisierung der PCR-Produkte erfolgte im ChemiDoc XRS Geldokumentationsgerät (Bio-Rad) unter Benutzung der Quantity One Software. Dabei wurden gewünschte Produktbanden in der Größe von ca. 900 Bp, bei Vorhandensein von schwächeren, unspezifischen Banden in der Größe von ca. 750 Bp detektiert. Bei den Stämmen *M. dura* CCUG 52213^T und *M. plicata* DSM 17505^T waren spezifische Produktbanden vorhanden, jedoch schwächer. Zur Erhöhung der PCR-Produktmengen dieser Stämme wurden deren PCR-Produkte wie im Abschnitt 9.3.2.4 aufgereinigt und anschließend 1:5 mit dH₂O verdünnt. Danach wurde jeweils 1 µl als Template für eine Reamplifikation unter analogen Bedingungen, wie oben bereits beschrieben, verwendet.

9.3.1.3. Auftrennung u. Aufreinigung der *gyrB* PCR-Produkte

Um das gewünschte PCR-Produkt von unspezifischen PCR-Produkten besser zu trennen, wurde ein 2.5 %iges LM Agarose-Gel (D-1 LE Agarose; Fisher Molecular Biology) mit je 2x 20 µl des PCR-Reaktionsgemisches beladen und dieses bei 150 V für 90 min. gelelektrophoretisch aufgetrennt (Bio-Rad Kammer, 1x TBE). Nach erfolgreichem Färben in der Ethidiumbromid-Lösung (2.5 µg/ ml; Roth) für 20 min und anschließendem 10 min Entfärbeschritt im Wasserbad wurden die PCR-Produkte im UV-Licht (Transilluminator Hoefer) visualisiert, die spezifischen Banden herausgeschnitten, in Eppendorf-Reaktionsgefäße transferiert und das Gewicht der Agarose-Gelbanden notiert. Anschließend wurden die PCR-Produkte unter Benutzung des Kits Wizard®SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) aus den Gelbanden isoliert und aufgereinigt. Dazu wurden jeweils 10 µl Membran-bindender Lösung pro 10 mg Gelstückgewicht zugesetzt und diese durch Erhitzen auf 65 °C (Heizer Bioer) bei gelegentlichem Schwenken aufgeschmolzen. Weitere Vorgangsweise war wie im Abschnitt 9.2.2 bereits beschrieben, mit dem Unterschied, dass in 25 µl (statt 50 µl) dH₂O eluiert wurde, um die PCR-Produkte zu konzentrieren. Die aufgereinigten PCR-Produkte wurden bei -20 °C aufbewahrt.

9.3.2. Haushaltsgen *lepA*

9.3.2.1. Primerkonstruktion zur Amplifikation der *lepA* Gene

Zur Primerkonstruktion zur Amplifikation des partiellen *lepA* Gens wurde die Sequenz des *lepA* Gens von *Janthinobacterium* sp. Marseille; ABR89533 im FASTA

9. Molekularbiologische Methoden

Programm mit der EMBL/Standard Nukleotidsequenzdatenbank auf EBI (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/sss/fasta/>; Pearson & Lipman, 1988) verglichen. Auf diese Weise konnten Sequenzfragmente des *lepA* Gens von zum Genus *Massilia* nah verwandten Stämmen der Genera (*Janthinobacterium*, *Herbaspirillum* und *Collimonas*) ausgeforscht werden, welche bei der Konstruktion des *lepA* Vorwärts- und Rückwärtsprimers verwendet wurden (Tab. 9.6).

Daraus ergaben sich folgende *lepA* Vorwärts- und Rückwärtsprimer:

*lepA*_f: 5'-ACC/GATCAAGGCCAGACCGC-3'

*lepA*_r: 5'-ATCAGTTCGCGCATCTTGGC-3'

Bezogen auf die *Janthinobacterium* sp. Marseille *lepA* Sequenz ABR89533 bindet der Vorwärtsprimer im Bereich der Nukleotidpositionen 157 - 176 und der Reverse im Bereich der Nukleotidpositionen 1537 - 1556. Die partielle, theoretische *lepA* PCR-Produktlänge beträgt inklusive Primer 1399 Bp.

9.3.2.2. Primerkonstruktion zur Amplifikation des *lepA* Gens von *M. plicata* DSM 17505^T

Zur Konstruktion von Primern wurden *lepA* Gensequenzen von näher und weiter entfernt zum Genus *Massilia* verwandten Stämmen mittels Clustal W (Thompson *et al.*, 1994) verglichen. Durch diesen direkten Abgleich konnten *lepA* Sequenzfragmente ausgeforscht werden, welche zur Konstruktion von Primern geeignet schienen (Tab. 9.7; 9.8).

Tabelle 9.6.: Zur Primerkonstruktion ausgewählte *lepA* Genfragmente von engeren Verwandten des Genus *Massilia*. Unterschiede in den Sequenzen sind durch fett gedruckte Buchstaben dargestellt.

Zugangs-Nr.	Stamm	Sequenzbereich des Vorwärtsprimers	Sequenzbereich des Rückwärtsprimers
ABR89533	<i>Janthinobacterium</i> sp. Marseille	5'-ACCATCAAGGCCCCAGACCGC-3'	5'-ATCAGTTGGCGCATCTTGGC-3'
ADJ63442	<i>Herbaspirillum seropedicae</i> SmR1	5'-ACCATCAAGGCCCCAGACCGC-3'	5'-ATCAGTTGGCGCATCTTGGC-3'
AEK62699	<i>Collimonas fungivorans</i> Ter331	5'-ACGATCAAGGCCCCAGACCGC-3'	5'-ATCAGTTGGCGCATCTTGGC-3'

Tabelle 9.7.: Für die Konstruktion des Primerpaares zur Amplifikation des partiellen *lepA* Gens von *M. plucata* DSM 17505^T ausgewählte *lepA* Sequenzfragmente verwandtschaftlich zum Genus *Massilia* entfernterer Stämme. Unterschiede in den Sequenzen sind durch fett gedruckte Buchstaben dargestellt.

Zugangs-Nr.	Stamm	Sequenzbereich des Vorwärtsprimers	Sequenzbereich des Rückwärtsprimers
ABF09298	<i>Cupriavidus metallidurans</i> CH34 ^T	5'-AGCGGGGCATCAGGATCAAGGC-3'	5'-ACGTCGTACATCTGACGGGG-3'
AEL77761	<i>Cupriavidus necator</i> N-1 ^T	5'-AGCGCGGCATCACCATCAAGGC-3'	5'-ACGTCGTACATCTGGCGGG-3'
CAQ69999	<i>Cupriavidus taiwanensis</i> IMG 19424 ^T	5'-AGCGCGGCATCAGCATCAAGGC-3'	5'-ACGTCGTACATCTGGCGGG-3'
EHP42285	<i>Cupriavidus basilensis</i> OR16	5'-AGCGCGGCATCACCATCAAGGC-3'	5'-ACGTCATACATCTGGCGGG-3'
EAP72013	<i>Ralstonia solanacearum</i> UW551	5'-AACCGCGGCATCAACCATCAAGGC-3'	5'-ACGTCGTACATCTGGCGGG-3'
CCA86000	<i>Ralstonia syzygii</i> R24	5'-AGCGCGGCATCACCATCAAGGC-3'	5'-ACGTCGTACATCTGGCGGG-3'
CAJ93641	<i>Ralstonia eutropha</i> H16	5'-AGCGCGGCATCAACCATCAAGGC-3'	5'-ACGTCGTACATCTGGCGGG-3'
AAU49375	<i>Burkholderia malvei</i> ATCC 23344 ^T	5'-AGCGCGGCATCAGGATCAAGGC-3'	5'-ACGTCGTACATCTGGCGGG-3'
CAR53166	<i>Burkholderia cenocepacia</i> J2315 ^T	5'-AGCGCGGCATCAACGATCAAGGC-3'	5'-ACGTCGTACATCTGGCGGG-3'

Tabelle 9.8.: Für die Konstruktion des Primerpaares zur Amplifikation des partiellen *lepA* Gens von *M. plicata* DSM 17505^T ausgewählte *lepA* Sequenzfragmente enger zum Genus *Massilia* verwandter Stämme. Unterschiede in den Sequenzen sind durch fett gedruckte Buchstaben dargestellt.

Zugangs-Nr.	Stamm	Sequenzbereich des Vorwärtsprimers	Sequenzbereich des Rückwärtsprimers
EJN07404	<i>Herbaspirillum</i> sp. YR522	5'-AACGGCGGCATCACCATCAAGGC-3'	5'-ACGTCGAACATCTGGCGCGG-3'
CAL62208	<i>Herminiimonas arsenicoxydans</i>	5'-AGCGCGGCATCAGATCAAGGC-3'	5'-ACGTCGAACATCTGGCGCGG-3'
ADJ63442	<i>Herbaspirillum seropedicae</i> SmR1	5'-AGCGCGGCATCACCATCAAGGC-3'	5'-ACATCGAACATCTGGCGCGG-3'
EKF71945	<i>Herbaspirillum frisingense</i> GSF30 ^T	5'-AGCGCGGCATCACCATCAAGGC-3'	5'-ACGTCGAACATCTGGCGCGG-3'
EJL86207	<i>Herbaspirillum</i> sp. CF444	5'-AGCGTGGCATCACGATCAAGGC-3'	5'-ACGTCGAACATCTGGCGCGG-3'
I3CU43_9BURK	<i>Herbaspirillum</i> sp. GW103	5'-AGCGCGGCATCACCATCAAGGC-3'	5'-ACATCAAACATCTGACGCGG-3'
AEK62699	<i>Collimonas fungivorans</i> Ter331	5'-AGCGCGGCATCAGATCAAGGC-3'	5'-ACGTCGAACATCTGGCGCGG-3'
EEO30308	<i>Oxalobacter formigenes</i> OXCC13	5'-AACGTGGCATTACGATCAAGGC-3'	5'-ACGTCGAACATCTGGCGCGG-3'
ABR89533	<i>Janthinobacterium</i> sp. Marseille	5'-AGCGTGGCATTACCATCAAGGC-3'	5'-ACGTCGAACATCTGGCGCGG-3'
UniRef_100UPI0002894F1E	<i>Janthinobacterium</i> sp. PAMC 25724	5'-AACGTGGCATTACCATTAAAGC-3'	5'-ACATCAAACATCTGACGCGG-3'

9. Molekularbiologische Methoden

Unter Berücksichtigung von Variationen in den konservierten Fragmenten der zum Genus *Massilia* verwandten Stämme ergaben sich folgende Vorwärts- und Rückwärtsprimer zur Amplifikation des partiellen *lepA* Gens von *M. plicata* DSM 17505^T:

lepA_f_2: 5'-AG/ACGT/CGGCATT/CACC/GATC/TAAA/GGC-3'

lepA_r_2: 5'-ACG/ATCA/GA/TACATT/CTGG/ACGCGG-3'

Beide Primer wurden unter Benutzung von Oligo Calculator, Version 3.26 (<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/OligoCalc.html>; Kibbe, 2007) negativ auf 3' Komplementarität und Bildung von Sekundärstrukturen getestet. Bezogen auf die *Janthinobacterium* sp. Marseille *lepA* Sequenz ABR89533 bindet der Vorwärtsprimer im Bereich der Nukleotidpositionen 146 - 167, der Reverse im Bereich zwischen 1558 - 1577. Die theoretische *lepA_2* PCR-Produktlänge beträgt inklusive Primer 1431 Bp.

9.3.2.3. PCR-Amplifikation der *lepA* Gene

Das Pipettierschema zur Amplifikation des partiellen *lepA* Gens ist mit dem Pipettierschema zur Amplifikation des partiellen *gyrB* Gens ident und kann unter dem Abschnitt 9.3.1.2, Tabelle 9.4, nachgesehen werden. Für *lepA* PCR-Amplifikationsbedingungen siehe Tabelle 9.9.

Tabelle 9.9.: 'Touchdown'-PCR Einstellungen zur Amplifikation des partiellen *lepA* Gens im MultiGene™ Gradient PCR Thermal Cycler (Labnet International, Inc.). *Die Primerhybridisierungstemperatur wurde in den ersten zehn Zyklen beginnend bei 64.4 °C schrittweise mit jedem Zyklus um 0.2 °C erniedrigt. In den darauffolgenden 20 Zyklen lag die Primerhybridisierungstemperatur bei 59 °C.

PCR-Phasen	Temperatur	Dauer
Anfangsdenaturierung	94 °C	5 min
Denaturierung	94 °C	1 min
Primerhybridisierung	*64.4 °C (-0.2) x10; 59 °C x20	30 s
Synthese	72 °C	1:30 min
Finale Synthese	72 °C	5 min
Anzahl der Zyklen	30	

Unter diesen Bedingungen lieferte die PCR sehr starke und breite Banden. Die Spezifität der PCR-Produkte wurde deshalb mit angepasster Produktmenge nachge-

wiesen. Je 4 µl des PCR-Produktes wurden auf einem 2%igen Agarose-Gel (Agarose NEEO; Roth) bei 120 V für 150 min (Bio-Rad Kammer, 1x TBE) aufgetrennt und wie bereits beschrieben visualisiert. Bei den Stämmen *M. dura* CCUG 52213^T und *M. lutea* CIP 109190^T führte die PCR zu keinen Produktbanden. Diese Stämme weisen untereinander in 16S rRNA Stammbäumen eine nähere Verwandtschaft auf und bilden einen separaten Zweig (Zhang *et al.*, 2006). Daher waren Variationen im Bindungsbereich der Primer denkbar. Eine Erniedrigung der Primerbindungstemperatur auf 59 °C bei sonst gleichbleibenden PCR-Einstellungen führte bei den Stämmen *M. dura* CCUG 52213^T und *M. lutea* CIP 109190^T zu ausschließlich spezifischen Banden.

Das PCR-Pipettierschema sowie die Amplifikationsbedingungen zur Vervielfältigung des partiellen *lepA* Gens von *M. plicata* waren zu jenen in der Tabelle 9.4 und 9.9 analog, aber mit der Ausnahme, dass das Primerpaar *lepA_f_2/ lepA_r_2* verwendet wurde und die Hybridisierungstemperatur 55 °C betrug. Nach der Amplifikation wurden 5 µl des PCR-Produktes auf einem 2%igen Agarose-Gel (Agarose NEEO; Roth) in 1x TBE, bei 200 V für 80 min gelelektrophoretisch aufgetrennt und wie bereits beschrieben visualisiert. Dabei wurde eine erwünschte Bande in der Größe von ca. 1400 Bp, sowie eine Bande von etwas mehr als 3000 Bp detektiert.

9.3.2.4. Auftrennung u. Aufreinigung der *lepA* PCR-Produkte

Die Amplifizierung der partiellen *lepA* Gensequenzen von allen in der vorliegenden Arbeit untersuchten Stämmen und Isolaten ergab nahezu ausschließlich spezifische Produkte. Lediglich beim Stamm *M. plicata* DSM 17505^T war eine Aufreinigung von unspezifischen PCR-Produkten notwendig; hierfür wurden 2x 20 µl des *lepA* PCR-Produktes auf einem 2%igen Agarose-Gel (Agarose NEEO; Roth) bei 140 V für 120 min (Bio-Rad Kammer und 1x TBE Laufpuffer) aufgetrennt und nach der Ethidiumbromid-Färbung visualisiert. Anschließend wurde die gewünschte Bande in der Größe von ca. 1400 Bp herausgeschnitten. Danach wurden die partiellen *lepA* PCR-Produkte wie in den Abschnitten 9.3.1.3 bzw. 9.2.2 angegeben, aus den Gelbanden bzw. den PCR-Reaktionsgemischen aufgereinigt.

9.3.3. Sequenzierung der *gyrB* und *lepA* Gensequenzen

Zum Sequenzieren wurde der Firma LGC Genomics eine Mischung aus 10 µl des *gyrB*- bzw. *lepA*-Amplikons, 1.5 µl dH₂O und 2.5 µl Primer (10 pmol/ µl) übersandt. Der *gyrB* Sequenzierungsprimer war *gyrB_f*. Das *lepA* PCR-Produkt wurde wegen

9. Molekularbiologische Methoden

seiner Länge zweimal von beiden Seiten mit Hilfe der Primer lepA_f und lepA_r sequenziert; beim Stamm *M. plicata* DSM 17505^T wurden die Primer lepA_f_2 und lepA_r_2 zur Sequenzierung verwendet.

Die erhaltenen partiellen Sequenzen wurden anschließend unter Benutzung von Clustal W (Thompson *et al.*, 1994) miteinander verglichen und unter Berücksichtigung des Leserahmens anhand der Sequenzen *Janthinobacterium* sp. Marseille DNA Gyrase B-Untereinheit, ABR88535 und *Janthinobacterium* sp. Marseille GTP-bindendes Protein LepA, ABR89533 auf eine für *gyrB* bzw. *lepA* gemeinsame Länge gekürzt. Bezogen auf die *gyrB* Sequenz ABR88535 stellen die Nukleotidpositionen 724 und 1548 die erste Base des ersten Codons bzw. die letzte Base des letzten Codons dar, resultierend in einer partiellen *gyrB* Sequenzlänge von 825 Bp. Die partiellen *lepA* Gensequenzen wurden in Bezug auf die Sequenz ABR89533 auf den Bereich zwischen 208 - 1506 Bp gekürzt und weisen eine Länge von 1299 Bp auf.

9.3.4. Erweiterung des *gyrB* und *lepA* Datensatzes

Der *lepA* und *gyrB* Datensatz wurde um entsprechende Gensequenzen von Spezies der Genera *Duganella* und *Pseudoduganella* sowie von fünf Spezies des Genus *Masilia* erweitert. Hierfür wurden die *gyrB* und *lepA* Gensequenzen von *D. zoogloeoides* IAM 12670^T / ATCC 25935^T, *gyrB* EU714412 / *lepA* KB912919; *P. violaceinigra* YIM 31327^T / DSM 15887^T, *gyrB* EU714411 / *lepA* KE384358 und *M. alkalitolerans* DSM 17462^T, *gyrB* ATYR01000025 / *lepA* ATYR01000001 aus den Datenbanken extrahiert¹. Die *gyrB* und *lepA* Sequenzen von *M. brevitalea* DSM 18925^T, *M. jejuensis* KACC 12634^T, *M. tieshanensis* KACC 14940^T und *M. yuzhufengensis* CGM-CC 1.12041^T wurden aus genomischen Teilsequenzen (R. Kaden, persönliche Mitteilung), anhand von bl2seq Sequenzvergleichen (blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi; Altschul *et al.*, 1997) extrahiert.

9.3.5. *gyrB* und *lepA* Stammbäume und Sequenzähnlichkeitsmatrizes

Mit Hilfe des Programmpakets MEGA 5.2.2 (Tamura *et al.*, 2011) wurden anhand von partiellen *lepA* und *gyrB* sowie den konkatenierten Nukleotid- bzw. Aminosäuresequenzen Stammbäume (maximum-likelihood, maximum-parsimony und neighbour-joining) mit 1000 bootstrap Wiederholungen berechnet. *Burkholderia cenocepacia*

¹Die *gyrB* Gensequenz der Typspezies *D. zoogloeoides* stammt vom Typstamm IAM 12670^T; jene der *lepA* Gensequenz vom Typstamm ATCC 25935^T. In *P. violaceinigra* ist dies in der *gyrB* Gensequenz der Typstamm YIM 31327^T sowie in der *lepA* Gensequenz der Typstamm DSM 15887^T.

9.4. 'Enterobacterial repetitive intergenic consensus' PCR

J2315^T (*gyrB* AM747720/ *lepA* AM747720) diente hierbei als 'outgroup'. Das *gyrB* Gen von *B. cenocepacia* J2315^T wies in Relation zu den *Massilia gyrB* Gensequenzen zwei Deletionen von 6 Bp und 9 Bp auf, welche dadurch innerhalb des Leserahmens lagen. In Relation zu den *gyrB Massilia* Gensequenzen lagen diese Deletionen an den Nukleotidpositionen 96 - 104 und 124 - 129 bzw. in *Burkholderia* nach den Nukleotidpositionen 809 und 828. In sämtlichen Analysen wurden diese Bereiche entfernt, resultierend in einer kontinuierlichen *gyrB* Sequenzlänge von 810 Bp/ 270 AS. Partielle *lepA* Gene der *Massilia* Spezies wiesen in Relation zu *B. cenocepacia* J2315^T keine Deletionen auf und wurden daher ungekürzt mit 1299 Bp bzw. 433 AS Länge analysiert. Der gleiche Datensatz diente auch zur Erstellung von Sequenzähnlichkeitsmatrizes unter Benutzung von BioEdit (Hall, 1999). Der Datensatz umfasste 17 etablierte *Massilia* Typstämme, die Typstämme des Genus *Telluria*, *T. chitinolytica* CIP 104069^T und *T. mixta* CCUG 35206^T, sowie Spezies nah verwandter Genera *Duganella* und *Pseudoduganella*.

9.4. 'Enterobacterial repetitive intergenic consensus' PCR

Das bei der ERIC-PCR verwendete Pipettierschema sowie die Amplifikationsbedingungen sind in der Tabelle 9.10 und 9.11 ersichtlich.

Sequenz des ERIC_1R Primers: 5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC-3'

Sequenz des ERIC_2 Primers: 5'-AAGTAAGTGACTGGGTGAGCG-3'

(Versalovic *et al.*, 1991)

Zur Auftrennung der Banden wurden jeweils 6.5 µl des PCR-Produktes auf ein 2 %iges Agarose-Gel (Agarose NEE0; Roth) aufgetragen und bei 90 V für 165 min in 1x TBE aufgetrennt. Als Größenstandard dienten 3.5 µl GeneRulerTM 100 Bp Plus DNA Ladder (Thermo Scientific). Visualisierung erfolgte wie im Abschnitt 9.2.2 angegeben.

9. Molekularbiologische Methoden

Tabelle 9.10.: Pipettierschema zur ERIC-PCR. Verwendete Komponenten: 25 mM MgCl₂ (Promega), 5 U/ µl DreamTaq DNA Polymerase (Thermo Scientific), 10x DreamTaq Green Buffer with 20 mM MgCl₂ (Thermo Scientific), 2 mM dNTP Mix (Thermo Scientific), 25 pmol/ µl ERIC_1R und 25 pmol/ µl ERIC_2 (Invitrogen™). Als Template diente aufgereinigte genomische DNA.

Komponenten	Volumen/Ansatz
dH ₂ O	17.1 µl
DreamTaq Polymerase	0.2 µl
10x Green Buffer	3.0 µl
dNTP Mix	3.0 µl
ERIC Primer_1R	1.8 µl
ERIC Primer_2	1.8 µl
MgCl ₂	0.6 µl
DNA	2.5 µl
	Σ 30.0 µl

Tabelle 9.11.: Im MultiGene™ Gradient PCR Thermal Cycler (Labnet International, Inc.) verwendete PCR-Einstellungen zur Amplifikation der ERIC-Boxen.

PCR-Phasen	Temperatur	Dauer
Anfangsdenaturierung	95 °C	7 min
Denaturierung	94 °C	1 min
Primerhybridisierung	52 °C	1 min
Synthese	65 °C	8 min
Finale Synthese	65 °C	15 min
Anzahl der Zyklen	30	

10. Morphologische und physiologische Teilcharakterisierung der Isolate *Oxalobacteraceae* bacterium Ma und NS9

Mit Aussicht auf eine Speziesbeschreibung wurden die Isolate *Oxalobacteraceae* bacterium Ma und NS9 morphologisch durch Beschreibung ihrer Zell- und Koloniemorphologie, cytologisch durch Beschreibung der Beweglichkeit und physiologisch durch Tests auf Vorhandensein der Cytochrom c Oxidase-Aktivität und Katalase-Aktivität charakterisiert. Die Beschreibung dieser Methoden und den Bedingungen, unter welchen diese Tests durchgeführt worden sind, sind im Manuskript 'Massilia norwichensis sp. nov., isolated from an air sample' im Anhang, Kapitel C, angeführt. Diese gelten in gleicher Weise für das Isolat *Oxalobacteraceae* bacterium Ma, mit der Ausnahme der Beschreibung der Koloniemorphologie sowie den Oxidase- und Katalasetests, welche nach der Anzucht auf dem 1/10 PYE Agar, durchgeführt wurden.

Teil III.

Ergebnisse und Diskussion

11. Wachstumscharakteristika und Überlebenstests

Alle im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Stämme und Isolate (Tab. 6.1) wuchsen auf PYE Agar und der entsprechenden Bouillon sowie auf dem nährstoffärmeren 1/10 PYE Agar bei 28 °C und 40 % relativer Feuchte. Unter diesen Kultivierungsbedingungen wurde bereits nach 12- bis 24-stündiger Inkubation Wachstum mit dem freien Auge beobachtet. Einige Stämme wiesen auf dem nährstoffreicheren PYE Agar eine auf wenige Tage begrenzte Überimpfbarkeit auf. Daher wurden Überlebenstests mit dem Ziel, die optimale Kultivierungsdauer in Abhängigkeit der Nährstoffmenge abzuschätzen, durchgeführt.

Bei den ermittelten Überimpfbarkeitswerten handelt es sich um Richtwerte, da die Überimpfbarkeit von Kolonien durch die Dichte des Ausstriches und den damit verbundenen Nährstoffverbrauch/ Akkumulation von Stoffwechselendprodukten, der Dicke des Mediums und von der entnommenen Kolonie (Randkolonie oder Kolonie im dicht bewachsenen Sektor) bzw. vom Koloniealter (bei einer Verzögerung des Wachstums nach Überimpfen von älteren, sich in der stationären Phase befindlichen Kolonien) abhängig ist.

M. albidiflava CIP 109189^T

PYE Agar Eine Überimpfbarkeit der Kultur wurde nach 7-tägiger Inkubation beobachtet. Nach 20-tägiger Inkubation wurde nach dem Überimpfen kein Wachstum beobachtet.

1/10 PYE Agar Eine Überimpfbarkeit der Kultur wurde nach 14-tägiger Inkubation beobachtet.

M. aurea AP13^T

PYE Agar Nach 16-tägiger Inkubation waren gelbe Kolonien überimpfbar, verblasste hingegen nicht mehr. Das Absterben der Kolonien war daher mit freiem Auge am Verblasen der intensiv gelben Kolonien sichtbar. Nach dem Überimpfen von 20 Tage alten Kolonien wurde kein Wachstum beobachtet.

11. Wachstumscharakteristika und Überlebenstests

1/10 PYE Agar Eine Überimpfbarkeit der Kultur wurde nach 14 - 16-tägiger Inkubation beobachtet. Nach dem Überimpfen von 16 Tage alten Kolonien wurde wiederholt kein Wachstum beobachtet.

M. consociata CCUG 58010^T

PYE Agar Eine Überimpfbarkeit der Kultur wurde wiederholt nach 20-tägiger Inkubation beobachtet.

1/10 PYE Agar Ein Austesten der Überimpfbarkeit war auf diesem Medium wegen der Überlebensfähigkeit auf dem PYE Agar nicht notwendig.

M. haematophila CCUG 38318^T

PYE Agar Eine Überimpfbarkeit der Kultur wurde wiederholt nach 20-tägiger Inkubation beobachtet.

1/10 PYE Agar Ein Austesten der Überimpfbarkeit war auf diesem Medium wegen der Überlebensfähigkeit auf dem PYE Agar nicht notwendig.

M. dura CCUG 52213^T

PYE Agar Eine Überimpfbarkeit der Kultur wurde nach 17-tägiger Inkubation beobachtet. Nach dem Überimpfen von 20 Tage alten Kolonien wurde kein Wachstum beobachtet.

1/10 PYE Agar Eine Überimpfbarkeit wurde nach 16-tägiger Inkubation beobachtet.

M. lutea CIP 109190^T

PYE Agar Eine Überimpfbarkeit der Kultur wurde nach 20-tägiger Inkubation beobachtet.

1/10 PYE Agar Eine Überimpfbarkeit der Kultur wurde nach 16-tägiger Inkubation beobachtet.

M. niabensis KACC 12632^T

PYE Agar Eine Überimpfbarkeit der Kultur wurde nach 2 - 3-tägiger Inkubation beobachtet. Nach dem Überimpfen von 5 - 6 Tage alten Kolonien wurde kein Wachstum beobachtet.

1/10 PYE Agar Eine Überimpfbarkeit der Kultur wurde nach 4 - 5 Tagen anhand von wenigen (ca. 10) Kolonien beobachtet.

***M. niastensis* KACC 12599^T**

PYE Agar Eine Überimpfbarkeit der Kultur wurde nach 20 Tagen Inkubation beobachtet.

1/10 PYE Agar Eine Überimpfbarkeit der Kultur wurde nach 20-tägiger Inkubation beobachtet.

***M. plicata* DSM 17505^T**

PYE Agar Eine Überimpfbarkeit der Kultur wurde nach 1 Tag Inkubation beobachtet. Nach dem Überimpfen von 3 Tage alten Kolonien wurde kein Wachstum beobachtet.

1/10 PYE Agar Nach 16-tägiger Inkubation wurde eine Überimpfbarkeit der Kultur beobachtet.

***M. timonae* CCUG 45783^T**

PYE Agar Eine Überimpfbarkeit der Kultur wurde wiederholt nach 20-tägiger Inkubation beobachtet.

1/10 PYE Agar Ein Austesten der Überimpfbarkeit war auf diesem Medium wegen der Überlebensfähigkeit auf dem PYE Agar nicht notwendig.

***M. varians* CCUG 35299^T**

PYE Agar Eine Überimpfbarkeit der Kultur wurde wiederholt nach 20-tägiger Inkubation beobachtet.

1/10 PYE Agar Ein Austesten der Überimpfbarkeit war auf diesem Medium wegen der Überlebensfähigkeit auf dem PYE Agar nicht notwendig.

***D. phyllosphaerae* T54^T**

PYE Agar Eine Überimpfbarkeit der Kultur wurde nach 7-tägiger Inkubation beobachtet. Nach dem Überimpfen von 13 Tage alten Kolonien wurde kein Wachstum beobachtet.

1/10 PYE Agar Eine Überimpfbarkeit der Kultur wurde nach 12-tägiger Inkubation beobachtet.

NS9

PYE Agar Eine Überimpfbarkeit der Kultur wurde nach 20-tägiger Inkubation beobachtet.

11. Wachstumscharakteristika und Überlebenstests

1/10 PYE Agar Ein Austesten der Überimpfbarkeit war auf diesem Medium wegen der Überlebensfähigkeit auf dem PYE Agar nicht notwendig.

E-JS-7

PYE Agar Eine Überimpfbarkeit der Kultur wurde nach 7-tägiger Inkubation beobachtet. Die Kolonien des Isolats verändern im Verlauf der Kultivierung die Pigmentierung von weißlich nach intensiv violett. Nach 14-tägiger Inkubation wurde nach dem Überimpfen von weißlichen und violetten Kolonien kein Wachstum beobachtet.

1/10 PYE Agar Eine Überimpfbarkeit der Kultur wurde nach 19 - 22-tägiger Inkubation beobachtet.

Oxalobacteraceae bacterium Ma

PYE Agar Eine Überimpfbarkeit der Kultur wurde nach 2-tägiger Inkubation anhand von wenigen (ca. 10) Kolonien beobachtet.

1/10 PYE Agar Nach 16-tägiger Inkubation wurde nach dem Überimpfen Wachstum beobachtet. Nach dem Überimpfen von 19 Tage alten Kolonien wurde kein Wachstum beobachtet.

M. aerilata DSM 19289^T „A” & „B”

PYE Agar Eine Überimpfbarkeit der Kultur wurde nach 3 - 4-tägiger Inkubation beobachtet. Nach dem Überimpfen von 5 Tage alten Kolonien wurde kein Wachstum beobachtet.

1/10 PYE Agar Eine Überimpfbarkeit der Kultur wurde nach 16-tägiger Inkubation beobachtet.

T. chitinolytica CIP 104069^T

PYE Agar Eine Überimpfbarkeit der Kultur wurde nach 3-tägiger Inkubation anhand von wenigen (<10) Kolonien beobachtet.

1/10 PYE Agar Eine Überimpfbarkeit der Kultur wurde nach 17-tägiger Inkubation beobachtet.

T. mixta CCUG 35206^T

PYE Agar Eine Überimpfbarkeit der Kultur wurde nach 2-tägiger Inkubation beobachtet. Nach dem Überimpfen von 4 Tage alten Kolonien wurde kein Wachstum beobachtet. Das Absterben der Kolonien war mit freiem Auge am Verblässen der weißlich-trüben Kolonien zu erkennen.

1/10 PYE Agar Nach 19 - 22-tägiger Inkubation wurde eine Überimpfbarkeit der Kultur beobachtet.

Bei einzelnen Umweltisolaten wurde auf dem nährstoffärmeren 1/10 PYE Agar eine längere Überimpfbarkeit als auf dem nährstoffreicheren PYE Agar beobachtet. Dies könnte auf eine Anpassung an eher höhere Nährstoffkonzentrationen hindeuten. Die Anpassung auf höhere Nährstoffkonzentrationen könnte der Grund für ein schnelleres Absterben einer Kultur auf dem PYE Agar gegenüber dem 1/10 PYE Agar sein. Isolate, welche auf höhere Nährstoffkonzentrationen angepasst sind, können Nährstoffe besser aufnehmen, wenn diese in höheren Konzentrationen vorliegen, was zum schnellerem Wachstum und damit zum schnelleren Verbrauch an Nährstoffen und in Folge auch zur schnelleren Akkumulation von Stoffwechselprodukten führen kann, welche ein Absterben der Kultur verursachen können. Es ist ebenfalls möglich, dass wachstumshemmende Stoffwechselprodukte produziert werden. Die Verlängerung der Lebensspanne von Umweltisolaten auf 1/10 PYE Agar war unterschiedlich stark. Einige Umweltisolate schienen besser auf niedrigere Nährstoffkonzentrationen angepasst zu sein, da auf dem nährstoffreicheren PYE Agar gegenüber dem 1/10 Agar eine längere Überimpfbarkeit beobachtet wurde. Diese Beobachtungen mögen verschiedene Umweltstandorte und die damit verbundenen Unterschiede in den Nährstoffvorkommen und Konzentrationen widerspiegeln. Bei allen klinischen Isolatn hingegen wurde auf dem nährstoffreicheren PYE Agar keine auf wenige Tage eingeschränkte Überimpfbarkeit beobachtet. Dies könnte die Wachstumsbedingungen unter klinischen Bedingungen widerspiegeln, unter welchen relativ hohe und konstante Nährstoffkonzentrationen vorliegen mögen.

Bei den untersuchten Vertretern des Genus *Massilia* wurde im Allgemeinen eine sich im Laufe der Kultivierung verändernde Koloniemorphologie hinsichtlich der Pigmentierung (E-JS-7) und des Profils der Kolonien (*M. plicata* DSM 17505^T) beobachtet. Bei absterbenden Kulturen wurden wiederholt Einschlüsse und kristallähnliche Strukturen (*M. albidiflava* CIP 109189^T), oder eine verblassende Pigmentierung (*M. aurea* AP13^T, *T. mixta* CCUG 35206^T) beobachtet. Koloniedimorphismus hinsichtlich der Koloniegröße wurde auf PYE Agar beim Stamm *M. dura* CCUG 52213^T beobachtet.

Kryokulturen stellen eine Möglichkeit zur Konservierung von lebenden Kulturen dar. Mit Hilfe des CryobankTM-Systems (Mast Diagnostica) konnten erfolgreich von in dieser Arbeit untersuchten Stämmen und Isolatn (Tab. 6.1) Kryokulturen hergestellt werden. Hierbei stellte sich heraus, dass besonders bei den Stämmen *M. lutea*

11. Wachstumscharakteristika und Überlebenstests

CIP 109190^T und *M. niabensis* KACC 12632^T sofortiges Einfrieren bei -80 °C zu keinen lebensfähigen Kulturen führt. Der kritische Schritt bei der Kryokulturherstellung von einigen *Massilia* Vertretern liegt daher wahrscheinlich beim Einfrieren bzw. Auftauen der Zellen. Möglicherweise führt schnelles Einfrieren bei diesen Stämmen zum Platzen der bakteriellen Zellwand und somit zum Tod der Zellen. Daher empfiehlt es sich, diese Stämme unter Benutzung eines NalgeneTM Isopropanol Kryocontainers (Thermo Scientific) schrittweise zuerst für 1 Std. bei -20 °C und anschließend bei -80 °C für ca. 1 Tag einzufrieren. Zur Rekultivierung sollten die Kryokulturen nahezu vollständig bei 37 °C (Heizer Bioer) aufgetaut werden und anschließend auf PYE bzw. 1/10 PYE Agar ausplattiert und bei 28 °C inkubiert werden.

Bei der Kryokonservierung von *Massilia* Spezies in Form von Glycerolstocks in 50 % (v/v) Glycerin und PO₄ Puffer im Verhältnis von 0.8:1.1 (v/v) wurden bei der Rekultivierung der Bakterien durch Auskratzen eines Eisstücks und anschließender Inkubation auf dem PYE Agar bei 28 °C keine oder wenige (1 - ca. 30) Kolonien erhalten. Selbst direkt nach der Herstellung der Kryokultur ohne voriges Einfrieren wurden bei einer Rekultivierung durch die Entnahme einer Impföse an Zellsuspension und dem Ausstreichen des Zellmaterials auf PYE Agar und anschließender Inkubation bei 28 °C und 40 % rel. Feuchte nur wenige oder keine Kolonien erhalten. Da die Einschränkung der Lebensfähigkeit der Kulturen unabhängig von der Aufbewahrung der Kryokulturen bei Minustemperaturen beobachtet wurde, erscheint es möglich, dass die Reduktion der Lebensfähigkeit der Kryokulturen durch aus Glycerin gebildetes Acrolein verursacht sein könnte. Wie Penkala *et al.* (2004) sowie Kehrer & Biswal (2000) in ihren Studien zeigten, kann Acrolein negativen Einfluss auf die Wachstumsrate von Zellen haben.

12. Taxonomische Untersuchung von Vertretern der Genera *Massilia* und *Telluria*

12.1. Chemotaxonomische Untersuchungen

12.1.1. Polyamine und Chinone

Zur Abwägung einer Zusammenführung der Genera *Massilia* und *Telluria* spielte die Analyse der Chinonsysteme und der Muster der Polyamine eine untergeordnete Rolle, da diese Merkmale für die untersuchte Bakteriengruppe innerhalb der *Betaproteobacteria* lediglich auf dem taxonomischen Level der Klasse aussagekräftig sind. Dementsprechend wies das Chinonsystem bei allen untersuchten Spezies die Hauptkomponente Ubichinon Q-8 auf, wie es für Mitglieder der Klasse der *Betaproteobacteria* charakteristisch ist (Busse *et al.*, 1996). Des Weiteren wurden die Ubichinone Q-7 und Q-9 in Spuren oder geringen Anteilen nachgewiesen, wobei letzteres Ubichinon in einigen Spezies nicht detektiert wurde (Tab. 12.1).

Auch das Muster der Polyamine aller untersuchten Spezies entsprach dem für die Mehrheit der *Betaproteobacteria* charakteristischen Muster, mit den Hauptkomponenten 2-Hydroxyputrescin und Putrescin (Busse & Auling, 1988; Busse, 2011). Andere Polyamine wie Spermidin und Spermin wurden bei den getesteten *Massilia* und *Telluria* Spezies in geringen Mengen detektiert. Die Polyamine Cadaverin und 1,3-Diaminopropan waren entweder in Spuren vorhanden, oder wurden bei mehreren Spezies des Genus *Massilia* sowie bei *T. mixta* CCUG 35206^T nicht detektiert (Tab. 12.1). Bei beiden *Telluria* Spezies wurde daher ein den Vertretern des Genus *Massilia* ähnliches Muster der Polyamine gefunden, wobei ausschließlich bei *T. mixta* CCUG 35206^T auch noch Spuren von *sym*-Norspermidin detektiert wurden. Aufgrund der Einzigartigkeit und dem sehr geringen Mengenanteil kann dieser Beobachtung zurzeit noch keine Bedeutung zugemessen werden.

12. Taxonomische Untersuchung von Vertretern der Genera *Massilia* und *Telluria*

Tabelle 12.1.: Chinonsysteme und Muster der Polyamine untersuchter Stämme und Isolate. Abkürzungen: Q, Ubichinon; HPUT, 2-Hydroxyputrescin; DAP, 1,3-Diaminopropan; PUT, Putrescin; CAD, Cadaverin; SPD, Spermidin; SPM, Spermium; sNSPD, *syn*-Norspermidin; -, nicht nachgewiesen; * Daten stammen von (Kämpfer *et al.*, 2008). Angabe der Chinone in %, der Polyamine in $\mu\text{mol/g}$ lyophilisierter Biomasse.

							<i>M. albidiflava</i> CIP 109189 ^T										
							<i>M. aurea</i> AP13 ^T										
							<i>M. consociata</i> CCUG 58010 ^T										
							<i>M. haematophila</i> CCUG 38318 ^T										
							<i>M. dura</i> CCUG 52213 ^T										
							<i>M. lutea</i> CIP 109190 ^T										
							<i>M. niastensis</i> KACC 12599 ^T										
							<i>M. plicata</i> DSM 17505 ^T										
							<i>M. timonae</i> CCUG 45783 ^T										
							<i>M. varians</i> CCUG 35299 ^T										
							<i>D. phyllosphaerae</i> T54 ^T										
							NS9										
							E-JS-7										
							<i>Oxalobacteraceae</i> bacterium Ma										
							<i>M. aerilata</i> DSM 19289 ^T										
							<i>T. chitinolytica</i> CIP 104069 ^T										
							<i>T. mixta</i> CCUG 35206 ^T										
Chinone																	
Q ₇	3.1	6.4	2.7	1.9	2.6	2.7	2.8	6.1	1.6	8.8	8.8	2.4	23.1	3.8	0.1	7.6	4.3
Q ₈	94.7	91.9	96.7	96.9	97.4	95.5	95.8	91.9	97.5	90.1	91.2	96.4	76.2	95.4	98.9	89.8	95.7
Q ₉	2.2	1.7	0.6	1.1	-	1.8	1.3	2.0	0.9	1.1	-	1.2	0.7	0.8	1.0	2.6	-
Polyamine																	
HPUT	28.0	72.7	43.3	21.0*	19.9	36.0	26.7	28.2	24.0*	26.3 - 46.3*	41.8	13.2	42.3	56.8	38.7	20.2	37.9
DAP	<0.1	0.1	-	-	-	-	-	-	-	<1.0*	0.4	0.1	-	<0.1	0.1	<0.1	-
PUT	69.4	52.8	75.7	95.9*	54.6	77.2	87.8	90.8	74.4*	44.8 - 69.0*	71.0	74.4	64.6	52.0	49.9	41.1	93.2
CAD	<0.1	<0.1	-	-	<0.1	<0.1	0.7	0.2	-	<1.0*	3.4	-	<0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
SPD	6.7	16.6	2.8	<3*	6.3	3.3	7.3	1.4	4.1*	1.4 - 16.8*	0.7	3.5	2.3	2.6	10.1	3.8	2.1
SPM	2.9	6.8	1.1	<3*	2.3	1.5	3.1	0.7	1.4*	1.1 - 6.0*	0.3	1.6	0.4	1.2	4.2	4.0	0.7
sNSPD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<0.1

12.1.2. Polare Lipide

Da bislang keine Daten zu den polaren Lipiden der *Telluria* Spezies zur Verfügung standen und der Verdacht bestand, dass die *Massilia* und *Telluria* Spezies einem gemeinsamen Genus angehören, wurden die polaren Lipide der *Telluria* Spezies, sowie von 11 *Massilia* und einer *Duganella* Spezies, *D. phyllosphaerae* T54^T untersucht (Abb. 12.2; 12.1; 14.4; 15.4; Tab. 12.2; 12.3). Die Muster der polaren Lipide der *Telluria* Spezies wiesen die Hauptkomponenten Diphosphatidylglycerol (DPG), Phosphatidylethanolamin (PE) und Phosphatidylglycerol (PG) auf, wie es auch schon für verschiedene Spezies des Genus *Massilia* beschrieben wurde (Kämpfer *et al.*, 2011). Bei den getesteten *Massilia* Spezies wurden zwar leicht unterschiedliche Mengen an DPG detektiert, bei allen handelte es sich jedoch um eine der Hauptkomponenten im Profil der polaren Lipide.

Das Muster der polaren Lipide von *Duganella phyllosphaerae* T54^T wies ebenfalls DPG auf und zwar als Hauptkomponente, in der Menge vergleichbar mit jener in die Analyse miteinbezogenen *Massilia* Spezies (Abb. 12.2; 12.1). Bislang wurde bei allen Spezies des Genus *Duganella* kein DPG nachgewiesen (Madhaiyan *et al.*, 2013; Kämpfer *et al.*, 2012b). In diesen Studien erfolgte die Anzucht der Biomasse zur späteren Lipidextraktion in anderen Nährmedien¹. Nichtsdestotrotz wies das Muster der polaren Lipide von *D. phyllosphaerae* T54^T und der *Massilia* und *Telluria* Spezies abgesehen von den Hauptkomponenten DPG, PE, PG und einem nicht identifizierten Lipid L2, das in geringerer Menge nachgewiesen wurde, keine weiteren Übereinstimmungen auf und unterschied sich somit deutlich von jenen der *Massilia* und *Telluria* Spezies (Tab. 12.2; 12.3). Die Vergleichbarkeit der Lipid-Daten in der vorliegenden Arbeit war durch die Annahme, dass die Muster der polaren Lipide unwesentlich von der Wachstumsphase beeinflusst werden, sowie durch Anzucht der Biomasse aller untersuchter Stämme und Isolate im demselben Nährmedium (PYE Bouillon), gegeben. Daher ist davon auszugehen, dass das Profil der polaren Lipide der Spezies *D. phyllosphaerae* T54^T wesentlich vom Nährmedium, das zur Anzucht der Biomasse zur Extraktion von polaren Lipiden verwendet wird, beeinflusst werden könnte. Aufgrund vorliegender Ergebnisse kann daher zwischen den Spezies der Genera *Massilia*, *Telluria* und *Duganella* allein aufgrund der Hauptkomponenten möglicherweise nur bedingt unterschieden werden.

¹Die Biomassen von *Duganella phyllosphaerae* T54^T und *Duganella zoogloeoides* IAM 12670^T wurden in 'trypticase soy broth' (TSB) angezogen (Kämpfer *et al.*, 2012b). Das zur Anzucht der Biomasse zur Extraktion von polaren Lipiden von *Duganella sacchari* Sac-22^T und *Duganella radialis* Sac-41^T verwendete Nährmedium ist in der Publikation von Madhaiyan *et al.* (2013) nicht angeführt. Es besteht jedoch die Annahme, dass es sich hierbei um R2 Bouillon handelte.

12. Taxonomische Untersuchung von Vertretern der Genera *Massilia* und *Telluria*

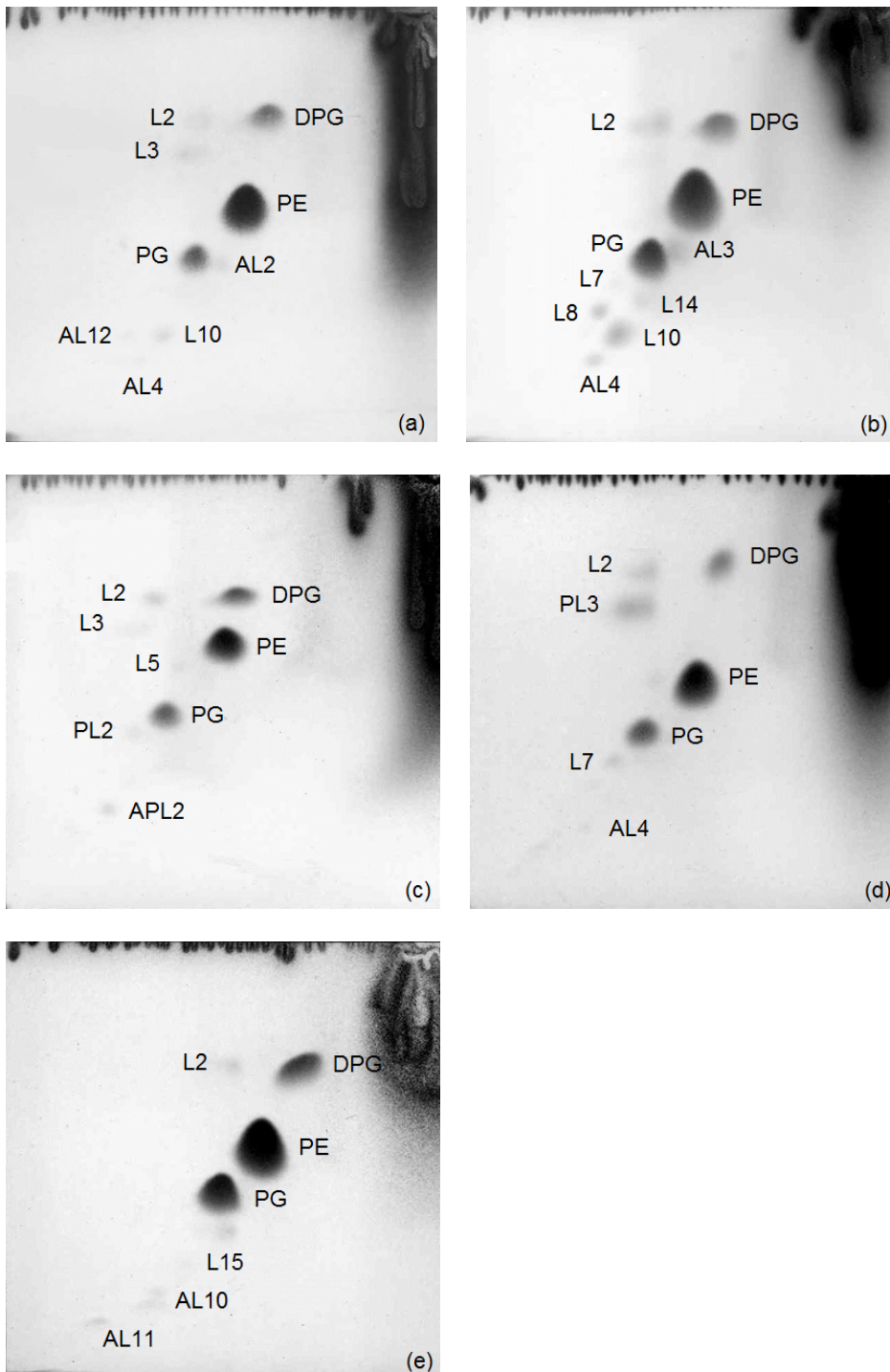


Abbildung 12.1.: Profile der polaren Lipide ausgewählter *Massilia* Spezies und *T. mixta* CCUG 35206^T im Vergleich nach zweidimensionaler Dünnschichtchromatographie und Färbung mit Molybdätdiphosphorsäure. (a) *T. mixta* CCUG 35206^T; (b) *M. consociata* CCUG 58010^T; (c) *M. niastensis* KACC 12599^T; (d) *M. aurea* AP13^T und (e) *M. timonae* CCUG 45783^T. Abkürzungen: DPG, Diphosphatidylglycerol; PE, Phosphatidylethanolamin; PG, Phosphatidylglycerol; L2-x, nicht identifizierte polare Lipide, die ausschließlich in der Gesamtlipidfärbung detektiert wurden; AL1-y, nicht identifizierte Aminolipide; APL2, nicht identifiziertes Aminophospholipid; PL3, nicht identifiziertes Phospholipid.

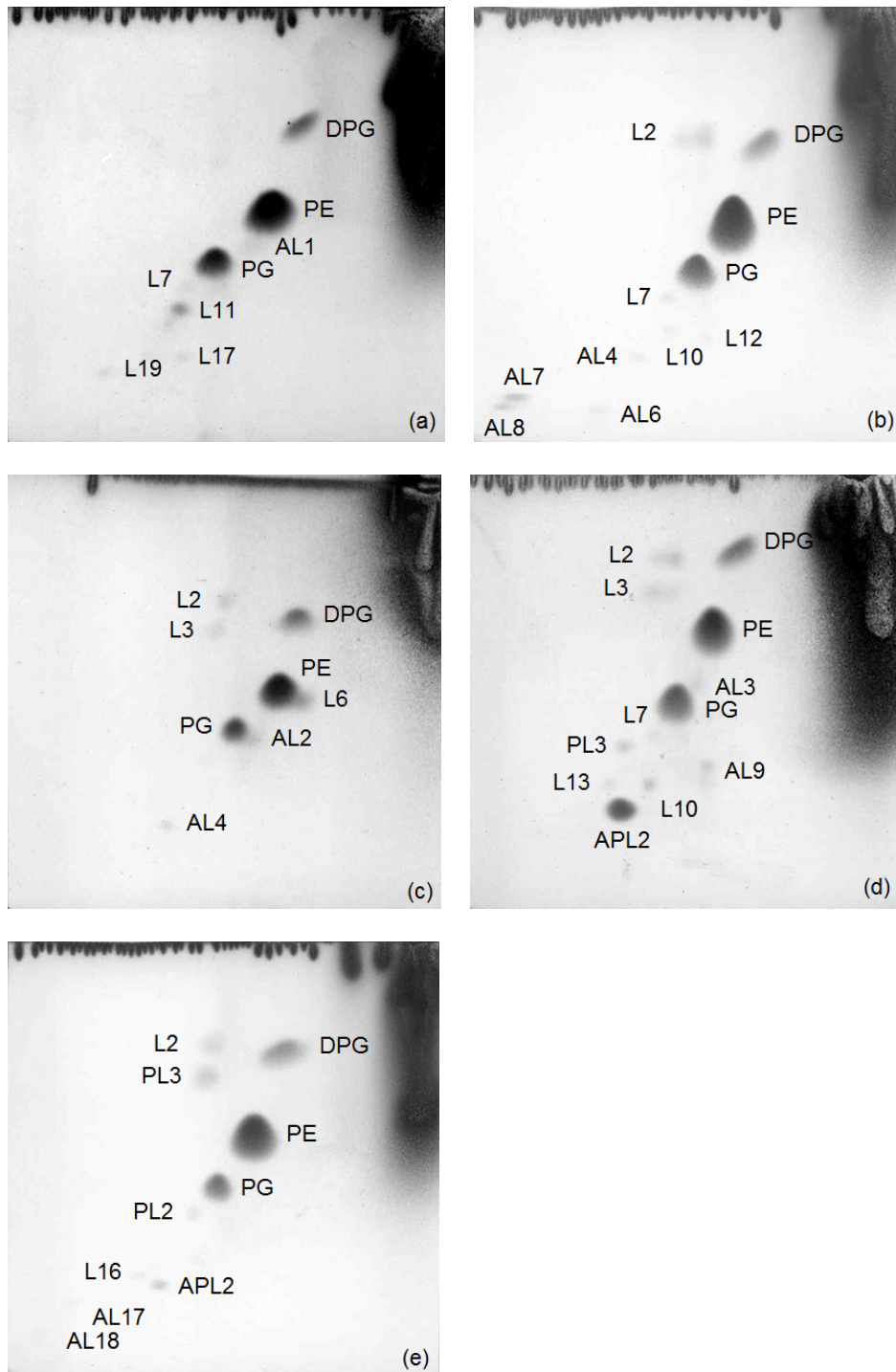


Abbildung 12.2.: Profile der polaren Lipide ausgewählter *Massilia* Spezies und *T. chitinolytica* CIP 104069^T im Vergleich nach zweidimensionaler Dünnschichtchromatographie und Färbung mit Molybdätosphorsäure. (a) *T. chitinolytica* CIP 104069^T; (b) *M. albidiflava* CIP 109189^T; (c) *M. dura* CCUG 52213^T; (d) *M. lutea* CIP 109190^T und (e) *D. phyllosphaerae* T54^T. Abkürzungen: DPG, Diposphatidylglycerol; PE, Phosphatidylethanolamin; PG, Phosphatidylglycerol; L2-x, nicht identifizierte polare Lipide, die ausschließlich in der Gesamtlipidfärbung detektiert wurden; AL2-y, nicht identifizierte Aminolipide; APL2, nicht identifiziertes Aminophospholipid; PL2-xy, nicht identifizierte Phospholipide.

12. Taxonomische Untersuchung von Vertretern der Genera *Massilia* und *Telluria*

Das Profil der polaren Lipide von *T. chitinolytica* CIP 104069^T (Abb. 12.2) wies neben den Hauptkomponenten DPG, PE und PG ein in geringen Mengen detektiertes, nicht identifiziertes Lipid L2 auf, das ebenfalls bei *M. albidiflava* CIP 109189^T, *M. aerilata* DSM 19289^T, *M. aurea* AP13^T, *M. consociata* CCUG 58010^T, *M. dura* CCUG 52213^T, *M. haematophila* CCUG 38318^T, *M. lutea* CIP 109190^T, *M. niastensis* KACC 12599^T, *M. plicata* DSM 17505^T, *M. timonae* CCUG 45783^T und *M. varians* CCUG 35299^T in mittleren Anteilen bis Spuren nachgewiesen wurde. Des Weiteren war im Profil der polaren Lipide von *T. chitinolytica* CIP 104069^T das in geringen Anteilen detektierte, nicht identifizierte Lipid L3 vorhanden, welches auch in *M. aurea* AP13^T, *M. dura* CCUG 52213^T, *M. niastensis* KACC 12599^T, *M. plicata* DSM 17505^T und *M. varians* CCUG 35299^T in geringen Anteilen bis Spuren nachgewiesen wurde. Das nicht identifizierte Lipid L3 wies ein zum nicht identifizierten Phospholipid PL1 analoges chromatographisches Verhalten auf. Eine Phosphatgruppe konnte in dem nicht identifizierten Lipid L3 von *M. aurea* AP13^T nicht nachgewiesen werden, auch wenn die Menge an Extrakt 0.8-fach erhöht wurde. Auch bei der Spezies *M. dura* CCUG 52213^T konnte eine Phosphatgruppe selbst bei der Analyse der 1.8-fachen Menge des Extrakts, die dünnschichtchromatographisch analysiert wurde, nicht nachgewiesen werden. Daher muss davon ausgegangen werden, dass es sich bei den Lipiden L3 und PL1 um unterschiedliche Lipide handelt. Außerdem wies das Profil der polaren Lipide von *T. chitinolytica* CIP 104069^T das nicht identifizierte Aminolipid AL4 auf, welches auch in *M. albidiflava* CIP 109189^T, *M. consociata* CCUG 58010^T, *M. haematophila* CCUG 38318^T, *M. lutea* CIP 109190^T, *M. niastensis* KACC 12599^T und *M. varians* CCUG 35299^T in geringen Anteilen bis Spuren detektiert wurde. Das nicht identifizierte Aminolipid AL4 wies ein dem nicht identifizierten Aminophospholipid APL2 entsprechendes chromatographisches Verhalten auf. Bei den Lipidflecken mit der chromatographischen Beweglichkeit der Lipide AL4/ APL2 konnte eine Phosphatgruppe von APL2 jedoch nur bei Stämmen, welche dieses Lipid als eine der Hauptkomponenten, wie z.B. *M. aurea* AP13^T, oder in mittleren Anteilen, wie z.B. *M. plicata* DSM 17505^T aufwiesen, sofort, ohne Erhöhung der Menge des Extrakts, nachgewiesen werden. In *M. timonae* CCUG 45783^T, *M. dura* CCUG 52213^T und NS9, welche dieses Lipid in geringen Anteilen aufwiesen, wurde die Phosphatgruppe erst nach der dünnschichtchromatographischen Analyse der 2-, 1.8- bzw. der 3.5-fachen Menge detektiert. Deshalb ist wahrscheinlich, dass es sich bei den Lipiden AL4 und APL2 strukturell um die gleichen Lipide handelt und der Phosphatgruppe-Nachweis in Stämmen mit geringeren Anteilen bis Spuren dieses Lipids erschwert ist. Eine weitere Komponente des Musters der polaren Lipide von *T. chitinolytica* CIP 104069^T war das nicht identifizierte Aminolipid

AL2, das in geringen Anteilen sowohl in *M. niastensis* KACC 12599^T und *M. varians* CCUG 35299^T nachgewiesen wurde. Darüber hinaus wurde auch das nicht identifizierte Lipid L10 in geringen Anteilen detektiert, das in mittleren Mengen bis Spuren auch in *M. albidiflava* CIP 109189^T, *M. aurea* AP13^T, *M. consociata* CCUG 58010^T, *M. haematophila* CCUG 38318^T und *M. plicata* DSM 17505^T detektiert wurde. Das einzige nicht in den untersuchten *Massilia* Spezies detektierte polare Lipid von *T. chitinolytica* CIP 104069^T war das nicht identifizierte Aminolipid AL12, welches in Spuren nachgewiesen wurde.

Das Profil der polaren Lipide von *T. mixta* CCUG 35206^T (Abb. 12.1) wies neben den Hauptkomponenten DPG, PE und PG das nicht identifizierte Aminolipid AL1 in geringen Anteilen auf, das ebenfalls in *M. varians* CCUG 35299^T, aber in mittleren Anteilen detektiert wurde. Außerdem wurde im Profil der polaren Lipide von *T. mixta* CCUG 35206^T das nicht identifizierte Lipid L7 in Spuren detektiert, das sowohl in *M. albidiflava* CIP 109189^T, *M. aurea* AP13^T, *M. consociata* CCUG 58010^T, *M. lutea* CIP 109190^T, *M. varians* CCUG 35299^T in geringeren Anteilen bis Spuren nachgewiesen wurde. Das nicht identifizierte Lipid L7 wies ein zum nicht identifizierten Phospholipid PL2 analoges chromatographisches Verhalten auf. Eine Phosphatgruppe war weder bei *T. mixta* CCUG 35206^T, noch bei *M. aurea* AP13^T und *M. varians* CCUG 35299^T auch nach chromatographischer Analyse der mehrfachen Menge an Extrakt nicht detektierbar. Aufgrund dieser Ergebnisse erscheint es möglich, dass das Lipid L7 für einen positiven Phosphatgruppe-Nachweis trotz starker Erhöhung der Menge des zu analysierenden Extrakts in nicht ausreichender Menge vorlag, oder es sich bei den Lipiden L7 und PL2 tatsächlich um verschiedene Lipide handelt, die aber im verwendeten chromatographischen System das gleiche chromatographische Laufverhalten aufweisen. Zudem konnte in *T. mixta* CCUG 35206^T und dem Isolat *Oxalobacteraceae* bacterium Ma das nicht identifizierte Lipid L11 in mittleren Anteilen detektiert werden. Außerdem wurde in *T. mixta* CCUG 35206^T das nicht identifizierte Lipid L17 in Spuren nachgewiesen, das ebenfalls im Isolat NS9, aber in mittleren Anteilen, detektiert wurde. Das nicht identifizierte Lipid L17 wies ein dem nicht identifizierten Aminolipid AL5 von *Oxalobacteraceae* bacterium Ma und *M. aerilata* DSM 19289^T „B” entsprechendes chromatographisches Verhalten auf. Im Lipid L17 des Isolats NS9 wurde die Aminogruppe auch nach der dünnschichtchromatographischen Analyse der 3.5-fachen Menge an Extrakt nicht nachgewiesen. Daher kann davon ausgegangen werden, dass es sich hierbei um unterschiedliche Lipide handelt. Das nicht identifizierte Lipid L19 wurde lediglich in *T. mixta* CCUG 35206^T in Spuren detektiert.

12. Taxonomische Untersuchung von Vertretern der Genera *Massilia* und *Telluria*

Außerdem wurde bei einigen Spezies des Genus *Massilia* das nicht identifizierte Lipid L8 nachgewiesen, welches ein dem nicht identifizierten Phospholipid PL3 entsprechendes chromatographisches Verhalten zeigte. Das Lipid L8 wurde bei *M. albidiflava* CIP 109189^T in mittleren Anteilen nachgewiesen. Bei der Spezies *M. aurea* AP13^T, in welcher das Lipid auch in mittleren Anteilen detektiert wurde, wurde die Phosphatgruppe nach Erhöhung der Menge des Extrakts um das 0.8-fache nachgewiesen. Bei *M. plicata* DSM 17505^T, welche das Lipid in leicht größeren Anteilen als *M. aurea* AP13^T aufweist, wurde die Phosphatgruppe direkt, ohne Erhöhung der Menge des Extrakts, schwach positiv nachgewiesen. Daher erscheint es auch hier möglich, dass es sich bei den Lipiden L8 und PL3 um idente Lipide handelt, da der Phosphatgruppen-Nachweis stark von der im Extrakt vorhandenen Menge abzuhängen scheint. Innerhalb des Genus *Massilia* konnten daher abgesehen von DPG, PG und PE, in welchen der Nachweis der Phosphatgruppe direkt ohne Erhöhung der Menge des Extrakts möglich war, zu sämtlichen Phospholipiden auch Lipide mit analogen chromatographischen Verhalten nachgewiesen werden. Daher scheinen die Phosphatgruppen, abgesehen in Lipiden mit Hauptkomponente-Anteilen, in mehreren Fällen nicht nachweisbar zu sein.

T. chitinolytica CIP 104069^T und *T. mixta* CCUG 35206^T wiesen somit in ihren Profilen der polaren Lipide bis auf jeweils eine Komponente ein Profil auf, das dem der *Massilia* Spezies sehr ähnlich war. Hierbei wurden zahlreiche Übereinstimmungen nicht nur zu den *Massilia* Spezies *M. plicata* DSM 17505^T, *M. albidiflava* CIP 109189^T, *M. dura* CCUG 52213^T und *M. lutea* CIP 109190^T, sondern auch zu allen anderen miteinbezogenen *Massilia* Referenzstämmen gefunden. Außerdem wurden in den Profilen der polaren Lipide der *Telluria* Spezies die Hauptkomponenten DPG, PE und PG detektiert, welche gemäß den Charakteristika von Mitgliedern des Genus *Massilia* die Hauptkomponenten im Muster der polaren Lipide darstellen (Kämpfer *et al.*, 2011) und auch in der vorliegenden Arbeit bei den *Massilia* Referenzstämmen in Hauptkomponenten-Anteilen detektiert wurden. In den Profilen der polaren Lipide von *T. chitinolytica* CIP 104069^T und *T. mixta* CCUG 35206^T wurden keine zueinander spezifischen Übereinstimmungen detektiert, welche ihre Positionierung als separaten Genus gegenüber dem Genus *Massilia* absichern würden. Eine Trennung der Genera *Massilia* und *Telluria* wird daher durch diesen Ansatz nicht unterstützt.

Tabelle 12.2.: Polare Lipide in Vertretern der Genera *Massilia*, *Telluria* und *Duganella*. Die Tabelle ist unter Tab. 12.3 fortgesetzt. Abkürzungen: L1-x, nicht identifizierte polare Lipide, die ausschließlich in der Gesamtlipidfärbung detektiert wurden; PL1-y, nicht identifizierte Phospholipide; DPG, Diphosphatidylglycerol; PE, Phosphatidylethanolamin; PG, Phosphatidylglycerol; AL1-z, nicht identifizierte Aminolipide. Mengen: ++++, Hauptkomponente; ++, mittlere Anteile; +, geringe Anteile; (+), Spuren; -, nicht detektiert. Umrandungen deuten auf polare Lipide mit gleichem chromatographischen Laufverhalten. *Die Detektion der Phosphatgruppe erfolgte erst nach einer Erhöhung der Menge an Extrakt, der dünnschichtchromatographisch analysiert wurde.

	<i>M. albidiflava</i> CIP 109189 ^T	<i>M. aurea</i> AP13 ^T	<i>M. consociata</i> CCUG 58010 ^T	<i>M. haematophila</i> CCUG 38318 ^T	<i>M. dura</i> CCUG 52213 ^T	<i>M. lutea</i> CIP 109190 ^T	<i>M. niastensis</i> KACC 12599 ^T	<i>M. plicata</i> DSM 17505 ^T	<i>M. timonae</i> CCUG 45783 ^T	<i>M. varians</i> CCUG 35299 ^T	<i>D. phyllosphaerae</i> T54 ^T	NS9	E-JS-7	<i>Oxalobacteraceae</i> bacterium Ma	<i>M. aervilata</i> DSM 19289 ^T „B“	<i>T. chitinolytica</i> CIP 104069 ^T	<i>T. mixta</i> CCUG 35206 ^T
L1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(+)	-	-	-	-	-	-	-
L2	++	++	++	(+)	++	++	++	++	++	(+)	+	++	++	++	+	++	++
L3	-	+	-	-	+	-	+	(+)	-	(+)	-	-	-	-	-	+	-
PL1	-	-	-	-	-	++	++	-	+++*	-	-	-	-	-	-	-	-
L4	-	-	-	(+)	-	-	-	++	++	-	-	-	-	-	-	-	-
DPG	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
PE	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
PG	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
L5	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
AL1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	-	-	++	-	-	-	+
AL2	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-
PL2	-	-	-	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L7	(+)	(+)	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	(+)
AL3	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PL3	-	++	-	-	-	-	-	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L8	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L10	++	++	(+)	(+)	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-
L11	-	-	-	(+)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	-	+	-

12. Taxonomische Untersuchung von Vertretern der Genera *Massilia* und *Telluria*

Tabelle 12.3.: Auflistung detektierter polarer Lipide in Vertretern der Genera *Massilia*, *Telluria* und *Duganella* in Fortsetzung der Tabelle 12.2. Abkürzungen: L6-x, nicht identifizierte polare Lipide, die ausschließlich in der Gesamtlipidfärbung detektiert wurden; APL1-2, nicht identifizierte Aminophospholipide; AL4-y, nicht identifizierte Aminolipide. Abkürzungen der Mengen: +++, Hauptkomponente; ++, mittlere Anteile; +, geringe Anteile; (+), Spuren; -, nicht detektiert. Umrandungen deuten auf polare Lipide mit gleichem chromatographischen Laufverhalten. *Die Detektion der Phosphatgruppe erfolgte erst nach einer Erhöhung der Menge an Extrakt, der dünnschichtchromatographisch analysiert wurde.

	<i>M. albidiflava</i> CIP 109189 ^T	<i>M. aurea</i> AP13 ^T	<i>M. consociata</i> CCUG 58010 ^T	<i>M. haematophila</i> CCUG 38318 ^T	<i>M. dura</i> CCUG 52213 ^T	<i>M. lutea</i> CIP 109190 ^T	<i>M. niastensis</i> KACC 12599 ^T	<i>M. plicata</i> DSM 17505 ^T	<i>M. timonae</i> CCUG 45783 ^T	<i>M. varians</i> CCUG 35299 ^T	<i>D. phyllosphaerae</i> T54 ^T	NS9	E-JS-7	<i>Oxalobacteraceae</i> bacterium Ma	<i>M. acrilata</i> DSM 19289 ^T „B“	<i>T. chitinolytica</i> CIP 104069 ^T	<i>T. mixta</i> CCUG 35206 ^T
APL1	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
APL2	-	+++	-	-	+	-	-	++	+	-	-	+	-	-	-	-	-
AL4	+	-	(+)	(+)	-	(+)	+	-	-	+	-	-	+	-	-	(+)	-
AL5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	++	-	-
L17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	-	++	-	-	(+)
L6	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
L12	-	-	(+)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AL6	-	-	(+)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AL7-8	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AL9	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L13	-	(+)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L14	(+)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
AL10-11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
AL12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(+)	-
AL13-16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(+)	-	-	-
AL17-18	-	-	-	-	-	-	-	-	(+)	-	-	-	-	-	-	-	-
AL19	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AL20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(+)	-	-
L16	-	-	-	-	-	-	-	-	(+)	-	-	-	-	-	-	-	-
L18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
L19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(+)

12.2. Molekularbiologische Untersuchungen

12.2.1. *gyrB* und *lepA* Sequenzähnlichkeiten

In den *gyrB* und *lepA* Nukleotid- und Aminosäuresequenzen besaßen beide *Telluria* Spezies *T. chitinolytica* CIP 104069^T und *T. mixta* CCUG 35206^T höhere Ähnlichkeitswerte zu einzelnen *Massilia* Spezies als untereinander oder zu den in die Analyse miteinbezogenen Spezies nah verwandter Genera *Duganella* und *Pseudoduganella*. Zwischen den untersuchten *Massilia* Spezies lagen die *gyrB* (810 Bp) Sequenzähnlichkeitswerte im Bereich von 89.1 - 97.6 %. In der korrespondierenden GyrB Aminosäuresequenz (270 AS) waren es 94.4 - 99.6 % (Tab. 12.4; 15.1). Die entsprechende *gyrB* Gensequenz von *T. chitinolytica* CIP 104069^T wies zu den *Massilia* Spezies Nukleotid- bzw. Aminosäuresequenzähnlichkeitswerte im Bereich von 90.0 % (*M. niabensis* KACC 12632^T) - 94.0 % (*M. plicata* DSM 17505^T) bzw. 94.4 % (*M. haematophila* CCUG 38318^T) - 99.2 % (*M. plicata* DSM 17505^T) auf. Für die Spezies *T. mixta* CCUG 35206^T ergaben sich zu den *Massilia* Spezies *gyrB* Nukleotid- bzw. Aminosäuresequenzähnlichkeitswerte im Bereich von 89.5 % (*M. plicata* DSM 17505^T) - 93.5 % (*M. varians* CCUG 35299^T, *M. tieshanensis* KACC 14940^T, *M. niastensis* KACC 12599^T) bzw. 95.1 % (*M. plicata* DSM 17505^T) - 98.5 % (*M. consociata* CCUG 58010^T). Für beide Spezies des Genus *Telluria*, *T. chitinolytica* CIP 104069^T und *T. mixta* CCUG 35206^T, lagen die *gyrB* Nukleotid- und Aminosäuresequenzähnlichkeitswerte somit innerhalb der für *Massilia* Vertreter beobachteten Werte.

Beim partiellen *lepA* Gen (1299 Bp) lagen die Sequenzähnlichkeitswerte zwischen den *Telluria* Spezies und den untersuchten *Massilia* Spezies bei leichten Abweichungen von *T. mixta* CCUG 35206^T ebenfalls innerhalb der beobachteten Schwankungsbreite für *Massilia* Spezies. Die *lepA* Sequenzähnlichkeitswerte der *Massilia* Spezies lagen zwischen 83.2 - 98.8 % bzw. in der korrespondierenden LepA Aminosäuresequenz zwischen 86.6 - 100 % (Tab. 12.5). Die Spezies *T. chitinolytica* CIP 104069^T besaß zu den untersuchten *Massilia* Spezies *lepA* Nukleotidsequenzähnlichkeitswerte im Bereich von 83.5 % (*M. brevitalea* DSM 18925^T, *M. jejuensis* KACC 12634^T) - 93.9 % (*M. plicata* DSM 17505^T). In der korrespondierenden LepA Aminosäuresequenz zeigten sich zwischen *T. chitinolytica* CIP 104069^T und den in die Analyse miteinbezogenen *Massilia* Spezies Sequenzähnlichkeitswerte im Bereich von 87.0 % (*M. brevitalea* DSM 18925^T) - 97.9 % (*M. plicata* DSM 17505^T), (Tab. 14.1). Die

12. Taxonomische Untersuchung von Vertretern der Genera *Massilia* und *Telluria*

Spezies *T. mixta* CCUG 35206^T zeigte zu den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten *Massilia* Spezies *lepA* Sequenzähnlichkeitswerte zwischen 84.2 % (*M. albidiflava* CIP 109189^T) - 88.2 % (*M. tieshanensis* KACC 14940^T) bzw. in der korrespondierenden LepA Aminosäuresequenz von 84.0 % (*M. plicata* DSM 17505^T) - 92.1 % (*M. consociata* CCUG 58010^T), wodurch sich die Spezies *T. mixta* CCUG 35206^T in der partiellen LepA Aminosäuresequenz teilweise unterhalb der im Genus *Massilia* ermittelten Sequenzähnlichkeitswerten bewegte (Tab. 12.5; 14.1). Die partiellen *gyrB* und *lepA* Sequenzen von *T. mixta* CCUG 35206^T wiesen zu den jeweiligen Gensequenzen von *Massilia* Spezies deutlich niedrigere Sequenzähnlichkeiten auf als vergleichsweise *T. chitinolytica* CIP 104069^T. Dies ist möglicherweise ein Indiz dafür, dass *T. mixta* CCUG 35206^T basierend auf den *gyrB* und *lepA* Haushaltsgenen deutlicher von den in die Analyse miteinbezogenen *Massilia* Spezies separiert sein könnte als vergleichsweise *T. chitinolytica* CIP 104069^T. Beide *Telluria* Spezies wären jedoch anhand ihrer Sequenzähnlichkeiten in den partiellen *gyrB* und *lepA* Gensequenzen demselben Genus zuzuordnen wie die *Massilia* Spezies.

12.2. Molekularbiologische Untersuchungen

Tabelle 12.4.: Sequenzähnlichkeitsmatrix basierend auf den partiellen *gyrB* Nukleotidsequenzen (810 Bp) anhand von BioEdit (Hall, 1999), Teil (a) und (b). Abkürzungen: chit, *T. chitimolytica* CIP 104069^T (HG798309); mixt, *T. mixta* CCUG 35206^T (HG798310); aeri, *M. aerilata* DSM 19289^T (HG798295); albi, *M. albidiflava* CIP 109189^T (HG798296); alka, *M. alkalitolerans* DSM 17462^T (ATYR01000025); aure, *M. aurea* AP13^T (HG798297); brev, *M. brevitalea* DSM 18925^T (KF780161); cons, *M. consociata* CCUG 58010^T (HG798298); dura, *M. dura* CCUG 52213^T (HG798299); haem, *M. haematophila* CCUG 38318^T (HG798300); jeju, *M. jejuensis* KACC 12634^T (KF780163); lute, *M. lutea* CIP 109190^T (HG798301); niab, *M. niabensis* KACC 12632^T (HG798302); nias, *M. niastensis* KACC 12599^T (HG798303); plic, *M. plicata* DSM 17505^T (HG798304); ties, *M. tieshanensis* KACC 14940^T (KF780165); timo, *M. timonae* CCUG 45783^T (HG798307); vari, *M. varians* CCUG 35299^T (HG798308); yuzh, *M. yuzhufengensis* CGMCC 1.12041^T (KF780159); oxal, *Oxalobacteraceae* bacterium Ma (HG798306); EJS7, E-JS-7 (keine Zugangsnummer); NS9, *M. norwichensis* sp. nov. NS9^T (HG798305); viol, *Pseudoduganella violaceinigra* YIM 31327^T (EU714411); zoog, *Duganella zoogloeooides* IAM 12670^T (EU714412); phyl, *Duganella phyllosphaerae* T54^T (HG798311); ceno, *Burkholderia cenocepacia* J2315^T (AM747720).

(a)

	chit	mixt	aeri	albi	alka	aure	brev	cons	dura	haem	jeju	lute	niab
chit	ID	0.916	0.917	0.929	0.928	0.917	0.909	0.923	0.924	0.923	0.909	0.930	0.900
mixt	0.916	ID	0.933	0.898	0.927	0.908	0.924	0.933	0.909	0.932	0.909	0.909	0.917
aeri	0.917	0.933	ID	0.909	0.929	0.907	0.924	0.928	0.909	0.937	0.916	0.909	0.923
albi	0.929	0.898	0.909	ID	0.918	0.924	0.913	0.909	0.953	0.922	0.900	0.951	0.900
alka	0.928	0.927	0.929	0.918	ID	0.908	0.919	0.953	0.913	0.929	0.913	0.916	0.919
aure	0.917	0.908	0.907	0.924	0.908	ID	0.919	0.914	0.911	0.914	0.920	0.920	0.911
brev	0.909	0.924	0.924	0.913	0.919	0.919	ID	0.925	0.904	0.940	0.920	0.917	0.919
cons	0.923	0.933	0.928	0.909	0.953	0.914	0.925	ID	0.906	0.928	0.916	0.909	0.927
dura	0.924	0.909	0.909	0.953	0.913	0.911	0.904	0.906	ID	0.913	0.891	0.951	0.900
haem	0.923	0.932	0.937	0.922	0.929	0.914	0.940	0.928	0.913	ID	0.911	0.912	0.922
jeju	0.909	0.909	0.916	0.900	0.913	0.920	0.920	0.916	0.891	0.911	ID	0.911	0.937
lute	0.930	0.909	0.909	0.951	0.916	0.920	0.917	0.909	0.951	0.912	0.911	ID	0.902
niab	0.900	0.917	0.923	0.900	0.919	0.911	0.919	0.927	0.900	0.922	0.937	0.902	ID
nias	0.928	0.935	0.925	0.917	0.953	0.913	0.920	0.958	0.908	0.927	0.911	0.913	0.922
plic	0.940	0.895	0.900	0.909	0.902	0.901	0.897	0.904	0.911	0.907	0.895	0.907	0.901
ties	0.927	0.935	0.929	0.914	0.946	0.916	0.922	0.954	0.907	0.937	0.912	0.913	0.922
timo	0.923	0.919	0.933	0.906	0.935	0.920	0.924	0.943	0.901	0.937	0.919	0.904	0.925
vari	0.927	0.935	0.934	0.918	0.976	0.914	0.924	0.962	0.918	0.939	0.924	0.918	0.923
yuzh	0.909	0.907	0.917	0.904	0.929	0.917	0.924	0.934	0.906	0.917	0.927	0.913	0.917
oxal	0.923	0.930	0.945	0.916	0.943	0.919	0.937	0.937	0.906	0.945	0.916	0.904	0.923
EJS7	0.918	0.898	0.897	0.901	0.914	0.906	0.897	0.912	0.886	0.897	0.904	0.895	0.885
NS9	0.896	0.919	0.930	0.892	0.923	0.902	0.916	0.919	0.887	0.945	0.904	0.885	0.911
viol	0.913	0.887	0.886	0.908	0.906	0.892	0.895	0.896	0.898	0.895	0.888	0.909	0.886
zoog	0.908	0.890	0.898	0.912	0.906	0.895	0.897	0.895	0.902	0.897	0.898	0.922	0.888
phyl	0.908	0.881	0.888	0.917	0.907	0.898	0.898	0.895	0.900	0.897	0.896	0.913	0.892
ceno	0.804	0.782	0.776	0.783	0.788	0.779	0.775	0.783	0.780	0.793	0.772	0.788	0.781

(b)

	nias	plic	ties	timo	vari	yuzh	oxal	EJS7	NS9	viol	zoog	phyl	ceno
chit	0.928	0.940	0.927	0.923	0.927	0.909	0.923	0.918	0.896	0.913	0.908	0.908	0.804
mixt	0.935	0.895	0.935	0.919	0.935	0.907	0.930	0.898	0.919	0.887	0.890	0.881	0.782
aeri	0.925	0.900	0.929	0.933	0.934	0.917	0.945	0.897	0.930	0.886	0.898	0.888	0.776
albi	0.917	0.909	0.914	0.906	0.918	0.904	0.916	0.901	0.892	0.908	0.912	0.917	0.783
alka	0.953	0.902	0.946	0.935	0.976	0.929	0.943	0.914	0.923	0.906	0.906	0.907	0.788
aure	0.913	0.901	0.916	0.920	0.914	0.917	0.919	0.906	0.902	0.892	0.895	0.898	0.779
brev	0.920	0.897	0.922	0.924	0.924	0.924	0.937	0.897	0.916	0.895	0.897	0.898	0.775
cons	0.958	0.904	0.954	0.943	0.962	0.934	0.937	0.912	0.919	0.896	0.895	0.895	0.783
dura	0.908	0.911	0.907	0.901	0.918	0.906	0.906	0.886	0.887	0.898	0.902	0.900	0.780
haem	0.927	0.907	0.937	0.937	0.939	0.917	0.945	0.897	0.945	0.895	0.897	0.897	0.793
jeju	0.911	0.895	0.912	0.919	0.924	0.927	0.916	0.904	0.904	0.888	0.898	0.896	0.772
lute	0.913	0.907	0.913	0.904	0.918	0.913	0.904	0.895	0.885	0.909	0.922	0.913	0.788
niab	0.922	0.901	0.922	0.925	0.923	0.917	0.923	0.885	0.911	0.886	0.888	0.892	0.781
nias	ID	0.900	0.967	0.935	0.962	0.917	0.933	0.918	0.917	0.903	0.897	0.901	0.790
plic	0.900	ID	0.901	0.897	0.904	0.893	0.892	0.902	0.887	0.901	0.898	0.904	0.795
ties	0.967	0.901	ID	0.932	0.956	0.913	0.930	0.909	0.922	0.900	0.895	0.892	0.795
timo	0.935	0.897	0.932	ID	0.939	0.920	0.934	0.903	0.918	0.895	0.885	0.883	0.790
vari	0.962	0.904	0.956	0.939	ID	0.929	0.948	0.923	0.924	0.908	0.909	0.912	0.796
yuzh	0.917	0.893	0.913	0.920	0.929	ID	0.914	0.897	0.906	0.906	0.902	0.902	0.772
oxal	0.933	0.892	0.930	0.934	0.948	0.914	ID	0.903	0.930	0.897	0.898	0.896	0.781
EJS7	0.918	0.902	0.909	0.903	0.923	0.897	0.903	ID	0.890	0.914	0.907	0.908	0.783
NS9	0.917	0.887	0.922	0.918	0.924	0.906	0.930	0.890	ID	0.876	0.876	0.872	0.772
viol	0.903	0.901	0.900	0.895	0.908	0.906	0.897	0.914	0.876	ID	0.902	0.907	0.782
zoog	0.897	0.898	0.895	0.885	0.909	0.902	0.898	0.907	0.876	0.902	ID	0.953	0.780
phyl	0.901	0.904	0.892	0.883	0.912	0.902	0.896	0.908	0.872	0.907	0.953	ID	0.780
ceno	0.790	0.795	0.795	0.790	0.796	0.772	0.781	0.783	0.772	0.782	0.780	0.780	ID

12. Taxonomische Untersuchung von Vertretern der Genera *Massilia* und *Telluria*

Tabelle 12.5.: Sequenzähnlichkeitsmatrix basierend auf den partiellen *lepA* Nukleotidsequenzen (1299 Bp) anhand von BioEdit (Hall, 1999), Teil (a) und (b). Abkürzungen: chit, *T. chitnolytica* CIP 104069^T (HG798326); mixt, *T. mixta* CCUG 35206^T (HG798327); aeri, *M. aerilata* DSM 19289^T (HG798312); albi, *M. albidiflava* CIP 109189^T (HG798313); alka, *M. alkalitolerans* DSM 17462^T (ATYR01000001); aure, *M. aurea* AP13^T (HG798314); brev, *M. brevitala* DSM 18925^T (KF780162); cons, *M. consociata* CCUG 58010^T (HG798315); dura, *M. dura* CCUG 52213^T (HG798316); haem, *M. haematophila* CCUG 38318^T (HG798317); jeju, *M. jejuensis* KACC 12634^T (KF780164); lute, *M. lutea* CIP 109190^T (HG798318); niab, *M. niabensis* KACC 12632^T (HG798319); nias, *M. niastensis* KACC 12599^T (HG798320); plic, *M. plicata* DSM 17505^T (HG798322); ties, *M. tieshanensis* KACC 14940^T (KF780166); timo, *M. timonae* CCUG 45783^T (HG798324); vari, *M. varians* CCUG 35299^T (HG798325); yuzh, *M. yuzhufengensis* CGMCC 1.12041^T (KF780160); oxal, *Oxalobacteraceae* bacterium Ma (HG798323); EJS7, E-JS-7 (keine Zugangsnummer); NS9, *M. norwicensis* sp. nov. NS9^T (HG798321); viol, *Pseudoduganella violaceinigra* DSM 15887^T (KE384358); zoog, *Duganella zoogloeoides* ATCC 25935^T (KB912919); phyl, *Duganella phyllosphaerae* T54^T (HG798328); ceno, *Burkholderia cenocepacia* J2315^T (AM747720).

(a)

	chit	mixt	aeri	albi	alka	aure	brev	cons	dura	haem	jeju	lute	niab
chit	ID	0.837	0.858	0.914	0.856	0.843	0.835	0.842	0.912	0.854	0.835	0.909	0.851
mixt	0.837	ID	0.865	0.842	0.870	0.855	0.868	0.870	0.847	0.869	0.854	0.849	0.856
aeri	0.858	0.865	ID	0.866	0.949	0.892	0.921	0.905	0.870	0.920	0.904	0.852	0.904
albi	0.914	0.842	0.866	ID	0.852	0.840	0.846	0.849	0.933	0.855	0.844	0.940	0.859
alka	0.856	0.870	0.949	0.852	ID	0.893	0.917	0.918	0.862	0.921	0.911	0.848	0.914
aure	0.843	0.855	0.892	0.840	0.893	ID	0.899	0.874	0.849	0.886	0.882	0.841	0.886
brev	0.835	0.868	0.921	0.846	0.917	0.899	ID	0.897	0.846	0.931	0.924	0.839	0.926
cons	0.842	0.870	0.905	0.849	0.918	0.874	0.897	ID	0.849	0.927	0.880	0.843	0.890
dura	0.912	0.847	0.870	0.933	0.862	0.849	0.846	0.849	ID	0.859	0.853	0.934	0.863
haem	0.854	0.869	0.920	0.855	0.921	0.886	0.931	0.927	0.859	ID	0.914	0.845	0.922
jeju	0.835	0.854	0.904	0.844	0.911	0.882	0.924	0.880	0.853	0.914	ID	0.832	0.926
lute	0.909	0.849	0.852	0.940	0.848	0.841	0.839	0.843	0.934	0.845	0.832	ID	0.847
niab	0.851	0.856	0.904	0.859	0.914	0.886	0.926	0.890	0.863	0.922	0.926	0.847	ID
nias	0.866	0.876	0.935	0.861	0.942	0.896	0.919	0.914	0.864	0.929	0.913	0.853	0.909
plic	0.939	0.843	0.864	0.916	0.856	0.850	0.845	0.852	0.912	0.861	0.843	0.918	0.849
ties	0.856	0.882	0.922	0.856	0.927	0.870	0.902	0.932	0.859	0.931	0.893	0.849	0.896
timo	0.862	0.856	0.921	0.857	0.919	0.896	0.903	0.884	0.865	0.899	0.894	0.842	0.899
vari	0.853	0.872	0.946	0.852	0.988	0.899	0.917	0.918	0.858	0.920	0.909	0.844	0.913
yuzh	0.839	0.857	0.923	0.847	0.936	0.889	0.913	0.896	0.849	0.909	0.905	0.839	0.909
oxal	0.866	0.884	0.934	0.867	0.934	0.904	0.926	0.909	0.873	0.917	0.892	0.866	0.920
EJS7	0.897	0.836	0.870	0.898	0.865	0.851	0.854	0.843	0.896	0.862	0.846	0.886	0.851
NS9	0.859	0.868	0.943	0.861	0.935	0.896	0.917	0.906	0.870	0.918	0.892	0.849	0.908
viol	0.889	0.838	0.881	0.901	0.872	0.846	0.856	0.848	0.898	0.866	0.859	0.888	0.856
zoog	0.860	0.831	0.852	0.867	0.853	0.834	0.839	0.833	0.876	0.844	0.844	0.865	0.841
phyl	0.873	0.840	0.863	0.882	0.862	0.842	0.846	0.843	0.888	0.852	0.848	0.876	0.852
ceno	0.809	0.827	0.815	0.812	0.812	0.812	0.819	0.823	0.821	0.819	0.810	0.805	0.811

(b)

	nias	plic	ties	timo	vari	yuzh	oxal	EJS7	NS9	viol	zoog	phyl	ceno
chit	0.866	0.939	0.856	0.862	0.853	0.839	0.866	0.897	0.859	0.889	0.860	0.873	0.809
mixt	0.876	0.843	0.882	0.856	0.872	0.857	0.884	0.836	0.868	0.838	0.831	0.840	0.827
aeri	0.935	0.864	0.922	0.921	0.946	0.923	0.934	0.870	0.943	0.881	0.852	0.863	0.815
albi	0.861	0.916	0.856	0.857	0.852	0.847	0.867	0.898	0.861	0.901	0.867	0.882	0.812
alka	0.942	0.856	0.927	0.919	0.988	0.936	0.934	0.865	0.935	0.872	0.853	0.862	0.812
aure	0.896	0.850	0.870	0.896	0.899	0.889	0.904	0.851	0.896	0.846	0.834	0.842	0.812
brev	0.919	0.845	0.902	0.903	0.917	0.913	0.926	0.854	0.917	0.856	0.839	0.846	0.819
cons	0.914	0.852	0.932	0.884	0.918	0.896	0.909	0.843	0.906	0.848	0.833	0.843	0.823
dura	0.864	0.912	0.859	0.865	0.858	0.849	0.873	0.896	0.870	0.898	0.876	0.888	0.821
haem	0.929	0.861	0.931	0.899	0.920	0.909	0.917	0.862	0.918	0.866	0.844	0.852	0.819
jeju	0.913	0.843	0.893	0.894	0.909	0.905	0.892	0.846	0.892	0.859	0.844	0.848	0.810
lute	0.853	0.918	0.849	0.842	0.844	0.839	0.866	0.886	0.849	0.888	0.865	0.876	0.805
niab	0.909	0.849	0.896	0.899	0.913	0.909	0.920	0.851	0.908	0.856	0.841	0.852	0.811
nias	ID	0.863	0.925	0.913	0.943	0.914	0.933	0.879	0.929	0.874	0.846	0.854	0.836
plic	0.863	ID	0.855	0.856	0.853	0.843	0.867	0.891	0.857	0.892	0.850	0.864	0.811
ties	0.925	0.855	ID	0.889	0.924	0.899	0.917	0.872	0.910	0.866	0.842	0.855	0.826
timo	0.913	0.856	0.889	ID	0.913	0.904	0.917	0.869	0.919	0.872	0.844	0.851	0.809
vari	0.943	0.853	0.924	0.913	ID	0.939	0.932	0.868	0.936	0.874	0.852	0.862	0.815
yuzh	0.914	0.843	0.899	0.904	0.939	ID	0.913	0.856	0.917	0.852	0.842	0.842	0.806
oxal	0.933	0.867	0.917	0.917	0.932	0.913	ID	0.869	0.936	0.871	0.851	0.861	0.826
EJS7	0.879	0.891	0.872	0.869	0.868	0.856	0.869	ID	0.874	0.919	0.865	0.870	0.804
NS9	0.929	0.857	0.910	0.919	0.936	0.917	0.936	0.874	ID	0.881	0.852	0.856	0.822
viol	0.874	0.892	0.866	0.872	0.874	0.852	0.871	0.919	0.881	ID	0.871	0.873	0.795
zoog	0.846	0.850	0.842	0.844	0.852	0.842	0.851	0.865	0.852	0.871	ID	0.949	0.792
phyl	0.854	0.864	0.855	0.851	0.862	0.842	0.861	0.870	0.856	0.873	0.949	ID	0.801
ceno	0.836	0.811	0.826	0.809	0.815	0.806	0.826	0.804	0.822	0.795	0.792	0.801	ID

In den partiellen und konkatenierten *gyrB/lepA* Nukleotid- (2109 Bp) und Aminosäuresequenzen (703 AS) lagen die Ähnlichkeitswerte zwischen untersuchten *Massilia* Spezies im Bereich von 86.2 % - 98.3 % bzw. 90.3 % - 99.8 % (Tab. 12.6; 14.2). Die *gyrB/lepA* Sequenzähnlichkeitswerte zu *T. chitinolytica* CIP 104069^T lagen hierbei zwischen 86.3 % (*M. brevitalea* DSM 18925^T) - 94.0 % (*M. plicata* DSM 17505^T) und in der korrespondierenden GyrB/ LepA Aminosäuresequenz bei 90.0 % (*M. niabensis* KACC 12632^T) - 98.4 % (*M. plicata* DSM 17505^T). Die Sequenzähnlichkeitswerte zwischen *T. chitinolytica* CIP 104069^T und den *Massilia* Spezies lagen somit auch in der konkatenierten *gyrB/lepA* Nukleotid- und Aminosäuresequenz innerhalb der für *Massilia* Spezies bestimmten Schwankungsbreite, was ein Hinweis für eine enge Verwandtschaft mit *Massilia* Spezies darstellt. Zu *T. mixta* CCUG 35206^T zeigten sich in der konkatenierten *gyrB/lepA* Sequenzähnlichkeitswerte zwischen 86.3 % (*M. albidiflava* CIP 109189^T und *M. plicata* DSM 17505^T) - 90.2 % (*M. tieshanensis* KACC 14940^T). In der korrespondierenden GyrB/ LepA Aminosäuresequenz von *T. mixta* CCUG 35206^T waren es zwischen 88.3 % (*M. plicata* DSM 17505^T) - 94.5 % (*M. consociata* CCUG 58010^T). Daraus ist wie schon vorher anhand der separaten *gyrB* und *lepA* Sequenzähnlichkeitswerte eine Zugehörigkeit von *T. mixta* CCUG 35206^T und *T. chitinolytica* CIP 104069^T und der *Massilia* Spezies zum selben Genus ersichtlich, jedoch ist auch hier *T. mixta* CCUG 35206^T deutlicher von den *Massilia* Spezies separiert als *T. chitinolytica* CIP 104069^T.

12. Taxonomische Untersuchung von Vertretern der Genera *Massilia* und *Telluria*

Tabelle 12.6.: Sequenzähnlichkeitsmatrix basierend auf den partiellen und konkatenierten *gyrB*/*lepA* Nukleotidsequenzen (2109 Bp) anhand von BioEdit (Hall, 1999), Teil (a) und Teil (b). Abkürzungen: chit, *T. chitinolytica* CIP 104069^T (HG798309/HG798326); mixt, *T. mixta* CCUG 35206^T (HG798310/HG798327); aeri, *M. aerilata* DSM 19289^T (HG798295/HG798312); albi, *M. albidiflava* CIP 109189^T (HG798296/HG798313); alka, *M. alkalitolerans* DSM 17462^T (ATYR01000025/ATYR01000001); aure, *M. aurea* AP13^T (HG798297/HG798314); brev, *M. brevitalea* DSM 18925^T (KF780161/KF780162); cons, *M. consociata* CCUG 58010^T (HG798298/HG798315); dura, *M. dura* CCUG 52213^T (HG798299/HG798316); haem, *M. haematophila* CCUG 38318^T (HG798300/HG798317); jeju, *M. jejuensis* KACC 12634^T (KF780163/KF780164); lute, *M. lutea* CIP 109190^T (HG798301/HG798318); niab, *M. niabensis* KACC 12632^T (HG798302/HG798319); nias, *M. niastensis* KACC 12599^T (HG798303/HG798320); plic, *M. plicata* DSM 17505^T (HG798304/HG798322); ties, *M. tieshanensis* KACC 14940^T (KF780165/KF780166); timo, *M. timonae* CCUG 45783^T (HG798307/HG798324); vari, *M. varians* CCUG 35299^T (HG798308/HG798325); yuzh, *M. yuzhufengensis* CGMCC 1.12041^T (KF780159/KF780160); oxal, *Oxalobacteraceae* bacterium Ma (HG798306/HG798323); EJS7, E-JS-7 (keine Zugangsnummer); NS9, *M. norwichensis* sp. nov. NS9^T (HG798305/HG798321); viol, *Pseudoduganella violaceinigra* YIM 31327^T/DSM 15887^T (EU714411/KE384358); zoog, *Duganella zoogloeoides* IAM 12670^T/ATCC 25935^T (EU714412/KB912919); phyl, *Duganella phyllosphaerae* T54^T (HG798311/HG798328); ceno, *Burkholderia cenocepacia* J2315^T (AM747720/AM747720).

(a)

	chit	mixt	aeri	albi	alka	aure	brev	cons	dura	haem	jeju	lute	niab
chit	ID	0.867	0.880	0.920	0.884	0.871	0.863	0.873	0.917	0.880	0.863	0.917	0.870
mixt	0.867	ID	0.891	0.863	0.892	0.875	0.889	0.894	0.871	0.893	0.875	0.872	0.879
aeri	0.880	0.891	ID	0.883	0.941	0.898	0.922	0.914	0.885	0.926	0.908	0.874	0.911
albi	0.920	0.863	0.883	ID	0.878	0.872	0.872	0.872	0.940	0.880	0.865	0.944	0.874
alka	0.884	0.892	0.941	0.878	ID	0.899	0.918	0.931	0.882	0.924	0.912	0.874	0.916
aure	0.871	0.875	0.898	0.872	0.899	ID	0.907	0.889	0.872	0.897	0.897	0.871	0.896
brev	0.863	0.889	0.922	0.872	0.918	0.907	ID	0.908	0.869	0.935	0.923	0.869	0.924
cons	0.873	0.894	0.914	0.872	0.931	0.889	0.908	ID	0.871	0.927	0.894	0.869	0.904
dura	0.917	0.871	0.885	0.940	0.882	0.872	0.869	0.871	ID	0.880	0.868	0.941	0.877
haem	0.880	0.893	0.926	0.880	0.924	0.897	0.935	0.927	0.880	ID	0.913	0.871	0.922
jeju	0.863	0.875	0.908	0.865	0.912	0.897	0.923	0.894	0.868	0.913	ID	0.862	0.930
lute	0.917	0.872	0.874	0.944	0.874	0.871	0.869	0.869	0.941	0.871	0.862	ID	0.868
niab	0.870	0.879	0.911	0.874	0.916	0.896	0.924	0.904	0.877	0.922	0.930	0.868	ID
nias	0.889	0.899	0.931	0.882	0.946	0.902	0.920	0.931	0.881	0.928	0.912	0.876	0.914
plic	0.940	0.863	0.878	0.914	0.874	0.870	0.865	0.872	0.911	0.879	0.863	0.914	0.869
ties	0.883	0.902	0.925	0.879	0.935	0.888	0.909	0.940	0.878	0.933	0.900	0.874	0.906
timo	0.885	0.880	0.926	0.876	0.926	0.906	0.911	0.907	0.879	0.914	0.904	0.866	0.909
vari	0.881	0.896	0.942	0.877	0.983	0.905	0.920	0.935	0.881	0.927	0.915	0.872	0.917
yuzh	0.866	0.876	0.920	0.869	0.934	0.899	0.917	0.911	0.871	0.912	0.913	0.867	0.912
oxal	0.888	0.902	0.938	0.886	0.937	0.910	0.930	0.920	0.886	0.928	0.901	0.881	0.921
EJS7	0.905	0.860	0.880	0.899	0.884	0.872	0.871	0.870	0.892	0.876	0.869	0.889	0.864
NS9	0.873	0.888	0.938	0.873	0.930	0.898	0.917	0.911	0.877	0.928	0.897	0.863	0.909
viol	0.899	0.857	0.883	0.904	0.885	0.864	0.871	0.866	0.898	0.877	0.871	0.896	0.867
zoog	0.879	0.853	0.870	0.884	0.873	0.857	0.861	0.857	0.886	0.864	0.865	0.887	0.859
phyl	0.887	0.856	0.873	0.896	0.879	0.863	0.866	0.863	0.892	0.870	0.866	0.890	0.868
ceno	0.807	0.810	0.800	0.801	0.803	0.799	0.802	0.808	0.805	0.809	0.796	0.798	0.799

(b)

	nias	plic	ties	timo	vari	yuzh	oxal	EJS7	NS9	viol	zoog	phyl	ceno
chit	0.889	0.940	0.883	0.885	0.881	0.866	0.888	0.905	0.873	0.899	0.879	0.887	0.807
mixt	0.899	0.863	0.902	0.880	0.896	0.876	0.902	0.860	0.888	0.857	0.853	0.856	0.810
aeri	0.931	0.878	0.925	0.926	0.942	0.920	0.938	0.880	0.938	0.883	0.870	0.873	0.800
albi	0.882	0.914	0.879	0.876	0.877	0.869	0.886	0.899	0.873	0.904	0.884	0.896	0.801
alka	0.946	0.874	0.935	0.926	0.983	0.934	0.937	0.884	0.930	0.885	0.873	0.879	0.803
aure	0.902	0.870	0.888	0.906	0.905	0.899	0.910	0.872	0.898	0.864	0.857	0.863	0.799
brev	0.920	0.865	0.909	0.911	0.920	0.917	0.930	0.871	0.917	0.871	0.861	0.866	0.802
cons	0.931	0.872	0.940	0.907	0.935	0.911	0.920	0.870	0.911	0.866	0.857	0.863	0.808
dura	0.881	0.911	0.878	0.879	0.881	0.871	0.886	0.892	0.877	0.898	0.886	0.892	0.805
haem	0.928	0.879	0.933	0.914	0.927	0.912	0.928	0.876	0.928	0.877	0.864	0.870	0.809
jeju	0.912	0.863	0.900	0.904	0.915	0.913	0.901	0.869	0.897	0.871	0.865	0.866	0.796
lute	0.876	0.914	0.874	0.866	0.872	0.867	0.881	0.889	0.863	0.896	0.887	0.890	0.798
niab	0.914	0.869	0.906	0.909	0.917	0.912	0.921	0.864	0.909	0.867	0.859	0.868	0.799
nias	ID	0.877	0.941	0.922	0.950	0.915	0.933	0.894	0.925	0.885	0.866	0.872	0.818
plic	0.877	ID	0.872	0.872	0.873	0.862	0.877	0.895	0.869	0.896	0.869	0.880	0.805
ties	0.941	0.872	ID	0.905	0.936	0.905	0.922	0.886	0.915	0.879	0.862	0.869	0.814
timo	0.922	0.872	0.905	ID	0.923	0.910	0.924	0.882	0.919	0.880	0.860	0.863	0.801
vari	0.950	0.873	0.936	0.923	ID	0.935	0.938	0.889	0.931	0.887	0.874	0.881	0.807
yuzh	0.915	0.862	0.905	0.910	0.935	ID	0.914	0.871	0.913	0.873	0.865	0.865	0.793
oxal	0.933	0.877	0.922	0.924	0.938	0.914	ID	0.882	0.934	0.881	0.869	0.874	0.808
EJS7	0.894	0.895	0.886	0.882	0.889	0.871	0.882	ID	0.880	0.917	0.881	0.885	0.796
NS9	0.925	0.869	0.915	0.919	0.931	0.913	0.934	0.880	ID	0.879	0.861	0.862	0.803
viol	0.885	0.896	0.879	0.880	0.887	0.873	0.881	0.917	0.879	ID	0.883	0.886	0.790
zoog	0.866	0.869	0.862	0.860	0.874	0.865	0.869	0.881	0.861	0.883	ID	0.950	0.788
phyl	0.872	0.880	0.869	0.863	0.881	0.865	0.874	0.885	0.862	0.886	0.950	ID	0.793
ceno	0.818	0.805	0.814	0.801	0.807	0.793	0.808	0.796	0.803	0.790	0.788	0.793	ID

Bei der Betrachtung der *Telluria* Sequenzähnlichkeitswerte untereinander, in Relation zu den ermittelten maximalen und minimalen *gyrB* und *lepA* Sequenzähnlichkeitswerten zwischen den *Massilia* Spezies, lagen die Sequenzähnlichkeitswerte zwischen den *Telluria* Spezies im unteren Bereich. In der *gyrB* Sequenz wurde zwischen *T. chitinolytica* CIP 104069^T und *T. mixta* CCUG 35206^T eine Ähnlichkeit von 91.6 % gefunden. In der korrespondierenden GyrB Aminosäuresequenz waren es 95.1 % (Tab. 12.4; 15.1). In der *lepA* Sequenz lag diese bei 83.7 % und in der korrespondierenden LepA Aminosäuresequenz bei 84.2 % (Tab. 12.5; 14.1). In den konkatenierten *gyrB*/*lepA* Nukleotid- und Aminosäuresequenzen waren es 86.7 % bzw. 88.4 % (Tab. 12.6; 14.2). Passend zu dieser Beobachtung wies die Spezies *T. chitinolytica* CIP 104069^T in den *gyrB* und *lepA* sowie in den konkatenierten *gyrB*/*lepA* Nukleotid- und Aminosäuresequenzen höchste Ähnlichkeitswerte zu *M. plicata* DSM 17505^T auf, während *T. mixta* CCUG 35206^T mit Ausnahme der *lepA* Ähnlichkeitswerte die niedrigsten Sequenzähnlichkeiten zu *M. plicata* DSM 17505^T zeigte. Die *gyrB* und *lepA* Sequenzähnlichkeiten deuten somit auf eine größere verwandtschaftliche Entfernung der *Telluria* zueinander an, als bislang durch 16S rRNA Sequenzen gezeigt wurde. Bislang basierte die *Telluria* Phylogenie auf den 16S rRNA Sequenzen von Bowman *et al.* (1993), anhand welcher beide *Telluria* Spezies, *T. chitinolytica* ACM 3522^T und *T. mixta* ACM 1762^T in den 16S rRNA Stammbäumen mit signifikanten bootstrap Werten von 100 % zusammen clusterten (Zhang *et al.*, 2006; Kämpfer *et al.*, 2011; Du *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2012; Rodríguez-Díaz *et al.*, 2014).

Auf der Ebene der Spezies basierend auf den *gyrB* und *lepA* Sequenzähnlichkeiten war die nächst zu *T. chitinolytica* CIP 104069^T verwandte Spezies *M. plicata* DSM 17505^T. In den *gyrB* und *lepA* Sequenzen wurden zwischen *M. plicata* DSM 17505^T und *T. chitinolytica* CIP 104069^T höchste Ähnlichkeitswerte gefunden. Diese lagen in den *gyrB*, *lepA* und den konkatenierten *gyrB*/*lepA* Nukleotidsequenzen bei 94.0 %, 93.9 % bzw. 94.0 % (Tab. 12.4; 12.5; 12.6). In den korrespondierenden GyrB, LepA und den konkatenierten GyrB/LepA Aminosäuresequenzen lagen die Ähnlichkeiten bei 99.2 %, 97.9 % bzw. 98.4 % (Tab. 15.1; 14.1; 14.2). Aufgrund dieser hohen Werte von >90 % ist dies gleichzeitig ein weiterer starker Hinweis dafür, dass *T. chitinolytica* CIP 104069^T und die Spezies des Genus *Massilia* in dasselbe Genus gehören.

Die Spezies *T. mixta* CCUG 35206^T wies in den partiellen GyrB, LepA sowie in den konkatenierten Aminosäuresequenzen höchste Sequenzähnlichkeiten zu *M. consociata* CCUG 58010^T auf (98.5 %; 92.1 % bzw. 94.5 %), (Tab. 15.1; 14.1; 14.2).

12. Taxonomische Untersuchung von Vertretern der Genera *Massilia* und *Telluria*

In den korrespondierenden *gyrB*, *lepA* und den konkatenierten Nukleotidsequenzen war es die Spezies *M. tieshanensis* KACC 14940^T, zu welcher sich höchste Sequenzähnlichkeitswerte zeigten (93.5 %, 88.2 % bzw. 90.2 %), (Tab. 12.4; 12.5; 12.6). In der *gyrB* Nukleotidsequenz wies *T. mixta* CCUG 35206^T neben *M. tieshanensis* KACC 14940^T auch zu *M. niastensis* KACC 12599^T und *M. varians* CCUG 35299^T 93.5 % Sequenzähnlichkeit auf (Tab. 12.4). *T. mixta* CCUG 35206^T wäre somit anhand der *gyrB* und *lepA* Sequenzähnlichkeitswerte in die Nähe dieser *Massilia* Spezies einzuordnen, da sich zu diesen die höchsten *gyrB* und *lepA* Sequenzähnlichkeiten zeigten.

12.2.2. *gyrB* und *lepA* Stammbäume

Die Spezies *T. mixta* CCUG 35206^T wies in einigen *gyrB* und *lepA* Stammbäumen, wie bereits in den *gyrB* und *lepA* Sequenzunterschieden angedeutet wurde, eine größere phylogenetische Distanz zu allen ebenfalls untersuchten Vertretern des Genus *Massilia* auf als *T. chitinolytica* CIP 104069^T. Dies war in den *lepA* Stammbäumen (maximum-likelihood und maximum-parsimony; Abb. 15.3; B.5) sowie im konkatenierten *gyrB*/*lepA* Stammbaum (maximum-parsimony; Abb. 12.3) ersichtlich. In diesen Stammbäumen clusterte *T. mixta* CCUG 35206^T mit signifikanten bootstrap Werten im Bereich von 68 - 99 % mit der 'outgroup' Spezies *Burkholderia cenocepacia* J2315^T. Gleichzeitig wurde aber in den genannten Stammbäumen der kürzeste phylogenetische Abstand zu den Vertretern des Genus *Massilia* aufgezeigt, allen voran zur Spezies *M. haematophila* CCUG 38318^T oder zum Isolat *Oxalobacteraceae* bacterium Ma. Die Verzweigungen waren jedoch nicht durch signifikante bootstrap Werte untermauert.

Auch in *LepA* Stammbäumen (maximum-likelihood und maximum-parsimony), clusterte *T. mixta* CCUG 35206^T mit *B. cenocepacia* J2315^T, allerdings ohne signifikante bootstrap Unterstützung bei der Verzweigung (Abb. B.7; B.8). Auch hier waren die nächst Verwandten, angezeigt durch kürzeste phylogenetische Distanzen, Spezies des Genus *Massilia*, *M. haematophila* CCUG 38318^T, *M. tieshanensis* KACC 14940^T und *M. consociata* CCUG 58010^T. Im *lepA* Stammbaum (neighbour-joining) zweigte *T. mixta* CCUG 35206^T von der *Massilia* Gruppe ab und war auf einem separaten Zweig, bei einem bootstrap Wert von 94 % positioniert. Die kürzeste phylogenetische Distanz wurde zum Isolat *Oxalobacteraceae* bacterium Ma, allerdings ohne signifikante bootstrap Unterstützung bei den Verzweigungen, erreicht (Abb. B.6).

In der Mehrzahl der *gyrB* und *lepA* Stammbäume clusterte *T. mixta* CCUG 35206^T

unter die Vertreter des Genus *Massilia*, in die Nähe von *M. consociata* CCUG 58010^T, *M. tieshanensis* KACC 14940^T, *M. niastensis* KACC 12599^T oder *M. aerilata* DSM 19289^T, welche auch anhand der 16S rRNA untereinander nah verwandt sind (Du *et al.*, 2012). In den GyrB Stammbäumen (maximum-likelihood, maximum-parsimony; Abb. B.4; B.3), sowie im Stammbaum anhand der konkatenierten GyrB/LepA Sequenzen (maximum-parsimony; Abb. B.11), lag *T. mixta* CCUG 35206^T auf einem separaten Zweig und wies ohne signifikante bootstrap Unterstützung bei der Verzweigung den kürzesten phylogenetischen Abstand zu *M. consociata* CCUG 58010^T auf. Im konkatenierten GyrB/ LepA Stammbaum (neighbour-joining) ergaben sich unterstützend für die Verwandtschaft von *T. mixta* CCUG 35206^T zu *M. consociata* CCUG 58010^T und *M. tieshanensis* KACC 14940^T signifikante bootstrap Werte von 81 % und 91 % (Abb. 12.4).

In konkatenierten *gyrB/ lepA* Stammbäumen (maximum-likelihood und neighbour-joining) sowie im LepA Stammbaum (neighbour-joining) lag *T. mixta* CCUG 35206^T auf einem separaten Zweig und ebenfalls in der Nähe der Stämme *M. niastensis* KACC 12599^T, *M. consociata* CCUG 58010^T und *M. tieshanensis* KACC 14940^T, allerdings ohne signifikante bootstrap Unterstützung für diese Verzweigungen (Abb. 12.5; B.9; 15.2). Des Weiteren clusterte *T. mixta* CCUG 35206^T im *gyrB* Stammbaum (maximum-likelihood) mit kürzestem phylogenetischen Abstand und ohne signifikante bootstrap Unterstützung bei der Verzweigung mit der Spezies *M. aerilata* DSM 19289^T (Abb. 14.2). Im Stammbaum berechnet anhand des neighbour-joining Algorithmus auf Basis der *gyrB* Nukleotidsequenzen zeigte *T. mixta* CCUG 35206^T ebenfalls den kürzesten phylogenetischen Abstand zu *M. aerilata* DSM 19289^T, jedoch war auch hier die Verzweigung ohne signifikante bootstrap Unterstützung (Abb. B.2).

12. Taxonomische Untersuchung von Vertretern der Genera *Massilia* und *Telluria*

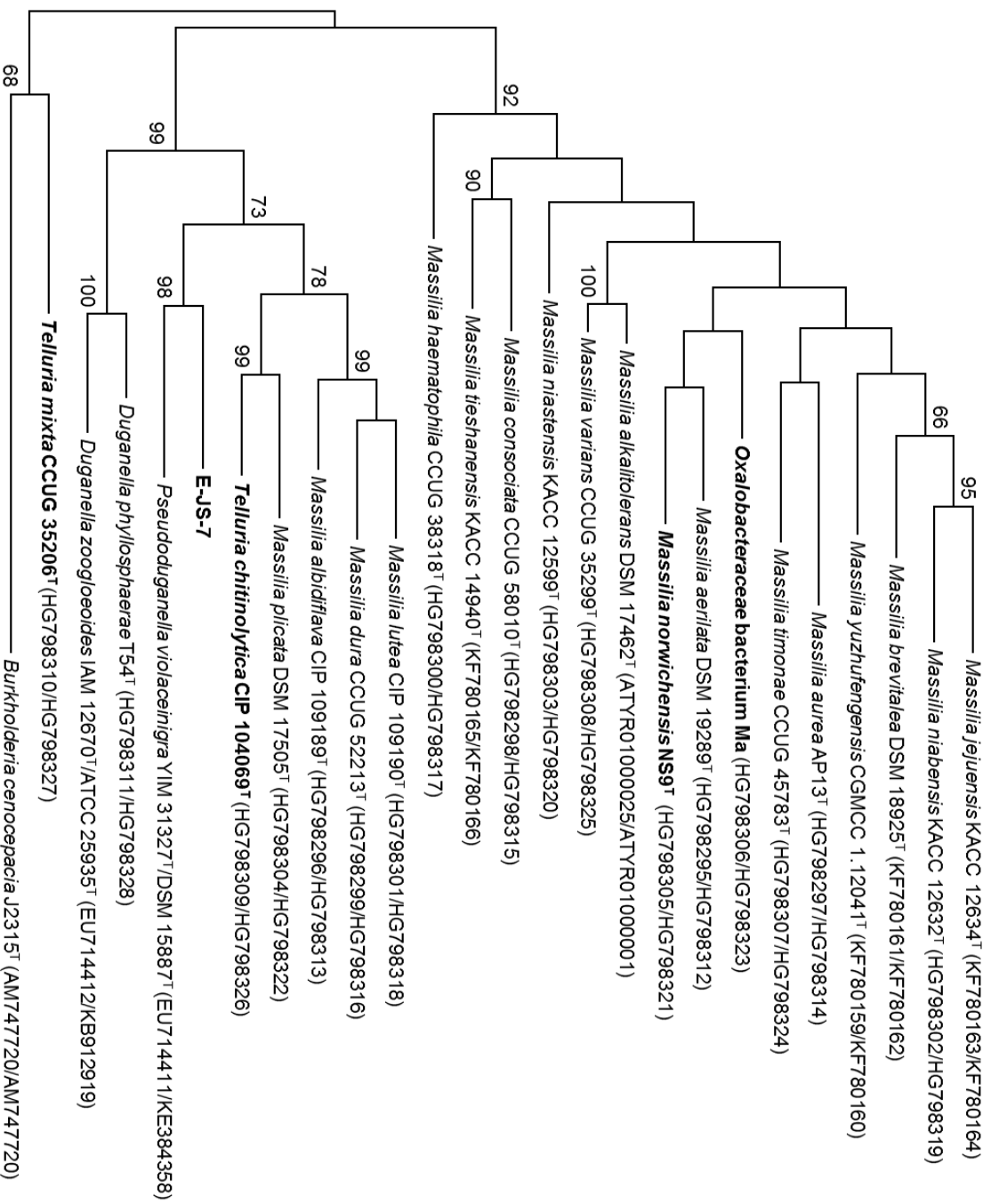


Abbildung 12.3.: Maximum-parsimony Stammbaum basierend auf partiellen und konkatanierten *gyrB* / *lepA* Nukleotidsequenzen (2109 Bp) unter Verwendung des Subtree-Pruning-Regrafting (SPR) Modells (Nei & Kumar, 2000). Der Stammbaum wurde mit Hilfe des Programms MEGA 5.2.2 (Tamura *et al.*, 2011) berechnet und Zahlenwerte an den Verzweigungspunkten geben das Ergebnis von 1000 bootstrap Replikationen in % an. Dargestellt sind nur bootstrap Werte ≥ 65 %. Balken, 50 akkumulierte Substitutionen pro Nukleotid.

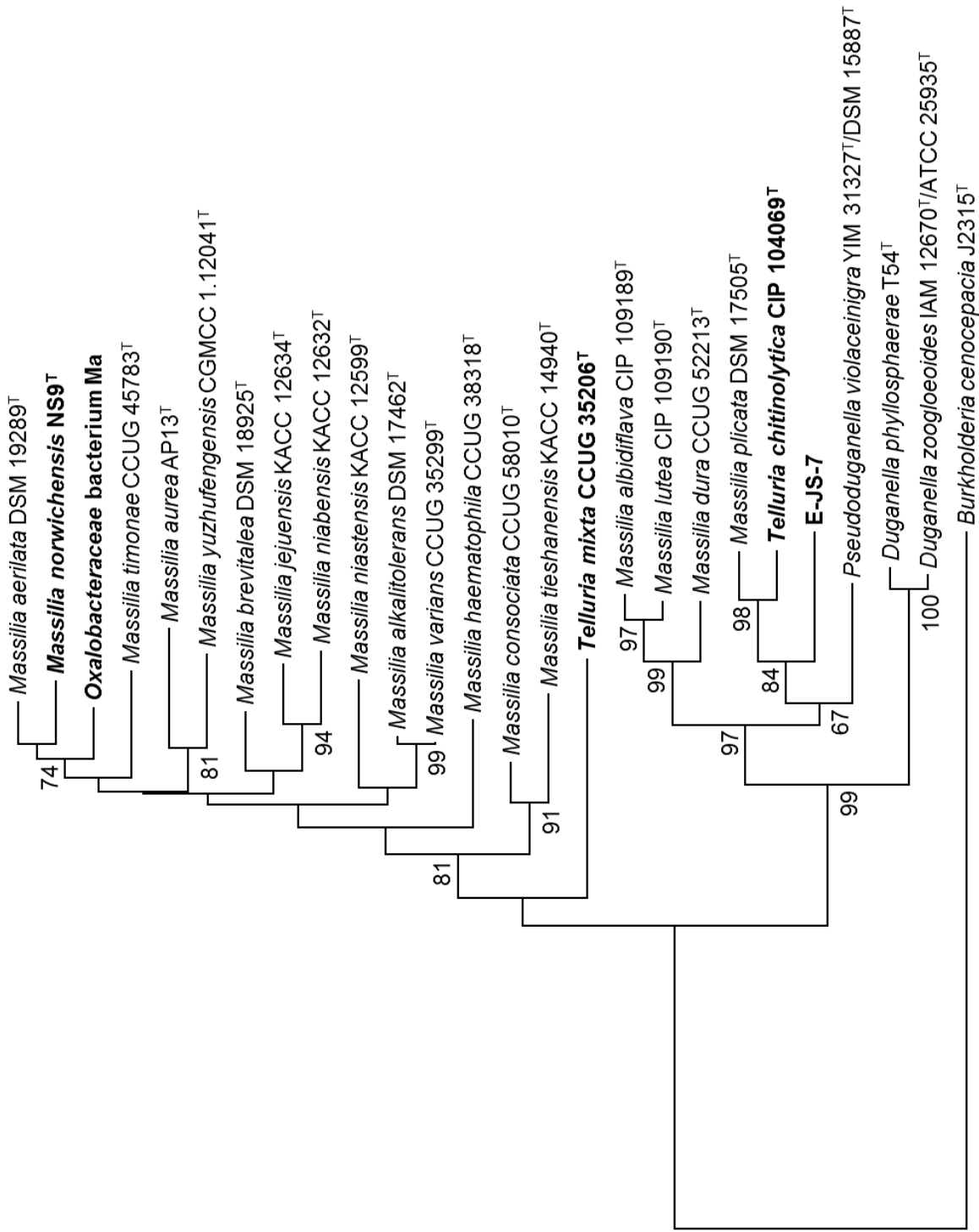


Abbildung 12.4.: Neighbour-joining Stammbaum basierend auf partiellen und konkatinierten GyrB/ LepA Aminosäuresequenzen (703 AS) anhand des Poisson correction Modells (Zuckerkindl & Pauling, 1965), berechnet im Programm MEGA 5.2.2 (Tamura *et al.*, 2011). Nur bootstrap Werte ≥ 65 % sind angegeben. Balken, 0.02 akkumulierte Substitutionen pro Aminosäure.

12. Taxonomische Untersuchung von Vertretern der Genera *Massilia* und *Telluria*

Zusammenfassend ergab sich daher für die Spezies *T. mixta* CCUG 35206^T in den *gyrB* und *lepA* Stammbäumen eine widersprüchliche phylogenetische Positionierung. Einerseits wird aufgrund der Clusterung mit der 'outgroup' *B. cenocepacia* J2315^T eine phylogenetische Position separat von den Spezies des Genus *Massilia* angedeutet, andererseits clusterte *T. mixta* CCUG 35206^T zusammen mit den Vertretern des Genus *Massilia*. Da in der Überzahl der *gyrB* und *lepA* Stammbäume eine Clusterung in der Nähe der Spezies *M. consociata* CCUG 58010^T, *M. tiesha-nensis* KACC 14940^T, *M. niastensis* KACC 12599^T und *M. aerilata* DSM 19289^T beobachtet wurde und in den *gyrB* und *lepA* Sequenzähnlichkeitsmatrizes ebenfalls zu diesen Spezies höchste Sequenzähnlichkeiten nachgewiesen werden konnten, ist doch eher anzunehmen, dass die Spezies *T. mixta* CCUG 35206^T und die Spezies des Genus *Massilia* demselben Genus angehören.

Dagegen erscheint die phylogenetische Position von *T. chitinolytica* CIP 104069^T mit *M. plicata* DSM 17505^T als nächsten Verwandten abgesichert zu sein, wie anhand der *gyrB* und *lepA* Stammbäume zu erkennen war. In nahezu allen *gyrB* und *lepA* Nukleotid- und Aminosäuresequenz-basierten Stammbäumen clusterte *M. plicata* DSM 17505^T zusammen mit *T. chitinolytica* CIP 104069^T bei signifikanter bootstrap Unterstützung (75 - 100 %) bei der Verzweigung (Abb. 14.3; 14.2; 12.5; 12.3; B.9; B.11; 12.4; 15.2; 15.3; B.3; B.5; B.7; B.10). Lediglich in den *gyrB* Stammbäumen (maximum-likelihood und maximum-parsimony) lag *T. chitinolytica* CIP 104069^T auf einem separaten Zweig. Allerdings deuteten die bootstrap Werte keine statistische Unterstützung für diese Position an und auch hier war der kürzeste phylogenetische Abstand zwischen *T. chitinolytica* CIP 104069^T und *M. plicata* DSM 17505^T (Abb. 14.2; B.1). Darüber hinaus deuteten die *lepA* und die konkatenierten *gyrB/lepA* Stammbäume (maximum-likelihood und neighbour-joining) eine nahe phylogenetische Verwandtschaft von *T. chitinolytica* CIP 104069^T und *M. plicata* DSM 17505^T zu *M. albidiflava* CIP 109189^T, *M. dura* CCUG 52213^T und *M. lutea* CIP 109190^T an, wobei die Verwandtschaftsgrade durch signifikante bootstrap Werte (73 - 100 %) bei den Verzweigungen untermauert wurden (Abb. 15.3; B.6; 12.5 B.9). Die Spezies *T. chitinolytica* CIP 104069^T wäre somit anhand der *gyrB* und *lepA* Phylogenie mit hoher Wahrscheinlichkeit demselben Genus zuzuordnen, wie *Massilia* Spezies, mit den nächsten Verwandten *M. plicata* DSM 17505^T und in weiterer Folge *M. dura* CCUG 52213^T, *M. albidiflava* CIP 109189^T und *M. lutea* CIP 109190^T.

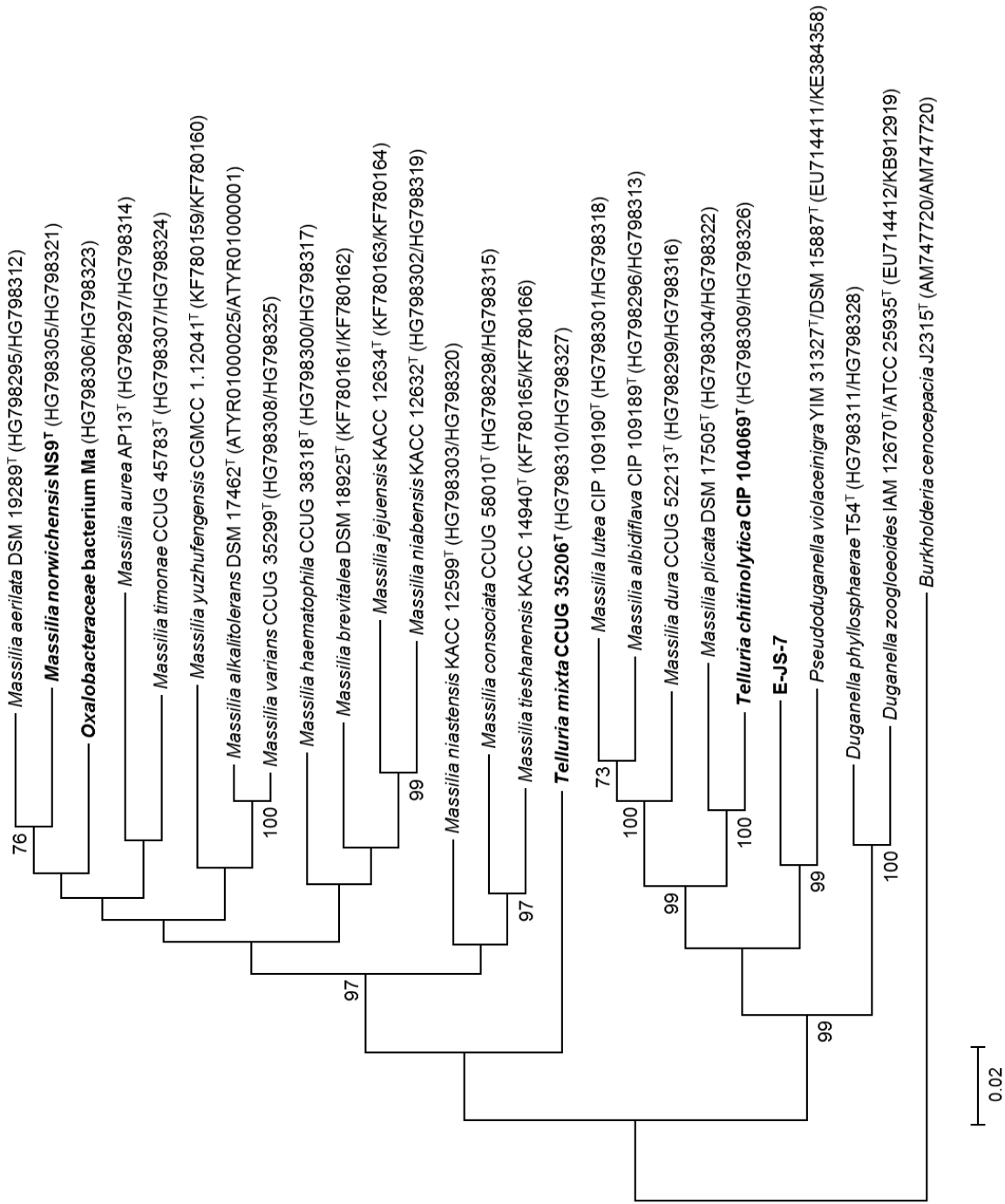


Abbildung 12.5.: Maximum-Likelihood Stammbaum basierend auf der partiellen und konkatenierten *gyrB*/*lepA* Nukleotidsequenz (2109 Bp) unter Verwendung des Tamura-Nei Modells (Tamura & Nei, 1993). Der Stammbaum wurde unter Benutzung von MEGA 5.2.2 (Tamura *et al.*, 2011) berechnet und Zahlenwerte an den Verzweigungspunkten geben das Ergebnis von 1000 bootstrapped Replikationen in % an. Dargestellt sind nur Werte ≥ 65 %. Balken, 0.02 akkumulierte Substitutionen pro Nukleotid.

12. Taxonomische Untersuchung von Vertretern der Genera *Massilia* und *Telluria*

In den *gyrB* und *lepA* Stammbäumen clusterten die Spezies *T. mixta* CCUG 35206^T und *T. chitinolytica* CIP 104069^T nicht gemeinsam und wiesen deutlich voneinander getrennte phylogenetische Positionen auf. Dies steht in Übereinstimmung mit den vergleichsweise niedrigen *gyrB* und *lepA* Nukleotid- und Aminosäuresequenzähnlichkeiten der *Telluria* Spezies zueinander (Tab. 12.4; 15.1; 12.5; 14.1). Anhand der *gyrB* und *lepA* Phylogenie handelt es sich bei den *Telluria* Spezies um verwandtschaftlich deutlich voneinander separierte Spezies, als bisher vergleichsweise anhand der 16S rRNA Phylogenie gezeigt wurde, wo *T. chitinolytica* ACM 3522^T und *T. mixta* ACM 1762^T untereinander die nächsten Verwandten darstellten (Du *et al.*, 2012).

12.2.3. 16S rRNA Sequenzähnlichkeiten

Bis zu diesem Zeitpunkt beruhte die Klassifizierung von Vertretern des Genus *Telluria* auf den 16S rRNA Gensequenzen, die von Bowman *et al.* (1993) für *T. mixta* ACM 1762^T (X65589) und *T. chitinolytica* ACM 3522^T (X65590) publiziert worden waren. Anhand dieser Sequenzen ergaben sich zum Zeitpunkt, als die Arbeiten zur vorliegenden Studie begonnen wurden, zwischen den *Telluria* und *Massilia* Spezies Sequenzähnlichkeiten, welche eine verwandtschaftliche Nähe zwischen den *Telluria* Spezies und einigen *Massilia* Spezies, insbesondere zu *M. plicata* DSM 17505^T, *M. albidiflava* CIP 109189^T, *M. dura* CCUG 52213^T und *M. lutea* CIP 109190^T zeigten. Entsprechende Ergebnisse wurden auch in dieser Arbeit bei der Analyse bearbeiteter 16S rRNA Gensequenzen (1325 Bp) beider *Telluria* Spezies gemeinsam mit den bis zum Zeitpunkt des Verfassens dieser Arbeit beschriebenen 23 *Massilia* Spezies, sowie den Spezies nah verwandter Genera erhalten. Für *T. mixta* ACM 1762^T ergaben sich zu den ebenfalls untersuchten *Massilia* Spezies Sequenzähnlichkeitswerte im Bereich von 94.1 - 95.9 % und für *T. chitinolytica* ACM 3522^T von 92.9 - 94.8 %. Hierbei lagen die Sequenzähnlichkeitswerte zwischen *T. mixta* ACM 1762^T und *M. timonae* UR/MT95^T bei 95.3 % und jene zwischen *T. chitinolytica* ACM 3522^T und *M. timonae* UR/MT95^T bei 94.1 %. Die 16S rRNA Sequenzähnlichkeiten zwischen den 23 untersuchten *Massilia* Spezies lagen hierbei zwischen 95.2 - 99.3 %. Demgegenüber standen die aus der Sequenzierung und Analyse der Haushaltsgene *gyrB* und *lepA* erhaltenen Daten, sowie die Ergebnisse aus der Analyse der Muster der polaren Lipide, welche in ihrer Gesamtheit für eine Zusammenführung der Genera *Massilia* und *Telluria* sprechen. Dies ergab schließlich den Anstoß, die 16S rRNA Gensequenzen der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Stämme *T. chitinolytica* CIP 104069^T und *T. mixta* CCUG 35206^T zu resequenzieren.

Die Resequenzierung der 16S rRNA Gene von *T. chitinolytica* CIP 104069^T und *T. mixta* CCUG 35206^T wurde von Stefanie Gläser (Institut für Angewandte Mi-

krobiologie, Justus-Liebig Universität Gießen, Deutschland) durchgeführt. Der Vergleich der neuen 16S rRNA Gensequenzen (1330 Bp) von *T. chitinolytica* CIP 104069^T (KJ183020) und *T. mixta* CCUG 35206^T (KJ183019) ergab Ähnlichkeitswerte im Bereich von 95.7 - 98.1 % mit *M. brevitalea* byr23-80^T als nächsten Verwandten von *T. mixta* CCUG 35206^T und *M. plicata* 76^T als nächsten Verwandten von *T. chitinolytica* CIP 104069^T von 95.4 - 98.6 % (höchste Werte). Zwischen den Spezies des Genus *Massilia* lagen die 16S rRNA Sequenzähnlichkeiten im Bereich von 95.1 - 99.3 %. Hiermit lagen die Sequenzähnlichkeiten innerhalb der im Genus *Massilia* beobachteten Schwankungsbreite. Zwischen den *Telluria* Spezies untereinander ergaben sich 16S rRNA Sequenzähnlichkeiten von 96.8 %. Jedenfalls deuten diese Werte an, dass *T. chitinolytica* CIP 104069^T und *T. mixta* CCUG 35206^T zueinander nicht die engsten Verwandten darstellen und eine Neuordnung der Spezies der Genera *Massilia* und *Telluria* sinnvoll erscheint, oder aber ihre Zusammenführung.

12.2.4. 16S rRNA Stammbäume

Bisher ergab sich in einigen 16S rRNA Stammbäumen anhand der *Telluria* 16S rRNA Gensequenzen von Bowman *et al.* (1993) in Abhängigkeit des Datensets und der gewählten statistischen Methode eine Clusterung von *T. mixta* und *T. chitinolytica* unter die Vertreter des Genus *Massilia*, in die Nähe von *M. albidiflava* 45^T, *M. lutea* 101^T, *M. dura* 16^T und *M. plicata* 45^T (Kämpfer *et al.*, 2011, 2012a). Hierbei waren in sämtlichen 16S rRNA Stammbäumen die *Telluria* Spezies zueinander die nächsten Verwandten und clusterten gemeinsam mit signifikanter bootstrap Unterstützung von 100 % (Zhang *et al.*, 2006; Kämpfer *et al.*, 2011; Du *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2012; Rodríguez-Díaz *et al.*, 2014).

Zur weiteren Abwägung einer Zusammenführung der Genera *Massilia* und *Telluria* wurden deshalb anhand des gleichen 16S rRNA Datensatzes (1330 Bp) mit resequenzierten *Telluria* 16S rRNA Gensequenzen (KJ183020; KJ183019), phylogenetische Stammbäume anhand der Algorithmen maximum-likelihood (Abb. A.1), neighbour-joining (Abb. A.2) und maximum-parsimony (Abb. 12.6) berechnet. In diesen Stammbäumen zeigte sich keine enge Verwandtschaft zwischen *T. mixta* CCUG 35206^T und *T. chitinolytica* CIP 104069^T. Die *Telluria* Spezies lagen auf verschiedenen Zweigen der untersuchten Gruppe von Bakterien. Dies steht in Übereinstimmung mit den *gyrB* und *lepA* Stammbäumen, in welchen sich für *T. mixta* CCUG 35206^T und *T. chitinolytica* CIP 104069^T ebenfalls eine unterschiedliche Positionierung innerhalb des Genus *Massilia* ergab (Abb. 12.5; B.9; 12.4; B.11). In den 16S rRNA Stammbäumen (maximum-likelihood und neighbour-joining) clusterte

12. Taxonomische Untersuchung von Vertretern der Genera *Massilia* und *Telluria*

T. chitinolytica CIP 104069^T mit *M. plicata* 76^T bei einer bootstrap Unterstützung von 67 - 77 % bei der Verzweigung und kürzestem phylogenetischen Abstand. Dies steht in Übereinstimmung mit der *gyrB* und *lepA* Phylogenie, wo sich in der Mehrzahl der Stammbäume eine Clusterung mit *M. plicata* DSM 17505^T bei signifikanten bootstrap Werten (75 - 100 %) zeigte (Abb. 15.3; 14.3; 15.2; B.7; B.8; 12.5; 12.3; B.9; B.11; 12.4). Die Spezies *T. mixta* CCUG 35206^T war in den 16S rRNA Stammbäumen (maximum-likelihood, maximum-parsimony und neighbour-joining) auf einem separaten Zweig positioniert und wies die gleichen phylogenetischen Nachbarn, *M. suwonensis* 5414S-25^T und *M. niabensis* 5420S-26^T auf, zu welchen sich im 16S rRNA maximum-parsimony Stammbaum ein bootstrap Wert von 65 % zeigte (Abb. 12.6). Somit zeigte sich für die Spezies *T. mixta* CCUG 35206^T, anders als für *T. chitinolytica* CIP 104069^T, in Abhängigkeit der zur Berechnung der Stammbäume eingesetzten 16S rRNA, *gyrB* oder *lepA* Gensequenzen, eine leicht unterschiedliche phylogenetische Positionierung innerhalb des Genus *Massilia*. Entscheidend für die Zuweisung zum Genus war, dass *T. mixta* CCUG 35206^T in nahezu allen Stammbäumen gemeinsam mit *Massilia* Spezies clusterte und in das entsprechend dem 16S rRNA Stammbaum *Massilia* Cluster 1 einzuordnen wäre. *T. chitinolytica* CIP 104069^T hingegen, zeigte sowohl in den *gyrB*, *lepA* und 16S rRNA Stammbäumen größte phylogenetische Nähe zu *M. plicata* 76^T und wäre somit im 16S rRNA Stammbaum zum *Massilia* Cluster 2 einzuordnen (Abb. 12.6). Jedenfalls zeigen diese Daten, dass die Spezies der Genera *Massilia* und *Telluria* phylogenetisch nicht voneinander zu trennen sind. Eine Konsequenz aus dieser Beobachtung wäre, dass alle *Massilia* Spezies in das Genus *Telluria* transferiert werden sollten, da dieses Genus früher beschrieben wurde als das Genus *Massilia*.

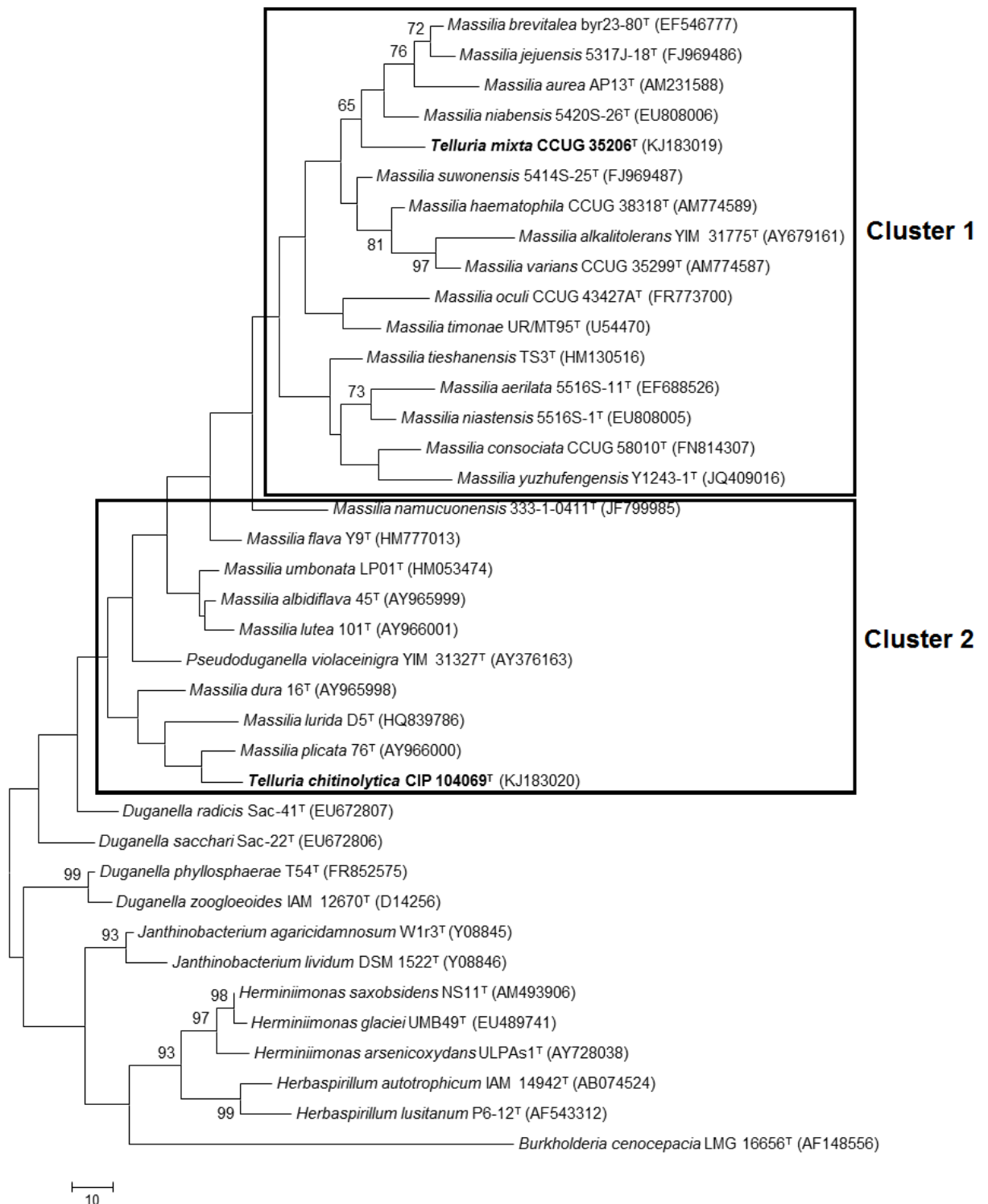


Abbildung 12.6.: Maximum-parsimony Stammbaum berechnet auf der Basis von 1330 Bp 16S rRNA Gensequenzen, unter Verwendung des Subtree-Pruning-Regrafting (SPR) Modells (Nei & Kumar, 2000). Der Stammbaum wurde im Programm MEGA 5.2.2 (Tamura *et al.*, 2011) berechnet. Nur bootstrap Werte ≥ 65 % sind angegeben. Balken, 10 akkumulierte Substitutionen pro Nukleotid.

13. Differenzierung der Genera *Massilia*/*Telluria* von den Genera *Pseudoduganella* und *Duganella*

Das Genus *Duganella*, welches basierend auf den 16S rRNA Daten eine nahe Verwandtschaft zu den Genera *Massilia*, *Telluria* und *Pseudoduganella* aufweist (Wang *et al.*, 2012; Kong *et al.*, 2013; Kämpfer *et al.*, 2008), kann von diesen anhand von chemotaxonomischen Merkmalen wie dem Vorkommen von Hydroxyfettsäuren unterschieden werden. Bei den bislang vier beschriebenen Mitgliedern des Genus *Duganella*, *D. zoogloeooides* IAM 12670^T (Hiraishi *et al.*, 1997), *D. phyllosphaerae* T54^T (Kämpfer *et al.*, 2012b), *D. radialis* Sac-41^T und *D. sacchari* Sac-22^T (Madhaiyan *et al.*, 2013) wurde im Gegensatz zu den Spezies des *Massilia*/*Telluria* Clusters und den Spezies des Genus *Pseudoduganella* ausschließlich die Hydroxyfettsäure C_{10:0} 3-OH nachgewiesen (Kämpfer *et al.*, 2012b; Madhaiyan *et al.*, 2013).

Außerdem konnte bislang zwischen den Genera *Massilia* und *Duganella* anhand der Hauptkomponenten im Profil der polaren Lipide unterschieden werden. Der Beschreibung des Genus *Duganella* (Kämpfer *et al.*, 2012b) nach enthält das Muster der polaren Lipide von Spezies des Genus *Duganella* die Hauptkomponenten PE und PG, während Diphosphatidylglycerol (DPG) fehlt. Die im Rahmen dieser Arbeit zusammen mit den Spezies des Genus *Massilia* durchgeführte Analyse des Profils der polaren Lipide der Spezies *D. phyllosphaerae* T54^T, welche 99.3 % 16S rRNA Sequenzähnlichkeit zur Typspezies des Genus *Duganella*, *D. zoogloeooides* IAM 12670^T aufweist (Kämpfer *et al.*, 2012b), zeigte für diese Spezies wie auch für alle anderen Spezies die Hauptkomponenten DPG, PE und PG. In dieser Studie wurden die Biomassen in der PYE Bouillon kultiviert, während Kämpfer *et al.* (2012b) für die Anzucht 'trypticase soy broth' (TSB) verwendete. Diese unterschiedlichen Anzuchtbedingungen könnten die unterschiedlichen Ergebnisse bezüglich des Vorkommens von DPG erklären. Darüber hinaus scheinen die Genera *Duganella* und *Massilia*

anhand der Hauptkomponenten im Muster der polaren Lipide nicht unterscheidbar zu sein (Abb. 12.2). Nichtsdestotrotz wurde von Kämpfer *et al.* (2012b) im Muster der polaren Lipide der Typspezies des Genus *Duganella*, *D. zoogloeooides* ein Glykolipid und Phosphatidylserin detektiert, während bei allen weiteren Spezies des Genus *Duganella*, *D. phyllosphaerae* T54^T, *D. radicans* Sac-41^T und *D. sacchari* Sac-22^T keine Glykolipide oder Phosphatidylserin nachgewiesen wurden (Madhaiyan *et al.*, 2013; Kämpfer *et al.*, 2012b). In Spezies des Genus *Massilia* wurden ebenfalls keine Glykolipide und Phosphatidylserin detektiert (Kämpfer *et al.*, 2011; Rodríguez-Díaz *et al.*, 2014; Shen *et al.*, 2013; Kong *et al.*, 2013; Weon *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2012; Du *et al.*, 2012; Gallego *et al.*, 2006; Kämpfer *et al.*, 2008, 2012b; Madhaiyan *et al.*, 2013). In dieser Arbeit wurde stichprobenartig beim Isolat NS9 auf das Vorkommen von Glykolipiden sowie bei *M. varians* CCUG 35299^T auf das Vorkommen von Phosphatidylserin (PS) negativ getestet. Hierzu wurde *M. varians* CCUG 35299^T, stellvertretend für alle untersuchten *Massilia* Spezies mit einem detektierten APL bzw. AL, das ein dem Phosphatidylserin (PS) ähnliches chromatographisches Verhalten zeigte, durch simultane Auftrennung der Referenz PS und des Lipidextrakts auf ein und derselben Dünnschichtplatte und anschließender Detektion wie im Abschnitt 8.3 angegeben, getestet. Hierbei unterschied sich das chromatographische Verhalten von AL bzw. APL¹ und PS, was auf unterschiedliche Lipide hindeutet.

Das Genus *Pseudoduganella* wurde kürzlich von Kämpfer *et al.* (2012b) beschrieben, wobei die Spezies *Duganella violaceinigra* YIM 31327^T zur einzigen Spezies des Genus reklassifiziert wurde. *P. violaceinigra* YIM 31327^T weist in der 16S rRNA Sequenz höchste Ähnlichkeiten zu den Vertretern der Genera *Massilia* und *Duganella* auf, 97.2 - 97.7 % zu *M. umbonata* LP01^T, *M. albidiflava* 45^T, *D. radicans* Sac-41^T, *T. chitinolytica* CIP 104069^T, *M. flava* Y9^T, *M. lutea* 101^T, *D. sacchari* Sac-22^T und *M. dura* 16^T. In korrespondierenden 16S rRNA (1330 Bp) Stammbäumen (maximum-likelihood, maximum-parsimony und neighbour-joining) clusterte *P. violaceinigra* YIM 31327^T zwar zusammen mit den *Massilia* Spezies, *M. albidiflava* 45^T, *M. dura* 16^T, *M. lutea* 101^T, *M. plicata* 76^T, *M. umbonata* LP01^T, *M. flava* Y9^T und *T. chitinolytica* CIP 104069^T, jedoch ergaben sich in den drei Berechnungsmodellen niedrige bootstrap Werte (<33 %). Die gemeinsame Clustierung von *P. violaceinigra* YIM 31327^T mit den *Massilia* Spezies sowie die relativ

¹Die Lipide AL4/ APL2 wiesen äquivalentes chromatographisches Verhalten auf. Bei den untersuchten *Massilia* Spezies wurde das Lipid AL4 jedoch lediglich in geringen Mengen oder in Spuren nachgewiesen. Wegen der geringen Menge des Lipids AL4 besteht daher die Annahme, dass die Phosphatgruppe vorhanden sein könnte, jedoch schwerer nachzuweisen ist (Tab. 12.3; Abb. 12.2; 12.1).

13. Differenzierung der Genera *Massilia*/ *Telluria*, *Pseudoduganella* & *Duganella*

hohen 16S rRNA Sequenzähnlichkeiten (>97 %) zu einzelnen Vertretern des Genus *Massilia* stellen Indizien für eine Eingliederung von *P. violaceinigra* YIM 31327^T zum *Massilia*/ *Telluria* Cluster dar.

Jedoch ist das Genus *Pseudoduganella* bislang anhand chemotaxonomischer Merkmale wie dem Muster der polaren Lipide und den Hydroxyfettsäuren von den Spezies des Genus *Massilia* unterscheidbar. Im Gegensatz zum Genus *Massilia* sind die Hauptkomponenten im Muster der polaren Lipide nicht DPG, PE und PG sondern lediglich PE und PG (Kämpfer *et al.*, 2012b; Kämpfer *et al.*, 2011). DPG wurde bei *P. violaceinigra* YIM 31327^T bisher in nur geringen Anteilen nachgewiesen (Kämpfer *et al.*, 2012b). Außerdem enthält das Muster der polaren Lipide von *P. violaceinigra* YIM 31327^T Phosphatidylserin (PS), welches bei Spezies des Genus *Massilia* bislang nicht nachgewiesen wurde (Kämpfer *et al.*, 2011; Rodríguez-Díaz *et al.*, 2014; Shen *et al.*, 2013; Kong *et al.*, 2013; Weon *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2012; Du *et al.*, 2012; Gallego *et al.*, 2006; Kämpfer *et al.*, 2008). Dies steht in Übereinstimmung mit den in dieser Arbeit erhaltenen Daten, wonach bei den untersuchten Vertretern des Genus *Massilia* ebenfalls kein PS detektiert werden konnte. Jedoch sollte beachtet werden, dass das zur Anzucht verwendete Medium Einfluss auf die Profile der polaren Lipide haben könnte und somit die Vergleichbarkeit der Daten beeinträchtigt. Wie bei den *Duganella* Spezies wurde die Biomasse zur späteren Extraktion von polaren Lipiden von *P. violaceinigra* YIM 31327^T in 'trypticase soy broth' (TSB) angezchtet (Kämpfer *et al.*, 2012b), während in der vorliegenden Arbeit PYE Bouillon zur Anzucht verwendet wurde. Daher wäre eine wiederholte Analyse des Profils der polaren Lipide von *P. violaceinigra* YIM 31327^T nach Anzucht in PYE Bouillon empfehlenswert, um eventuelle Schwankungen der Mengen bzw. Änderungen im Muster der polaren Lipide in Abhängigkeit vom Nährmedium erfassen zu können. Außerdem wurde bei den *Massilia* Spezies *M. dura* 16^T, *M. lutea* 101^T, *M. plicata* 76^T, *M. albidiflava* 45^T, *M. flava* Y9^T, *M. lurida* D5^T, *M. umbonata* LP01^T und *M. aerilata* 5516S-11^T die Hydroxyfettsäure C_{14:0}-2-OH nachgewiesen (Zhang *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2012; Luo *et al.*, 2013; Rodríguez-Díaz *et al.*, 2014; Weon *et al.*, 2008), welche bislang nur bei diesen *Massilia* Spezies, aber nicht bei Spezies der Genera *Duganella* oder *Pseudoduganella* (Kämpfer *et al.*, 2012b; Madhaiyan *et al.*, 2013) nachgewiesen wurde. Dies ist besonders von Bedeutung, da diese *Massilia* Gruppe mit Ausnahme von *M. aerilata* 5516S-11^T, in den 16S rRNA Stammbäumen die größte phylogenetische Nähe zu den Spezies der Genera *Pseudoduganella* und *Duganella* aufweist (Rodríguez-Díaz *et al.*, 2014; Du *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2012; Weon *et al.*, 2008).

14. Isolat *Oxalobacteraceae* bacterium Ma

Beim Isolat *Oxalobacteraceae* bacterium Ma handelt es sich um ein Gram-negatives Stäbchen, welches von R. Kaden aus der Tonerde eines Bergwerks in Westerwald, Deutschland, isoliert wurde.

Die 16S rRNA Gensequenz des Isolats *Oxalobacteraceae* bacterium Ma (1450 Bp) war zu Beginn der Arbeiten bereits in den Gendatenbanken hinterlegt (GQ451844). Eine erste Klassifizierung des Isolats erfolgte durch den 16S rRNA Gensequenzvergleich mittels des EzTaxon-e Servers (<http://eztaxon-e.ezbiocloud.net/>; Kim *et al.*, 2012). Hierbei zeigte die 16S rRNA Sequenz von *Oxalobacteraceae* bacterium Ma höchste Sequenzähnlichkeiten zu den Vertretern des Genus *Massilia*, wobei höchste Sequenzähnlichkeiten zum Typstamm von *M. haematophila* CCUG 38318^T (98.0 %) erreicht wurden.

In der 16S rRNA Sequenzähnlichkeitsmatrix lagen die Sequenzähnlichkeiten zwischen den *Massilia* und *Telluria* Spezies bei 95.1 - 99.4 %. Dies lässt auf eine Trennung von Spezies der Genera *Massilia* und *Telluria* durch 16S rRNA Ähnlichkeiten unterhalb von 99.4 % schließen. Das Isolat *Oxalobacteraceae* bacterium Ma zeigte zu den in die Untersuchung einbezogenen *Massilia* und *Telluria* Spezies 16S rRNA Sequenzähnlichkeiten von 95.7 % - 98.6 %. Daher liegen die 16S rRNA Sequenzähnlichkeiten des Isolats *Oxalobacteraceae* bacterium Ma zu den *Massilia* und *Telluria* Spezies innerhalb der für Spezies des *Massilia*/*Telluria* Clusters ermittelten Schwankungsbreite. Deshalb kann angenommen werden, dass das Isolat eine noch nicht beschriebene Spezies der *Massilia*/*Telluria* Gruppe repräsentieren könnte. Die höchsten 16S rRNA Sequenzähnlichkeiten wurden hierbei zu den korrespondierenden Gensequenzen von *T. mixta* CCUG 35206^T (98.6 %), *M. suwonensis* 5414S-25^T (98.2 %), NS9 (98.1 %), *M. haematophila* CCUG 38318^T (98.0 %) und *M. niabensis* 5420S-26^T (98.0 %) erreicht.

14. Isolat *Oxalobacteraceae* bacterium Ma

In den 16S rRNA Stammbäumen (maximum-likelihood, maximum-parsimony und neighbour-joining) clusterte das Isolat *Oxalobacteraceae* bacterium Ma mit der Spezies *T. mixta* CCUG 35206^T mit kürzestem phylogenetischen Abstand und signifikanter bootstrap Unterstützung (70 %) bei der Verzweigung im letztgenannten Algorithmus (Abb. 15.1; 14.1; A.3). Weitere nächst Verwandte in allen drei Stammbäumen waren die Spezies *M. niabensis* 5420S-26^T und *M. suwonensis* 5414S-25^T, allerdings ohne dass die Verzweigungen durch signifikante bootstrap Werte unterstützt waren. Jedoch deutet die Tatsache, dass bei allen drei Berechnungen mit verschiedenen Algorithmen dieselben Verzweigungsgrade gefunden wurden, auf eine Verlässlichkeit dieser Verwandtschaftsverhältnisse hin. Außerdem stehen diese Ergebnisse in guter Übereinstimmung mit den 16S rRNA Sequenzähnlichkeiten. Zusammenfassend deuten die 16S rRNA Untersuchungen somit auf eine Zugehörigkeit des Isolats *Oxalobacteraceae* bacterium Ma zur Gruppe *Massilia*/*Telluria* hin, mit den nächst verwandten Spezies *T. mixta*, *M. suwonensis* und *M. niabensis*.

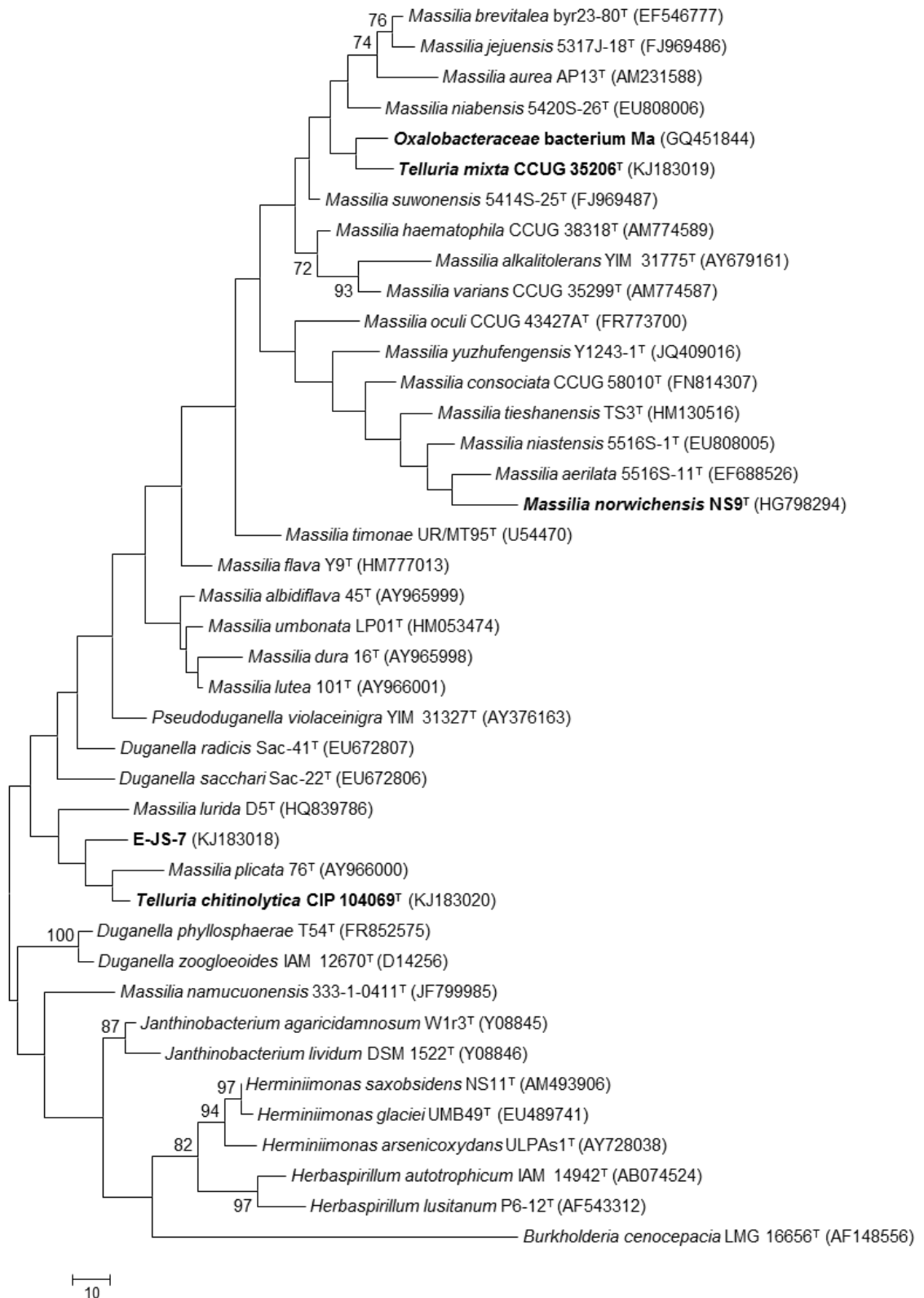


Abbildung 14.1.: Maximum-parsimony Stammbaum basierend auf bearbeiteten 16S rRNA Gensequenzen (1327 Bp). Der Stammbaum wurde mit Hilfe des Subtree-Pruning-Regrafting (SPR) Modells (Nei & Kumar, 2000) im Programm MEGA 5.2.2 (Tamura *et al.*, 2011) berechnet und zeigt die phylogenetische Positionierung der Isolate NS9, *Oxalobacteraceae* bacterium Ma und E-JS-7 innerhalb des *Massilia*/*Telluria* Clusters. Dargestellt sind nur bootstrap Werte ≥ 65 %. Balken, 10 akkumulierte Substitutionen pro Nukleotid.

14. Isolat *Oxalobacteraceae* bacterium Ma

Der Vergleich der Ähnlichkeiten in der partiellen *gyrB* Nukleotidsequenz (810 Bp) zeigte zwischen den *Massilia* und *Telluria* Spezies Ähnlichkeitswerte im Bereich von 89.1 - 97.6 %. Diese Beobachtung deutet somit darauf hin, dass man von einer separaten Speziesgrenze sprechen kann, wenn die Sequenzähnlichkeiten bei <97.6 % liegen. Für das Isolat *Oxalobacteraceae* bacterium Ma lagen die *gyrB* Sequenzähnlichkeiten bei 89.2 % (*M. plicata* DSM 17505^T) - 94.8 % (*M. varians* CCUG 35299^T), (Tab. 12.4).

In der korrespondierenden GyrB Aminosäuresequenz lagen die Ähnlichkeitswerte zwischen den *Massilia*/ *Telluria* Spezies bei 94.4 - 99.6 %. Daraus ergibt sich, dass verschiedene Spezies in der GyrB Sequenz nicht mehr als 99.6 % aufweisen. Das Isolat *Oxalobacteraceae* bacterium Ma zeigte in der korrespondierenden GyrB Aminosäuresequenz Ähnlichkeiten von 95.1 % (*M. plicata* DSM 17505^T und *T. chitinolytica* CIP 104069^T) - 99.2 % (*M. aerilata* DSM 19289^T und *M. haematophila* CCUG 38318^T), (Tab. 15.1).

In der *lepA* Nukleotidsequenz (1299 Bp) wurden zwischen den untersuchten *Massilia* und *Telluria* Spezies Sequenzähnlichkeitswerte zwischen 83.2 - 98.8 % gefunden. Dies deutet an, dass die Grenze für die Unterscheidung zwischen Spezies innerhalb dieser Gruppe bei <99.0 % liegt. Für das Isolat *Oxalobacteraceae* bacterium Ma lagen die *lepA* Sequenzähnlichkeiten zu den *Massilia* und *Telluria* Spezies im Bereich von 86.6 % (*M. lutea* CIP 109190^T und *T. chitinolytica* CIP 104069^T) - 93.4 % (*M. aerilata* DSM 19289^T und *M. alkalitolerans* DSM 17462^T), wobei zum Isolat NS9 mit 93.6 % die höchste *lepA* Sequenzähnlichkeit aufgezeigt wurde (Tab. 12.5).

In den korrespondierenden LepA Aminosäuresequenzen lagen die Sequenzähnlichkeiten zwischen den Spezies der *Massilia* und *Telluria* Gruppe bei 84.0 - 100 %. Die korrespondierende Aminosäuresequenz (433 AS) scheint deshalb hoch konserviert zu sein und ist somit in dieser Bakteriengruppe kaum zur Unterscheidung von Spezies geeignet. Besonders bei *Massilia* Spezies, welche bereits im 16S rRNA Gen höchste Sequenzähnlichkeiten zueinander aufweisen, wie z.B. *M. lutea* 101^T und *M. albidiflava* 45^T (99.4 %), oder *M. varians* CCUG 35299^T und *M. alkalitolerans* YIM 31775^T (98.1 %), zeigten auch in der partiellen LepA Aminosäuresequenz sehr hohe Ähnlichkeitswerte (99.5 bzw. 100 %) zueinander. In der LepA Aminosäuresequenz lagen die Sequenzähnlichkeitswerte zwischen dem Isolat *Oxalobacteraceae* bacterium Ma und den *Massilia*/ *Telluria* Spezies bei 87.5 % (*M. plicata* DSM 17505^T) - 97.2 % (*M. alkalitolerans* DSM 17462^T, *M. varians* CCUG 35299^T, *M. brevitalea* DSM 18925^T), wobei aber auch hier die höchste Ähnlichkeit zu NS9 erreicht wurde (97.9 %), (Tab. 14.1).

In den konkatenierten *gyrB*/*lepA* Nukleotidsequenzen lagen die Ähnlichkeitswerte zwischen den einzelnen *Massilia*/*Telluria* Spezies im Bereich von 86.2 - 98.3 %. Daraus ergibt sich, dass die Spezies durch Sequenzähnlichkeiten <98.3 % voneinander getrennt sind (Tab. 12.6). In den korrespondierenden GyrB/ LepA Aminosäuresequenzen lagen die Werte bei 88.3 - 99.8 %. Daraus lässt sich schließen, dass verschiedene Spezies nahezu identische GyrB/ LepA Aminosäuresequenzen aufweisen können und nur relativ niedrige Werte eine neue Spezies andeuten können (Tab. 14.2). Für das Isolat *Oxalobacteraceae* bacterium Ma ergaben sich zu den *Massilia* und *Telluria* Spezies *gyrB*/*lepA* Sequenzähnlichkeitswerte von 87.7 % (*M. plicata* DSM 17505^T) - 93.8 % (*M. varians* CCUG 35299^T und *M. aerilata* DSM 19289^T) bzw. in der korrespondierenden GyrB/ LepA Aminosäuresequenz von 90.4 % (*M. plicata* DSM 17505^T und *T. chitinolytica* CIP 104069^T) - 97.8 % (*M. aerilata* DSM 19289^T) und 98.2 % (NS9).

Bei den ermittelten *gyrB* und *lepA* Nukleotid- und Aminosäuresequenz-basierten Grenzen zur Trennung von Spezies handelt es sich um hypothetische Werte. Diese können sich mit Zunahme des Datensatzes und erfolgter manueller Bearbeitung auch noch nach oben verschieben. Der Datensatz umfasste 17 *Massilia* und 2 *Telluria* Spezies und somit die Mehrzahl der Spezies dieser Gruppe. Deshalb kann davon ausgegangen werden, dass die Speziesgrenzen zuverlässig sind. Zusammenfassend ergaben sich für das Isolat *Oxalobacteraceae* bacterium Ma zu den untersuchten *Massilia* und *Telluria* Spezies *gyrB* und *lepA* Nukleotid- und Aminosäuresequenzähnlichkeiten, welche innerhalb der für *Massilia* und *Telluria* Spezies ermittelten Schwankungsbreite lagen. Daher ist das Isolat *Oxalobacteraceae* bacterium Ma aller Wahrscheinlichkeit nach als neue Spezies der *Massilia* und *Telluria* Gruppe anzusehen. Die nächsten Verwandten stellen die Spezies *M. haematophila* CCUG 38318^T, *M. varians* CCUG 35299^T und *M. aerilata* DSM 19289^T, sowie das Isolat NS9 dar, da sich zu diesen insgesamt die höchsten Sequenzähnlichkeiten in den *gyrB* und *lepA* Nukleotid- und Proteinsequenzen zeigten.

14. Isolat *Oxalobacteraceae* bacterium Ma

Tabelle 14.1.: Sequenzähnlichkeitsmatrix basierend auf den partiellen LepA Aminosäuresequenzen (433 AS). Die Matrix wurde anhand von BioEdit (Hall, 1999) erstellt und umfasst die Teile (a) und (b). Abkürzungen: chit, *T. chitinolytica* CIP 104069^T (CDL67810); mixt, *T. mixta* CCUG 35206^T (CDL67811); aeri, *M. aerilata* DSM 19289^T (CDL67796); albi, *M. albidiflava* CIP 109189^T (CDL67797); alka, *M. alkalitolerans* DSM 17462^T (keine Zugangsnummer); aure, *M. aurea* AP13^T (CDL67798); brev, *M. brevitalea* DSM 18925^T (AHG55154); cons, *M. consociata* CCUG 58010^T (CDL67799); dura, *M. dura* CCUG 52213^T (CDL67800); haem, *M. haematophila* CCUG 38318^T (CDL67801); jeju, *M. jejuensis* KACC 12634^T (AHG55155); lute, *M. lutea* CIP 109190^T (CDL67802); niab, *M. niabensis* KACC 12632^T (CDL67803); nias, *M. niastensis* KACC 12599^T (CDL67804); plic, *M. plicata* DSM 17505^T (CDL67806); ties, *M. tieshanensis* KACC 14940^T (AHG55156); timo, *M. timonae* CCUG 45783^T (CDL67808); vari, *M. varians* CCUG 35299^T (CDL67809); yuzh, *M. yuzhufengensis* CGMCC 1.12041^T (AHG55153); oxal, *Oxalobacteraceae* bacterium Ma (CDL67807); EJS7, E-JS-7 (keine Zugangsnummer); NS9, *M. norwichensis* sp. nov. NS9^T (CDL67805); viol, *Pseudoduganella violaceinigra* DSM 15887^T (keine Zugangsnummer); zoog, *Duganella zoogloeoidea* ATCC 25935^T (keine Zugangsnummer); phyl, *Duganella phyllosphaerae* T54^T (CDL67812); ceno, *Burkholderia cenocepacia* J2315^T (keine Zugangsnummer).

(a)

	chit	mixt	aeri	albi	alka	aure	brev	cons	dura	haem	jeju	lute	niab
chit	ID	0.842	0.879	0.958	0.875	0.872	0.870	0.872	0.953	0.879	0.872	0.958	0.872
mixt	0.842	ID	0.898	0.847	0.912	0.893	0.900	0.921	0.854	0.898	0.898	0.847	0.886
aeri	0.879	0.898	ID	0.886	0.972	0.951	0.969	0.949	0.891	0.951	0.946	0.886	0.951
albi	0.958	0.847	0.886	ID	0.879	0.870	0.877	0.872	0.974	0.879	0.879	0.995	0.882
alka	0.875	0.912	0.972	0.879	ID	0.963	0.965	0.960	0.882	0.951	0.953	0.879	0.956
aure	0.872	0.893	0.951	0.870	0.963	ID	0.958	0.946	0.868	0.944	0.949	0.866	0.949
brev	0.870	0.900	0.969	0.877	0.965	0.958	ID	0.946	0.875	0.969	0.972	0.877	0.972
cons	0.872	0.921	0.949	0.872	0.960	0.946	0.946	ID	0.872	0.967	0.935	0.872	0.930
dura	0.953	0.854	0.891	0.974	0.882	0.868	0.875	0.872	ID	0.877	0.882	0.979	0.884
haem	0.879	0.898	0.951	0.879	0.951	0.944	0.969	0.967	0.877	ID	0.956	0.879	0.951
jeju	0.872	0.898	0.946	0.879	0.953	0.949	0.972	0.935	0.882	0.956	ID	0.879	0.976
lute	0.958	0.847	0.886	0.995	0.879	0.866	0.877	0.872	0.979	0.879	0.879	ID	0.882
niab	0.872	0.886	0.951	0.882	0.956	0.949	0.972	0.930	0.884	0.951	0.976	0.882	ID
nias	0.877	0.905	0.958	0.882	0.972	0.946	0.963	0.949	0.882	0.960	0.963	0.882	0.953
plic	0.979	0.840	0.882	0.956	0.877	0.872	0.872	0.875	0.949	0.882	0.870	0.956	0.872
ties	0.875	0.909	0.935	0.870	0.937	0.926	0.933	0.969	0.870	0.953	0.933	0.870	0.919
timo	0.882	0.900	0.965	0.882	0.965	0.956	0.963	0.939	0.884	0.939	0.949	0.877	0.956
vari	0.875	0.912	0.972	0.879	1.000	0.963	0.965	0.960	0.882	0.951	0.953	0.879	0.956
yuzh	0.872	0.896	0.958	0.870	0.969	0.960	0.949	0.944	0.870	0.944	0.937	0.870	0.939
oxal	0.875	0.909	0.969	0.882	0.972	0.956	0.972	0.951	0.882	0.951	0.949	0.882	0.956
EJS7	0.963	0.842	0.868	0.937	0.866	0.863	0.863	0.861	0.937	0.868	0.866	0.937	0.861
NS9	0.879	0.903	0.983	0.886	0.972	0.951	0.967	0.949	0.886	0.946	0.939	0.882	0.946
viol	0.946	0.852	0.898	0.951	0.884	0.872	0.879	0.872	0.951	0.882	0.886	0.946	0.884
zoog	0.914	0.877	0.879	0.919	0.884	0.870	0.879	0.884	0.923	0.886	0.879	0.919	0.886
phyl	0.914	0.877	0.879	0.919	0.884	0.872	0.879	0.884	0.923	0.886	0.879	0.919	0.886
ceno	0.810	0.836	0.836	0.815	0.836	0.836	0.831	0.838	0.819	0.833	0.836	0.812	0.831

(b)

	nias	plic	ties	timo	vari	yuzh	oxal	EJS7	NS9	viol	zoog	phyl	ceno
chit	0.877	0.979	0.875	0.882	0.875	0.872	0.875	0.963	0.879	0.946	0.914	0.914	0.810
mixt	0.905	0.840	0.909	0.900	0.912	0.896	0.909	0.842	0.903	0.852	0.877	0.877	0.836
aeri	0.958	0.882	0.935	0.965	0.972	0.958	0.969	0.868	0.983	0.898	0.879	0.879	0.836
albi	0.882	0.956	0.870	0.882	0.879	0.870	0.882	0.937	0.886	0.951	0.919	0.919	0.815
alka	0.972	0.877	0.937	0.965	1.000	0.969	0.972	0.866	0.972	0.884	0.884	0.884	0.836
aure	0.946	0.872	0.926	0.956	0.963	0.960	0.956	0.863	0.951	0.872	0.870	0.872	0.836
brev	0.963	0.872	0.933	0.963	0.965	0.949	0.972	0.863	0.967	0.879	0.879	0.879	0.831
cons	0.949	0.875	0.969	0.939	0.960	0.944	0.951	0.861	0.949	0.872	0.884	0.884	0.838
dura	0.882	0.949	0.870	0.884	0.882	0.870	0.882	0.937	0.886	0.951	0.923	0.923	0.819
haem	0.960	0.882	0.953	0.939	0.951	0.944	0.951	0.868	0.946	0.882	0.886	0.886	0.833
jeju	0.963	0.870	0.933	0.949	0.953	0.937	0.949	0.866	0.939	0.886	0.879	0.879	0.836
lute	0.882	0.956	0.870	0.877	0.879	0.870	0.882	0.937	0.882	0.946	0.919	0.919	0.812
niab	0.953	0.872	0.919	0.956	0.956	0.939	0.956	0.861	0.946	0.884	0.886	0.886	0.831
nias	ID	0.877	0.942	0.951	0.972	0.949	0.960	0.872	0.958	0.893	0.884	0.884	0.845
plic	0.877	ID	0.872	0.879	0.877	0.872	0.875	0.953	0.882	0.946	0.905	0.905	0.808
ties	0.942	0.872	ID	0.930	0.937	0.923	0.937	0.870	0.930	0.875	0.877	0.877	0.849
timo	0.951	0.879	0.930	ID	0.965	0.949	0.967	0.870	0.965	0.886	0.882	0.882	0.836
vari	0.972	0.877	0.937	0.965	ID	0.969	0.972	0.866	0.972	0.884	0.884	0.884	0.836
yuzh	0.949	0.872	0.923	0.949	0.969	ID	0.953	0.866	0.953	0.875	0.868	0.870	0.836
oxal	0.960	0.875	0.937	0.967	0.972	0.953	ID	0.866	0.979	0.884	0.884	0.884	0.831
EJS7	0.872	0.953	0.870	0.870	0.866	0.866	0.866	ID	0.868	0.933	0.903	0.903	0.812
NS9	0.958	0.882	0.930	0.965	0.972	0.953	0.979	0.868	ID	0.896	0.879	0.879	0.829
viol	0.893	0.946	0.875	0.886	0.884	0.875	0.884	0.933	0.896	ID	0.921	0.921	0.817
zoog	0.884	0.905	0.877	0.882	0.884	0.868	0.884	0.903	0.879	0.921	ID	0.997	0.819
phyl	0.884	0.905	0.877	0.882	0.884	0.870	0.884	0.903	0.879	0.921	0.997	ID	0.819
ceno	0.845	0.808	0.849	0.836	0.836	0.836	0.831	0.812	0.829	0.817	0.819	0.819	ID

Tabelle 14.2.: Sequenzähnlichkeitsmatrix basierend auf partiellen und konkatenierten GyrB/ LepA Aminosäuresequenzen (703 AS) anhand von BioEdit (Hall, 1999). Die Matrix ist auf die Teile (a) und (b) aufgeteilt. Abkürzungen: chit, *T. chitinolytica* CIP 104069^T (CDL67793/CDL67810); mixt, *T. mixta* CCUG 35206^T (CDL67794/CDL67811); aeri, *M. aerilata* DSM 19289^T (CDL67779/CDL67796); albi, *M. albidiflava* CIP 109189^T (CDL67780/CDL67797); alka, *M. alkalitolerans* DSM 17462^T (keine Zugangsnummern); aure, *M. aurea* AP13^T (CDL67781/CDL67798); brev, *M. brevitalea* DSM 18925^T (AHG55150/AHG55154); cons, *M. consociata* CCUG 58010^T (CDL67782/CDL67799); dura, *M. dura* CCUG 52213^T (CDL67783/CDL67800); haem, *M. haematophila* CCUG 38318^T (CDL67784/CDL67801); jeju, *M. jejuensis* KACC 12634^T (AHG55151/AHG55155); lute, *M. lutea* CIP 109190^T (CDL67785/CDL67802); niab, *M. niabensis* KACC 12632^T (CDL67786/CDL67803); nias, *M. niastensis* KACC 12599^T (CDL67787/CDL67804); plic, *M. plicata* DSM 17505^T (CDL67788/CDL67806); ties, *M. tieshanensis* KACC 14940^T (AHG55152/AHG55156); timo, *M. timonae* CCUG 45783^T (CDL67791/CDL67808); vari, *M. varians* CCUG 35299^T (CDL67792/CDL67809); yuzh, *M. yuzhufengensis* CGMCC 1.12041^T (AHG55149/AHG55153); oxal, *Oxalobacteraceae* bacterium Ma (CDL67790/CDL67807); EJS7, E-JS-7 (keine Zugangsnummern); NS9, *M. norwichenensis* sp. nov. NS9^T (CDL67789/CDL67805); viol, *Pseudoduganella violaceinigra* YIM 31327^T/DSM 15887^T (ACF74547/keine Zugangsnummer); zoog, *Duganella zoogloeoides* IAM 12670^T/ATCC 25935^T (ACF74548/keine Zugangsnummer); phyl, *Duganella phyllosphaerae* T54^T (CDL67795/CDL67812); ceno, *Burkholderia cenocepacia* J2315^T (CAR50732/keine Zugangsnummer).

(a)

	chit	mixt	aeri	albi	alka	aure	brev	cons	dura	haem	jeju	lute	niab
chit	ID	0.884	0.908	0.958	0.907	0.903	0.903	0.906	0.955	0.904	0.904	0.961	0.900
mixt	0.884	ID	0.928	0.891	0.937	0.917	0.928	0.945	0.899	0.927	0.926	0.894	0.918
aeri	0.908	0.928	ID	0.917	0.974	0.955	0.977	0.960	0.921	0.964	0.961	0.920	0.960
albi	0.958	0.891	0.917	ID	0.917	0.910	0.913	0.910	0.978	0.911	0.916	0.992	0.913
alka	0.907	0.937	0.974	0.917	ID	0.963	0.968	0.972	0.917	0.960	0.960	0.917	0.963
aure	0.903	0.917	0.955	0.910	0.963	ID	0.960	0.950	0.907	0.950	0.960	0.908	0.953
brev	0.903	0.928	0.977	0.913	0.968	0.960	ID	0.957	0.913	0.972	0.975	0.916	0.968
cons	0.906	0.945	0.960	0.910	0.972	0.950	0.957	ID	0.911	0.967	0.948	0.913	0.950
dura	0.955	0.899	0.921	0.978	0.917	0.907	0.913	0.911	ID	0.908	0.918	0.981	0.914
haem	0.904	0.927	0.964	0.911	0.960	0.950	0.972	0.967	0.908	ID	0.961	0.911	0.955
jeju	0.904	0.926	0.961	0.916	0.960	0.960	0.975	0.948	0.918	0.961	ID	0.918	0.978
lute	0.961	0.894	0.920	0.992	0.917	0.908	0.916	0.913	0.981	0.911	0.918	ID	0.916
niab	0.900	0.918	0.960	0.913	0.963	0.953	0.968	0.950	0.914	0.955	0.978	0.916	ID
nias	0.907	0.931	0.964	0.911	0.975	0.947	0.963	0.964	0.913	0.960	0.964	0.914	0.963
plic	0.984	0.883	0.910	0.957	0.911	0.903	0.904	0.910	0.954	0.906	0.903	0.960	0.903
ties	0.906	0.933	0.948	0.906	0.955	0.935	0.943	0.975	0.904	0.960	0.944	0.906	0.940
timo	0.910	0.928	0.971	0.914	0.970	0.958	0.968	0.954	0.920	0.951	0.957	0.914	0.958
vari	0.906	0.938	0.975	0.916	0.998	0.964	0.970	0.971	0.918	0.961	0.961	0.916	0.961
yuzh	0.904	0.926	0.965	0.908	0.971	0.965	0.964	0.955	0.910	0.953	0.955	0.913	0.950
oxal	0.904	0.934	0.978	0.916	0.975	0.960	0.977	0.960	0.914	0.967	0.960	0.916	0.960
EJS7	0.964	0.890	0.906	0.945	0.904	0.900	0.904	0.901	0.948	0.901	0.901	0.948	0.894
NS9	0.903	0.931	0.982	0.914	0.971	0.953	0.970	0.957	0.913	0.965	0.950	0.911	0.954
viol	0.960	0.891	0.920	0.955	0.914	0.901	0.913	0.907	0.955	0.906	0.913	0.955	0.907
zoog	0.930	0.906	0.908	0.937	0.913	0.903	0.910	0.910	0.937	0.911	0.911	0.935	0.908
phyl	0.930	0.903	0.906	0.937	0.913	0.901	0.910	0.910	0.934	0.908	0.908	0.935	0.908
ceno	0.799	0.817	0.819	0.799	0.816	0.812	0.812	0.816	0.802	0.817	0.816	0.796	0.813

(b)

	nias	plic	ties	timo	vari	yuzh	oxal	EJS7	NS9	viol	zoog	phyl	ceno
chit	0.907	0.984	0.906	0.910	0.906	0.904	0.904	0.964	0.903	0.960	0.930	0.930	0.799
mixt	0.931	0.883	0.933	0.928	0.938	0.926	0.934	0.890	0.931	0.891	0.906	0.903	0.817
aeri	0.964	0.910	0.948	0.971	0.975	0.965	0.978	0.906	0.982	0.920	0.908	0.906	0.819
albi	0.911	0.957	0.906	0.914	0.916	0.908	0.916	0.945	0.914	0.955	0.937	0.937	0.799
alka	0.975	0.911	0.955	0.970	0.998	0.971	0.975	0.904	0.971	0.914	0.913	0.913	0.816
aure	0.947	0.903	0.935	0.958	0.964	0.965	0.960	0.900	0.953	0.901	0.903	0.901	0.812
brev	0.963	0.904	0.943	0.968	0.970	0.964	0.977	0.904	0.970	0.913	0.910	0.910	0.812
cons	0.964	0.910	0.975	0.954	0.971	0.955	0.960	0.901	0.957	0.907	0.910	0.910	0.816
dura	0.913	0.954	0.904	0.920	0.918	0.910	0.914	0.948	0.913	0.955	0.937	0.934	0.802
haem	0.960	0.906	0.960	0.951	0.961	0.953	0.967	0.901	0.965	0.906	0.911	0.908	0.817
jeju	0.964	0.903	0.944	0.957	0.961	0.955	0.960	0.901	0.950	0.913	0.911	0.908	0.816
lute	0.914	0.960	0.906	0.914	0.916	0.913	0.916	0.948	0.911	0.955	0.935	0.935	0.796
niab	0.963	0.903	0.940	0.958	0.961	0.950	0.960	0.894	0.954	0.907	0.908	0.908	0.813
nias	ID	0.910	0.958	0.957	0.974	0.954	0.963	0.904	0.960	0.917	0.906	0.906	0.820
plic	0.910	ID	0.907	0.910	0.910	0.904	0.904	0.958	0.904	0.960	0.924	0.924	0.796
ties	0.958	0.907	ID	0.943	0.954	0.937	0.950	0.901	0.947	0.906	0.903	0.903	0.826
timo	0.957	0.910	0.943	ID	0.971	0.958	0.971	0.908	0.965	0.914	0.907	0.904	0.816
vari	0.974	0.910	0.954	0.971	ID	0.972	0.977	0.906	0.972	0.913	0.914	0.911	0.817
yuzh	0.954	0.904	0.937	0.958	0.972	ID	0.961	0.906	0.957	0.910	0.903	0.904	0.815
oxal	0.963	0.904	0.950	0.971	0.977	0.961	ID	0.903	0.982	0.910	0.913	0.910	0.816
EJS7	0.904	0.958	0.901	0.908	0.906	0.906	0.903	ID	0.900	0.950	0.924	0.924	0.800
NS9	0.960	0.904	0.947	0.965	0.972	0.957	0.982	0.900	ID	0.913	0.906	0.903	0.815
viol	0.917	0.960	0.906	0.914	0.913	0.910	0.910	0.950	0.913	ID	0.935	0.938	0.800
zoog	0.906	0.924	0.903	0.907	0.914	0.903	0.913	0.924	0.906	0.935	ID	0.994	0.805
phyl	0.906	0.924	0.903	0.904	0.911	0.904	0.910	0.924	0.903	0.938	0.994	ID	0.802
ceno	0.820	0.796	0.826	0.816	0.817	0.815	0.816	0.800	0.815	0.800	0.805	0.802	ID

14. Isolat *Oxalobacteraceae* bacterium Ma

Die phylogenetische Positionierung des Isolats *Oxalobacteraceae* bacterium Ma innerhalb der Gruppe *Massilia* und *Telluria* wurde anhand von Stammbäumen basierend auf den partiellen Nukleotid- und Aminosäuresequenzen der Haushaltsgene *gyrB* und *lepA* untersucht.

In den *gyrB* Stammbäumen (neighbour-joining, maximum-parsimony und maximum-likelihood) clusterte das Isolat *Oxalobacteraceae* bacterium Ma in der Nähe von *T. mixta* CCUG 35206^T. Für diese Positionierung ergaben sich in den *gyrB* Stammbäumen (maximum-parsimony und maximum-likelihood) kürzeste bzw. zweitkürzeste phylogenetische Abstände. Die Positionierung von *T. mixta* in der Nähe des Isolats *Oxalobacteraceae* bacterium Ma war jedoch in keinem der *gyrB* Stammbäume anhand der drei Berechnungsmodelle durch signifikante bootstrap Werte bei den Verzweigungen untermauert (Abb. 14.2; B.1; B.2). In den GyrB Stammbäumen (neighbour-joining, maximum-parsimony und maximum-likelihood) wies das Isolat *Oxalobacteraceae* bacterium Ma den kürzesten phylogenetischen Abstand zum Typstamm von *M. haematophila* CCUG 38318^T auf. Hierbei wurde im GyrB maximum-likelihood Stammbaum für die Abzweigungen von *M. haematophila* CCUG 38318^T und NS9 zum Isolat *Oxalobacteraceae* bacterium Ma ein signifikanter bootstrap Wert von 77 % gefunden (Abb. 14.3; B.3; B.4).

Des Weiteren zeigte sich in den *gyrB* und *lepA* Stammbäumen für das Isolat *Oxalobacteraceae* bacterium Ma eine nähere phylogenetische Verwandtschaft zur Spezies *M. aerilata* DSM 19289^T und zum Isolat NS9. In den *gyrB* Stammbäumen (maximum-parsimony und neighbour-joining) clusterte das Isolat *Oxalobacteraceae* bacterium Ma mit *M. aerilata* DSM 19289^T, allerdings ohne signifikante bootstrap Unterstützung bei der Verzweigung (Abb. B.1; B.2). In den *lepA* Stammbäumen berechnet mit allen drei Algorithmen wies *M. aerilata* DSM 19289^T den kürzesten phylogenetischen Abstand zum Isolat *Oxalobacteraceae* bacterium Ma auf, aber ohne signifikante bootstrap Unterstützung bei der Verzweigung (Abb. 15.3; B.5; B.6). Der zweit kürzeste phylogenetische Abstand wurde in den *lepA* Stammbäumen (maximum-parsimony und neighbour-joining) zum Isolat NS9 gefunden (Abb. B.5; B.6). In den korrespondierenden LepA Stammbäumen (maximum-likelihood und maximum-parsimony) zeigte das Isolat NS9 die kürzesten phylogenetischen Abstände zum Isolat *Oxalobacteraceae* bacterium Ma, jedoch ebenfalls ohne signifikante bootstrap Unterstützung bei der Verzweigung (Abb. B.7; B.8). Im LepA neighbour-joining Stammbaum wiesen die Spezies *M. aerilata* DSM 19289^T und das Isolat NS9 die kürzesten phylogenetischen Abstände zum Isolat *Oxalobacteraceae* bacterium Ma auf, jedoch waren die Verzweigungspunkte erneut nicht durch signifikante bootstrap

Unterstützung untermauert (Abb. 15.2).

In den konkatenierten *gyrB*/*lepA* Nukleotid- und Aminosäuresequenz-basierten Stammbäumen berechnet anhand der drei Algorithmen zweigte das Isolat *Oxalobacteraceae* bacterium Ma von den zusammen clusternden Stämmen *M. aerilata* DSM 19289^T und NS9 leicht tiefer ab (Abb. 12.5; 12.3; B.9; B.10; B.11; 12.4). Für diese Verzweigung ergaben sich in den konkatenierten GyrB/ LepA Stammbäumen (maximum-parsimony und neighbour-joining) signifikante bootstrap Werte (77 % bzw. 74 %), (Abb. B.11; 12.4).

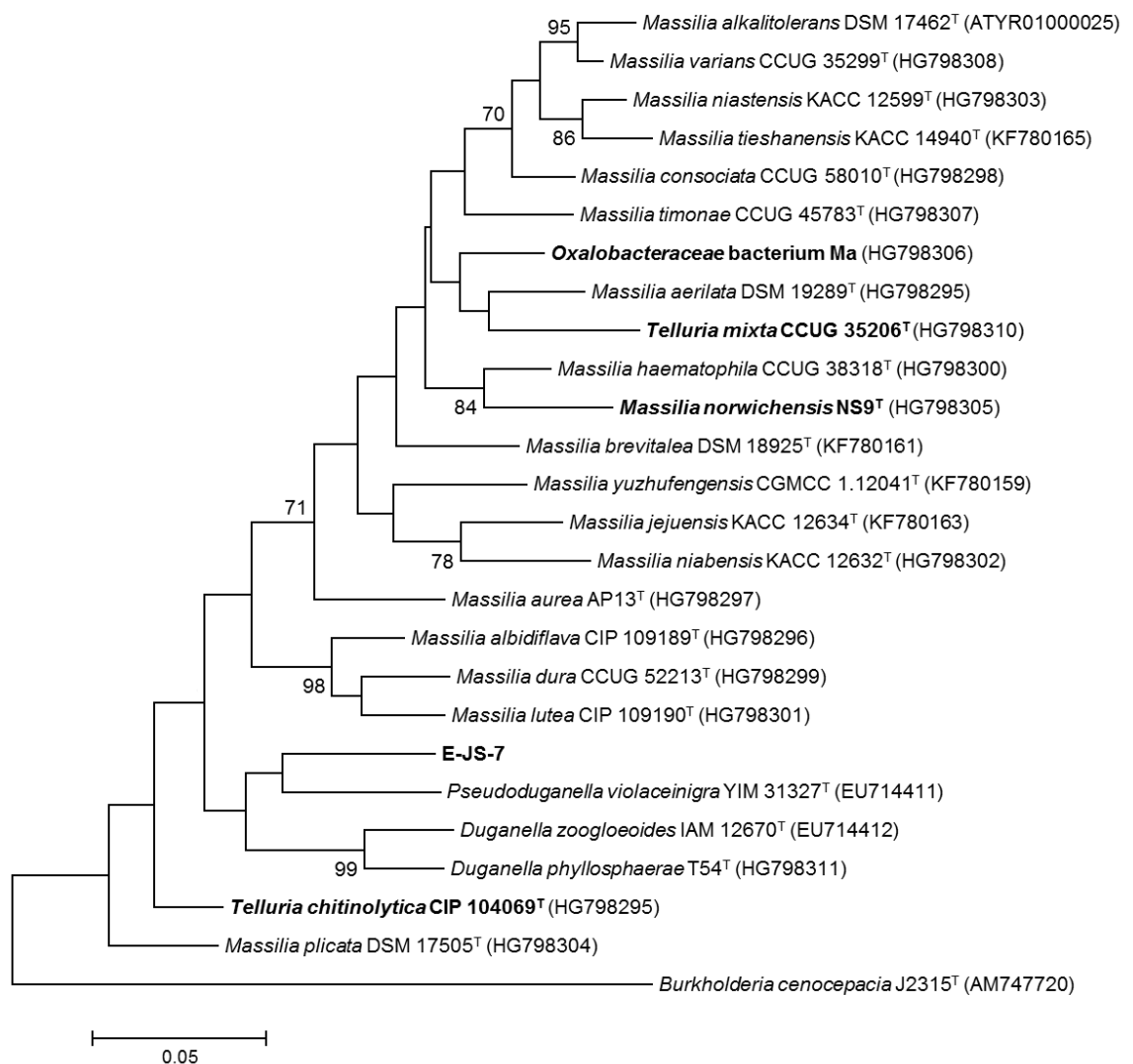


Abbildung 14.2.: Maximum-likelihood Stammbaum basierend auf partiellen *gyrB* Nukleotidsequenzen (810 Bp) anhand des Tamura-Nei Modells (Tamura & Nei, 1993), berechnet im Programm MEGA 5.2.2 (Tamura *et al.*, 2011). Nur bootstrap Werte ≥ 65 % sind angegeben. Balken, 0.05 akkumulierte Substitutionen pro Nukleotid.

14. Isolat *Oxalobacteraceae* bacterium Ma



Abbildung 14.3.: Neighbour-joining Stammbaum basierend auf partiellen GyrB Aminosäuresequenzen (270 AS) unter Verwendung des Poisson correction Modells (Zuckerandl & Pauling, 1965), berechnet im Programm MEGA 5.2.2 (Tamura *et al.*, 2011). Nur bootstrap Werte ≥ 65 % sind angegeben. Balken, 0.02 akkumulierte Substitutionen pro Aminosäure.

Zusammenfassend stellen basierend auf den *gyrB* und *lepA* Haushaltsgenen die Stämme *M. aerilata* DSM 19289^T, NS9, *M. haematophila* CCUG 38318^T und *M. varians* CCUG 35299^T die nächsten Verwandten des Isolats *Oxalobacteraceae* bacterium Ma dar. Zu diesen Stämmen wurden in den Stammbäumen anhand der partiellen Nukleotid- und Aminosäuresequenzen der *gyrB* und *lepA* Gene die kürzesten phylogenetischen Abstände, sowie in den korrespondierenden Matrizes die höchsten prozentualen Sequenzähnlichkeiten zum Isolat *Oxalobacteraceae* bacterium Ma gefunden. Die nahe Verwandtschaft des Isolats *Oxalobacteraceae* bacterium Ma zu *M. aerilata* DSM 19289^T und NS9 wurde zusätzlich in konkatenierten *gyrB*/*lepA* Nukleotid- und Aminosäuresequenz-basierten Stammbäumen angedeutet. Basierend auf den 16S rRNA Sequenzähnlichkeiten und Stammbäumen ergab sich für das Isolat *Oxalobacteraceae* bacterium Ma jedoch eine nähere Verwandtschaft zu *T. mixta* CCUG 35206^T. *T. mixta* zeigte in den *gyrB* Stammbäumen teilweise und in den *lepA* Stammbäumen zur Gänze eine größere phylogenetische Distanz zum Isolat *Oxalobacteraceae* bacterium Ma als vergleichsweise die Spezies *M. aerilata* DSM 19289^T, *M. haematophila* CCUG 38318^T oder das Isolat NS9. Dieser Unterschied könnte seine Ursache im unterschiedlichen Konservierungsgrad der untersuchten Gensequenzen haben. Die *Massilia* und *Telluria* Referenzstämme wiesen zum Isolat *Oxalobacteraceae* bacterium Ma *gyrB*, *lepA* und 16S rRNA Sequenzähnlichkeiten unterhalb den zwischen separaten Spezies der *Massilia*/*Telluria* Gruppe gefunden Sequenzähnlichkeiten auf. Daher kann aufgrund der gewonnenen Daten angenommen werden, dass es sich beim Isolat *Oxalobacteraceae* bacterium Ma um den Vertreter einer neuen Spezies des *Massilia*/*Telluria* Clusters handelt.

Zur chemotaxonomischen Charakterisierung wurde das Chinonsystem, das Muster der Polyamine und der polaren Lipide des Isolats *Oxalobacteraceae* bacterium Ma ermittelt und mit jenem der *Massilia* und *Telluria* Spezies verglichen.

Das Chinonsystem des Isolats *Oxalobacteraceae* bacterium Ma enthielt als Hauptkomponente Ubichinon Q-8 (Tab. 12.1). Dies ist typisch für Bakterien, welche zur Klasse der *Betaproteobacteria* gehören (Busse *et al.*, 1996) und zu welcher auch das untersuchte Isolat zählt. Außerdem wurden die Ubichinone Q-7 und Q-9 in geringen Anteilen bzw. Spuren nachgewiesen. Dies steht im Einklang mit den gefundenen Chinonmengen von in die Analyse miteinbezogenen *Massilia* Typstämmen, bei welchen ebenfalls geringe Anteile an Ubichinon Q-7 und zumindest zum Teil Spuren an Ubichinon Q-9 nachgewiesen wurden.

14. Isolat *Oxalobacteraceae* bacterium Ma

Das Muster der Polyamine des Isolats *Oxalobacteraceae* bacterium Ma zeigte ebenfalls dessen Zugehörigkeit zur Klasse der *Betaproteobacteria*, da 2-Hydroxyputrescin und Putrescin die Hauptkomponenten im Muster der Polyamine darstellten. Außerdem wurden wie bei den Vertretern des Genus *Massilia* die Polyamine Spermidin und Spermin in geringen Anteilen sowie Cadaverin und 1,3-Diaminopropan in Spuren nachgewiesen (Tab. 12.1).

Bei der Analyse des Profils der polaren Lipide von Isolat *Oxalobacteraceae* bacterium Ma sollte darauf geachtet werden, ob dieses die für Vertreter des Genus *Massilia* gemeinsamen Merkmale aufweist. Diese würden zusammen mit den bisher gewonnenen Daten als weitere Indizien für eine Zugehörigkeit des Isolats zur *Massilia*/*Telluria* Gruppe dienen. Das Muster der polaren Lipide des Isolats *Oxalobacteraceae* bacterium Ma wies die Hauptkomponenten DPG, PE und PG auf, welche ebenfalls gemäß den Charakteristika von Mitgliedern des Genus *Massilia* (Kämpfer *et al.*, 2011) die Hauptkomponenten im Muster der polaren Lipide darstellen (Abb. 14.4; Tab. 12.2). Des Weiteren wurde im Profil der polaren Lipide des Isolats *Oxalobacteraceae* bacterium Ma das nicht identifizierte Lipid L11 in mittlerer Menge detektiert, das ausschließlich ebenfalls bei der Spezies *T. mixta* CCUG 35206^T nachgewiesen wurde. Diese Beobachtung unterstützt die 16S rRNA Daten. Im 16S rRNA Stammbaum (neighbour-joining) clusterte *T. mixta* CCUG 35206^T zusammen mit dem Isolat *Oxalobacteraceae* bacterium Ma bei signifikanter bootstrap Unterstützung (70 %) bei der Verzweigung. Außerdem wies das Isolat *Oxalobacteraceae* bacterium Ma zu *T. mixta* CCUG 35206^T die höchste 16S rRNA Gensequenzähnlichkeit (98.6 %) auf. Weitere Komponente im Profil der polaren Lipide des Isolats *Oxalobacteraceae* bacterium Ma war das in mittlerer Menge nachgewiesene nicht identifizierte Aminolipid AL5, welches nur noch bei *M. aerolata* DSM 19289^T detektiert wurde (Abb. 14.4).

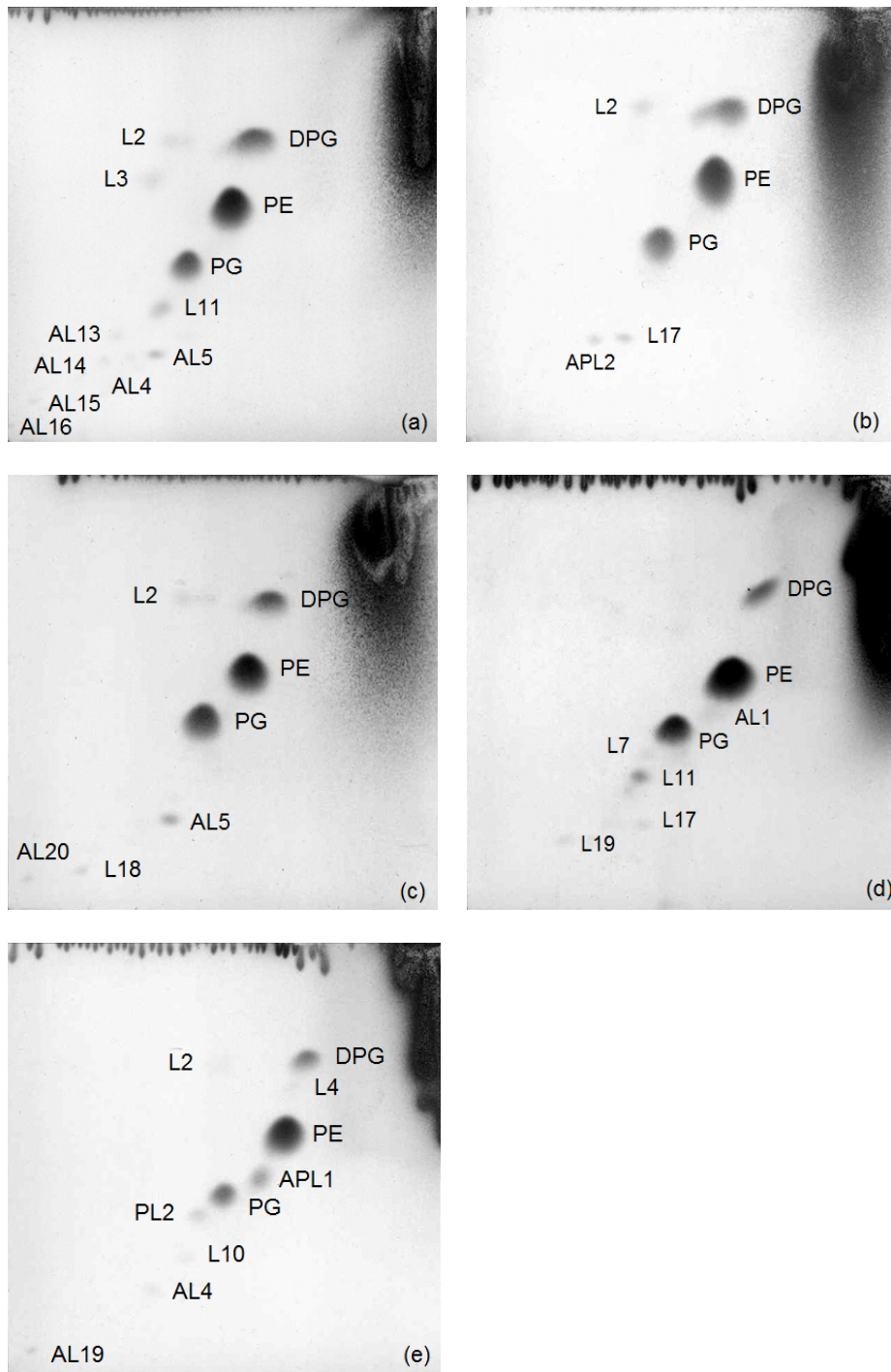


Abbildung 14.4.: Muster der polaren Lipide von (a) *Oxalobacteraceae* bacterium Ma; (b) NS9; (c) *M. aerilata* DSM 19289^T „B“; (d) *T. mixta* CCUG 35206^T und (e) *M. haematophila* CCUG 38318^T nach zweidimensionaler Dünnschichtchromatographie und Färbung mit Molybdätdiphosphorsäure. Abkürzungen: DPG, Diphosphatidylglycerol; PE, Phosphatidylethanolamin; PG, Phosphatidylglycerol; L2-x, unidentifizierte polare Lipide, die ausschließlich in der Gesamtlipidfärbung detektiert wurden; AL1-y, unidentifizierte Aminolipide; APL2, unidentifiziertes Aminophospholipid; PL2, unidentifiziertes Phospholipid. Nummerierung der Lipide erfolgte in Relation zu den in die Analyse miteinbezogenen 11 *Massilia*, 2 *Telluria* Spezies sowie der Spezies *Duganella phyllosphaerae* T54^T (Tab. 6.1).

14. Isolat *Oxalobacteraceae* bacterium Ma

Dies wiederum deutet auf eine nahe Verwandtschaft von *M. aerilata* DSM 19289^T und *Oxalobacteraceae* bacterium Ma, welche auch in der *gyrB* und *lepA* Phylogenie angedeutet wurde (Abb. B.1; 14.2; B.7; 15.2; 12.5; B.9; B.11). Das nicht identifizierte Aminolipid AL5 von *Oxalobacteraceae* bacterium Ma und *M. aerilata* DSM 19289^T wies ein zum nicht identifizierten Lipid L17 von *T. mixta* CCUG 35206^T und NS9 analoges chromatographisches Verhalten auf. Eine Aminogruppe konnte aber im identifizierten Lipid L17 von NS9 nicht nachgewiesen werden. Daher muss hier davon ausgegangen werden, dass es sich hierbei um unterschiedliche Lipide handelt. Außerdem wies das Profil der polaren Lipide des Isolats *Oxalobacteraceae* bacterium Ma zwei jeweils in geringen Mengen detektierte, unidentifizierte polare Lipide, L2 und L3, auf. Das unidentifizierte polare Lipid L2 wurde auch bei zum Isolat *Oxalobacteraceae* bacterium Ma näher verwandten Stamm *M. aerilata* DSM 19289^T und dem Isolat NS9 sowie weiteren *Massilia* Stämmen, *M. albidiflava* CIP 109189^T, *M. aurea* AP13^T, *M. consociata* CCUG 58010^T, *M. haematophila* CCUG 38318^T, *M. dura* CCUG 52213^T, *M. lutea* CIP 109190^T, *M. niastensis* KACC 12599^T, *M. varians* CCUG 35299^T, *M. timonae* CCUG 45783^T und dem *Telluria* Stamm, *T. chitinolytica* CIP 104069^T in mittleren Anteilen bis Spuren nachgewiesen (Tab. 12.2). Das nicht identifizierte Lipid L3 wurde in *M. aurea* AP13^T, *M. dura* CCUG 52213^T, *M. niastensis* KACC 12599^T, *M. plicata* DSM 17505^T, *M. varians* CCUG 35299^T und *T. chitinolytica* CIP 104069^T nachgewiesen (Tab. 12.2). Das Profil der polaren Lipide des Isolats *Oxalobacteraceae* bacterium Ma enthielt außerdem Spuren des nicht identifizierten Aminolipids AL4, das ebenfalls in *M. albidiflava* CIP 109189^T, *M. consociata* CCUG 58010^T, *M. haematophila* CCUG 38318^T, *M. lutea* CIP 109190^T, *M. niastensis* KACC 12599^T, *M. varians* CCUG 35299^T und *T. chitinolytica* CIP 104069^T in Spuren bis geringen Anteilen nachgewiesen wurde. Dieses Lipid wies ein zum Lipid APL2 analoges chromatographisches Verhalten auf; die Phosphatgruppe konnte jedoch möglicherweise wegen der geringen Menge im Lipid AL4 dieser Stämme nicht nachgewiesen werden. Bei den Stämmen *M. timonae* CCUG 45783^T, *M. dura* CCUG 52213^T und dem Isolat NS9 lag dieses Lipid ebenfalls in geringen Anteilen bis Spuren vor und die Phosphatgruppe konnte erst nach starker Erhöhung der Menge des Extrakts, die dünnschichtchromatographisch analysiert wurde, detektiert werden. Lediglich in den Stämmen *M. aurea* AP13^T und *M. plicata* DSM 17505^T war das Lipid als Hauptanteil bzw. in mittleren Anteilen vorhanden (Tab. 12.3). Daher ist anzunehmen, dass es sich bei den Lipiden AL4 und APL2 um idente Lipide handeln könnte. Des Weiteren wurden im Muster der polaren Lipide von *Oxalobacteraceae* bacterium Ma vier in Spuren nachgewiesene, unidentifizierte Aminolipide AL13-16 detektiert, welche ausschließlich bei diesem

Isolat nachgewiesen wurden und dieses von allen 11 untersuchten Typstämmen der *Massilia/ Telluria* Gruppe zu unterscheiden scheinen (Tab. 12.3). Aufgrund ihrer geringen Menge sind diese Aminolipide als alleiniges Differenzierungsmerkmal zu Spezies der *Massilia/ Telluria* Gruppe nicht als brauchbar anzusehen, da hier nicht geklärt wurde, ob ihr Vorkommen vielleicht auch kulturbedingt ist; im Gesamtkontext der gewonnenen Daten stellen sie vorerst aber ein weiteres Indiz für die separate Stellung des Isolats *Oxalobacteraceae* bacterium Ma dar. Darüber hinaus wird basierend auf den Ähnlichkeiten im Muster der polaren Lipide von *Oxalobacteraceae* bacterium Ma zu *T. mixta* CCUG 35206^T und *M. aerilata* DSM 19289^T eine Gruppierung zu diesen angedeutet, welche auch in der *gyrB* Phylogenie aufgezeigt wurde (Abb. 14.2; B.1; B.2).

Zur weiteren Charakterisierung des Isolats *Oxalobacteraceae* bacterium Ma wurde dessen Zell- und Koloniemorphologie sowie eine physiologische Teilcharakterisierung durch Ermittlung der Katalase- und Oxidaseaktivität durchgeführt. Nach dreitägiger Inkubation auf dem 1/10 PYE Agar bei 28 °C und 40 % relativer Feuchte wurden ca. 1 mm große, zirkuläre, halbdurchsichtige, glänzende, glatte, weißlich-hellgelbe Kolonien, ähnlich der Farbe des Nährbodens mit einem helleren und glatten Rand beobachtet. Im Laufe der Kultivierung erschienen die Kolonien trockener und waren schwerer mit einer Impföse zu entnehmen. Nach einwöchiger Inkubation auf 1/10 PYE Agar bei 28 °C und 40 % relativer Feuchte waren die Zellen Gram-negativ färbende Stäbchen mit Katalase-Aktivität, aber negativ in der Oxidase-Aktivität. Im SIM-Test wurde nach zweiwöchiger Inkubation bei 28 °C und 40 % relativer Feuchte sehr schwaches Wachstum unterhalb der Oberfläche beobachtet. Daher wurde die Beweglichkeit unter zum SIM-Test analogen Bedingungen, aber im 1/10 PYE und PYE Weichagar-Röhrchen getestet. Beweglichkeit wurde in 1/10 PYE Weichagar unter mikroaeroben Bedingungen beobachtet. Diese war anhand von diffusem Wachstum 1 - 4 mm unterhalb der Oberfläche sichtbar. Im korrespondierenden PYE Weichagar zeigte das Isolat *Oxalobacteraceae* bacterium Ma ebenfalls Beweglichkeit unter mikroaeroben Bedingungen, sichtbar anhand von diffusem Wachstum direkt unterhalb der Oberfläche.

Isolat *Oxalobacteraceae* bacterium Ma wuchs auf PYE, 1/10 PYE Agar und Blutagar, allerdings ohne Hämolyse. Auf nährstoffreicheren Medien wie dem PYE Agar war die Überimpfbarkeit nach zweitägiger Kultivierung stark eingeschränkt, wie sich aus den Subkultivierungsversuchen ergab (Abschn. 7.1). Kein Wachstum wurde auf MacConkey Agar und PYE Agar, supplementiert mit 4 % (w/v) NaCl, beobachtet.

15. Isolat E-JS-7

Das Isolat E-JS-7 wurde aus dem Wasser des Aquariums einer Blutegefarm in Deutschland von S. Gläser (pers. Mitteilung) isoliert.

Die 16S rRNA Gensequenz des Isolats E-JS-7 (1413 Bp) war bei Beginn der Arbeiten bereits in Gendatenbanken hinterlegt worden (KJ183018). Eine erste Klassifizierung des Isolats erfolgte durch den 16S rRNA Gensequenzvergleich unter Benutzung des EzTaxon-e Servers (<http://eztaxon-e.ezbiocloud.net/>; Kim *et al.*, 2012). Die rohe 16S rRNA Gensequenz des Isolats E-JS-7 wies hierbei die höchsten Ähnlichkeiten zu den Spezies des Genus *Massilia* auf, allen voran zum Typstamm von *M. lurida* D5^T (97.3 %).

In den Sequenzähnlichkeitsmatrizes anhand bearbeiteter 16S rRNA Gensequenzen wurden zwischen E-JS-7 und den *Massilia* und *Telluria* Spezies Sequenzähnlichkeiten im Bereich von 94.9 % - 98.6 % gefunden. Die höchsten Ähnlichkeiten wies die 16S rRNA Gensequenz des Isolats E-JS-7 zu *T. chitinolytica* CIP 104069^T (98.6 %) und *M. plicata* 76^T (97.6 %) auf. Zwischen den *Massilia* und *Telluria* Spezies lagen diese im Bereich von 95.1 - 99.4 %. Daher kann angenommen werden, dass Spezies der Genera *Massilia* und *Telluria* durch 16S rRNA Ähnlichkeiten unterhalb von 99.4 % voneinander getrennt sind. Für das Isolat E-JS-7 lagen die 16S rRNA Sequenzähnlichkeiten somit bei einer geringfügigen Abweichung im unteren Bereich innerhalb der für Spezies des *Massilia*/*Telluria* Clusters ermittelten Schwankungsbreite. Daher darf angenommen werden, dass das Isolat E-JS-7 eine noch nicht beschriebene Spezies der *Massilia*/*Telluria* Gruppe repräsentieren könnte.

In den 16S rRNA Stammbäumen (maximum-likelihood, neighbour-joining und maximum-parsimony) wies E-JS-7 den kürzesten phylogenetischen Abstand zum Stamm *T. chitinolytica* CIP 104069^T auf. Hierbei wurde in den ersten zwei genannten Algorithmen eine gemeinsame Clusterung von E-JS-7 mit *T. chitinolytica* CIP 104069^T gefunden (Abb. 15.1; A.3; 14.1).

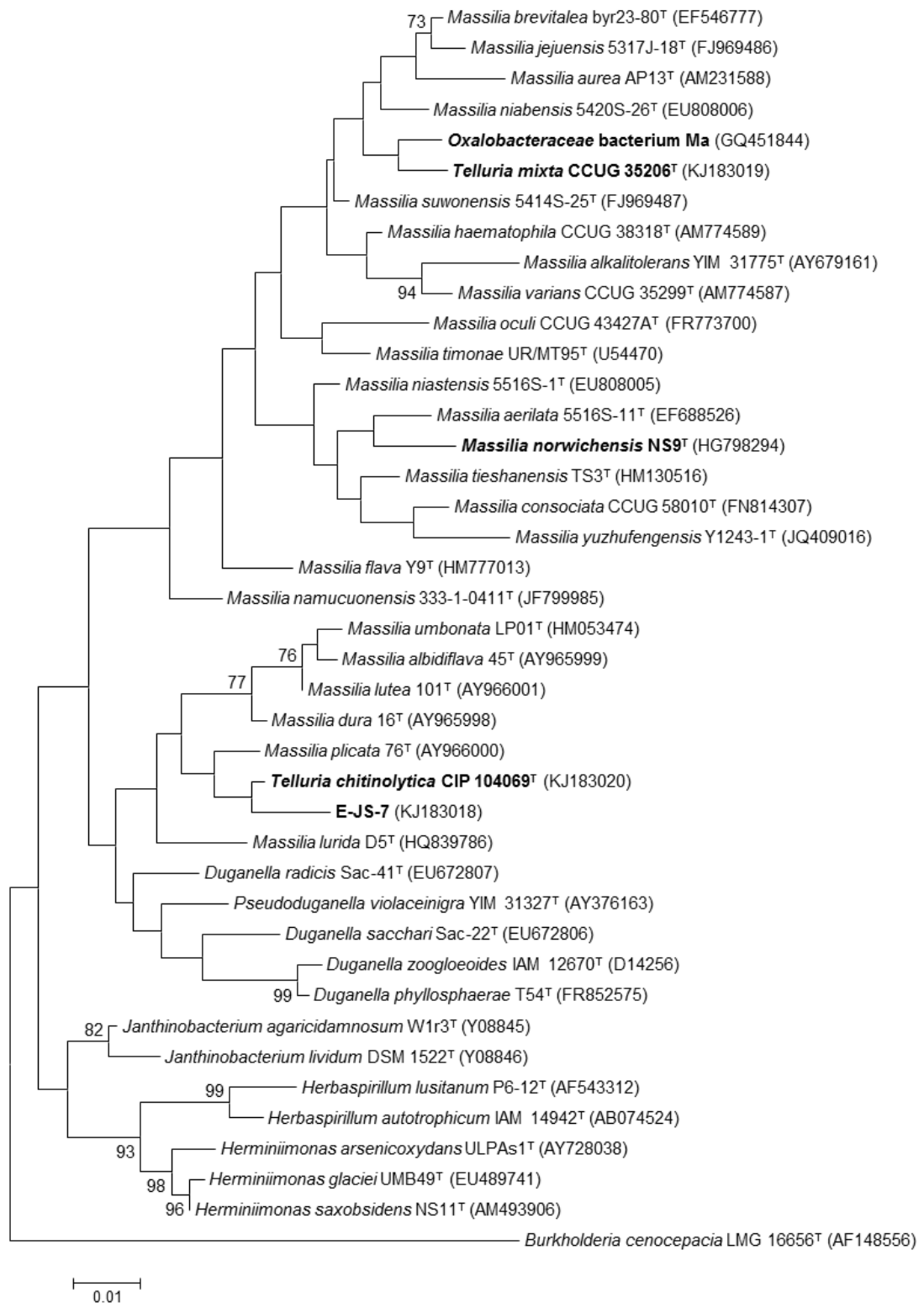


Abbildung 15.1.: Maximum-likelihood Stammbaum basierend auf bearbeiteten 16S rRNA (1327 Bp) Gensequenzen. Der Stammbaum wurde mit Hilfe des Tamura-Nei Modells (Tamura & Nei, 1993) im Programm MEGA 5.2.2 (Tamura *et al.*, 2011) berechnet und zeigt die phylogenetische Positionierung der Isolate NS9, *Oxalobacteraceae* bacterium Ma und E-JS-7 innerhalb des *Massilia*/*Telluria* Clusters. Die Zahlenwerte an den Verzweigungspunkten geben das Ergebnis von 1000 bootstrap Replikationen in % an. Dargestellt sind nur bootstrap Werte ≥ 65 %. Balken, 0.01 akkumulierte Substitutionen pro Nukleotid.

15. Isolat E-JS-7

Im neighbour-joining Stammbaum wurde die nahe Verwandtschaft zwischen *T. chitinolytica* CIP 104069^T und E-JS-7 durch einen signifikanten bootstrap Wert von 67 % bei der Verzweigung abgesichert (Abb. A.3). Den zweitkürzesten phylogenetischen Abstand wies E-JS-7 in den 16S rRNA Stammbäumen zu *M. plicata* 76^T auf, allerdings ohne bootstrap Unterstützung bei den Verzweigungen.

Die Gesamtheit der gewonnenen 16S rRNA Daten deutet darauf hin, dass die nächsten Verwandten des Isolats E-JS-7 die Spezies *T. chitinolytica* CIP 104069^T und *M. plicata* 76^T repräsentieren. Darüber hinaus weisen die 16S rRNA Sequenzähnlichkeiten von <99.0 % darauf hin, dass es sich beim Isolat E-JS-7 um eine eigene Spezies handelt. Zur Absicherung wären aber unbedingt DNA-DNA Hybridisierungen zu *T. chitinolytica* CIP 104069^T und *M. plicata* 76^T durchzuführen.

Die Verwandtschaftsverhältnisse zwischen dem Isolat E-JS-7 und den Spezies der *Massilia* und *Telluria* Gruppe wurden ferner anhand von Sequenzähnlichkeiten in den partiellen Nukleotid- und Aminosäuresequenzen der Haushaltsgene *gyrB* und *lepA* untersucht.

In der partiellen *gyrB* Nukleotidsequenz (810 Bp) zeigten sich zwischen den *Massilia* und *Telluria* Spezies Ähnlichkeitswerte im Bereich von 89.1 - 97.6 %. Diese Daten deuten somit darauf hin, dass die Spezies dieser Bakteriengruppe durch *gyrB* Sequenzähnlichkeiten <97.6 % voneinander separiert sind (Tab. 12.4). Das Isolat E-JS-7 zeigte zu den untersuchten *Massilia*/*Telluria* Spezies *gyrB* Sequenzähnlichkeiten im Bereich von 88.5 % (*M. niabensis* KACC 12632^T) - 92.3 % (*M. varians* CCUG 35299^T). Zur *gyrB* Sequenz des Stammes *P. violaceinigra* YIM 31327^T zeigte die korrespondierende Gensequenz von E-JS-7 einen Ähnlichkeitswert von 91.4 %.

In den korrespondierenden GyrB Aminosäuresequenzen lagen die Ähnlichkeitswerte zwischen den *Massilia*/*Telluria* Spezies zwischen 94.4 - 99.6 %. Daraus ergibt sich, dass unterschiedliche Spezies GyrB Sequenzähnlichkeiten von <99.6 % aufweisen (Tab. 15.1). Für das Isolat E-JS-7 ergaben sich in der GyrB Aminosäuresequenz Ähnlichkeiten im Bereich von 94.8 % (*M. niabensis* KACC 12632^T) - 97.0 % (*M. varians* CCUG 35299^T, *M. yuzhufengensis* CGMCC 1.12041^T, *M. timonae* CCUG 45783^T, *M. brevitalea* DSM 18925^T). Die GyrB Aminosäuresequenz von E-JS-7 wies aber zu *Pseudoduganella violaceinigra* YIM 31327^T einen höheren Ähnlichkeitswert (97.7 %) auf, als zu den untersuchten *Massilia*/*Telluria* Spezies.

Tabelle 15.1.: Sequenzähnlichkeitsmatrix basierend auf den partiellen GyrB Aminosäuresequenzen (270 AS) anhand von BioEdit (Hall, 1999). Die Matrix umfasst zwei Teile (a) und (b). Abkürzungen: chit, *T. chitinolytica* CIP 104069^T (CDL67793); mixt, *T. mixta* CCUG 35206^T (CDL67794); aeri, *M. aerilata* DSM 19289^T (CDL67779); albi, *M. albidiflava* CIP 109189^T (CDL67780); alka, *M. alkalitolerans* DSM 17462^T (keine Zugangsnummer); aure, *M. aurea* AP13^T (CDL67781); brev, *M. brevitalea* DSM 18925^T (AHG55150); cons, *M. consociata* CCUG 58010^T (CDL67782); dura, *M. dura* CCUG 52213^T (CDL67783); haem, *M. haematophila* CCUG 38318^T (CDL67784); jeju, *M. jejuensis* KACC 12634^T (AHG55151); lute, *M. lutea* CIP 109190^T (CDL67785); niab, *M. niabensis* KACC 12632^T (CDL67786); nias, *M. niastensis* KACC 12599^T (CDL67787); plic, *M. plicata* DSM 17505^T (CDL67788); ties, *M. tieshanensis* KACC 14940^T (AHG55152); timo, *M. timonae* CCUG 45783^T (CDL67791); vari, *M. varians* CCUG 35299^T (CDL67792); yuzh, *M. yuzhufengensis* CGMCC 1.12041^T (AHG55149); oxal, *Oxalobacteraceae* bacterium Ma (CDL67790); EJS7, E-JS-7 (keine Zugangsnummer); NS9, *M. norwichensis* sp. nov. NS9^T (CDL67789); viol, *Pseudoduganella violaceinigra* YIM 31327^T (ACF74547); zoog, *Duganella zoogloeoides* IAM 12670^T (ACF74548); phyl, *Duganella phyllosphaerae* T54^T (CDL67795); ceno, *Burkholderia cenocepacia* J2315^T (CAR50732).

(a)

	chit	mixt	aeri	albi	alka	aure	brev	cons	dura	haem	jeju	lute	niab
chit	ID	0.951	0.955	0.959	0.959	0.951	0.955	0.959	0.959	0.944	0.955	0.966	0.944
mixt	0.951	ID	0.977	0.962	0.977	0.955	0.974	0.985	0.970	0.974	0.970	0.970	0.970
aeri	0.955	0.977	ID	0.966	0.977	0.962	0.988	0.977	0.970	0.985	0.985	0.974	0.974
albi	0.959	0.962	0.966	ID	0.977	0.974	0.970	0.970	0.985	0.962	0.974	0.988	0.962
alka	0.959	0.977	0.977	0.977	ID	0.962	0.974	0.992	0.974	0.974	0.970	0.977	0.974
aure	0.951	0.955	0.962	0.974	0.962	ID	0.962	0.955	0.970	0.959	0.977	0.977	0.959
brev	0.955	0.974	0.988	0.970	0.974	0.962	ID	0.974	0.974	0.977	0.981	0.977	0.962
cons	0.959	0.985	0.977	0.970	0.992	0.955	0.974	ID	0.974	0.966	0.970	0.977	0.981
dura	0.959	0.970	0.970	0.985	0.974	0.970	0.974	0.974	ID	0.959	0.977	0.985	0.962
haem	0.944	0.974	0.985	0.962	0.974	0.959	0.977	0.966	0.959	ID	0.970	0.962	0.962
jeju	0.955	0.970	0.985	0.974	0.970	0.977	0.981	0.970	0.977	0.970	ID	0.981	0.981
lute	0.966	0.970	0.974	0.988	0.977	0.977	0.977	0.977	0.985	0.962	0.981	ID	0.970
niab	0.944	0.970	0.974	0.962	0.974	0.959	0.962	0.981	0.962	0.962	0.981	0.970	ID
nias	0.955	0.974	0.974	0.959	0.981	0.948	0.962	0.988	0.962	0.959	0.966	0.966	0.977
plic	0.992	0.951	0.955	0.959	0.966	0.951	0.955	0.966	0.962	0.944	0.955	0.966	0.951
ties	0.955	0.970	0.970	0.962	0.985	0.951	0.959	0.985	0.959	0.970	0.962	0.962	0.974
timo	0.955	0.974	0.981	0.966	0.977	0.962	0.977	0.977	0.970	0.970	0.970	0.974	0.962
vari	0.955	0.981	0.981	0.974	0.996	0.966	0.977	0.988	0.977	0.977	0.974	0.974	0.970
yuzh	0.955	0.974	0.977	0.970	0.974	0.974	0.988	0.974	0.974	0.966	0.985	0.981	0.966
oxal	0.951	0.974	0.992	0.970	0.981	0.966	0.985	0.974	0.966	0.992	0.977	0.970	0.966
EJS7	0.966	0.966	0.966	0.959	0.966	0.959	0.970	0.966	0.966	0.955	0.959	0.966	0.948
NS9	0.940	0.977	0.981	0.959	0.970	0.955	0.974	0.970	0.955	0.996	0.966	0.959	0.966
viol	0.981	0.955	0.955	0.962	0.962	0.948	0.966	0.962	0.962	0.944	0.955	0.970	0.944
zoog	0.955	0.951	0.955	0.966	0.959	0.955	0.959	0.951	0.959	0.951	0.962	0.962	0.944
phyl	0.955	0.944	0.948	0.966	0.959	0.948	0.959	0.951	0.951	0.944	0.955	0.962	0.944
ceno	0.781	0.788	0.792	0.774	0.785	0.774	0.781	0.781	0.774	0.792	0.785	0.770	0.785

(b)

	nias	plic	ties	timo	vari	yuzh	oxal	EJS7	NS9	viol	zoog	phyl	ceno
chit	0.955	0.992	0.955	0.955	0.955	0.955	0.951	0.966	0.940	0.981	0.955	0.955	0.781
mixt	0.974	0.951	0.970	0.974	0.981	0.974	0.974	0.966	0.977	0.955	0.951	0.944	0.788
aeri	0.974	0.955	0.970	0.981	0.981	0.977	0.992	0.966	0.981	0.955	0.955	0.948	0.792
albi	0.959	0.959	0.962	0.966	0.974	0.970	0.970	0.959	0.959	0.962	0.966	0.966	0.774
alka	0.981	0.966	0.985	0.977	0.996	0.974	0.981	0.966	0.970	0.962	0.959	0.959	0.785
aure	0.948	0.951	0.951	0.962	0.966	0.974	0.966	0.959	0.955	0.948	0.955	0.948	0.774
brev	0.962	0.955	0.959	0.977	0.977	0.988	0.985	0.970	0.974	0.966	0.959	0.959	0.781
cons	0.988	0.966	0.985	0.977	0.988	0.974	0.974	0.966	0.970	0.962	0.951	0.951	0.781
dura	0.962	0.962	0.959	0.977	0.977	0.974	0.966	0.966	0.955	0.962	0.959	0.951	0.774
haem	0.959	0.944	0.970	0.970	0.977	0.966	0.992	0.955	0.996	0.944	0.951	0.944	0.792
jeju	0.966	0.955	0.962	0.970	0.974	0.985	0.977	0.959	0.966	0.955	0.962	0.955	0.785
lute	0.966	0.966	0.962	0.974	0.974	0.981	0.970	0.966	0.959	0.970	0.962	0.962	0.770
niab	0.977	0.951	0.974	0.962	0.970	0.966	0.966	0.948	0.966	0.944	0.944	0.944	0.785
nias	ID	0.962	0.985	0.966	0.977	0.962	0.966	0.955	0.962	0.955	0.940	0.940	0.781
plic	0.962	ID	0.962	0.959	0.962	0.955	0.951	0.966	0.940	0.981	0.955	0.955	0.777
ties	0.985	0.962	ID	0.962	0.981	0.959	0.970	0.951	0.974	0.955	0.944	0.944	0.788
timo	0.966	0.959	0.962	ID	0.981	0.974	0.977	0.970	0.966	0.959	0.948	0.940	0.785
vari	0.977	0.962	0.981	0.981	ID	0.977	0.985	0.970	0.974	0.959	0.962	0.955	0.788
yuzh	0.962	0.955	0.959	0.974	0.977	ID	0.974	0.970	0.962	0.966	0.959	0.959	0.781
oxal	0.966	0.951	0.970	0.977	0.985	0.974	ID	0.962	0.988	0.951	0.959	0.951	0.792
EJS7	0.955	0.966	0.951	0.970	0.970	0.970	0.962	ID	0.951	0.977	0.959	0.959	0.781
NS9	0.962	0.940	0.974	0.966	0.974	0.962	0.988	0.951	ID	0.940	0.948	0.940	0.792
viol	0.955	0.981	0.955	0.959	0.959	0.966	0.951	0.977	0.940	ID	0.959	0.966	0.774
zoog	0.940	0.955	0.944	0.948	0.962	0.959	0.959	0.959	0.948	0.959	ID	0.988	0.781
phyl	0.940	0.955	0.944	0.940	0.955	0.959	0.951	0.959	0.940	0.966	0.988	ID	0.774
ceno	0.781	0.777	0.788	0.785	0.788	0.781	0.792	0.781	0.792	0.774	0.781	0.774	ID

15. Isolat E-JS-7

In der *lepA* Nukleotidsequenz (1299 Bp) lagen die Sequenzähnlichkeiten zwischen den *Massilia* und *Telluria* Spezies bei 83.2 - 98.8 %. Dies lässt darauf schließen, dass eine Unterscheidung zwischen Spezies innerhalb dieser Gruppe bei *lepA* Sequenzähnlichkeiten von <99.0 % möglich ist (Tab. 12.5). Das Isolat E-JS-7 wies zu den untersuchten *Massilia* und *Telluria* Spezies *lepA* Ähnlichkeitswerte im Bereich von 83.6 % (*T. mixta* CCUG 35206^T) - 89.8 % (*M. albidiflava* CIP 109189^T) auf, wobei der höchste Wert zu *Pseudoduganella violaceiniga* DSM 15887^T (91.9 %) erreicht wurde.

In den korrespondierenden LepA Aminosäuresequenzen wurden zwischen den Spezies der *Massilia* und *Telluria* Gruppe Sequenzähnlichkeiten zwischen 84.0 - 100 % nachgewiesen (Tab. 14.1). Die hohen Ähnlichkeiten in der LepA Sequenz deuten auf die beschränkte Eignung dieser Sequenz zur Unterscheidung von Spezies des *Massilia* und *Telluria* Clusters hin. Für das Isolat E-JS-7 lagen die Ähnlichkeitswerte in der LepA Aminosäuresequenz zwischen 84.2 % (*T. mixta* CCUG 35206^T) - 96.3 % (*T. chitinolytica* CIP 104069^T). Hierbei ergab sich zwischen E-JS-7 und *P. violaceiniga* ein Ähnlichkeitswert von 93.3 %.

In den konkatenierten *gyrB/lepA* Nukleotidsequenzen zeigten sich zwischen unterschiedlichen Spezies der *Massilia* und *Telluria* Gruppe Sequenzähnlichkeiten im Bereich von 86.2 - 98.3 %. Dies bedeutet, dass die Spezies durch Werte von <98.3 % (Tab. 12.6) voneinander getrennt sind. Die *gyrB/lepA* Nukleotidsequenz des Isolats E-JS-7 wies zu den *Massilia* und *Telluria* Spezies Sequenzähnlichkeiten von 86.0 % (*T. mixta* CCUG 35206^T) - 90.5 % (*T. chitinolytica* CIP 104069^T) auf. Eine geringfügig höhere Sequenzähnlichkeit in der *gyrB/lepA* Sequenz wies E-JS-7 zum Typstamm der Spezies *Pseudoduganella violaceiniga*¹ YIM 31327^T / DSM 15887^T auf (91.7 %).

In den korrespondierenden GyrB/ LepA Aminosäuresequenzen lagen die Sequenzähnlichkeiten zwischen den *Massilia* und *Telluria* Spezies bei 88.3 - 99.8 %. Die konkatenierten GyrB/ LepA Aminosäuresequenzen sind zusammen mit den LepA Aminosäuresequenzen wegen der relativ hohen Ähnlichkeiten zwischen den *Massilia* und *Telluria* Spezies daher nur bedingt zur Abgrenzung dieser Spezies geeignet (Tab. 14.2; 14.1). In der korrespondierenden GyrB/ LepA Aminosäuresequenz von E-JS-7 lagen die Ähnlichkeiten den zu *Massilia/ Telluria* Spezies im Bereich von 89.0 % (*T. mixta* CCUG 35206^T) - 96.4 % (*T. chitinolytica* CIP 104069^T). Die GyrB/ LepA Aminosäuresequenz von *P. violaceiniga* YIM 31327^T / DSM 15887^T wies zu jener

¹Die *gyrB* Gensequenz der Typspezies *P. violaceiniga* stammt vom Typstamm YIM 31327^T; jene der *lepA* Gensequenz vom Typstamm DSM 15887^T.

von E-JS-7 Ähnlichkeiten von 95.0 % auf.

Zusammenfassend zeigte das Isolat E-JS7 in den *lepA* und den konkatenierten *gyrB/lepA* Nukleotid- als auch Aminosäuresequenzen höchste Ähnlichkeiten zu den Typstämmen von *T. chitinolytica* CIP 104069^T oder *Pseudoduganella violaceinigra* YIM 31327^T/ DSM 15887^T. Lediglich in den Ähnlichkeiten berechnet anhand der *gyrB* Nukleotid- und Proteinsequenzen wurden die höchsten Werte zu *M. varians* CCUG 35299^T (und anderen Vertretern des Genus *Massilia*), bzw. zu *P. violaceinigra* YIM 31327^T gefunden (Tab. 12.4; 15.1). Die *gyrB* und *lepA* Sequenzähnlichkeiten deuten daher nicht nur auf eine verwandtschaftliche Nähe des Isolats E-JS-7 zum *Massilia/ Telluria* Cluster hin, sondern auch zum Genus *Pseudoduganella*. Nichtsdestotrotz deuten die *gyrB* und *lepA* Nukleotid- und Aminosäuresequenz-basierten Ähnlichkeiten zwischen dem Isolat E-JS-7 und den nächst verwandten Spezies *T. chitinolytica* und *Pseudoduganella violaceinigra* unterhalb der zur Unterscheidung von Spezies der *Massilia* und *Telluria* Gruppe gefundenen Ähnlichkeiten auf eine separate Spezies-Identität des Isolats E-JS-7 hin.

Die phylogenetische Verwandtschaft des Isolats E-JS-7 zu den Spezies der *Massilia* und *Telluria* Gruppe sowie zur Typspezies des Genus *Pseudoduganella*, *P. violaceinigra* wurde anhand von *gyrB* und *lepA* Nukleotid- und Aminosäuresequenz-basierten Stammbäumen untersucht.

In Stammbäumen (maximum-likelihood, maximum-parsimony und neighbour-joining) generiert auf Basis der konkatenierten GyrB/ LepA Aminosäuresequenzen zweigte das Isolat E-JS-7 an der Basis des Astes mit den Spezies *M. plicata* DSM 17505^T und *T. chitinolytica* CIP 104069^T ab. Diese Verzweigung kann als verlässlich angesehen werden, da die bootstrap Werte im Bereich von 77 - 84 % liegen (Abb. B.10; B.11; 12.4). Ähnliche phylogenetische Verwandtschaftsgrade zwischen E-JS-7 und den Spezies *T. chitinolytica* CIP 104069^T und *M. plicata* DSM 17505^T ergaben sich ebenfalls in den LepA Stammbäumen, berechnet anhand der drei Berechnungsmodelle (Abb. 15.2; B.7; B.8). In diesen clusterte *M. plicata* DSM 17505^T mit *T. chitinolytica* CIP 104069^T bei signifikanten bootstrap Werten von 75 - 81 %, wobei das Isolat E-JS-7 von diesen beiden Spezies bei hohen und damit signifikanten bootstrap Werten von 92 - 93 % abzweigte. Die phylogenetisch enge Verwandtschaft des Isolats E-JS-7 zu *T. chitinolytica* CIP 104069^T und *M. plicata* DSM 17505^T war daher zum Teil auch in den *gyrB* und *lepA* Stammbäumen ersichtlich.

15. Isolat E-JS-7

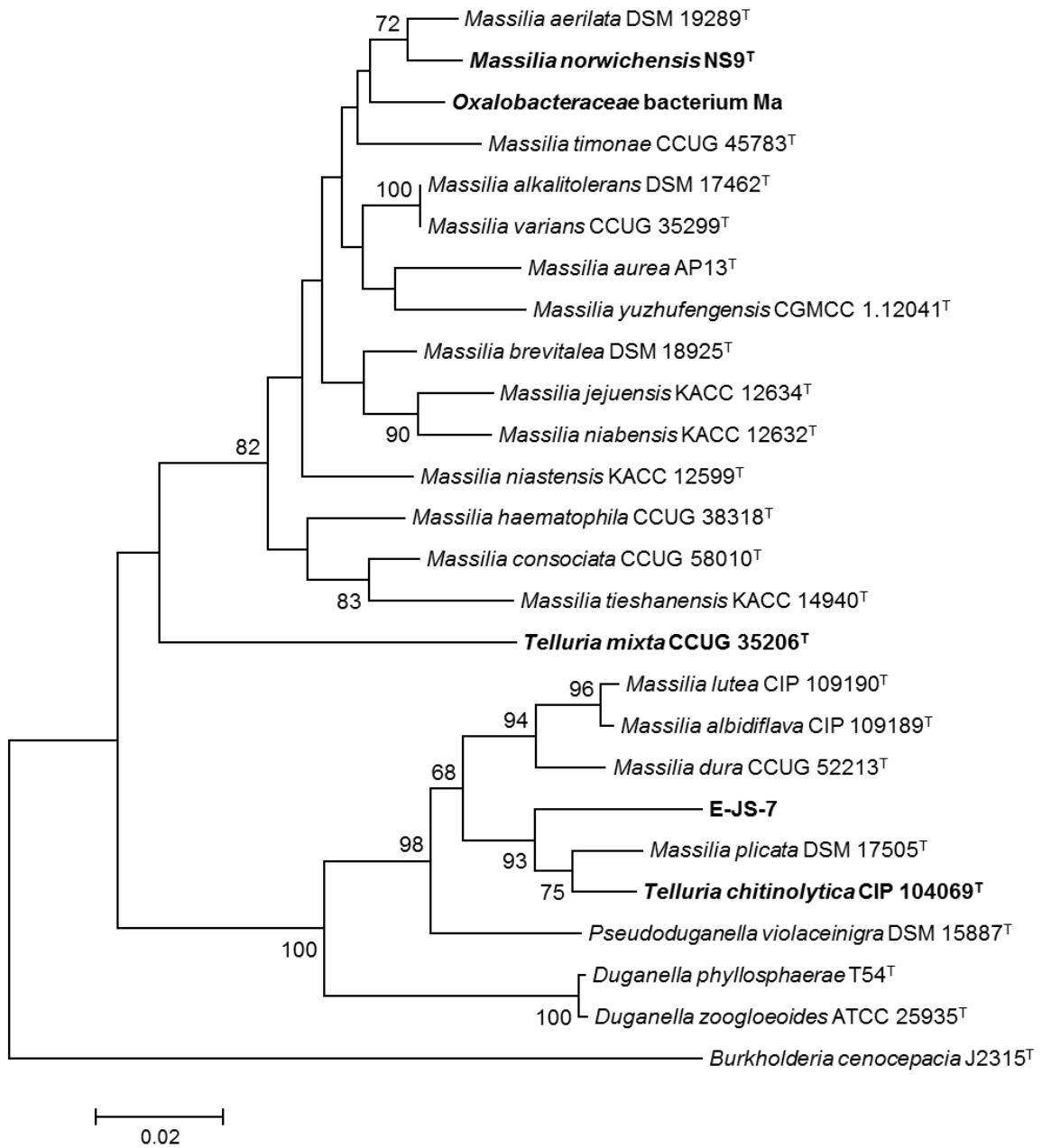


Abbildung 15.2.: Neighbour-joining Stammbaum basierend auf partiellen LepA Aminosäuresequenzen (433 AS) anhand des Poisson correction Modells (Zuckerandl & Pauling, 1965), berechnet im Programm MEGA 5.2.2 (Tamura *et al.*, 2011). Nur bootstrap Werte ≥ 65 % sind angegeben. Balken, 0.02 akkumulierte Substitutionen pro Aminosäure.

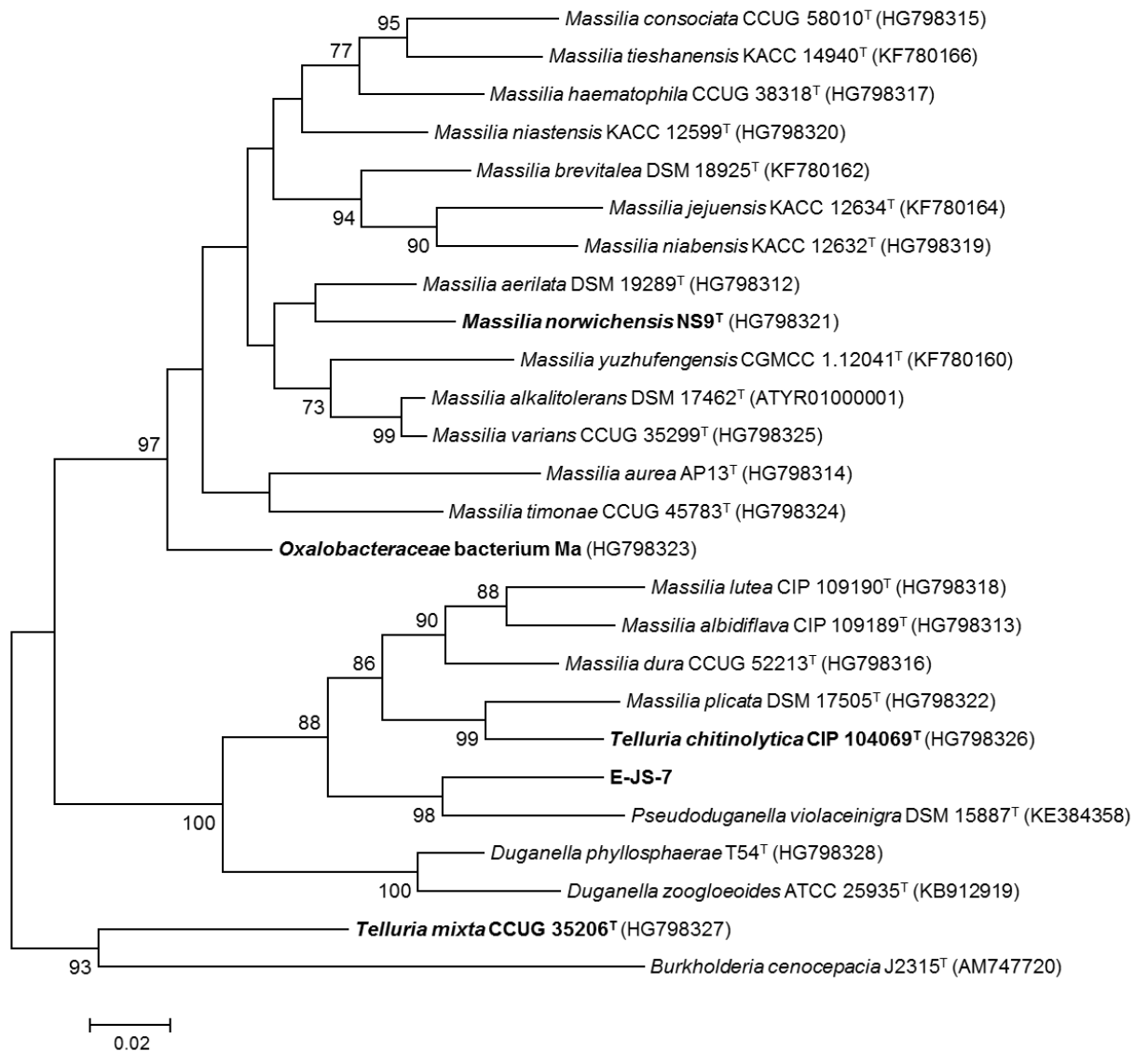


Abbildung 15.3.: Maximum-likelihood Stammbaum basierend auf partiellen *lepA* Nukleotidsequenzen (1299 Bp) unter Verwendung des Tamura-Nei Modells (Tamura & Nei, 1993), berechnet anhand von MEGA 5.2.2 (Tamura *et al.*, 2011). Nur bootstrap Werte $\geq 65\%$ sind eingeblendet. Balken, 0.02 akkumulierte Substitutionen pro Nukleotid.

15. Isolat E-JS-7

Ein näheres verwandtschaftliches Verhältnis von E-JS-7 zum Typstamm von *P. violaceinigra* YIM 31327^T / DSM 15887^T war auch in den *gyrB* Nukleotid- und Aminosäuresequenz-basierten Stammbäumen, in den *lepA* Nukleotidsequenz-basierten Stammbäumen, sowie in den anhand von konkatenierten *gyrB* / *lepA* Nukleotidsequenzen erstellten Stammbäumen, berechnet anhand der drei Berechnungsmodelle, ersichtlich (Abb. 14.2; B.1; B.2; B.4; B.3; 14.3; 15.3; B.5; B.6; 12.5; 12.3; B.9). In den erwähnten Stammbäumen wies E-JS-7 zum Typstamm von *P. violaceinigra* YIM 31327^T / DSM 15887^T die kürzeste phylogenetische Entfernung auf und clusterte bis auf die *gyrB* Nukleotid- und Aminosäuresequenz-basierten Stammbäume auch bei signifikanten, sehr hohen bootstrap Werten von 97 - 99 % mit *P. violaceinigra* YIM 31327^T / DSM 15887^T (Abb. 15.3; B.5; B.6; 12.5; 12.3; B.9). Diese Daten weisen auf eine nahe phylogenetische Verwandtschaft des Genus *Pseudoduganella* zur der im 16S rRNA Stammbaum tiefer abgezweigten *Massilia* / *Telluria* Gruppe hin, zu welcher auch das Isolat E-JS-7 einzuordnen ist (Abb. A.3). Zum Typstamm von *P. violaceinigra* YIM 31327^T sind allerdings in den 16S rRNA Stammbäumen (neighbour-joining, maximum-parsimony und maximum-likelihood) die nächsten Verwandten Spezies des Genus *Duganella* (Abb. A.3; 14.1; 15.1).

Zudem wurde das Isolat E-JS-7 chemotaxonomisch durch Ermittlung des Chinonsystems, des Musters der polaren Lipide und der Polyamine charakterisiert.

Das Chinonsystem des Isolats E-JS-7 wies die Hauptkomponente Ubichinon Q-8 auf, wie es für Mitglieder der Klasse der *Betaproteobacteria* charakteristisch ist (Busse *et al.*, 1996). Des Weiteren wurde Ubichinon Q-7 in mittleren Anteilen, sowie das Ubichinon Q-9 in Spuren nachgewiesen (Tab. 12.1).

Das Muster der Polyamine des Isolats E-JS-7 enthielt 2-Hydroxyputrescin und Putrescin als Hauptkomponenten (Tab. 12.1). Weiter wurden die Polyamine Spermidin und Spermin in geringen Anteilen sowie das Polyamin Cadaverin in Spuren nachgewiesen. Ähnliche Muster der Polyamine mit den Diaminen 2-Hydroxyputrescin und Putrescin als Hauptkomponenten und deutlich geringere Mengen an Spermidin, Spermin und 1,3-diaminopropan wurden auch in allen *Massilia* und *Telluria* Referenzstämmen gefunden (Tab. 12.1). Die untersuchten Referenzstämme der Genera *Massilia*, *Telluria* und *Duganella* sowie das Isolat E-JS-7 wiesen somit ein Muster der Polyamine auf, das in guter Übereinstimmung mit jenem der Mehrheit der Spezies der Klasse der *Betaproteobacteria* steht (Busse, 2011).

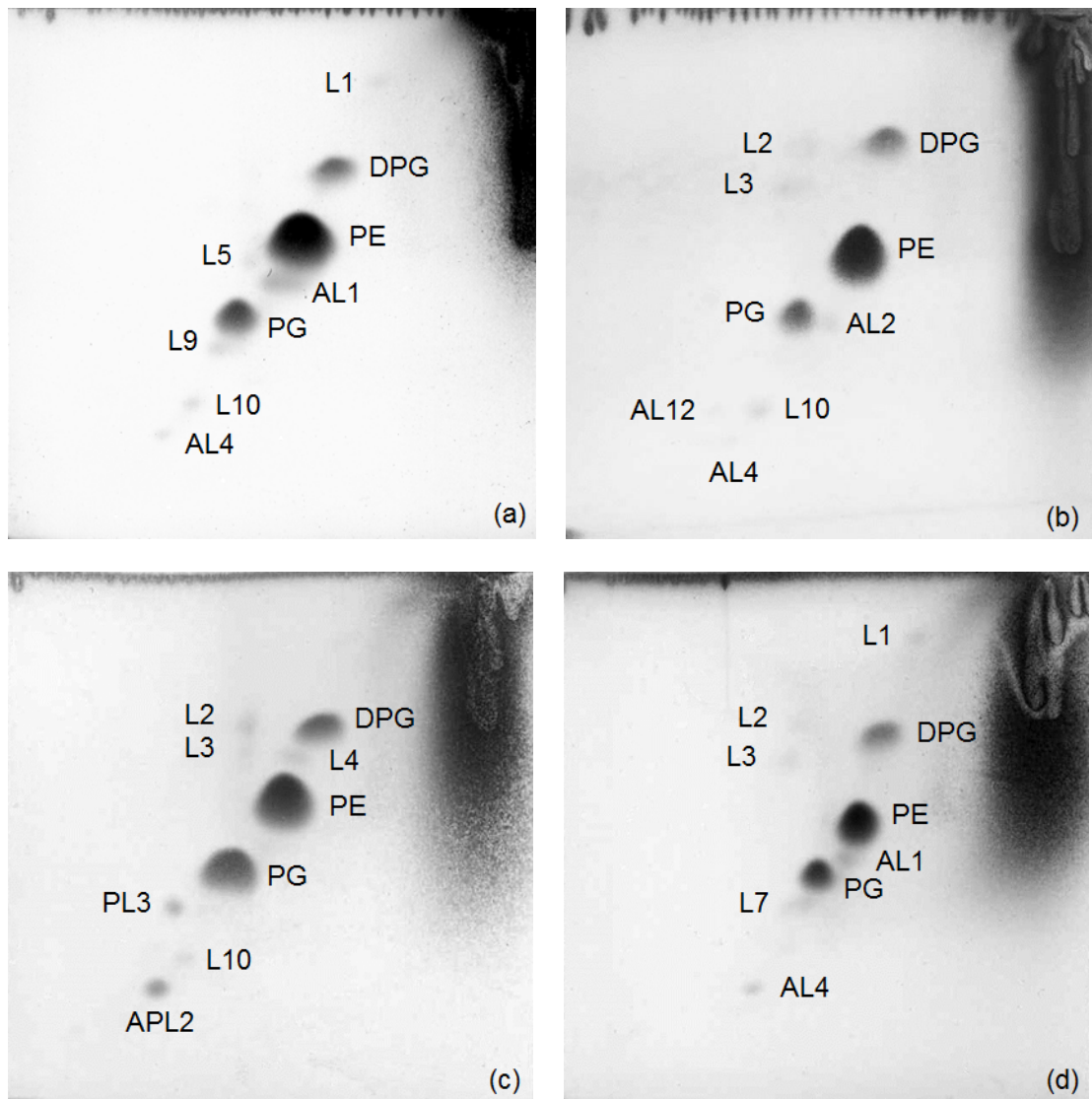


Abbildung 15.4.: Muster der polaren Lipide von (a) E-JS-7; (b) *T. chitinolytica* CIP 104069^T; (c) *M. plicata* DSM 17505^T und (d) *M. varians* CCUG 35299^T nach zweidimensionaler Dünnschichtchromatographie und Färbung mit Molybdätophosphorsäure. Abkürzungen: DPG, Diphosphatidylglycerol; PE, Phosphatidylethanolamin; PG, Phosphatidylglycerol; L1-x, unidentifizierte polare Lipide, die ausschließlich in der Gesamtlipidfärbung detektiert wurden; AL1-y, unidentifizierte Aminolipide; APL2, unidentifiziertes Aminophospholipid; PL3, unidentifiziertes Phospholipid. Nummerierung der Lipide erfolgte in Relation zu den in die Analyse miteinbezogenen 11 *Massilia*, 2 *Telluria* Spezies sowie der Spezies *Duganella phyllosphaerae* T54^T (Abb. 12.2; 12.1).

15. Isolat E-JS-7

Das Muster der polaren Lipide des Isolats E-JS-7 wies die Hauptkomponenten Diphosphatidylglycerol (DPG), Phosphatidylethanolamin (PE) und Phosphatidylglycerol (PG) auf, wie es für Vertreter der Genera *Massilia* und *Telluria* gezeigt wurde (Abb. 12.2; 12.1; Kämpfer *et al.*, 2011). Darüber hinaus wurden im Muster der polaren Lipide von E-JS-7 zahlreiche Übereinstimmungen zu den in die Analyse miteinbezogenen *Massilia* und *Telluria* Spezies detektiert, welche auf die Zugehörigkeit von E-JS-7 zur *Massilia*/*Telluria* Gruppe hindeuten (Abb. 15.4; Tab. 12.2; 12.3). Außerdem wies das Muster der polaren Lipide von E-JS-7 das in mittlerer Menge nachgewiesene, nicht identifizierte Aminolipid AL1 auf, sowie das in Spuren detektierte, nicht identifizierte Lipid L1 auf, welche sonst nur noch in *M. varians* CCUG 35299^T nachgewiesen wurden. Des Weiteren wurde bei E-JS-7 das nicht identifizierte Lipid L10 in geringen Mengen detektiert, welches ebenfalls in den Mustern der polaren Lipide von *M. albidiflava* CIP 109189^T, *M. aurea* AP13^T, *M. consociata* CCUG 58010^T, *M. haematophila* CCUG 38318^T, *M. plicata* DSM 17505^T und *T. chitinolytica* CIP 104069^T in mittleren Anteilen bis Spuren detektiert wurde. Außerdem wurde bei E-JS-7 das nicht identifizierte Aminolipid AL4 in geringen Mengen detektiert, das ebenso in *M. albidiflava* CIP 109189^T, *M. consociata* CCUG 58010^T, *M. haematophila* CCUG 38318^T, *M. lutea* CIP 109190^T und *M. nias-tensis* KACC 12599^T, *M. varians* CCUG 35299^T und *T. chitinolytica* CIP 104069^T in geringen Anteilen bis Spuren zu finden war. Das Muster der polaren Lipide von E-JS-7 wies auch das nicht identifizierte Lipid L5 auf, welches in geringen Anteilen vorhanden war und ebenfalls in *M. dura* CCUG 52213^T detektiert wurde. Das nicht identifizierte Lipid L9 wurde lediglich beim Isolat E-JS-7 detektiert. Dieses Lipid wurde bei E-JS-7 in mittleren Mengen nachgewiesen und stellt ein mögliches Indiz zur Abgrenzung von E-JS-7 von den in die Analyse miteinbezogenen *Massilia* und *Telluria* Spezies dar.

Ein Vergleich des Profils der polaren Lipide von E-JS-7 mit der Typspezies des Genus *Pseudoduganella*, *P. violaceinigra* offenbarte mehrere Unterschiede. Das Profil der polaren Lipide von *P. violaceinigra* YIM 31327^T wies DPG in geringen Anteilen auf und nicht, wie für E-JS-7 nachgewiesen wurde als eine der Hauptkomponenten. Außerdem wurde bei *P. violaceinigra* YIM 31327^T Phosphatidylserin detektiert (Kämpfer *et al.*, 2012b). Dies ist von Bedeutung, da E-JS-7 in der *gyrB* und *lepA* Phylogenie nicht nur mit den *Massilia*/*Telluria* Spezies, sondern auch mit dem Typstamm von *P. violaceinigra* YIM 31327^T / DSM 15887^T bei signifikanten bootstrap Werten clusterte (Abb. 12.5; 12.3; B.9; 15.3). Allerdings wurde für die Analyse der polaren Lipide von *P. violaceinigra* YIM 31327^T Biomasse verwendet, die in 'trypticase soy broth' (TSB) angezogen wurde (Kämpfer *et al.*, 2012b), im Gegensatz

zur PYE Bouillon, welche im Rahmen dieser Arbeit zur Anzucht aller Stämme und Isolate verwendet wurde. Es ist deshalb nicht ausgeschlossen, dass die beobachteten Unterschiede im Muster der polaren Lipide auf unterschiedliche Kultivierungsbedingungen zurückzuführen sind.

Zur weiteren Differenzierung von E-JS-7 und *P. violaceinigra* YIM 31327^T wäre eine Analyse des Fettsäuremusters von Vorteil. Hierbei sollte darauf geachtet werden, ob E-JS-7 die Fettsäure C_{14:0} 2-OH aufweist. Diese wurde bislang nur bei den *Massilia* Spezies *M. dura* 16^T, *M. lutea* 101^T, *M. plicata* 76^T, *M. albidiflava* 45^T, *M. flava* Y9^T, *M. lurida* D5^T, *M. umbonata* LP01^T und *M. aerilata* 5516-S11^T nachgewiesen (Zhang *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2012; Luo *et al.*, 2013; Rodríguez-Díaz *et al.*, 2014; Weon *et al.*, 2008). E-JS-7 wäre in den 16S rRNA Stammbäumen (Abb. 15.1; 14.1; A.3) zu den genannten *Massilia* Spezies einzuordnen; mit Ausnahme von *M. aerilata*, welche in den genannten Stammbäumen eine größere phylogenetische Entfernung zum Isolat E-JS-7 zeigte.

Trotz der gemeinsamen Clusterung von E-JS-7 mit dem Typstamm von *P. violaceinigra* YIM 31327^T / DSM 15887^T in den Stammbäumen anhand der *lepA* und der konkatenierten *gyrB* / *lepA* Nukleotidsequenzen bei signifikanten bootstrap Werten (97 - 99 %) (Abb. 15.3; B.5; B.6; 12.5 12.3; B.9) deutet die Gesamtheit der gewonnenen Daten eher auf eine Zugehörigkeit des Isolats E-JS-7 zum *Massilia* / *Telluria* Cluster hin. Die Ergebnisse aus den Untersuchungen der Profile der polaren Lipide, den *LepA*, den *gyrB* und den 16S rRNA Sequenzähnlichkeiten, sowie den Stammbäumen anhand der *LepA*, der konkatenierten *GyrB* / *LepA* und der 16S rRNA Sequenzen bilden Indizien für eine Zugehörigkeit des Isolats E-JS-7 zur *Massilia* / *Telluria* Gruppe. Innerhalb dieser könnte E-JS-7 eine bislang unbeschriebene Spezies repräsentieren.

Neben der taxonomischen Eingliederung des Isolats E-JS-7 wurde auch dessen Koloniemorphologie im Verlauf der Kultivierung auf 1xPYE Agar bei 40% rel. Feuchte und 28°C beschrieben. Die Kolonien des Isolats E-JS-7 wiesen nach eintägiger Inkubation eine weißlich-trübe Pigmentierung, eine glatte, glänzende Oberfläche und einen glatten, runden Umriss auf. Im Verlauf der Kultivierung veränderten die Kolonien das Profil und die Pigmentierung. Ab dem ca. 3. Tag der Kultivierung nahmen die Kolonien zunehmend eine hellviolette Pigmentierung ein. Nach 6-tägiger Inkubation erschienen die knopfförmigen Kolonien im Bereich des Knopfes violett, während der Rand der Kolonie eine weißliche Pigmentierung mit einem violetten Stich aufwies. Nach ca. 1-wöchiger Kultivierung war das Profil der Kolonien erhaben bis halbkugelig bei einem Durchmesser von ca. 4 mm. Die Pigmentierung war gleichmäßig intensiv violett.

16. Mitwirkung an der Beschreibung von *M.* *norwichensis* sp. nov.

Das Isolat NS9^T wurde aus der Innenluft des Sainsbury Centre for Visual Arts in Norwich, im Sommer des Jahres 1997, isoliert. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde eine Analyse der 16S rRNA und der partiellen Gensequenzen der Haushaltsgene *gyrB* und *lepA*, sowie eine chemotaxonomische Analyse durch Ermittlung des Musters der Polyamine, polarer Lipide und des Chinonsystems durchgeführt. Beim Isolat NS9^T handelt es sich um ein Gram-negatives, bewegliches Stäbchen. Die 16S rRNA Gensequenz von NS9^T identifizierte *Massilia haematophila* CCUG 38318^T, *Massilia niastensis* 5516S-1^T (beide 97.7 % Sequenzähnlichkeit), *Massilia aerilata* 5516S-11^T (97.4 % Sequenzähnlichkeit) und *Massilia tieshanensis* TS3^T (97.4 % Sequenzähnlichkeit) als nächst verwandte Spezies. In den partiellen *gyrB* und *lepA* Nukleotidsequenzen wies NS9^T die höchsten Sequenzähnlichkeiten zu *M. haematophila* CCUG 38318^T (94.5 %) bzw. zu *M. aerilata* 5516-11^T (94.3 %) auf. Die Sequenzähnlichkeiten in den untersuchten partiellen Haushaltsgenen und den 16S rRNA Genen deuten auf die Zugehörigkeit von NS9^T zum Genus *Massilia* hin. Hierbei zeigte NS9^T in diesen Genen zu den *Massilia* Spezies Sequenzähnlichkeiten, welche unterhalb der in dieser Bakteriengruppe ermittelten Sequenzähnlichkeiten zur Separierung von Spezies liegen. Das Chinonsystem von NS9^T mit Ubichinon Q-8 als Hauptkomponente, sowie das Profil der polaren Lipide mit den Hauptkomponenten Diphosphatidylglycerol, Phosphatidylethanolamin und Phosphatidylglycerol, sowie ein Muster der Polyamine mit den Hauptkomponenten 2-Hydroxyputrescine und Putrescin stand im Einvernehmen mit der Zuweisung von NS9^T zum Genus *Massilia*. Aufgrund der Ergebnisse, die zu einem Manuskript (s. Anhang, Abschn. C) zusammengefasst worden sind, wird die neue Spezies *M. norwichensis* vorgeschlagen. Das revidierte Manuskript wird im 'International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology' unter dem Titel '*Massilia norwichensis* sp. nov., isolated from an air sample', erscheinen.

17. *M. aerilata* DSM 19289^T Kolonietypen „A” & „B”

Die Spezies *M. aerilata* DSM 19289^T wies die zwei verschiedenen Kolonietypen „A” und „B” in Reinkultur auf (Peter Kämpfer, persönliche Mitteilung). Aufgrund von Beobachtungen von Koloniedimorphismen bei Spezies des Genus *Massilia* (Kap. 11) bestand die Annahme, dass es sich bei den Kolonietypen DSM 19289^T „A” und „B” trotz des beobachteten Koloniedimorphismus, welcher üblicherweise ein Indiz für unterschiedliche Spezies darstellt, um dieselbe Spezies handeln könnte.

17.1. Koloniemorphologie

M. aerilata DSM 19289^T „A” wies nach dreitägiger Inkubation auf 1/10 PYE Agar bei 28 °C, 40 % rel. Feuchte ca. 1 mm große, punktförmige, glänzende, halbdurchsichtige Kolonien mit glattem Rand, glatter Oberfläche und leicht knopfförmigen Profil auf. Das Zentrum der Kolonien war gelblich pigmentiert. Der Randbereich der Kolonien war hellgelb pigmentiert und wies einen dunkelgelb pigmentierten Ring auf. Dieser Verlauf der Pigmentierung war vor allem bei Einzelkolonien im dritten Sektor des Verdünnungsausstriches vorhanden. Einzelkolonien im zweiten Sektor waren einheitlich gelb pigmentiert.

Kolonien von *M. aerilata* DSM 19289^T „B” unterschieden sich nur in ihrer Pigmentierung von den Kolonien von *M. aerilata* DSM 19289^T „A”. Unter analogen Kultivierungsbedingungen wiesen die Kolonien der Kolonievariante DSM 19289^T „B” im Zentrum einen runden, dunkleren nicht scharf abgegrenzten, ocker pigmentierten Bereich auf, welcher in eine hellockerfarbene Pigmentierung überging. Im flächigen Wachstum in Bereichen mit erhöhter Nährstoffkonkurrenz wiesen die Kolonien eine hellere Pigmentierung auf. Bei der Kultivierung auf 1/10 und PYE Agar wurden bei DSM 19289^T „A” und „B” gleiche Lebensspannen beobachtet (Abschn. 7.1). In der PYE Bouillon wuchsen beide Kolonievarianten unter Flockenbildung.

17.2. Chemotaxonomische Untersuchungen

Es soll vorab erwähnt werden, dass die bei *M. aerilata* DSM 19289^T „A“ und „B“ durchgeführte Untersuchung des Chinonsystems und der Muster der Polyamine und der polaren Lipide in erster Linie zur chemotaxonomischen Charakterisierung von Vertretern des Genus *Massilia* / *Telluria* durchgeführt wurde. Diese Methoden sind nicht oder nur bedingt, wie z.B. das Muster der polaren Lipide (Tab. 12.2; 12.3), zur Unterscheidung von Spezies des *Massilia* / *Telluria* Clusters geeignet.

17.2.1. Chinone, polare Lipide und Polyamine

Die HPLC Analyse der Chinonsysteme von *M. aerilata* DSM 19289^T „A“ und „B“ ergab nahezu gleiche Mengen an Chinonen Q-7 (0.1 %), Q-8 (98.9 %) und Q-9 (1.0 %) bei Mengenabweichungen im hundertstel der Nachkommastelle. Diese Methode ist zusammen mit dem Muster der Polyamine bei dieser Bakteriengruppe auf den taxonomischen Level der Klasse beschränkt. Das Muster der Polyamine wurde deshalb lediglich beim Kolonietyp DSM 19289^T „A“ stellvertretend für beide Kolonietypen untersucht. Die Hauptkomponenten stellten die Polyamine Putrescin und 2-Hydroxyputrescin dar, gefolgt von deutlich kleineren Anteilen von in abnehmender Reihenfolge detektierten Polyaminen Spermidin, Spermin und 1,3-Diaminopropan (Tab. 12.1).

Das Muster der polaren Lipide beider Kolonietypen bestand aus den Hauptkomponenten Diphosphatidylglycerol (DPG), Phosphatidylethanolamin (PE) und Phosphatidylglycerol (PG) sowie aus in geringen Mengen detektierten, nicht identifizierten Lipid L1 und einem in moderaten Mengen nachgewiesenen nicht identifizierten Aminolipid AL1 (Abb. 17.1). Im Profil der Lipide des Kolonietyps DSM 19289^T „B“ wurden außerdem jeweils Spuren des nicht identifizierten Lipids L2 und des nicht identifizierten Aminolipids AL2 nachgewiesen, welche aber beim Kolonietyp DSM 19289^T „A“ nicht detektiert wurden. Dieser Unterschied im Muster der polaren Lipide kann in der unterschiedlichen Konzentration des Lipids im Extrakt begründet sein.

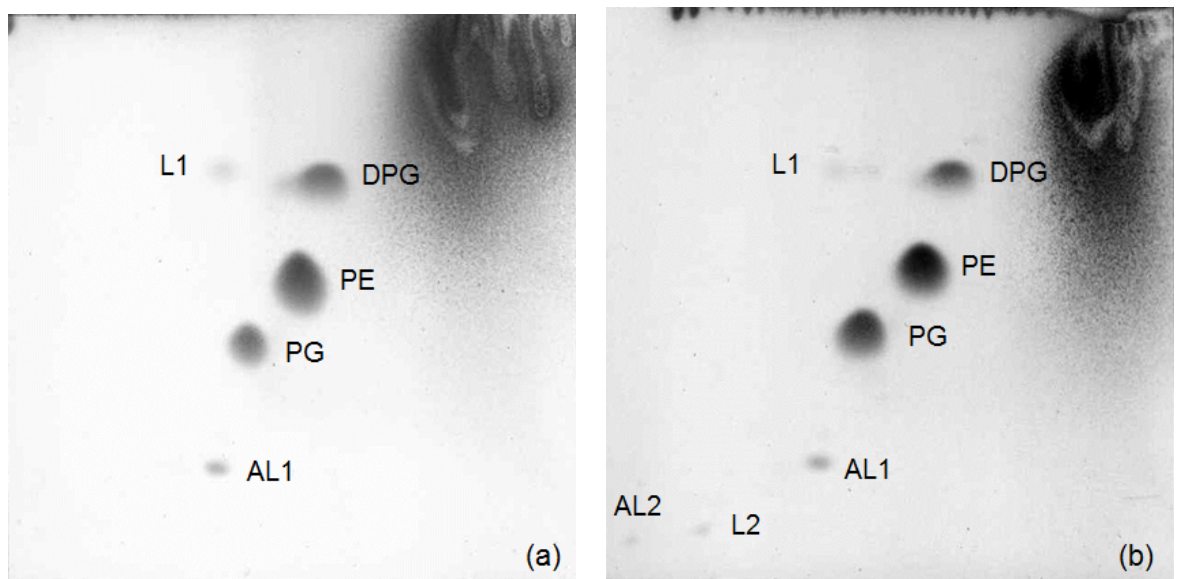


Abbildung 17.1.: Muster der polaren Lipide der Kolonietypen (a) *M. aerilata* DSM 19289^T „A“ und (b) *M. aerilata* DSM 19289^T „B“ nach zweidimensionaler Dünnschichtchromatographie und Färbung mit Molybdätophosphorsäure. Abkürzungen: DPG, Diphosphatidylglycerol; PE, Phosphatidylethanolamin; PG, Phosphatidylglycerol; L1-2, nicht identifizierte polare Lipide, die ausschließlich in der Gesamtlipidfärbung detektiert wurden; AL1-2, nicht identifizierte Aminolipide.

17.3. Molekularbiologische Untersuchungen

17.3.1. Analyse des partiellen *gyrB* Gens

Mit dem Ziel, die Verwandtschaft der Kolonietypen von *M. aerilata* DSM 19289^T „A“ und „B“ auf dem taxonomischen Level der Spezies zu untersuchen, wurde von beiden Kolonietypen das *gyrB* Gen partiell sequenziert. Ein Vergleich der *gyrB* Sequenzen beider Kolonietypen offenbarte bis auf das Vorhandensein eines Dimorphismus eine Übereinstimmung von 498 Bp. In Bezug auf die Literatursequenz AY996864 lag der Dimorphismus an der Nukleotidposition 748. Der Kolonietyp DSM 19289^T „A“ wies an dieser Stelle ein Cytosin auf, während beim Kolonietyp DSM 19289^T „B“ ein Guanosin eingelesen wurde. Dieser Polymorphismus ist jedoch mit großer Wahrscheinlichkeit auf eine Kontamination der Template mit unspezifischen PCR-Produkten zurückzuführen. Das Sequenzierungschromatogramm des Kolonietyps DSM 19289^T „A“ wies ein hohes Hintergrundrauschen auf, welches die Interpretation erschwerte und zur Kürzung der Sequenz auf 498 Bp führte.

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten *Massilia* und *Telluria* Spezies sowie weitere näher zum Genus *Massilia* verwandte Spezies, welche ebenfalls zur Familie *Oxalobacteraceae* gehören, wie *Duganella zoogloeoides* IAM 12670^T, *Pseudoduganella violaceinigra* YIM 31327^T, *Undibacterium oligocarboniphilum* CCUG 57265^T, *Herbaspirillum canariense* SUEMI03^T, *Herbaspirillum soli* SUEMI10^T, *Herbaspirillum aurantiacum* SUEMI08^T wiesen alle an dieser Position ein Guanosin auf. Daher ist anzunehmen, dass diese Position innerhalb der *Massilia*/*Telluria* Gruppe konserviert sein könnte. Deshalb ist beim Kolonietyp DSM 19289^T „A“ mit größter Wahrscheinlichkeit ein Guanosin an diese Position zu setzen. Daraus ergaben sich zwischen den Kolonietypen DSM 19289^T „A“ und „B“ identische partielle *gyrB* Sequenzbereiche von 498 Bp. Da sich die partielle *gyrB* Sequenz (810 Bp) zur Unterscheidung von Spezies im Genus *Massilia* eignet (ermittelte Speziesgrenze 97.6 %), (Tab. 12.4), stellt dies ein Indiz für eine Spezies dar.

17.3.2. 'Enterobacterial repetitive intergenic consensus' PCR

Um die durch identische partielle *gyrB* Sequenz angedeutete Spezies-Identität zu bestätigen, wurde eine ERIC-PCR, welche meist zur Unterscheidung von Spezies und manchmal auch von Stämmen derselben Spezies herangezogen wird (Wieser & Busse, 2000) durchgeführt. Diese zeigte bei den Kolonietypen DSM 19289^T „A“ und „B“ ein identisches Bandenmuster. Zum Vergleich wurde die Spezies *M. timonae* CCUG 45783^T untersucht, zu welcher sich klare Unterschiede im Bandenmuster und

somit zu einer anderen Spezies des Genus *Massilia* zeigten (Abb. 17.2). Deshalb kann zusammen mit dem Ergebnis des Vergleichs der partiellen *gyrB* Nukleotidsequenz, der identische Sequenzen in der Länge von 498 Bp aufzeigte, davon ausgegangen werden, dass es sich bei den Kolonietypen DSM 19289^T „A“ und „B“ um dieselbe Spezies handelt, welche aber eine unterschiedliche Pigmentierung der Kolonien aufweist.

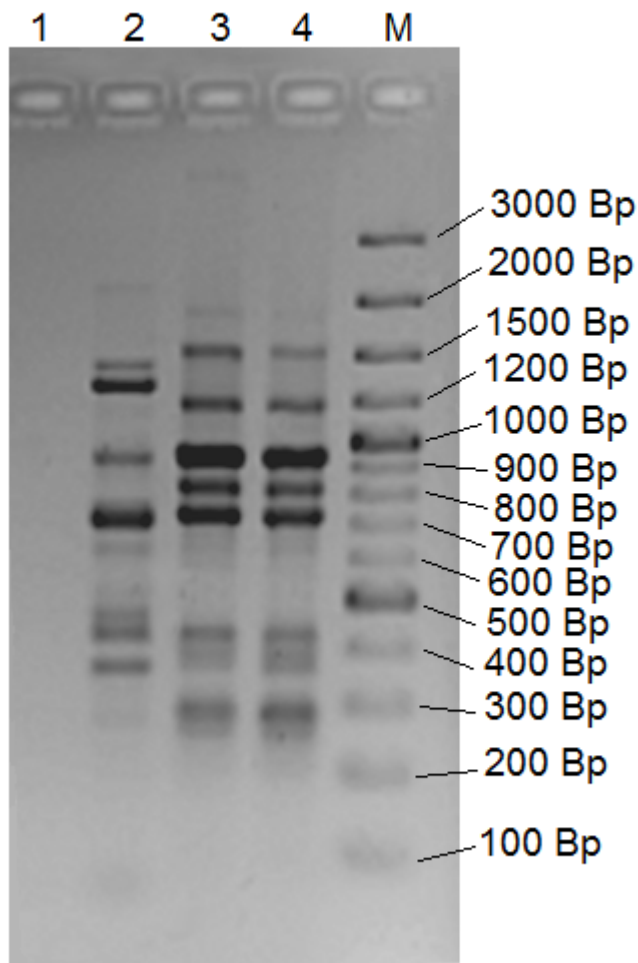


Abbildung 17.2.: Genomische Fingerabdrücke nach der ERIC-PCR von *M. aerilata* DSM 19289^T Kolonietypen „A“ und „B“. Bahn (1) negative Kontrolle ohne DNA Template; (2) *M. timonae* CCUG 45783^T; (3) *M. aerilata* DSM 19289^T „A“; (4) *M. aerilata* DSM 19289^T „B“; (M) Größenstandard GeneRulerTM 100 Bp Plus DNA Ladder.

Teil IV.
Zusammenfassung

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit aus der Analyse der polaren Lipide und der partiellen *gyrB* und *lepA* Haushaltsgene von *Telluria chitinolytica* CIP 104069^T und *Telluria mixta* CCUG 35206^T stellen Indizien für eine Zusammenführung der Genera *Massilia* und *Telluria* dar. Eine Differenzierung zwischen den Genera *Massilia* und *Telluria* war anhand der Muster der polaren Lipide nicht möglich. Die Muster der polaren Lipide der *Telluria* wiesen die Hauptkomponenten Diphosphatidylglycerol, Phosphatidylglycerol und Phosphatidylethanolamin in Übereinstimmung mit den Charakteristika der Muster der polaren Lipide von *Massilia* Spezies auf. Nahezu alle in den Profilen der polaren Lipide der *Telluria* Spezies detektierte Lipide wurden ebenfalls bei den in die Analyse einbezogenen *Massilia* Referenzstämmen detektiert. Darüber hinaus konnten keine ausschließlich den *Telluria* gemeinsame polare Lipide, welche ihre Positionierung als separaten Genus gegenüber dem Genus *Massilia* absichern würden, nachgewiesen werden. Bei der Analyse der partiellen *gyrB* und *lepA* Nukleotid- und Aminosäuresequenzen von *T. chitinolytica* CIP 104069^T und *T. mixta* CCUG 35206^T zeigten sich zu den miteinbezogenen Vertretern des Genus *Massilia* höhere Sequenzähnlichkeiten als zu den Vertretern nah verwandter Genera *Duganella* und *Pseudoduganella*. Die Nukleotid- und Aminosäuresequenzähnlichkeiten in den *gyrB* und *lepA* Gensequenzen beider *Telluria* lagen bei minimalen Abweichungen innerhalb der für *Massilia* Spezies beobachteten Schwankungsbreite. Hierbei wies die *gyrB* und *lepA* Nukleotid- und Aminosäuresequenz von *T. chitinolytica* CIP 104069^T höchste Sequenzähnlichkeiten zu jener von *M. plicata* DSM 17505^T auf. Die nahe Verwandtschaft von *T. chitinolytica* CIP 104069^T und *M. plicata* DSM 17505^T konnte außerdem in nahezu allen *gyrB* und *lepA* Stammbäumen durch eine gemeinsame Clusterung bei signifikanter bootstrap Unterstützung (75 - 100 %) untermauert werden. *T. mixta* CCUG 35206^T zeigte höchste *gyrB* und *lepA* Sequenzähnlichkeiten zu *M. tieshanensis* KACC 14940^T und in den korrespondierenden Aminosäuresequenzen zu *M. consociata* CCUG 58010^T. In der Mehrzahl der *gyrB* und *lepA* Stammbäume clusterte *T. mixta* CCUG 35206^T bei zum Teil signifikanten bootstrap Werten (71 - 98 %) mit den Vertretern des Genus *Massilia*, in der Nähe von *M. consociata* CCUG 58010^T, *M. tieshanensis* KACC 14940^T, *M. niastensis* KACC 12599^T und *M. aerilata* DSM 19289^T, welche auch anhand der 16S rRNA untereinander nah verwandt sind (Du *et al.*, 2012). Die Analyse der resequenzierten 16S rRNA Gensequenzen (1330 Bp) von *T. chitinolytica* CIP 104069^T und *T. mixta* CCUG 35206^T bestätigte die Notwendigkeit einer Zusammenführung der Genera *Massilia* und *Telluria*. Beide *Telluria* zeigten zu den *Massilia* Spezies 16S rRNA Sequenzähnlichkeiten innerhalb der zwischen Spezies des Genus *Massilia* beobachteten Schwankungsbreite. Hierbei wies *T. mixta* CCUG 35206^T höchst-

te Sequenzähnlichkeiten zu *M. brevitalea* byr23-80^T (98.1 %) und *M. suwonensis* 5414S-25^T (98.0 %) auf. In den 16S rRNA Stammbäumen (1330 Bp) wies *T. mixta* CCUG 35206^T die gleichen phylogenetischen Nachbarn *M. suwonensis* 5414S-25^T und *M. niabensis* 5420S-26^T auf, jedoch waren die Verwandtschaftsgrade nicht durch signifikante bootstrap Werte zu den Verzweigungen untermauert. Die resequenzierte 16S rRNA Gensequenz von *T. chitinolytica* CIP 104069^T zeigte höchste Sequenzähnlichkeiten zu *M. plicata* 76^T (98.6 %). In den 16S rRNA Stammbäumen (maximum-likelihood und neighbour-joining) clusterte *T. chitinolytica* CIP 104069^T mit *M. plicata* 76^T mit signifikanter bootstrap Unterstützung von (67 - 77 %) bei der Verzweigung und kürzestem phylogenetischen Abstand. Anhand der partiellen 16S rRNA, *gyrB* und *lepA* Gensequenzen stellen die nächsten Verwandten der *Telluria* Spezies somit Vertreter des Genus *Massilia* dar. Die *Telluria* Spezies sind nicht die nächst Verwandten.

Ferner können die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Isolate NS9, *Oxalobacteraceae* bacterium Ma und E-JS-7 als neue Spezies des *Massilia*/*Telluria* Clusters angesehen werden. Die partiellen Sequenzähnlichkeitswerte der 16S rRNA, *lepA* und *gyrB* Gene lagen für alle drei Isolate unterhalb der für *Massilia* und *Telluria* Vertreter beobachteten Grenzen zur Separierung von Spezies. Basierend auf den 16S rRNA Sequenzähnlichkeiten sowie den 16S rRNA Stammbäumen stellt die Spezies *T. mixta* CCUG 35206^T den nächsten Verwandten des Isolats *Oxalobacteraceae* bacterium Ma; *M. aerilata* 5516S-11^T den nächsten Verwandten des Isolats NS9 und *T. chitinolytica* CIP 104069^T die nächst verwandte Spezies des Isolats E-JS-7 dar. Bei allen drei Isolaten konnte die Verwandtschaft durch 16S rRNA Sequenzähnlichkeiten (>97.0 %), sowie durch eine in 16S rRNA Stammbäumen gemeinsame Clustierung mit der jeweiligen Spezies untermauert werden. Hierbei wurde im neighbour-joining 16S rRNA Stammbaum zwischen *T. mixta* CCUG 35206^T und dem Isolat *Oxalobacteraceae* bacterium Ma bzw. zwischen *T. chitinolytica* CIP 104069^T und dem Isolat E-JS-7 eine signifikante bootstrap Unterstützung (70 % bzw. 67 %) für die jeweilige Verzweigung erhalten. Die Zugehörigkeit der Isolate *Oxalobacteraceae* bacterium Ma, NS9 und E-JS-7 zum *Massilia*/*Telluria* Cluster konnte auch anhand der partiellen *lepA* und *gyrB* Nukleotid- und Aminosäuresequenzähnlichkeiten und in den korrespondierenden Stammbäumen gezeigt werden, in welchen sich teilweise mit dem 16S rRNA Gen übereinstimmende Positionierungen innerhalb des *Massilia*/*Telluria* Clusters ergaben. Lediglich die *gyrB* und *lepA* Nukleotid- und Aminosäuresequenz von E-JS-7 wies zum Teil höhere Sequenzähnlichkeiten zu den korrespondierenden *gyrB* und *lepA* Sequenzen der mit den Genera *Massilia* und *Telluria* eng verwandten Spezies *Pseudoduganella violaceinigra* YIM 31327^T auf,

als zu den in die Analyse miteinbezogenen *Massilia* und *Telluria* Spezies. In einzelnen *gyrB* und *lepA* Stammbäumen ergab sich für E-JS-7 und *Pseudoduganella violaceinigra* YIM 31327^T eine gemeinsame Clusterung bei signifikanten bootstrap Werten (97 - 99 %). Die Muster der polaren Lipide aller drei Isolate wiesen die für Vertreter des Genus *Massilia* typischen Hauptkomponenten sowie weitere mit den *Massilia* und *Telluria* Referenzstämmen gemeinsame polare Lipide auf. Dies sicherte besonders die Klassifizierung des Isolats E-JS-7 zum Cluster *Massilia*/*Telluria* ab, da der Vergleich der Muster der polaren Lipide mit jenem der Typspezies des Genus *Pseudoduganella*, *P. violaceinigra* YIM 31327^T Unterschiede aufzeigte. Im Gegensatz zu *Massilia* und *Telluria* Spezies, bei welchen Diphosphatidylglycerol eine der Hauptkomponenten im Muster der polaren Lipide darstellt, konnte Diphosphatidylglycerol bei *P. violaceinigra* YIM 31327^T bislang nur in geringen Mengen nachgewiesen werden. Außerdem enthält das Muster der polaren Lipide von *P. violaceinigra* YIM 31327^T Phosphatidylserin, welches bei *Massilia* und *Telluria* Spezies bislang nicht detektiert wurde (Kämpfer *et al.*, 2011; Rodríguez-Díaz *et al.*, 2014; Shen *et al.*, 2013; Kong *et al.*, 2013; Weon *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2012; Du *et al.*, 2012; Gallego *et al.*, 2006; Kämpfer *et al.*, 2008, 2012b; Madhaiyan *et al.*, 2013).

Abstract

The results of this study obtained from the analysis of polar lipids and partial *gyrB* and *lepA* housekeeping genes of *Telluria chitinolytica* CIP 104069^T and *Telluria mixta* CCUG 35206^T form a basis for merging of the genera *Massilia* and *Telluria*. Differentiation between the genera *Massilia* and *Telluria* was not possible on the basis of their polar lipid patterns. The polar lipid patterns of *Telluria* species showed diphosphatidylglycerol, phosphatidylglycerol and phosphatidylethanolamine in major amounts in accordance with the polar lipid characteristics of *Massilia* species. Almost all polar lipids found in the *Telluria* species could also be detected in *Massilia* reference strains, as well. In addition, no *Telluria* specific polar lipids could be detected, which would support their status as a separate genus. The partial *gyrB* and *lepA* nucleotide and corresponding protein sequences of *T. chitinolytica* CIP 104069^T and *T. mixta* CCUG 35206^T showed higher sequence similarities to certain members of the genus *Massilia* than to each other or representatives of closely related genera such as *Duganella* and *Pseudoduganella*. *T. chitinolytica* CIP 104069^T showed highest *gyrB* and *lepA* nucleotide and protein sequence similarities to that of *M. plicata* DSM 17505^T. The close relationship of *T. chitinolytica* CIP 104069^T and *M. plicata* DSM 17505^T was substantiated in almost all generated *gyrB* and *lepA* phylogenetic trees and supported from high bootstrap values (75 - 100 %). *T. mixta* CCUG 35206^T showed highest *gyrB* and *lepA* partial nucleotide sequence similarities to *M. tieshanensis* KACC 14940^T and in the corresponding protein sequences to *M. consociata* CCUG 58010^T. In the majority of the *gyrB* and *lepA* phylogenetic trees, *T. mixta* CCUG 35206^T clustered by partly significant bootstrap values (71 - 98 %) within the *Massilia* species in the vicinity of *M. consociata* CCUG 58010^T, *M. tieshanensis* KACC 14940^T, *M. niastensis* KACC 12599^T and *M. aerilata* DSM 19289^T, which appear to be closely related to each other on the basis of 16S rRNA phylogeny (Du *et al.*, 2012). The analysis of the re-sequenced partial 16S rRNA gene sequences (1330 bp) of *T. chitinolytica* CIP 104069^T and *T. mixta* CCUG 35206^T confirmed the necessity to merge the genera *Massilia* and *Telluria*. Both *Telluria* species showed to all established *Massilia* species 16S rRNA sequence similarity values within the range of variation also found among species of the genus *Massilia*. The partial 16S rRNA gene sequence of *T. mixta* CCUG 35206^T exhibited highest sequence similarity values to *M. brevitalea* byr23-80^T (98.1 %) and *M. suwonensis* 5414S-25^T (98.0 %). In 16S rRNA phylogenetic trees (1330 bp) *M. suwonensis* 5414S-25^T and *M. niabensis* 5420S-26^T were the nearest phylogenetic neighbours of *T. mixta* CCUG 35206^T, although the branching knots were not supported from significant bootstrap values. The re-sequenced partial 16S rRNA gene

sequence of *T. chitinolytica* CIP 104069^T showed highest sequence similarities to those of *M. plicata* 76^T (98.6 %). In 16S rRNA phylogenetic trees (maximum-likelihood and neighbour-joining) *T. chitinolytica* CIP 104069^T clustered with *M. plicata* 76^T by significant bootstrap values (67 - 77 %) and shortest phylogenetic distance. Thus, on the basis of 16S rRNA, *gyrB* and *lepA* gene sequences, the closest relatives of both *Telluria* species were representatives of the genus *Massilia*. Hence, the two *Telluria* species are not closest relatives.

Furthermore, the isolates NS9, *Oxalobacteraceae* bacterium Ma and E-JS-7 should be considered as new species of the *Massilia*/*Telluria* group. The partial sequence similarities in 16S rRNA, *gyrB* and *lepA* genes identified members of the *Massilia*/*Telluria* group as next relatives. Based on 16S rRNA (1327 bp) sequence similarities (>97.0 %) and 16S rRNA (1327 bp) based phylogenetic analyses, the species *T. mixta* CCUG 35206^T was shown to be the closest relative of the isolate *Oxalobacteraceae* bacterium Ma; *M. aerilata* 5516S-11^T to be the closest relative of the isolate NS9 and *T. chitinolytica* CIP 104069^T to be the closest related species of the isolate E-JS-7. Further support for the high levels of relatedness was provided in the neighbour-joining 16S rRNA tree by high bootstrap values for branching of *T. mixta* CCUG 35206^T with the isolate *Oxalobacteraceae* bacterium Ma and *T. chitinolytica* CIP 104069^T with the isolate E-JS-7 (70 and 67 %), respectively. The affiliation of the isolates *Oxalobacteraceae* bacterium Ma, NS9 and E-JS-7 to the *Massilia*/*Telluria* group could also be demonstrated on the basis of partial *lepA* and *gyrB* nucleotide and protein sequence similarities and corresponding phylogenetic trees. The phylogenetic positioning of the isolates *Oxalobacteraceae* bacterium Ma, NS9 and E-JS-7 within the *gyrB* and *lepA* nucleotide and protein phylogenetic trees matched quite well to the 16S rRNA phylogeny, though several exceptions were found. Only the *gyrB* and *lepA* nucleotide and protein sequences of E-JS-7 showed partly even higher sequence similarity values to the closely related species *Pseudoduganella violaceinigra* YIM 31327^T, than to *Massilia* and *Telluria* species. In some *gyrB* and *lepA* phylogenetic trees, E-JS-7 and *Pseudoduganella violaceinigra* YIM 31327^T showed a common branching by significant bootstrap values (97 - 99 %). The polar lipid pattern of the isolates *Oxalobacteraceae* bacterium Ma, NS9 and E-JS-7 showed diposphatidylglycerol, phosphatidylethanolamine and phosphatidylglycerol in major amounts, as has been shown for species of the genus *Massilia*. Moreover, multiple matches in the polar lipid patterns between the three isolates and the *Massilia*/*Telluria* reference strains could be detected. This secured especially the classification of the isolate E-JS-7 to the *Massilia*/*Telluria* cluster, since the comparison of the lipid pattern with that of the type species of the genus *Pseudoduganella*, *P. violacei-*

nigra YIM 31327^T pointed out differences. In contrast to *Massilia* species, in which diphosphatidylglycerol is one of the main components in the polar lipid pattern, in *P. violaceinigra* YIM 31327^T diphosphatidylglycerol has only been detected in small amounts. In addition, the polar lipid pattern of *P. violaceinigra* YIM 31327^T shows phosphatidylserine which could not be detected in *Massilia* and *Telluria* species so far (Kämpfer *et al.*, 2011; Rodríguez-Díaz *et al.*, 2014; Shen *et al.*, 2013; Kong *et al.*, 2013; Weon *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2012; Du *et al.*, 2012; Gallego *et al.*, 2006; Kämpfer *et al.*, 2008, 2012b; Madhaiyan *et al.*, 2013).

Teil V.

Literaturverzeichnis

Literaturverzeichnis

- Altenburger, P., Kämpfer, P., Akimov, V., Lubitz, W. & Busse, H.-J. (1997).** Polyamine Distribution in Actinomycetes with Group B Peptidoglycan and Species of the Genera *Brevibacterium*, *Corynebacterium* and *Tsukamurella*. *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.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D. J. (1997).** Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**, 3389–3402.
- Bachrach, U. (2005).** Naturally Occurring Polyamines: Interaction with Macromolecules. In *Current Protein & Peptide Science*, Seiten 559–566. Bentham Science Publishers.
- Berger, J. M. & Wang, J. C. (1996).** Recent developments in DNA topoisomerase II structure and mechanism. *Curr Opin Struct Biol* **6**, 84–90.
- Bowman, J. P., Sly, L. I., Hayward, A. C., Spiegel, Y. & Stackebrandt, E. (1993).** *Telluria mixta* (*Pseudomonas mixta* Bowman, Sly and Hayward 1988) gen. nov., comb. nov., and *Telluria chitinolytica* sp. nov., Soil-Dwelling Organisms Which Actively Degrade Polysaccharides. *Int J Syst Bacteriol* **43**, 120–124.
- Busse, H.-J. (2011).** Polyamines. In *Taxonomy of Prokaryotes, Methods in Microbiology*, editiert von F. Rainey & A. Oren, Seiten 239–260. Elsevier Ltd.
- Busse, H.-J. & Auling, G. (1988).** Polyamine Pattern as a Chemotaxonomic Marker within the *Proteobacteria*. *Syst Appl Microbiol* **11**, 1–8.
- Busse, H.-J., Denner, E. B. M. & 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.

- Cohen, S. S. & Lichtenstein, J. (1960).** Polyamines and Ribosome Structure. *J Biol Chem* **235**, 2112–2116.
- Collins, M. D. & Jones, D. (1981).** Distribution of Isoprenoid Quinone Structural Types in Bacteria and Their Taxonomic Implications. *Microbiol Rev* **45**, 316–354.
- Du, Y., Yu, X. & Wang, G. (2012).** *Massilia tieshanensis* sp. nov., isolated from mining soil. *Int J Syst Evol Microbiol* **62**, 2356–2362.
- Fischer, W., Landgraf, H. R. & Herrmann, J. (1973).** Phosphatidyl-diglycosyl diglyceride from *Streptococci* and its relationship to other polar lipids. *Biochim Biophys Acta* **306**, 353–367.
- Fox, G. E., Wisotzkey, J. D. & Jurtschuk, P. J. (1992).** How Close Is Close: 16S rRNA Sequence Identity May Not Be Sufficient To Guarantee Species Identity. *Int J Syst Bacteriol* **42**, 166–170.
- Gallego, V., Sánchez-Porro, C., Garcia, M. T. & Ventosa, A. (2006).** *Massilia aurea* sp. nov., isolated from drinking water. *Int J Syst Evol Microbiol* **56**, 2449–2453.
- Geiger, L. E. & Morris, D. R. (1978).** Polyamine Deficiency Reduces the Rate of DNA Replication Fork Movement in *Escherichia coli*. *Nature* **272**, 730–732.
- 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.
- 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.
- Hiraishi, A., Shin, Y. K. & Sugiyama, J. (1997).** Proposal To Reclassify *Zoogloea ramigera* IAM 12670 (P. R. Dugan 115) as *Duganella zoogloeoides* gen. nov., sp. nov.. *Int J Syst Bacteriol* **47**, 1249–1252.
- Huang, W. M. (1996).** Bacterial diversity based on type II DNA topoisomerase genes. *Annu Rev Genet* **30**, 79–107.
- Hulton, C. S., Higgins, C. F. & Sharp, P. M. (1991).** ERIC sequences: a novel family of repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and other enterobacteria. *Mol Microbiol* **5**, 825–834.

- Imhoff, J. F., Kushner, D. J., Kushwaha, S. C. & Kates, M. (1982).** Polar lipids in phototrophic bacteria of the *Rhodospirillaceae* and *Chromatiaceae* families. *J Bacteriol* **150**, 1192–1201.
- Janda, J. M. & Abbott, S. L. (2007).** 16S rRNA Gene Sequencing for Bacterial Identification in the Diagnostic Laboratory: Pluses, Perils, and Pitfalls. *J Clin Microbiol* **45**, 2761–2764.
- Jeršek, B., Gilot, P., Gubina, M., Klun, N., Mehle, J., Tcherneva, E., Rijpens, N. & Herman, L. (1999).** Typing of *Listeria monocytogenes* Strains by Repetitive Element Sequence-Based PCR. *J Clin Microbiol* **37**, 103–109.
- Jones, D. T., Taylor, W. R. & Thornton, J. M. (1992).** The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. *Comput Appl Biosci* **8**, 275–282.
- Kates, M. (1990).** *Glycolipids, Phosphoglycolipids and Sulfoglycolipids*. New York: Plenum Press, Seiten 125–126.
- Kehrer, J. P. & Biswal, S. S. (2000).** The Molecular Effects of Acrolein. *Tox Sci* **57**, 6–15.
- Kibbe, W. A. (2007).** OligoCalc: an online oligonucleotide properties calculator. *Nucleic Acids Res* **35**(webserver issue).
- Kim, O.-S., Cho, Y.-J., Lee, K., Yoon, S.-H., Kim, M., Na, H., Park, S.-C., Jeon, Y. S., Lee, J.-H., Yi, H., Won, S. & Chun, J. (2012).** Introducing EzTaxon-e: a prokaryotic 16S rRNA Gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species. *Int J Syst Evol Microbiol* **62**, 716–721.
- Kimura, M. (1980).** A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol* **16**, 111 – 120.
- Kämpfer, P., Falsen, E. & Busse, H.-J. (2008).** *Naxibacter varians* sp. nov. and *Naxibacter haematophilus* sp. nov., and emended description of the genus *Naxibacter*. *Int J Syst Evol Microbiol* **58**, 1680–1684.
- Kämpfer, P., Lodders, N., Martin, K. & Falsen, E. (2011).** Revision of the genus *Massilia* La Scola *et al.* 2000, with an emended description of the genus and inclusion of all species of the Genus *Naxibacter* as new combinations, and proposal of *Massilia consociata* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* **61**, 1528–1533.

- Kämpfer, P., Lodders, N., Martin, K. & Falsen, E. (2012a).** *Massilia oculi* sp. nov., isolated from a human clinical specimen. *Int J Syst Evol Microbiol* **62**, 364–369.
- Kämpfer, P., Wellner, S., Lohse, K., Martin, K. & Lodders, N. (2012b).** *Duganella phyllosphaerae* sp. nov., isolated from the leaf surface of *Trifolium repens* and proposal to reclassify *Duganella violaceinigra* into a novel genus as *Pseudoduganella violaceinigra* gen. nov., comb. nov. *Syst Appl Microbiol* **35**, 19–23.
- Kneifel, H., Stetter, K. O., Andreesen, J. R., Wiegel, J., König, H. & Schoberth, S. M. (1986).** Distribution of polyamines in representative species of archaeobacteria. *Syst Appl Microbiol* **7**, 241–245.
- Kong, B.-H., Li, Y.-H., Liu, M., Liu, Y., Li, C.-L., Liu, L., Yang, Z.-W. & Yu, R. (2013).** *Massilia namucuoensis* sp. nov., isolated from a soil sample. *Int J Syst Evol Microbiol* **63**, 352–357.
- La Scola, B., Birtles, R. J., Mallet, M. N. & Raoult, D. (1998).** *Massilia timonae* gen. nov., sp. nov., isolated from blood of an immunocompromised patient with cerebellar lesions. *J Clin Microbiol* **36**, 2847–2852.
- Lambert, M. A. & Moss, C. W. (1989).** Cellular fatty acid composition and isoprenoid quinone contents of 23 *Legionella* Species. *J Clin Microbiol* **27**, 465–473.
- Lane, D. J. (1991).** 16S/23S rRNA sequencing. In *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*, editiert von E. Stackebrandt & M. Goodfellow, Seiten 115–175. Chichester: Wiley.
- Lane, D. J., Pace, B., Olsen, G. J., Stahl, D. A., Sogin, M. L. & Pace, N. R. (1985).** Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. *Proc Natl Acad Sci USA* **82**, 6955–6959.
- Lechevalier, M. P., Bievre, C. D. & Lechevalier, H. (1977).** Chemotaxonomy of aerobic Actinomycetes: Phospholipid composition. *Biochem Syst Ecol* **5**, 249–260.
- Luo, X., Xie, Q., Wang, J., Pang, H., Fan, J. & Zhang, J. (2013).** *Massilia lurida* sp. nov., isolated from soil. *Int J Syst Evol Microbiol* **63**, 2118–2123.
- Madhaiyan, M., Poonguzhali, S., Saravanan, V. S., Hari, K., Lee, K.-C. & Lee, J.-S. (2013).** *Duganella sacchari* sp. nov. and *Duganella radialis* sp. nov.,

- two novel species isolated from rhizosphere of field-grown sugar cane. *Int J Syst Evol Microbiol* **63**, 1126–1131.
- Mannheim, W., Stieler, W., Wolf, G. & Zabel, R. (1978).** Taxonomic Significance of Respiratory Quinones and Fumarate Respiration in *Actinobacillus* and *Pasteurella*. *Int J Syst Bacteriol* **28**, 7–13.
- Nei, M. & Kumar, S. (2000).** *Molecular Evolution and Phylogenetics*. New York: Oxford University Press.
- Papke, R. T., White, E., Reddy, P., Weigel, G., Kamekura, M., Minegishi, H., Usami, R. & Ventosa, A. (2011).** A multilocus sequence analysis approach to the phylogeny and taxonomy of the *Halobacteriales*. *Int J Syst Evol Microbiol* **61**, 2984–2995.
- Pearson, W. R. & Lipman, D. J. (1988).** Improved tools for biological sequence comparison. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 2444–2448.
- Peeters, K. & Willems, A. (2011).** The *gyrB* gene is a useful phylogenetic marker for exploring the diversity of *Flavobacterium* strains isolated from terrestrial and aquatic habitats in Antarctica. *FEMS Microbiol Lett* **321**, 130–140.
- Penkala, J., Law, M. D., Horaska, D. D. & Dickinson, A. L. (2004).** Acrolein 2-Propenal: A Versatile Microbiocide for Control of Bacteria in Oilfield Systems. In *Corrosion*. NACE International.
- Qin, Y., Polacek, N., Vesper, O., Staub, E., Einfeldt, E., Wilson, D. N. & Nierhaus, K. H. (2006).** The Highly Conserved LepA Is a Ribosomal Elongation Factor that Back-Translocates the Ribosome. *Cell* **127**, 721–733.
- Rodríguez-Díaz, M., Cerrone, F., Sánchez-Penaido, M., SantaCruz-Calvo, L., Pozo, C. & González-López, J. (2014).** *Massilia umbonata* sp. nov., able to accumulate poly- β -hydroxybutyrate, isolated from a sewage sludge compost-soil microcosm. *Int J Syst Evol Microbiol* **64**, 131–137.
- Scherer, P. & Kneifel, H. (1983).** Distribution of Polyamines in Methanogenic Bacteria. *J Bacteriol* **154**, 1315–1322.
- Shen, L., Liu, Y., Wang, N., Yao, T., Jiao, N., Liu, H., Zhou, Y., Xu, B. & Liu, X. (2013).** *Massilia yuzhufengensis* sp. nov., isolated from an ice core. *Int J Syst Evol Microbiol* **63**, 1285–1290.

- Stothard, P. (2000).** The sequence manipulation suite: JavaScript programs for analyzing and formatting protein and DNA sequences. *BioTechniques* **28**, 1102–1104.
- Tabor, C. W. & Tabor, H. (1966).** Transport Systems for 1,4-Diaminobutane, Spermidine, and Spermine in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **241**, 3714–3723.
- Tabor, C. W. & Tabor, H. (1985).** Polyamines in Microorganisms. *Microbiol Rev* **49**, 81–99.
- Tabor, H., Rosenthal, S. M. & Tabor, C. W. (1958).** The Biosynthesis of Spermidine and Spermine from Putrescine and Methionine. *J Biol Chem* **233**, 907–914.
- Tamura, K. & Nei, M. (1993).** Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol Biol Evol* **10**, 512 – 526.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. & Kumar, S. (2011).** MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* **28**, 2731–2739.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G. & Gibson, T. J. (1994).** CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* **22**, 4673–4680.
- Tindall, B. J. (1990a).** A Comparative Study of the Lipid Composition of *Halobacterium saccharovorum* from Various Sources. *Syst Appl Microbiol* **13**, 128–130.
- Tindall, B. J. (1990b).** Lipid Composition of *Halobacterium lacusprofundi*. *FEMS Microbiol Lett* **66**, 199–202.
- 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* **24**, 6823–6831.
- Wang, J.-W., Zhang, J.-L., Pang, H., Zhang, Y.-B., Li, Y.-Y. & Fan, J.-P. (2012).** *Massilia flava* sp. nov., isolated from soil. *Int J Syst Evol Microbiol* **62**, 580–585.

- Wang, L.-T., Lee, F.-L., Tai, C.-J. & Kasai, H. (2007). Comparison of gyrB gene sequences, 16S rRNA gene sequences and DNA-DNA hybridization in the *Bacillus subtilis* group. *Int J Syst Evol Microbiol* **57**, 1846–1850.
- Watt, P. M. & Hickson, I. D. (1994). Structure and function of type II DNA Topoisomerases. *J Biochem* **303**, 681–695.
- Weon, H.-Y., Kim, B.-Y., Hong, S.-B., Jeon, Y.-A., Koo, B.-S., Kwon, S.-W. & Stackebrandt, E. (2009). *Massilia niabensis* sp. nov. and *Massilia niastensis* sp. nov., isolated from air samples. *Int J Syst Evol Microbiol* **59**, 1656–1660.
- Weon, H.-Y., Kim, B.-Y., Son, J.-A., Jang, H. B., Hong, S. K., Go, S.-J. & Kwon, S.-W. (2008). *Massilia aerilata* sp. nov., isolated from an air sample. *Int J Syst Evol Microbiol* **58**, 1422–1425.
- Weon, H.-Y., Song, J., Kim, B.-Y., Hur, O.-S., Park, I.-C. & Sun, J.-W. (2011). Rapid discrimination of potato scab-causing *Streptomyces* species based on the RNase P RNA gene sequences. *J Microbiol* **49**, 791–796.
- Weon, H.-Y., Yoo, S.-H., Kim, S.-J., Kim, Y.-S., Anandham, R. & Kwon, S.-W. (2010). *Massilia jejuensis* sp. nov. and *Naxibacter suwonensis* sp. nov., isolated from air samples. *Int J Syst Evol Microbiol* **60**, 1938–1943.
- Wieser, M. & Busse, H.-J. (2000). Rapid Identification of *Staphylococcus epidermidis*. *Int J Syst Evol Microbiol* **50**, 1087–1093.
- Woese, C. R. (1987). Bacterial Evolution. *Microbiol Rev* **51**, 221–271.
- Young, J. M., Park, D. C., Shearman, H. M. & Fargier, E. (2008). A multilocus sequence analysis of the genus *Xanthomonas*. *Syst Appl Microbiol* **31**, 366–377.
- Zhang, Y. Q., Li, W.-J., Zhang, K.-Y., Tian, X.-P., Jiang, Y., Xu, L.-H., Jiang, C.-L. & Lai, R. (2006). *Massilia dura* sp. nov., *Massilia albidiflava* sp. nov., *Massilia plicata* sp. nov. and *Massilia lutea* sp. nov., isolated from soils in China. *Int J Syst Microbiol* **56**, 459–463.
- Zuckerkindl, E. & Pauling, L. (1965). Evolutionary divergence and convergence in protein. In *Evolving Genes and Proteins*, editiert von V. Bryson & H. J. Vogel, Seiten 97–166. New York: Academic Press.

- Zul, D., Wanner, G. & Overmann, J. (2008). *Massilia brevitalea* sp. nov., a novel betaproteobacterium isolated from lysimeter soil. *Int J Syst Evol Microbiol* **58**, 1245–1251.

Teil VI.
Anhang

A. 16S rRNA Stammbäume

A. 16S rRNA Stammbäume

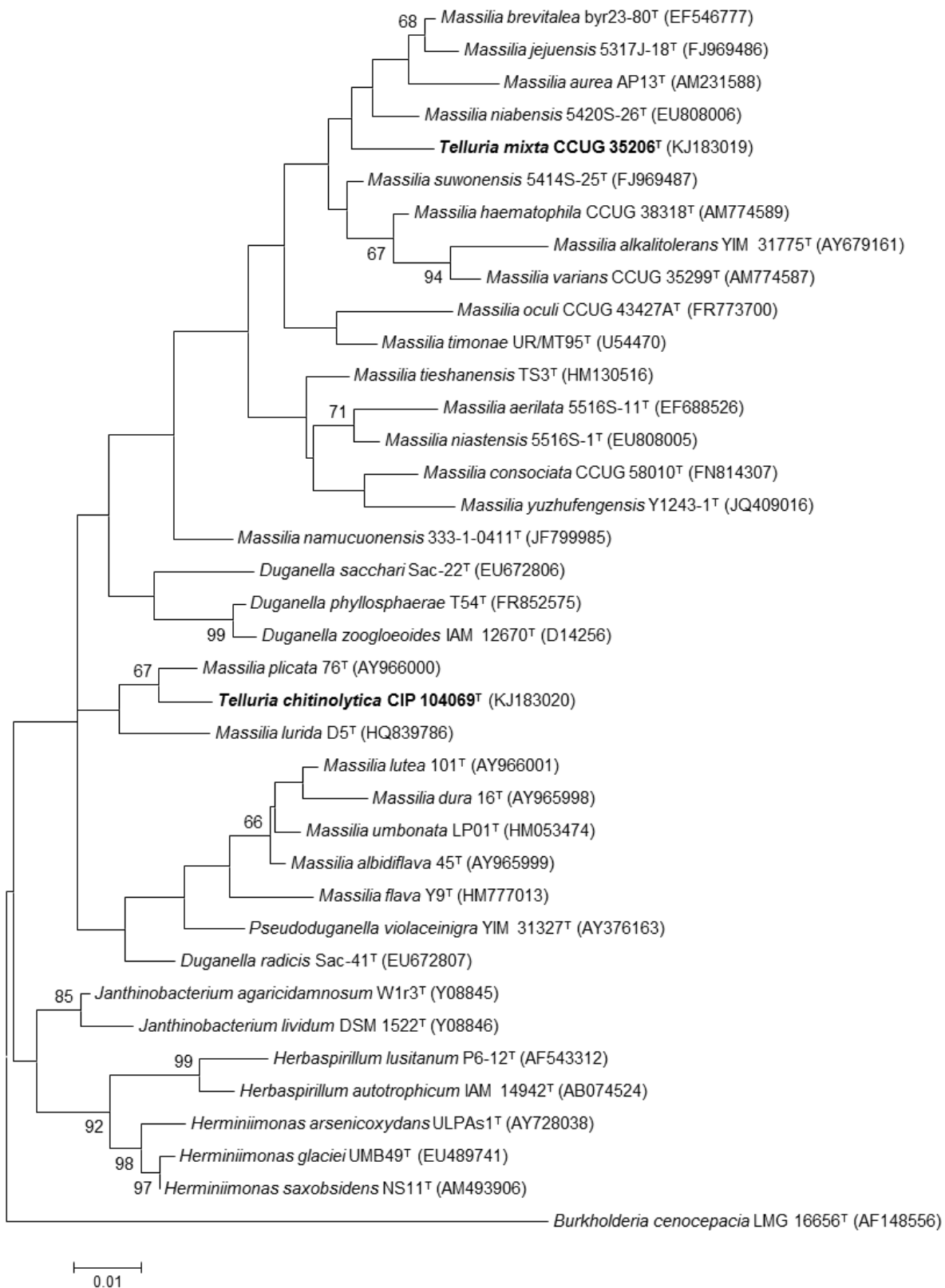


Abbildung A.1.: Maximum-likelihood Stammbaum unter Verwendung des Tamura-Nei Modells (Tamura & Nei, 1993) basierend auf bearbeiteten 16S rRNA Gensequenzen (1330 Bp) von *Massilia* und *Telluria* Spezies. Der Stammbaum wurde unter Benutzung von MEGA 5.2.2 (Tamura *et al.*, 2011) berechnet. Dargestellt sind nur bootstrap Werte ≥ 65 %. Balken, 0.01 akkumulierte Substitutionen pro Nukleotid.

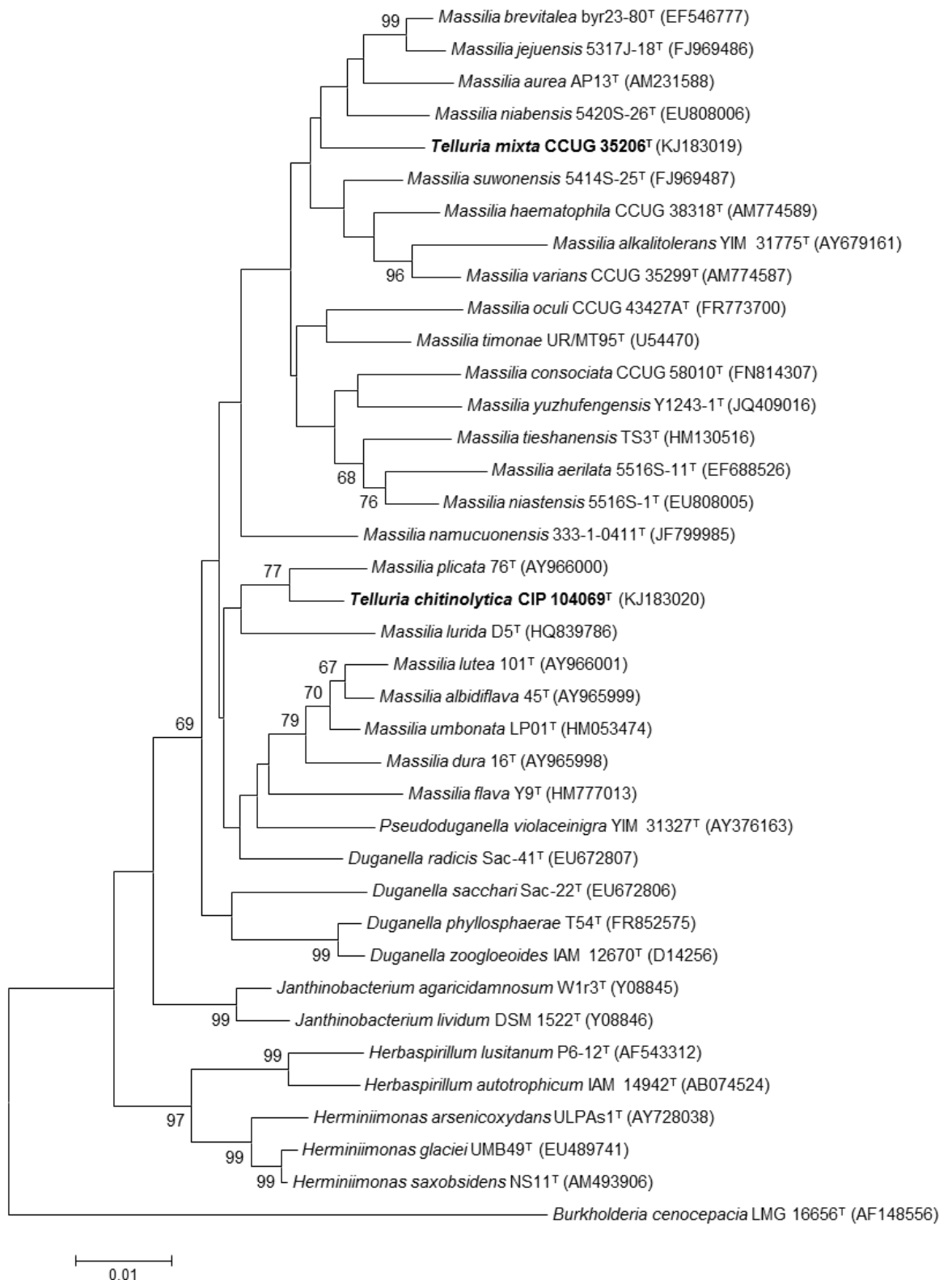


Abbildung A.2.: Neighbour-joining Stammbaum unter Verwendung des Kimura 2-Parameter Modells (Kimura, 1980) basierend auf bearbeiteten 16S rRNA Gensequenzen (1330 Bp) von *Massilia* und *Telluria* Spezies. Der Stammbaum wurde unter Benutzung von MEGA 5.2.2 (Tamura *et al.*, 2011) berechnet. Dargestellt sind nur bootstrap Werte ≥ 65 %. Balken, 0.01 akkumulierte Substitutionen pro Nukleotid.

A. 16S rRNA Stammbäume

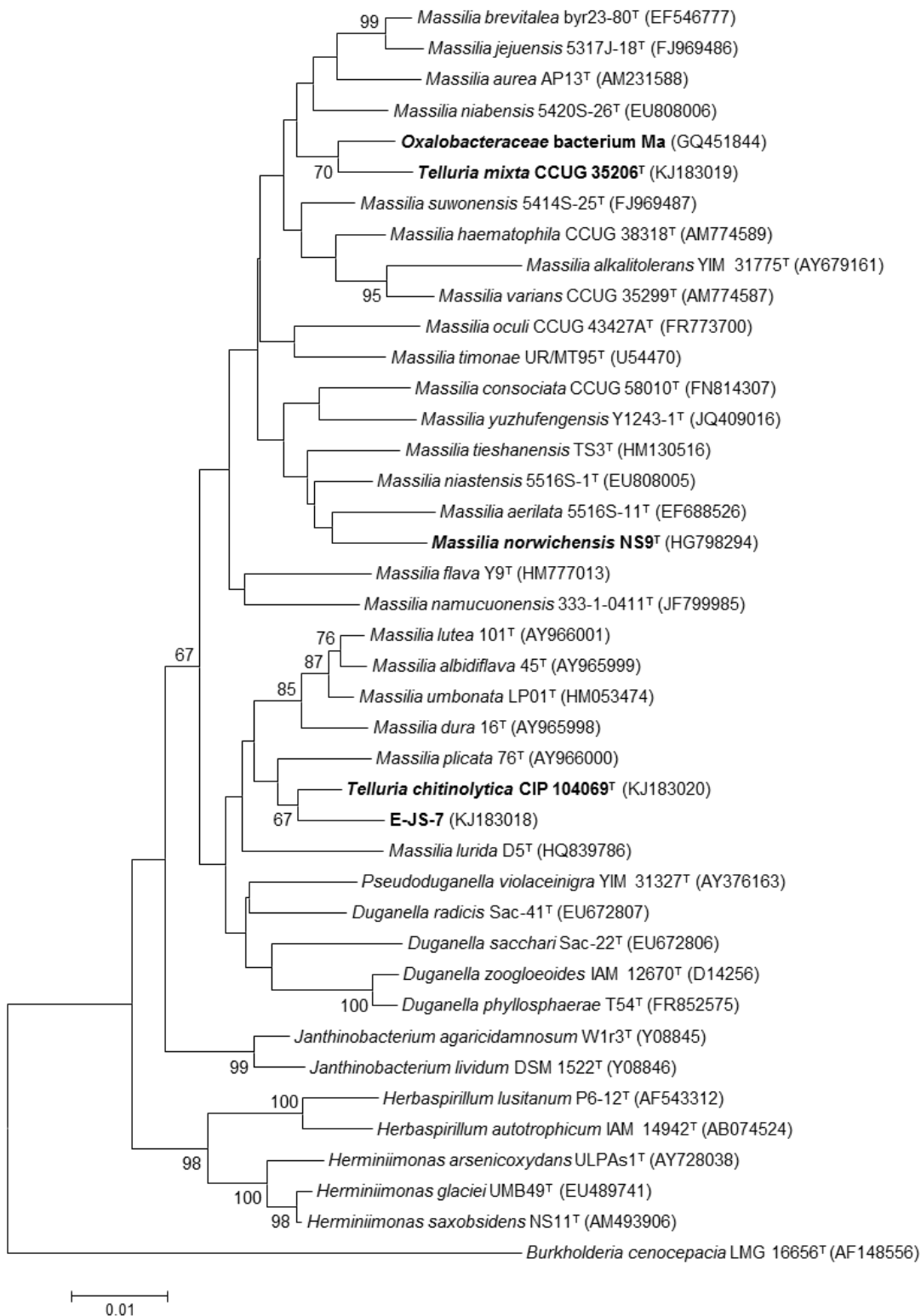


Abbildung A.3.: Neighbour-joining Stammbaum unter Verwendung des Kimura 2-Parameter Modells (Kimura, 1980) basierend auf bearbeiteten 16S rRNA (1327 Bp) Gensequenzen, unter Miteinbeziehung resequenzierter 16S rRNA *Telluria* Sequenzen und der 16S rRNA Gensequenzen der Isolate NS9, *Oxalobacteraceae* bacterium Ma und E-JS-7. Der Stammbaum wurde mit Hilfe der Software MEGA 5.2.2 (Tamura *et al.*, 2011) berechnet. Die Zahlenwerte an den Verzweigungspunkten geben das Ergebnis von 1000 bootstrap Replikationen in % an. Dargestellt sind nur bootstrap Werte ≥ 65 %. Balken, 0.01 akkumulierte Substitutionen pro Nukleotid.

B. *gyrB* und *lepA* Stammbäume

B. gyrB und lepA Stammbäume

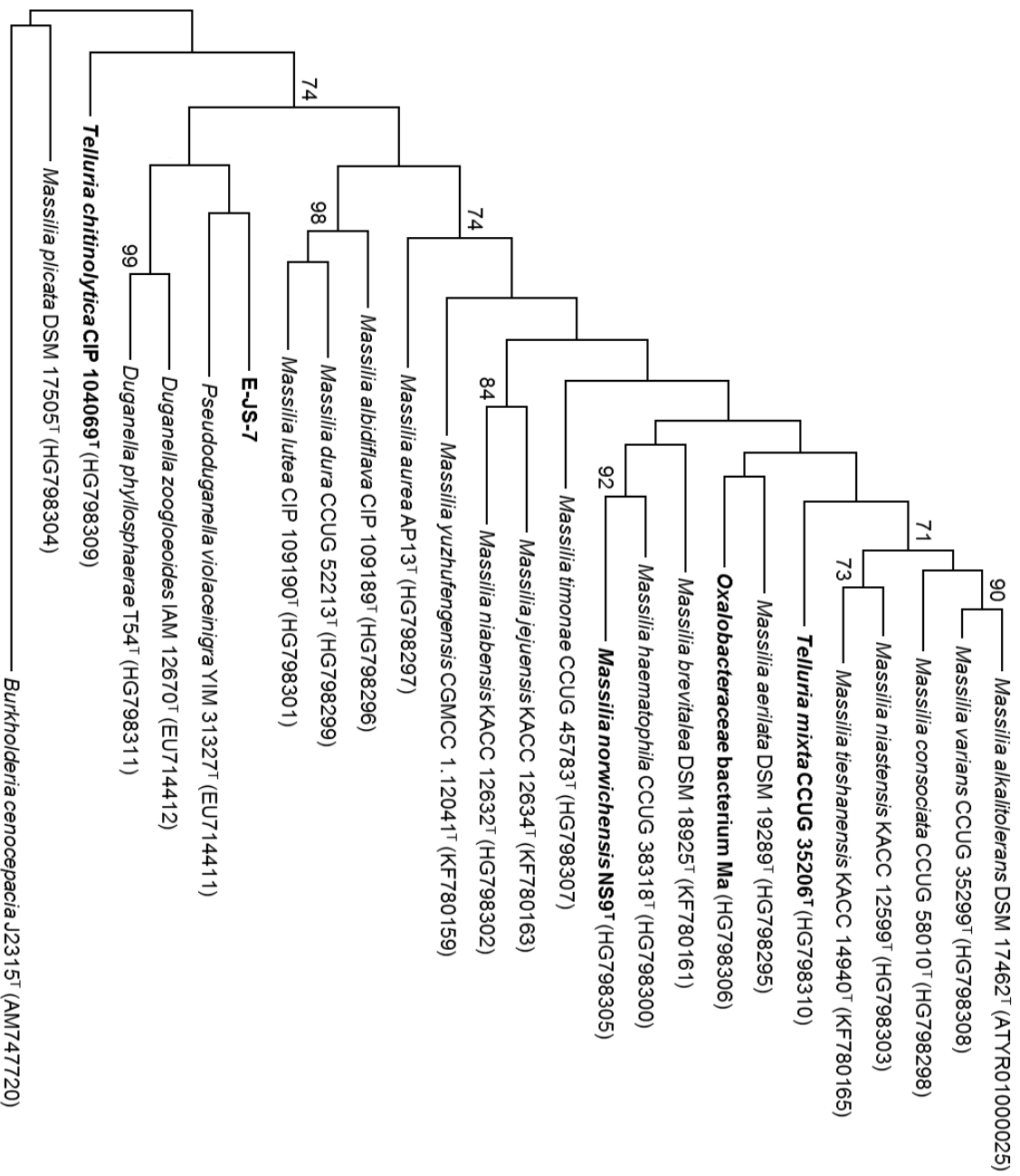


Abbildung B.1.: Maximum-parsimony Stammbaum unter Verwendung des Subtree-Pruning-Regrafting (SPR) Modells (Nei & Kumar, 2000), basierend auf partiellen *gyrB* Nukleotidsequenzen (810 Bp). Der Stammbaum wurde unter Benutzung von MEGA 5.2.2 (Tamura *et al.*, 2011) berechnet. Dargestellt sind nur bootstrapped Werte $\geq 65\%$. Balken, 20 akkumulierte Substitutionen pro Nukleotid.

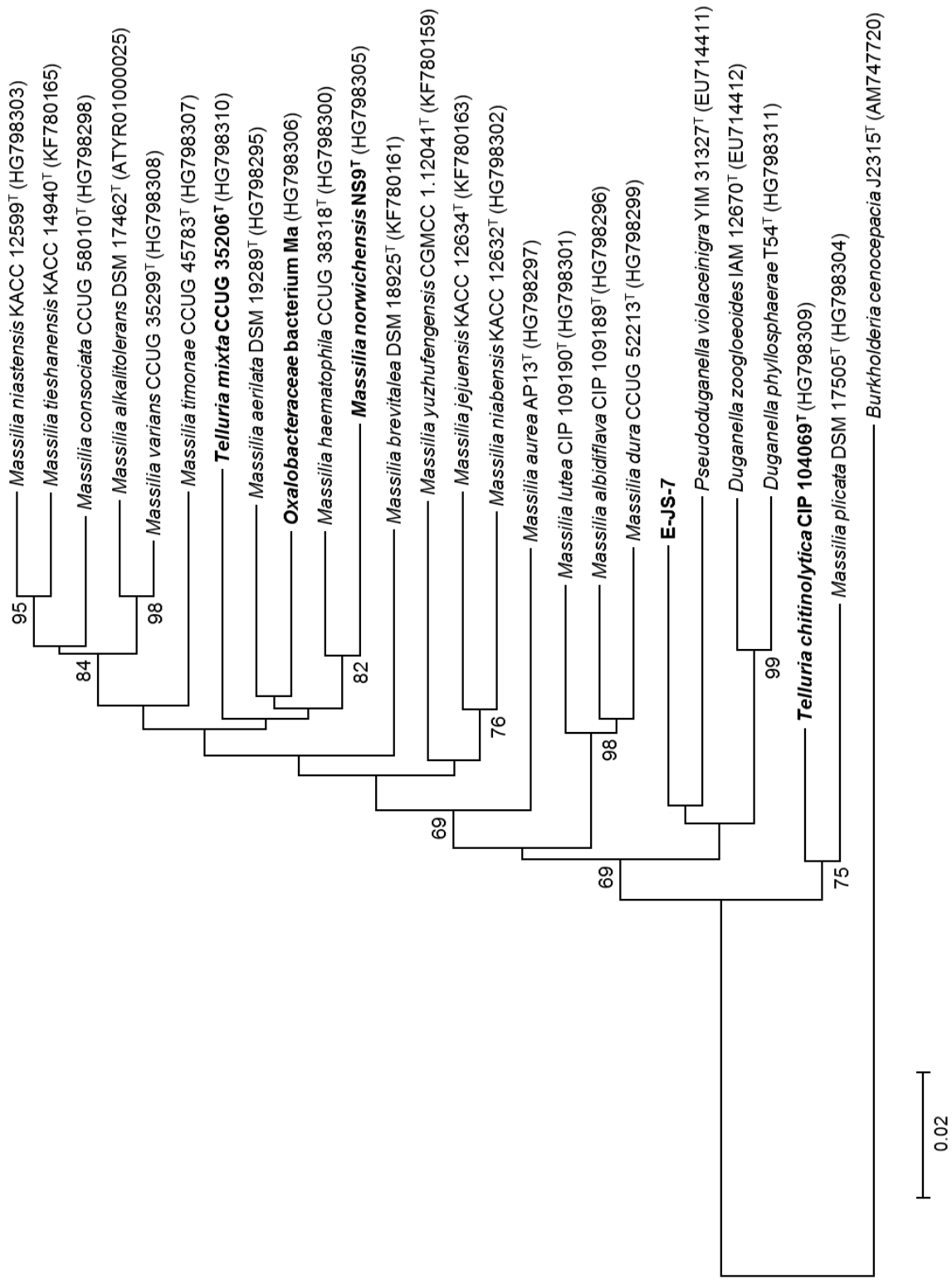


Abbildung B.2.: Neighbour-joining Stammbaum unter Verwendung des Kimura 2-Parameter Modells (Kimura, 1980), basierend auf partiellen *gyrB* Nukleotidsequenzen (810 Bp). Der Stammbaum wurde unter Benutzung von MEGA 5.2.2 (Tamura *et al.*, 2011) berechnet. Dargestellt sind nur bootstrap Werte ≥ 65 %. Balken, 0.02 akkumulierte Substitutionen pro Nukleotid.

B. gyrB und lepA Stammbäume

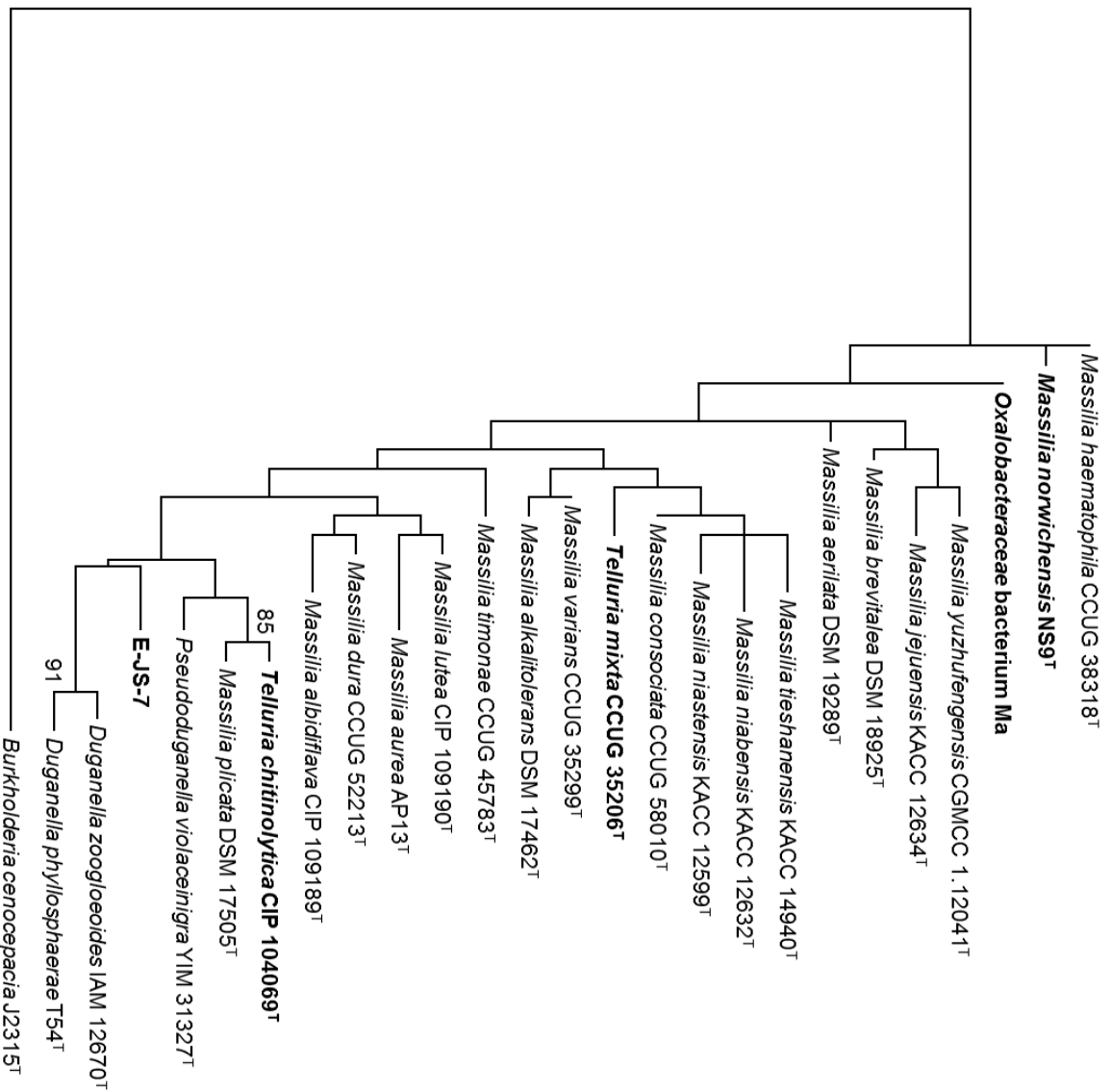
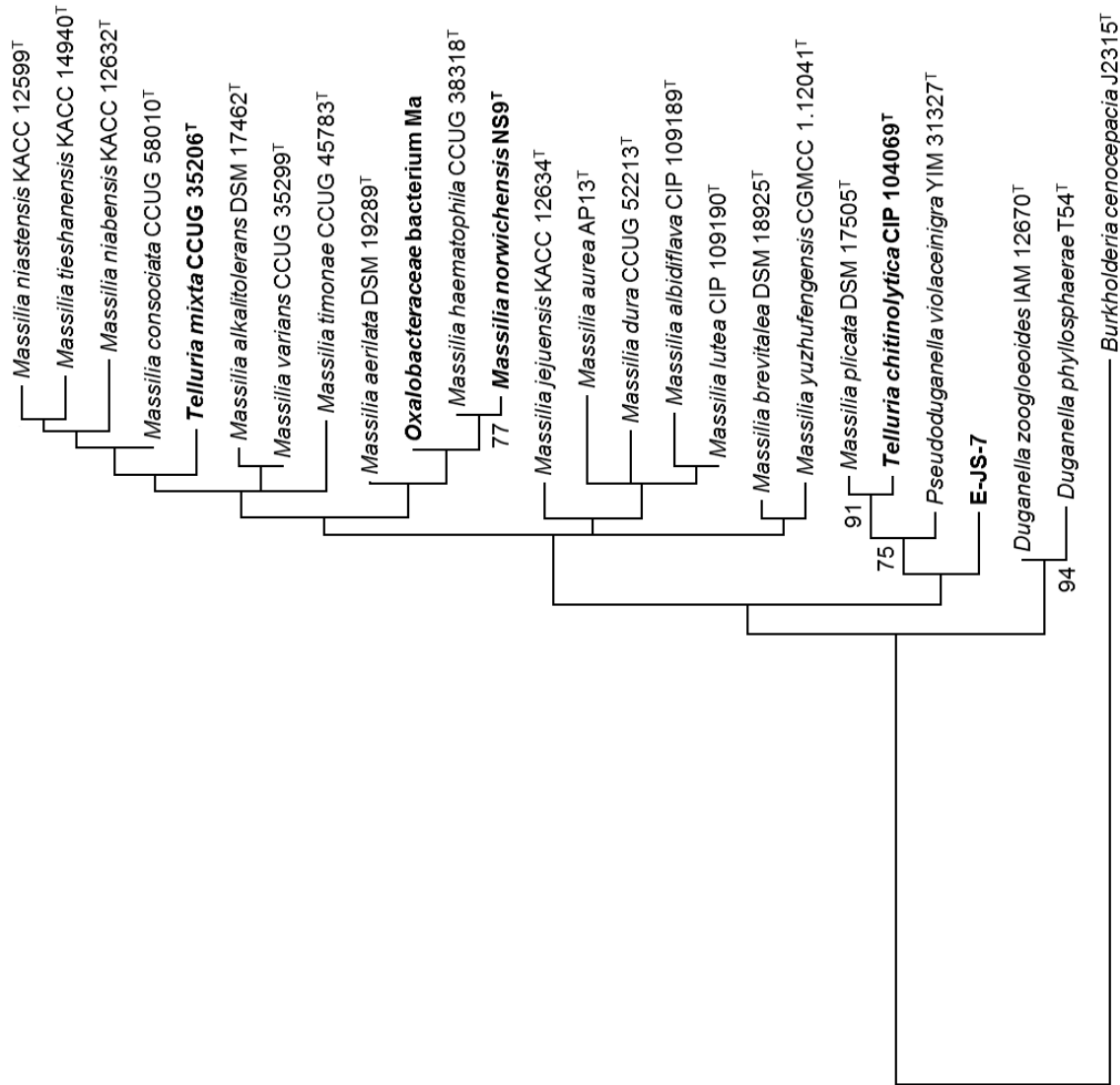


Abbildung B.3.: Maximum-parsimony Stammbaum unter Verwendung des Subtree-Pruning-Regrafting (SPR) Modells (Nei & Kumar, 2000), basierend auf partiellen GyrB Aminosäuresequenzen (270 AS). Der Stammbaum wurde unter Benutzung von MEGA 5.2.2 (Tamura *et al.*, 2011) berechnet. Dargestellt sind nur bootstrap Werte $\geq 65\%$. Balken, 5 akkumulierte Substitutionen pro Aminosäure.



0.02

Abbildung B.4.: Maximum-likelihood Stammbaum anhand des JTT Matrix Modells (Jones *et al.*, 1992), basierend auf partiellen GyrB Aminosäuresequenzen (270 AS). Der Stammbaum wurde unter Benutzung von MEGA 5.2.2 (Tamura *et al.*, 2011) berechnet. Dargestellt sind nur bootstrap Werte ≥ 65 %. Balken, 0.02 akkumulierte Substitutionen pro Aminosäure.

B. *gyrB* und *lepA* Stammbäume

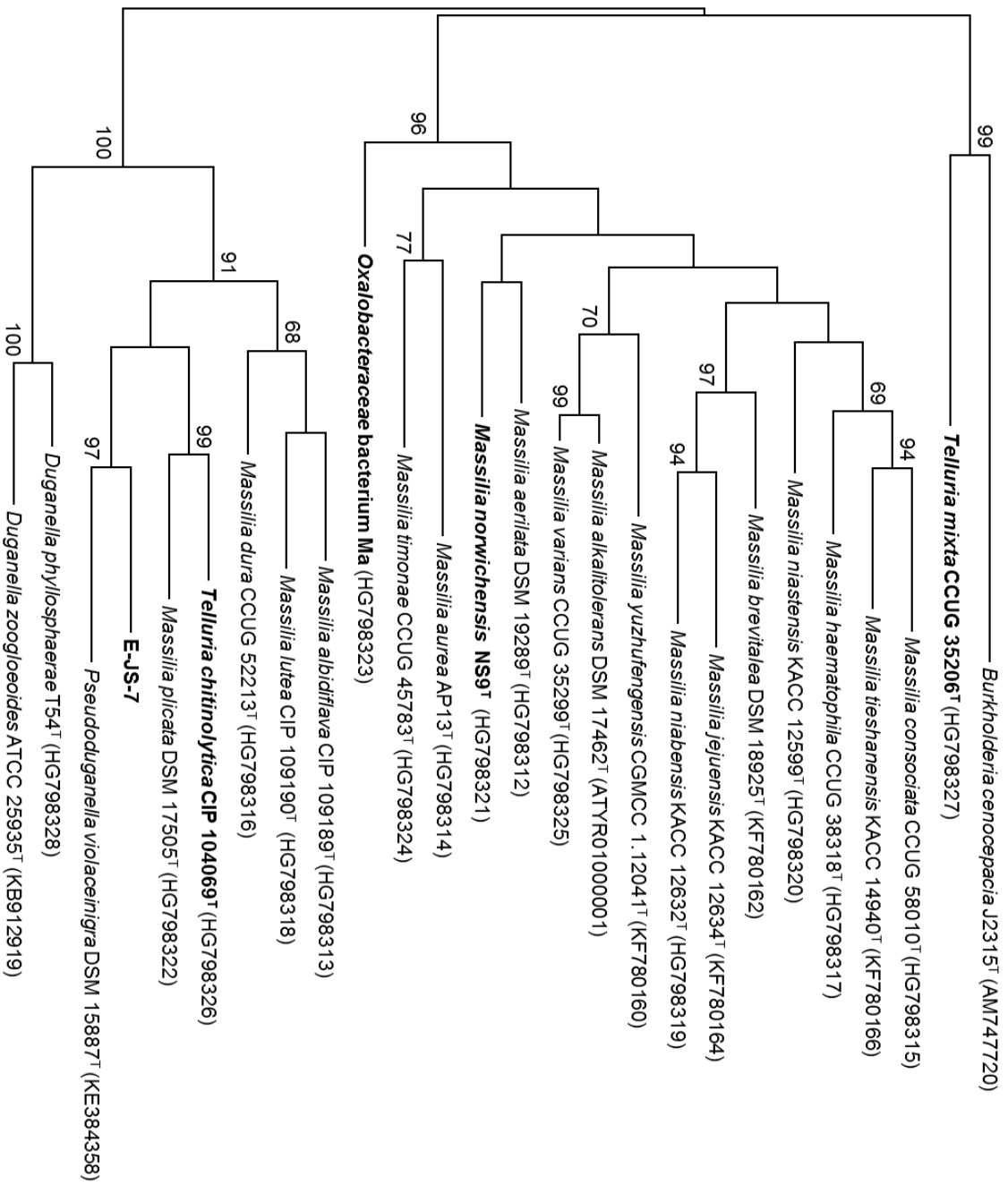
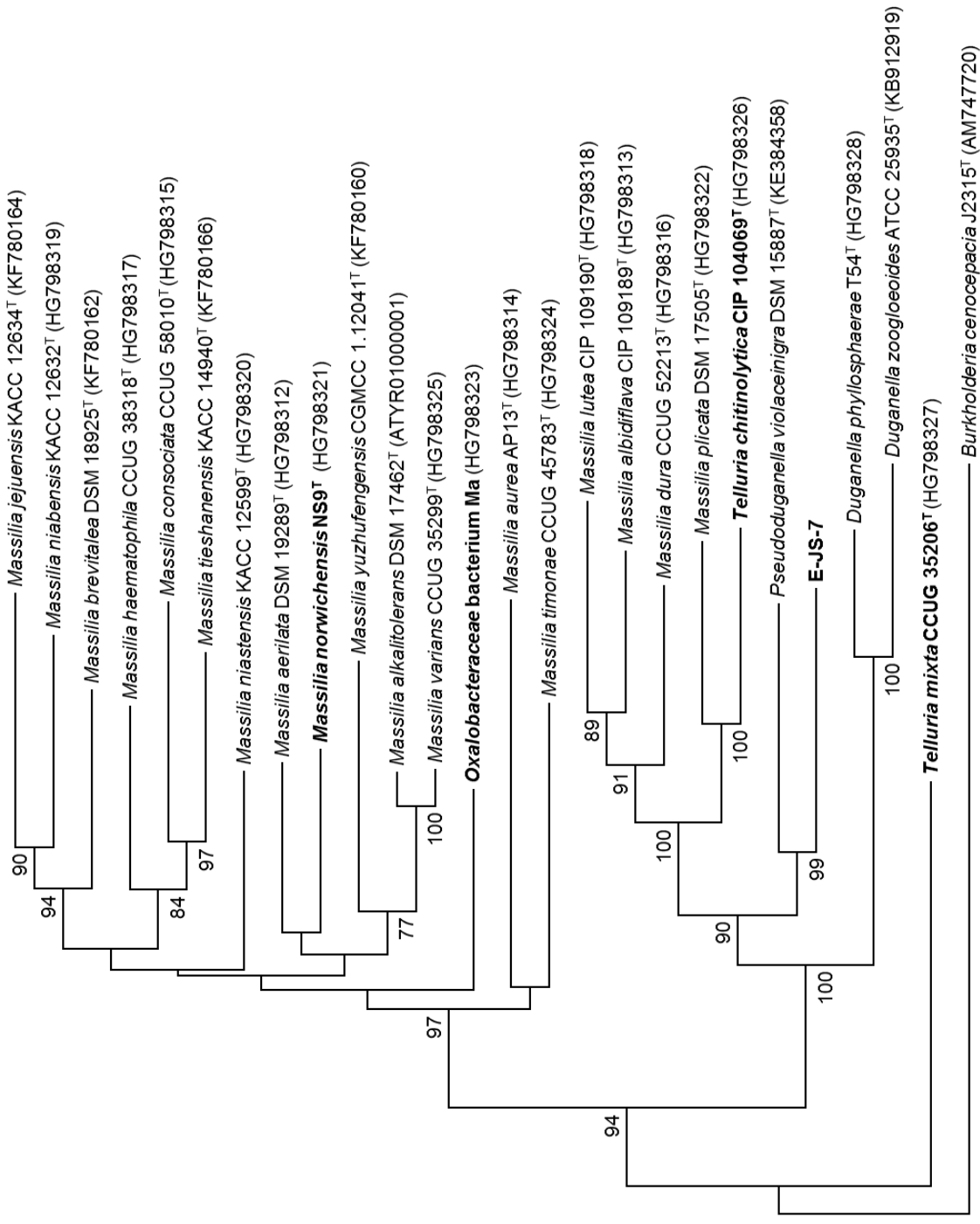


Abbildung B.5.: Maximum-parsimony Stammbaum unter Verwendung des Subtree-Pruning-Regrafting (SPR) Modells (Nei & Kumar, 2000), basierend auf partiellen *lepA* Nukleotidsequenzen (1299 Bp). Der Stammbaum wurde unter Benutzung von MEGA 5.2.2 (Tamura *et al.*, 2011) berechnet. Eingebildet sind nur bootstrap Werte ≥ 65 %. Balken, 50 akkumulierte Substitutionen pro Nukleotid.



0.02

Abbildung B.6.: Neighbour-joining Stammbaum anhand des Kimura 2-Parameter Modells (Kimura, 1980), basierend auf partiellen *lepA* Nukleotidsequenzen (1299 Bp). Der Stammbaum wurde unter Benutzung von MEGA 5.2.2 (Tamura *et al.*, 2011) berechnet. Eingebledet sind nur bootstrap Werte ≥ 65 %. Balken, 0.02 akkumulierte Substitutionen pro Nukleotid.

B. gyrB und lepA Stammbäume

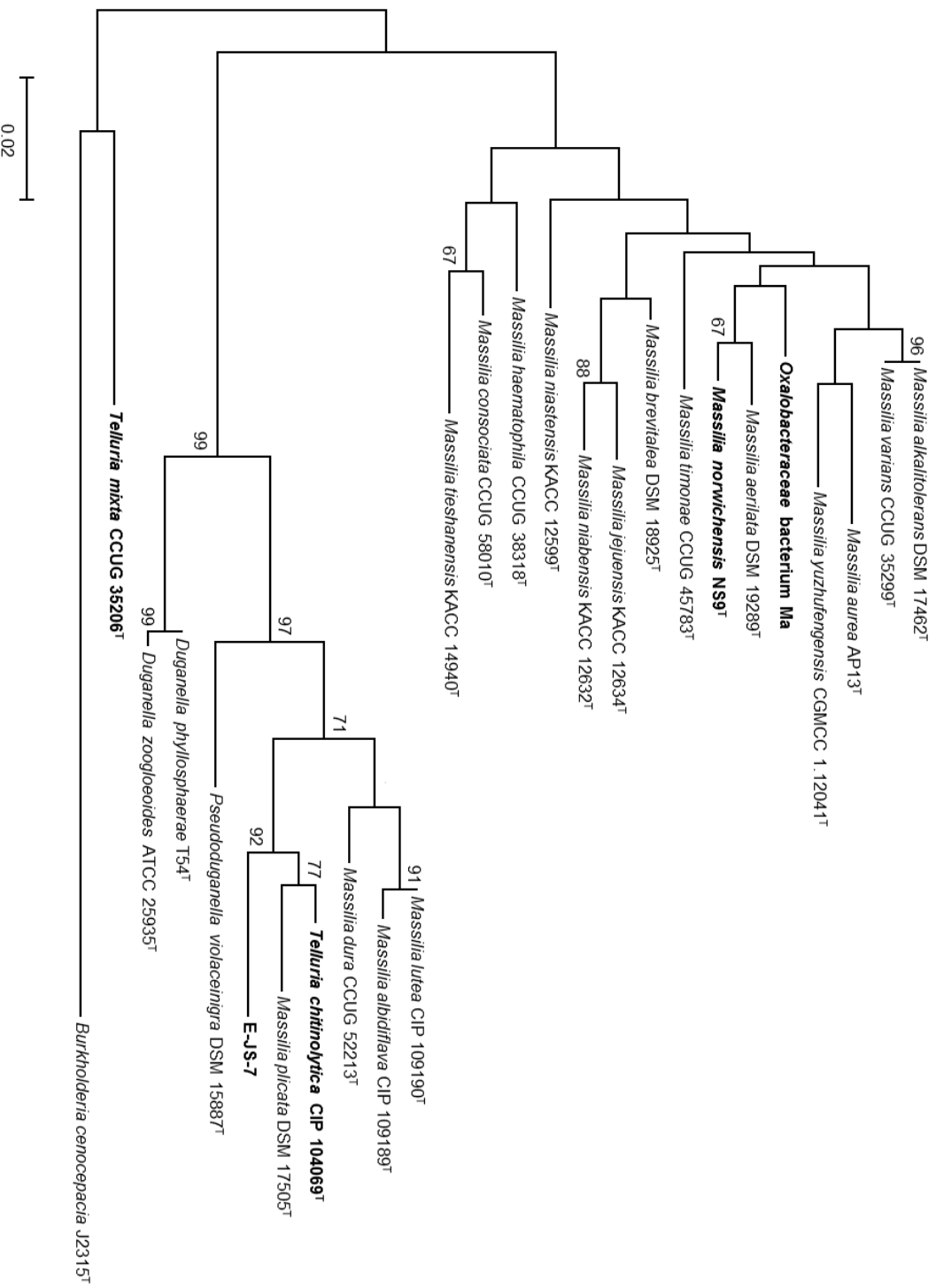
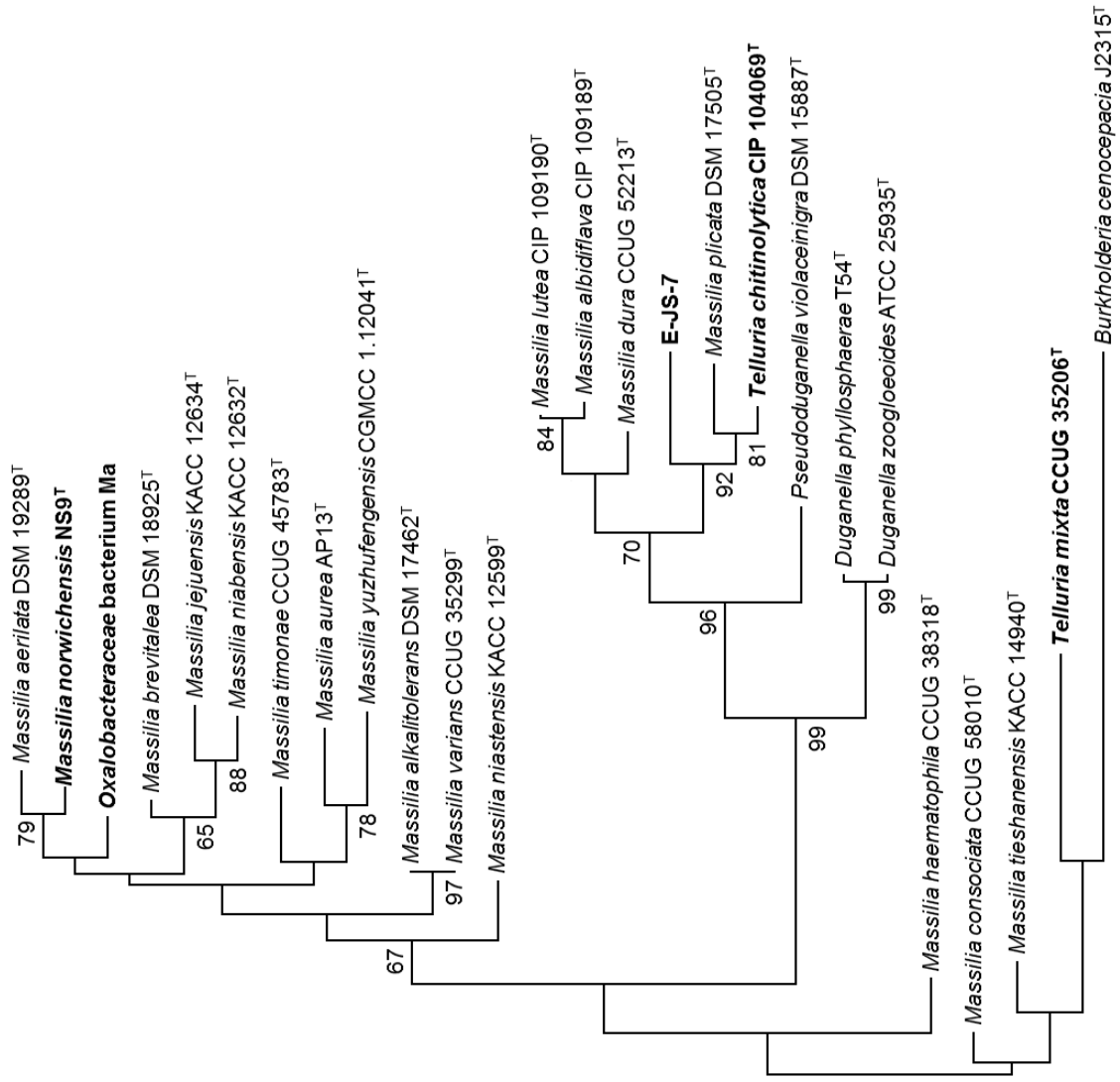


Abbildung B.7.: Maximum-likelihood Stammbaum unter Verwendung des JTT Matrix Modells (Jones *et al.*, 1992), basierend auf partiellen LepA Aminosäuresequenzen (433 AS). Der Stammbaum wurde unter Benutzung von MEGA 5.2.2 (Tamura *et al.*, 2011) berechnet. Eingelblendet sind nur bootstrap Werte ≥ 65 %. Balken, 0.02 akkumulierte Substitutionen pro Aminosäure.



10

Abbildung B.8.: Maximum-parsimony Stammbaum unter Verwendung des Subtree-Pruning-Regrafting (SPR) Modells (Nei & Kumar, 2000), basierend auf partiellen LepA Aminosäuresequenzen (433 AS). Der Stammbaum wurde unter Benutzung von MEGA 5.2.2 (Tamura *et al.*, 2011) berechnet. Eingebledet sind nur bootstrap Werte ≥ 65 %. Balken, 10 akkumulierte Substitutionen pro Aminosäure.

B. *gyrB* und *lepA* Stammbäume

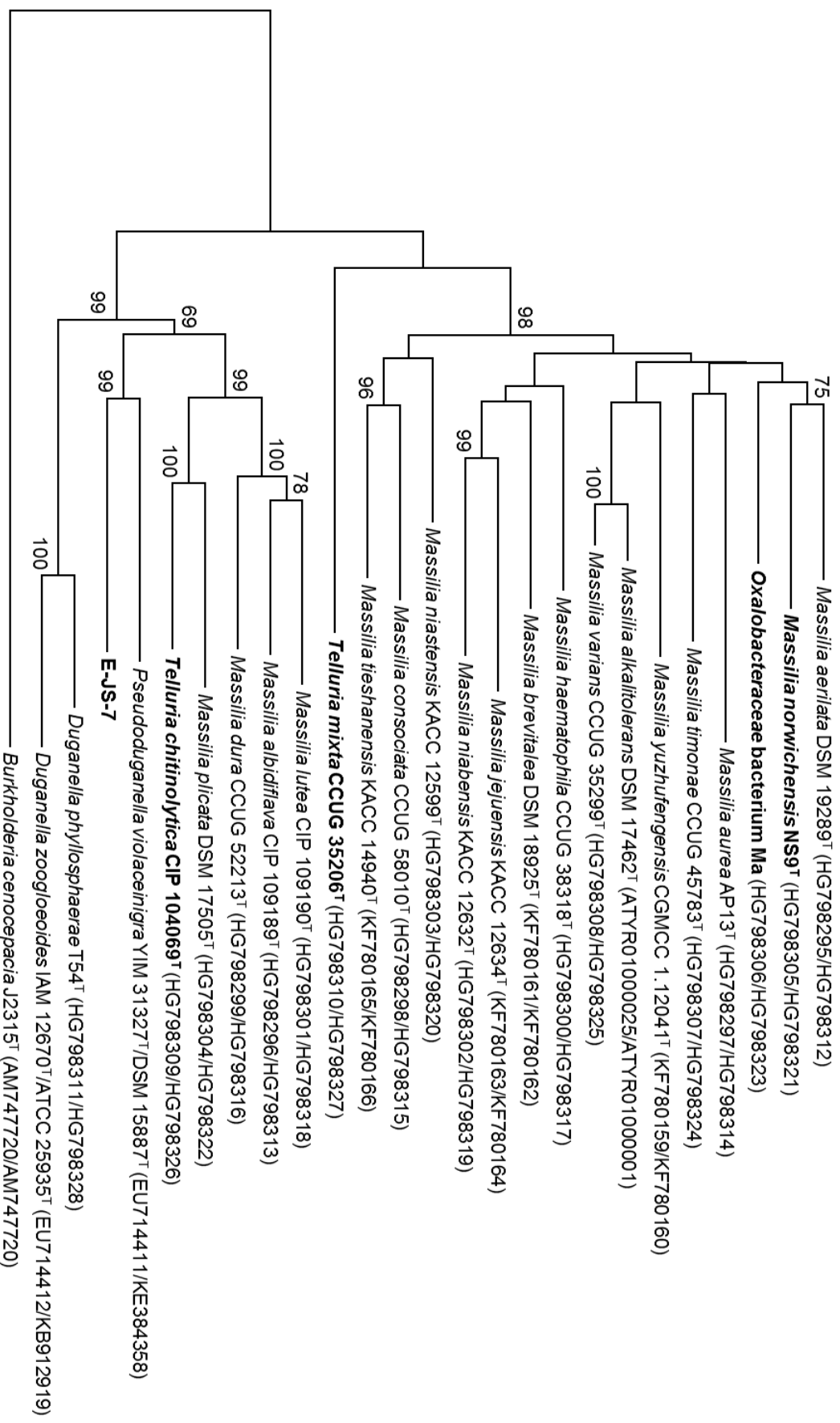
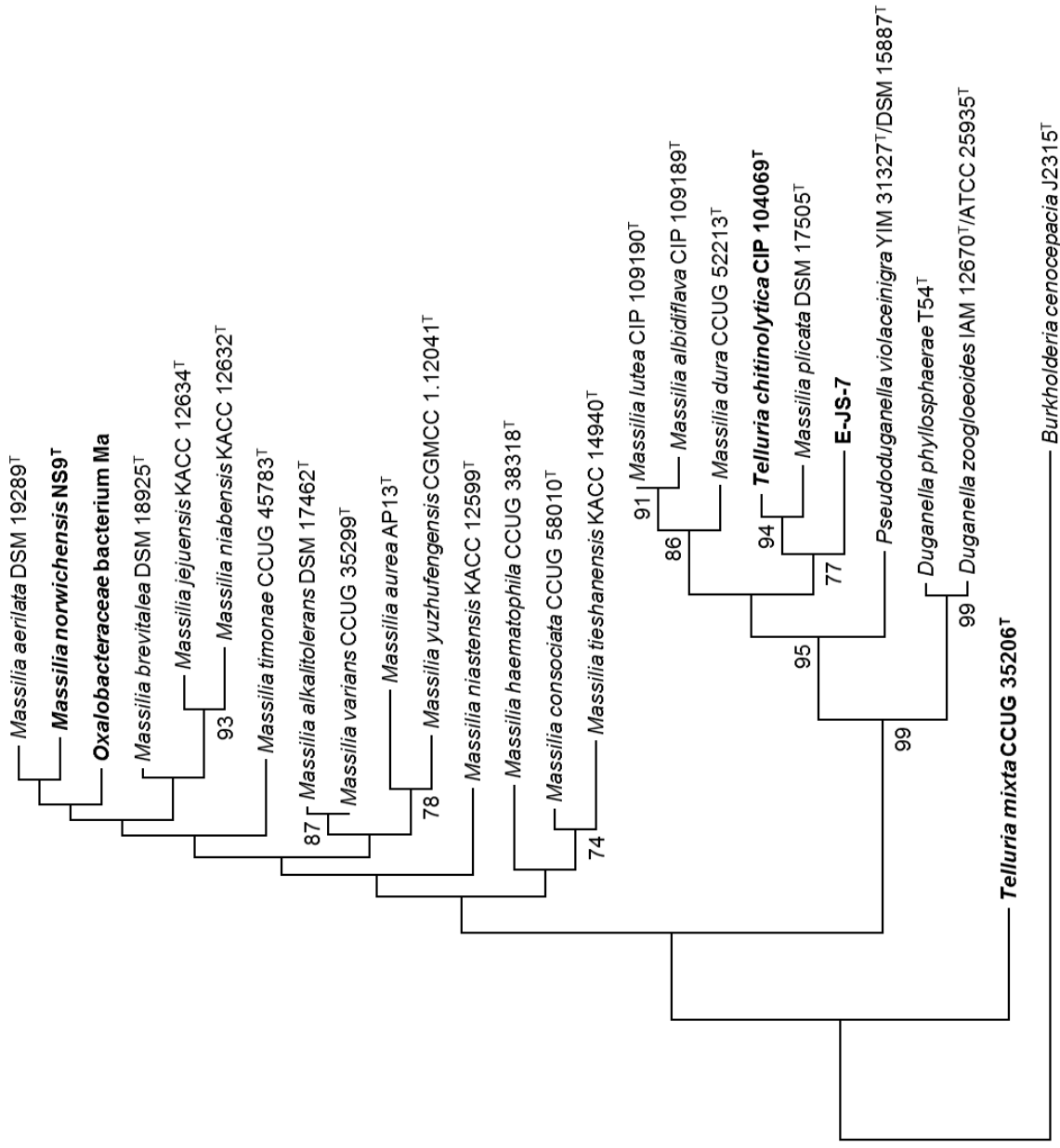


Abbildung B.9.: Neighbour-joining Stammbaum basierend auf partiellen und konkatinierten *gyrB*/*lepA* Nukleotidsequenzen (2109 Bp) anhand des Kimura 2-Parameter Modells (Kimura, 1980), berechnet im Programm MEGA 5.2.2 (Tamura *et al.*, 2011). Nur bootstrap Werte ≥ 65 % sind angegeben. Balken, 0.02 akkumulierte Substitutionen pro Nukleotid.



0.02

Abbildung B.10.: Maximum-likelihood Stammbaum unter Verwendung des JTT Matrix Modells (Jones *et al.*, 1992), basierend auf partiellen und konkatenierten GyrB/ LepA Aminosäuresequenzen (703 AS). Der Stammbaum wurde unter Benutzung von MEGA 5.2.2 (Tamura *et al.*, 2011) berechnet. Eingebildet sind nur bootstrapped Werte $\geq 65\%$. Balken, 0.02 akkumulierte Substitutionen pro Aminosäure.

B. gyrB und lepA Stammbäume

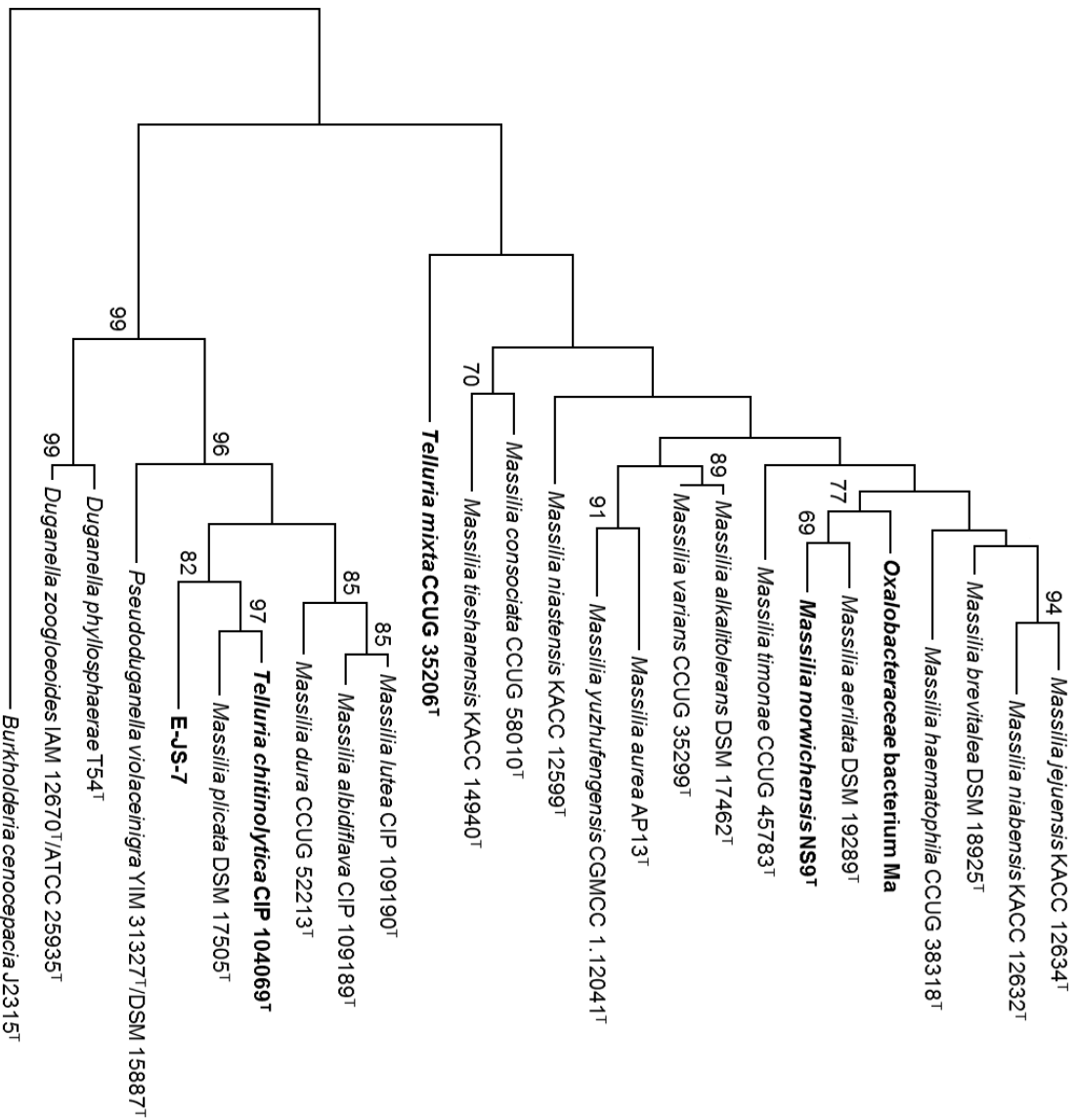


Abbildung B.11.: Maximum-parsimony Stammbaum anhand des Subtree-Pruning-Regrafting (SPR) Modells (Nei & Kumar, 2000), basierend auf partiellen und concatenierten GyrB/ LepA Aminosäuresequenzen (703 AS). Der Stammbaum wurde unter Benutzung von MEGA 5.2.2 (Tamura *et al.*, 2011) berechnet. Eingebledet sind nur bootstrap Werte ≥ 65 %. Balken, 20 akkumulierte Substitutionen pro Aminosäure.

C. Manuskript

'Manuscript in progress':

***Massilia norwichensis* sp. nov., isolated from an air sample**

Ivana Orthová¹, Peter Kämpfer², Stefanie Gläser², René Kaden³ and Hans-Jürgen Busse¹

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

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

³Department of Medical Sciences, Clinical Bacteriology, University of Uppsala, SE-75185 Uppsala, Sweden

The GenBank/EMBL/DDBJ accession number for the partial 16S rRNA gene sequence of NS9^T is HG798294. Sequences of *gyrB* and *lepA* are deposited under the accession numbers HG798295 - HG798311, KF780159, KF780161, KF780163, KF780165 and HG798312 - HG798328, KF780160, KF780162, KF780164, KF780166, respectively.

Abstract

A Gram-negative, rod-shaped and motile bacterial isolate, designated strain NS9^T, isolated from air of the Sainsbury Centre for Visual Arts in Norwich, England was subject to a polyphasic taxonomic study including phylogenetic analyses based on partial 16S rRNA, *gyrB* and *lepA* gene sequences and phenotypic characterisation. The 16S rRNA gene sequence of NS9^T identified *Massilia haematophila* CCUG 38318^T, *Massilia nias-tensis* 5516S-1^T (both 97.7 % similarity), *Massilia aerilata* 5516S-11^T (97.4 % similarity) and *Massilia tieshanensis* TS3^T (97.4 % similarity)

as the next related species. In partial *gyrB* and *lepA* sequences NS9^T shared highest similarities with *M. haematophila* CCUG 38318^T (94.5 %) and *M. aerilata* 5516-11^T (94.3 %), respectively. These sequence data are demonstrating affiliation of NS9^T to the genus *Massilia*. The detection of the predominant ubiquinone Q-8, a polar lipid profile consisting of the major compounds diphosphatidylglycerol, phosphatidylethanolamine and phosphatidylglycerol and a polyamine pattern containing 2-hydroxyputrescine and putrescine were in agreement with assignment of strain NS9^T to the genus *Massilia*. Major fatty acids are summed feature 3 (C_{16:1} ω7c and/or iso-C_{15:0} 2-OH), C_{16:0}, C_{18:1} ω7c and C_{10:0} 3-OH. Dissimilarities in partial *lepA* and *gyrB* gene sequences as well as results from DNA-DNA hybridizations demonstrate that strain NS9^T is a representative of a so far not described species of the genus *Massilia* which is also distinguished from its close relatives based on physiological and biochemical traits. Hence, we are here describing a novel species for which we are proposing the name *Massilia norwichensis* sp. nov. with the type strain NS9^T = CCUG 65457^T = LMG 28164^T.

The genus *Massilia* La Scola *et al.* (1998) belongs to the betaproteobacterial family *Oxalobacteraceae* with the closely related genera *Telluria*, *Pseudoduganella*, *Duganella* and *Janthinobacterium* (Kämpfer *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2012; Kong *et al.*, 2013). The genus was described on the basis of a single clinical isolate from the blood of a 25-year-old immunocompromised patient with meningoencephalitis. Since then, additional 22 species have been described including *Massilia aerilata* (Weon *et al.*, 2008), *Massilia albidiflava* (Zhang *et al.*, 2006), *Massilia alkalitolerans* (Kämpfer *et al.*, 2011), *Massilia aurea* (Gallego *et al.*, 2006), *Massilia brevitalea* (Zul *et al.*, 2008), *Massilia consociata* (Kämpfer *et al.*, 2011), *Massilia dura* (Zhang *et al.*, 2006), *Massilia flava* (Wang *et al.*, 2012), *Massilia haematophila* (Kämpfer *et al.*, 2011), *Massilia jejuensis* (Weon *et al.*, 2010), *Massilia lurida* (Luo *et al.*, 2013), *Massilia lutea* (Zhang *et al.*, 2006), *Massilia namucuoensis* (Kong *et al.*, 2013), *Massilia niabensis* (Weon *et al.*, 2009), *Massilia niastensis* (Weon *et al.*, 2009), *Massilia oculi* (Kämpfer *et al.*, 2012), *Massilia plicata* (Zhang *et al.*, 2006), *Massilia suwonensis* (Kämpfer *et al.*, 2011), *Massilia tieshanensis* (Du *et al.*, 2012), *Massilia umbonata* (Rodríguez-Díaz *et al.*, 2014), *Massilia varians* (Kämpfer *et al.*, 2011) and *Massilia yuzhufengensis* (Shen *et al.*, 2013). These species were isolated from clinical and environmental specimens from an eye, blood, soil, air, water and ice. According to the genus description (La Scola *et al.*, 1998; Kämpfer *et al.*, 2011) members of the

genus *Massilia* are characterised as Gram-negative, aerobic, non-spore-forming, motile, rods. Major isoprenoid quinone is Q-8. The polar lipid profile predominantly contains diphosphatidylglycerol, phosphatidylethanolamine and phosphatidylglycerol. The DNA G+C content ranges from 62.4 to 68.9 mol%.

Strain NS9^T was isolated in summer 1997 from the air of the Sainsbury Centre for Visual Arts in Norwich, England. The present investigation was designed to establish the taxonomic position of this isolate. Strain NS9^T was routinely grown on PYE agar (0.3 % yeast extract, 0.3 % peptone from casein, 1.5 % agar, pH 7.2) or the corresponding broth and 1/10 PYE agar at 28 °C. Colony morphology of strain NS9^T was studied on cells grown on PYE agar for three days at 28 °C. Gram-staining was carried with cells grown for two and seven days at 28 °C on PYE agar according to Gerhardt *et al.* (1994) and was observed under a Leitz, Dialux 20 microscope at x 1000 magnification. In all samples the cells stained Gram-negative and revealed rod-shaped cells. Growth was tested on MacConkey II (BD Biosciences), Columbia III agar supplemented with 5 % sheep blood and PYE agar supplemented with 4 % (w/v) NaCl at 28 °C. NS9^T did not grow on MacConkey and PYE agar plates supplemented with 4 % NaCl but grew well on blood agar without haemolysis. After growth on SIM soft agar (Merck, Darmstadt) for eight days no H₂S and indole production were detected, nor any signs of motility. In order to avoid any influence of the medium, testing for motility was repeated in 1/10 PYE and PYE soft agar tubes (0.3 %; w/v) according to test conditions applied in the SIM test. After 5 days of cultivation in 1/10 PYE soft agar strain NS9^T showed diffuse growth surrounding the stab channel in a narrow area approximately 1-5 mm from below the surface, indicating motility under microaerobic conditions. In the corresponding test in PYE soft agar tubes, strain NS9^T grew only on the surface. A colony of strain NS9^T, which had been grown on PYE agar for one week at 28 °C did not show oxidase activity applying BBLTM DrySlideTM oxidase test (BD Biosciences). This trait is in line with the emended description of the genus which lists this trait to be variable between species of the genus (Kämpfer *et al.*, 2011). Test for presence of catalase activity was positive as demonstrated by the production of bubbles when cells were suspended in 3 % H₂O₂ (v/v) on a glass slide.

Detailed physiological characterisation of strain NS9^T in comparison to closest related *Massilia* type strains was performed using the 96-well physiological and biochemical test panel as described by Kämpfer (1990) and Kämpfer *et al.* (1991). Detailed carbon substrate assimilation pattern of strain NS9^T is listed in the species description. Differentiating characteristics to other *Massilia* type strains are given in Tab. 1.

Phylogenetic position of strain NS9^T was studied by partial 16S rRNA, *lepA* and *gyrB* gene sequence analyses. Genomic DNA was extracted from a loop of biomass using the ULTRACleanTM Microbial DNA Isolation Kit according to the manufacturer's protocol (MO BIO Laboratories; West Carlsbad, CA). The 16S rRNA gene of strain NS9^T was amplified by polymerase chain reaction containing 0.65 µl of each primer solution (50 pmol/µl; 27f and 1492r, Lane, 1991), 30 µl REDTaq[®]ReadyMixTM PCR Reaction Mix with MgCl₂ (Sigma-Aldrich[®]), 26.2 µl sterile H₂O and 2.5 µl 1:5 diluted genomic DNA. The amplification was carried out in a MultiGeneTM Gradient PCR thermal cycler (Labnet International, Inc.) and consisted of an initial denaturation at 95 °C for 5 min, followed by 30 cycles of denaturation at 94 °C for 1:30 min, annealing at 55 °C for 1:30 min, elongation at 72 °C for 5 min and a final extension at 72 °C for 10 min. PCR products were purified using the Wizard[®]SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) according to the manufacturer's instructions and were sequenced at LGC Genomics (Berlin, Germany). The 16S rRNA gene sequence of NS9^T was composed of 1404 bases and subjected to entries in data bases using the EzTaxon-e server (eztaxon-e.ezbiocloud.net/; Kim *et al.*, 2012). Highest sequence similarities were found with *Massilia haematophila* CCUG 38318^T, *Massilia niastensis* 5516S-1^T (both 97.7 %), *Massilia aerilata* 5516S-11^T and *Massilia tieshanensis* TS3^T (both 97.4 %). For phylogenetic analyses, the 16S rRNA sequences of NS9^T and established *Massilia* species were aligned using Clustal W (Thompson *et al.*, 1994) and manually edited for gaps and ambiguous nucleotides using BioEdit (Hall, 1999). Comparison of the edited 16S rRNA gene sequences (1327 bp) resulted in slightly higher similarity values but still *Massilia aerilata* 5516S-11^T, *M. niastensis* 5516S-1^T (both 97.9 %) and *M. haematophila* CCUG 38318^T (97.8 %) were identified as next relatives of strain NS9^T.

Phylogenetic calculations based on 16S rRNA gene sequences were carried out applying the maximum-likelihood algorithm using the Tamura-Nei model (Tamura & Nei, 1993) with 1000 bootstrap replications included in MEGA 5.2.2 (Tamura *et al.*, 2011). In this tree strain NS9^T branched next to *M. aerilata* and slightly more distant to *M. niastensis* and *M. tieshanensis* whereas *M. haematophila* was found in a separate clade (Fig. 1). However, none of the branching knots were supported from significant bootstrap values.

The phylogenetic position of NS9^T within the genus *Massilia* was further studied employing partial housekeeping gene sequences of *gyrB* and *lepA* (encoding for DNA gyrase, subunit B and GTP-binding protein, respectively) of *M. aerilata* DSM 19289^T,

M. albidiflava CIP 109189^T, *M. aurea* AP13^T, *M. consociata* CCUG 58010^T, *M. dura* CCUG 52213^T, *M. haematophila* CCUG 38318^T, *M. lutea* CIP 109190^T, *M. niabensis* KACC 12632^T, *M. niastensis* KACC 12599^T, *M. plicata* DSM 17505^T, *M. timonae* CCUG 45783^T, *M. varians* CCUG 35299^T, *Telluria chitinolytica* CIP 104069^T and *Telluria mixta* CCUG 35206^T. Primers for amplification of partial *gyrB* and *lepA* sequences were designed based on corresponding sequences in closely related strains. For PCR amplification of partial housekeeping genes the following primers were constructed: *gyrB*_f 5'-TCSTTCCTSAAYAAYGGCG-3' / *gyrB*_r 5'-TCGGTCATGATGATGATRCGG-3' and *lepA*_f 5'-ACSATCAAGGCCAGACCGC-3' / *lepA*_r 5'-ATCAGTTCGCGCATCTTGGC-3'. PCR reactions were performed in 50 µl volumes using the REDTaq[®]ReadyMix[™] PCR Reaction Mix with MgCl₂ (Sigma-Aldrich[®]) each containing 21 µl distilled water, 25 µl RedTaq[®] mix and 1 µl of each primer *gyrB*_f and *gyrB*_r or *lepA*_f and *lepA*_r (10 pmol/µl) and 2 µl of 1:5 diluted genomic DNA as a template. Conditions for *gyrB* gene amplification were: initial denaturation at 94 °C for 5 min, followed by 25 cycles denaturation at 94 °C for 1 min, primer hybridization at 58.9 °C for 45 sec, elongation at 72 °C for 1 min and a final elongation for 5 min. PCR products were electrophoretically separated in a 2.5 % LM agarose gel (D-1 LE Agarose; Fisher Molecular Biology), stained with ethidium bromide and bands of the expected size of approximately 910 bp were excised and extracted from the gel using Wizard[®]SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega). At these PCR conditions, only low amounts of the corresponding PCR product were obtained from *M. plicata* DSM 17505^T and *M. dura* CCUG 52213^T. Therefore, the excised bands were re-amplified and treated as described above. Conditions for *lepA* gene amplification were: initial denaturation step at 94 °C for 5 min, followed by 30 cycles denaturation at 94 °C for 1 min, primer annealing for 30 sec, with stepwise decreasing temperature (0.2 steps) from 64.4 °C to 62.4 °C and 20 cycles at 59 °C, elongation at 72 °C for 1:30 min and final extension at 72 °C for 5 min. In almost all strains specific PCR product of the expected size of approximately 1400 bp were detected by electrophoretic separation in a 2 % agarose gel (Agarose NEE0; ROTH) and ethidium bromide staining. In *M. lutea* CIP 109190^T and *M. dura* CCUG 52213^T specific PCR products were obtained by lowering the primer annealing temperature to 59 °C. An appropriate PCR product of *M. plicata* DSM 17505^T could only be obtained using another primer pair, *lepA*_f_2 5'-ARCGYGGCATYACSATYAARGC-3' / *lepA*_r_2 5'-ACRTCRWACATYTGRCGCGG-3' and changing the PCR conditions to an annealing temperature of 55 °C. Purified PCR products were sequenced by LGC Genomics (Berlin, Germany). Resulting sequences of *lepA* and *gyrB* and corresponding se-

quences retrieved from GenBank/EMBL/DDBJ gene data bases were aligned using Clustal W provided in BioEdit (Thompson *et al.*, 1994; Hall, 1999). Sequences were manually edited by removal of 5' and 3' ends to obtain sequences matching in length (*gyrB*: 810 bp; *lepA*: 1299 bp) and removal of gaps. The partial *gyrB* and *lepA* gene sequence data were used to infer phylogenetic trees employing MEGA 5.2.2 (Tamura *et al.*, 2011), (supplementary Fig. S1, S2, respectively) applying the Tamura-Nei evolutionary model (Tamura & Nei, 1993) and the maximum-likelihood algorithm. Neighbour-joining algorithm and the Kimura-2 parameter model (Kimura, 1980) were employed for analysis of the phylogeny based on translated amino acid sequences translated from corresponding nucleotide sequences (results not shown). *Burkholderia cenocepacia* J2315^T was used as an outgroup. Among the representative species of the genus *Massilia* including the two *Telluria* species, *gyrB* sequence similarities were in the range between 89.1 and 97.6 % and in the *lepA* between 83.2 and 98.8 %. These data suggest that species of the genus *Massilia* are separated from each other in the *gyrB* gene sequence at values below 98 % similarity and in the *lepA* gene at values below 99 % similarity. Strain NS9^T shared in its *gyrB* sequence highest similarity with *M. haematophila* CCUG 38318^T (94.5 %) and with the other species included to comparison similarity values between 88.5 % (*M. lutea* CIP 109190^T) and 93 % (*M. aerilata* DSM 19289^T). The partial *lepA* gene sequence of NS9^T shared highest similarity with *M. aerilata* DSM 19289^T (94.3 %) and similarity values with other species were between 84.9 % (*M. lutea* CIP 109190^T) and 93.6 % (*M. varians* CCUG 35299^T). In both housekeeping gene sequences highest similarity values were clearly below the threshold value concluded from similarity values between established species. In translated amino acid sequences obtained after translation of corresponding gene sequences members of the *Massilia*/*Telluria* group showed GyrB similarities between 94.4 - 99.6 % and LepA similarities in the range between 84.0 and 100 % in 270 and 433 amino acids, respectively. Strain NS9^T showed highest sequence similarity in the GyrB sequence to *M. haematophila* CCUG 38318^T and in the LepA sequence to *M. aerilata* DSM 19289^T (99.6 % and 98.3 %, respectively). Very high similarities (>99 %) between certain species indicate that the partial amino acid sequences of the two proteins GyrB and LepA are not useful for identification of novel strains at the species level. It is also worth to mention that among the set of species included to comparison of *gyrB* and *lepA* gene sequences and of the corresponding protein sequences, as well, the species *M. alkali-tolerans* DSM 17462^T and *M. varians* CCUG 35299^T exhibited in the two genes and proteins highest similarity values (*gyrB*: 97.6 %; *lepA*: 98.8 %; GyrB: 99.6 %; LepA: 100 %) which is very well reflecting their close relatedness at the 16S rRNA gene

level (Fig. 1, 2, supplementary Fig. S1, S2; Kämpfer *et al.*, 2011; Kong *et al.*, 2013; Luo *et al.*, 2013; Shen *et al.*, 2013). In agreement with highest sequence similarities in *gyrB* and the corresponding protein sequences *M. haematophila* CCUG 38318^T was identified as the next phylogenetic relative of strain NS9^T (supplementary Fig. S1). Like in 16S rRNA gene phylogeny (Fig. 1) the trees based on *lepA* and the amino acid sequence of the corresponding protein, as well, identified *M. aerilata* DSM 19289^T as the next related species of NS9^T (supplementary Fig. S2) and this was also indicated in the trees constructed from concatenated sequences (Fig. 2).

DNA-DNA hybridization (DDH) experiments were performed between NS9^T and type strains of closely related *Massilia* species according to the method of Ziemke *et al.* (1998) with a modification in nick translation; 2 µg of DNA were labelled during 3 hrs of incubation at 15 °C. DDH values obtained after hybridization of NS9^T with *M. niastensis* KACC 12599^T, *M. aerilata* DSM 19289^T, *M. haematophila* CCUG 38318^T, *M. brevitalea* DSM 18925^T, *M. jejuensis* KACC 12634^T, *M. aurea* AP13^T, *M. niabensis* KACC 12632^T, *M. consociata* CCUG 58010^T and *M. yuzhufengensis* CGMCC 1.12041^T were 37.1 %, 43.5 %, 45.1 %, 59.9 %, 7.3 %, 11.8 %, 40.9 %, 21.6 % and 55 %, respectively. These results demonstrate that strain NS9^T can be considered to be representative of a novel species. Furthermore, in comparison with 16S rRNA gene sequence similarities, the DDH values are supporting the view of Kim *et al.* (2014) that the threshold for species demarcation can be raised from 97 % to approximately 98.5 % 16S rRNA gene sequence similarity.

For production of biomass subjected to quinone and polar lipid analyses, NS9^T and reference strains were grown in PYE broth at 28 °C and harvested when cells had reached the stationary growth phase. Quinone and polar lipid analyses were carried out using lyophilized biomass as described previously (Tindall, 1990a, b; Altenburger *et al.*, 1996). Biomass subjected to polyamine was harvested in the late exponential growth phase as recommended by Busse & Auling (1988) and analysed as described by Busse *et al.* (1997). For HPLC analysis the instrumentation described by Stolz *et al.* (2007) was used. The predominant respiratory ubiquinone was Q-8 (96.4 %) followed by minor amounts of Q-7 (2.4 %) and Q-9 (1.2 %). The polar lipid profile of NS9^T (Fig. 3) and all reference strains (results not shown) showed diphosphatidylglycerol, phosphatidylglycerol and phosphatidylethanolamine in major amounts in accordance with the emended description of the genus *Massilia* (Kämpfer *et al.*, 2011). Additionally, NS9^T possessed an unidentified polar lipid (L1) in moderate amounts also detected in trace to moderate amounts in *M. albidifla-*

C. Manuskript

va CIP 109189^T, *M. aurea* AP13^T, *M. consociata* CCUG 58010^T, *M. haematophila* CCUG 38318^T, *M. dura* CCUG 52213^T, *M. lutea* CIP 109190^T, *M. niastensis* KACC 12599^T, *M. plicata* DSM 17505^T, *M. timonae* CCUG 45783^T, *M. varians* CCUG 35299^T, *M. aerilata* DSM 19289^T and *T. chitinolytica* CIP 104069^T but not in *T. mixta* CCUG 35206^T (data not shown). Moreover, strain NS9^T showed minor amounts of an unidentified aminophospholipid (APL) which was detected as a major compound in *M. aurea* AP13^T and in moderate to minor amounts in *M. plicata* DSM 17505^T, *M. timonae* CCUG 45783^T and *M. dura* CCUG 52213^T. *M. albidiflava* CIP 109189^T, *M. consociata* CCUG 58010^T, *M. haematophila* CCUG 38318^T, *M. lutea* CIP 109190^T, *M. niastensis* KACC 12599^T, *M. varians* CCUG 35299^T and *T. chitinolytica* CIP 104069^T showed the presence of minor to trace amounts of an unidentified aminolipid (AL) with chromatographic motility corresponding to that of aminophospholipid (APL) of NS9^T (Fig. 3). However, absence of a positive reaction in staining for presence of phosphate might be due to low abundance of this aminolipid in these strains. Neither the lipids APL nor AL were detected in *M. aerilata* DSM 19289^T and *T. mixta* CCUG 35206^T (results not shown). Another unidentified polar lipid (L2) was only detected in NS9^T and *T. mixta* CCUG 35206^T. NS9^T showed a polyamine pattern characteristic for the majority of members of the class *Betaproteobacteria*, with the major compounds putrescine [74.4 $\mu\text{mol (g dry weight)}^{-1}$] and 2-hydroxyputrescine [13.2 $\mu\text{mol (g dry weight)}^{-1}$]. Other polyamines including spermidine and spermine were detected in smaller amounts [3.5 and 1.6 $\mu\text{mol (g dry weight)}^{-1}$, respectively] and only traces of 1,3-diaminopropane [0.1 $\mu\text{mol (g dry weight)}^{-1}$] were detected as well. Similar polyamine patterns containing the major diamines 2-hydroxyputrescine and putrescine and significant lesser amounts of spermidine, spermine and 1,3-diaminopropane were also detected in all reference strains analysed in this study including *M. aerilata* DSM 19289^T, *M. albidiflava* CIP 109189^T, *M. aurea* AP13^T, *M. consociata* CCUG 58010^T, *M. dura* CCUG 52213^T, *M. lutea* CIP 109190^T, *M. niastensis* KACC 12599^T, *M. plicata* DSM 17505^T, *T. chitinolytica* CIP 104069^T and *T. mixta* CCUG 35206^T (results not shown). Hence, polyamine patterns of the species of the genus *Massilia* are well in agreement with those of the majority of species of the class *Betaproteobacteria* (Busse, 2011).

Biomass of strain NS9^T and reference strains for fatty acid analysis were grown on TS agar at 28 °C for 48 h. Fatty acid extraction and analysis was performed as described by Kämpfer & Kroppenstedt (1996) using a HP gas chromatograph HP 6890 with the Sherlock MIDI software version 2.11 and the TSBA peak naming

table version 4.1. Major fatty acids of strain NS9^T are summed feature 3 (C_{16:1}ω7c and/or iso-C_{15:0} 2-OH; 41.5 %), C_{16:0} (26.6 %), C_{18:1}ω7c (8.9 %) and C_{10:0} 3-OH (7.4 %); minor amounts (<5.0 %) of C_{17:0} cyclo, C_{12:0}, C_{14:0} and C_{14:0} 2-OH are also present. The fatty acid profile of strain NS9^T is typical for *Massilia* species, with minor differences in relative abundance of fatty acids to other *Massila* type strains (Tab. 2).

Results from sequence analysis of the partial 16S rRNA, *gyrB* and *lepA* genes clearly demonstrate that strain NS9^T is a member of the genus *Massilia* and its polar lipid profile, fatty acid profile, quinone system and polyamine pattern are in agreement with this classification. Furthermore, *gyrB*, *lepA* gene sequences and DDH results suggest that NS9^T is a representative of a novel species which is supported from physiological characteristics. Hence, we here are proposing a novel species *Massilia norwichensis* sp. nov. and the type strain is NS9^T (CCUG 65457^T = LMG 28164^T).

Description of *Massilia norwichensis* sp. nov.

Massilia norwichensis (nor.wich.en´sis. N. L. fem. adj. norwichensis of or belonging to Norwich) according to the city where the strain was isolated in the Sainsbury Centre for Visual Arts.

Cells are rod-shaped staining Gram-negative. Motility is only observed under micro-aerobic conditions in 1/10 PYE soft agar (0.3 %). Colonies are approx. 1-2 mm in diameter, circular, bright, smooth, semi-translucent, whitish pale to ochre-yellow with lightly coloured entire margins on PYE agar after 3 days of cultivation at 28 °C. Catalase positive and oxidase negative. Grows well on PYE, 1/10 PYE and Columbia agar supplemented with 5 % defibrinated sheep blood but haemolysis is not observed. No growth on MacConkey agar and PYE agar supplemented with 4 % NaCl (w/v). Sulphide, indole production and motility on SIM agar are negative. Strain NS9^T is positive for assimilation of L-arabinose, D-maltose, D-ribose, D-xylose, acetate, fumarate, glutarate, L-malate, 2-oxoglutarate, pyruvate, L-aspartate, L-serine, weak positive for the assimilation of D-cellobiose, D-glucose, salicin and DL-lactate and negative for the assimilation of N-acetyl-D-galactosamine, N-acetyl-D-glucosamine, *p*-arbutin, D-fructose, D-galactose, gluconate, D-mannose, α-D-melibiose, L-rhamnose, sucrose, D-trehalose, adonitol, *i*-inositol, maltitol, D-mannitol, D-sorbitol, putrescine, propionate, *cis*-aconitat, *trans*-aconitate, adipate, 4-aminobutyrate, azelate, citrate, DL-3-hydroxybutyrate, itaconate, mesaconate,

suberate, L-alanine, β -alanine, L-histidine, L-leucine, L-ornithine, L-phenylalanine, L-proline, L-tryptophan, 3-hydroxybenzoate, 4-hydroxybenzoate and (DL-3-) phenylacetate. The respiratory quinone system consists of the major compound ubiquinone Q-8 and small amounts of Q-7 and Q-9. Major compounds of the polar lipid profile are diphosphatidylglycerol, phosphatidylethanolamine and phosphatidylglycerol. Furthermore, moderate amounts of two unidentified lipids L1, L2 and an unidentified aminophospholipid in minor amounts are present (Fig. 3). Major polyamines are putrescine and 2-hydroxyputrescine, followed by small amounts of spermidine and spermine and traces of 1,3-diaminopropane. Major fatty acids are summed feature 3 ($C_{16:1}\omega7c$ and/or iso- $C_{15:0}$ 2-OH), $C_{16:0}$, $C_{18:1}\omega7c$ and $C_{10:0}$ 3-OH; minor amounts of $C_{17:0}$ cyclo, $C_{12:0}$, $C_{14:0}$ and $C_{14:0}$ 2-OH are also present.

The type strain of *Massilia norwichensis* is strain NS9^T (= CCUG 65457^T = LMG 28164^T). The type strain was isolated from air of the Sainsbury Centre for Visual Arts in Norwich, England.

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.
- Busse, H.-J. (2011). Polyamines. In *Taxonomy of Prokaryotes, Methods in Microbiology*, pp. 239-260. Edited by F. Rainey & A. Oren. London: Academic Press.
- Busse, H.-J. & Auling, G. (1988). Polyamine pattern as a chemotaxonomic Marker within the *Proteobacteria*. *Syst Appl Microbiology* **11**, 1-8.
- Busse, H.-J., Bunka, S., Hensel, A. & Lubitz, W. (1997). Discrimination of members of the family *Pasteurellaceae* based on polyamine patterns. *Int J Syst Bacteriol* **47**, 698-708.
- Du, Y., Yu, X. & Wang, G. (2012). *Massilia tieshanensis* sp. nov., isolated from mining soil. *Int J Syst Evol Microbiol* **62**, 2356-2362.
- Gallego, V., Sánchez-Porro, C., Garcia, M. T. & Ventosa, A. (2006). *Massilia aurea* sp. nov., isolated from drinking water. *Int J Syst Evol Microbiol* **56**, 2449-2453.

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.

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. (1990). Evaluation of the Titertek-Enterobac-Automated system (TTE-AS) for identification of *Enterobacteriaceae*. *Zentbl Bakteriol* **273**, 164-172.

Kämpfer, P., Falsen, E. & Busse, H.-J. (2008). *Naxibacter varians* sp. nov. and *Naxibacter haematophilus* sp. nov., and emended description of the genus *Naxibacter*. *Int J Syst Evol Microbiol* **58**, 1680-1684.

Kämpfer, P., Lodders, N., Martin, K. & Falsen, E. (2011). Revision of the genus *Massilia* La Scola *et al.* 2000, with an emended description of the genus and inclusion of all species of the Genus *Naxibacter* as new combinations, and proposal of *Massilia consociata* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* **61**, 1528-1533.

Kämpfer, P., Lodders, N., Martin, K. & Falsen, E. (2012). *Massilia oculi* sp. nov., isolated from a human clinical specimen. *Int J Syst Evol Microbiol* **62**, 364-369.

Kämpfer, P., Steiof, M. & Dott, W. (1991). Microbiological characterisation of a fuel-oil contaminated site including numerical identification of heterotrophic water and soil bacteria. *Microb Ecol* **21**, 227-243.

Kim, O.-S., Cho, Y.-J., Lee, K., Yoon, S.-H., Kim, M., Na, H., Park, S.-C., Jeon, Y. S., Lee, J.-H., Yi, H., Won, S. & Chun, J. (2012). Introducing EzTaxon-e: a prokaryotic 16S rRNA Gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species. *Int J Syst Evol Microbiol* **62**, 716-721.

Kim, M., Oh, H.-S., Park S.-C. & Chun J. (2014). Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence simila-

rity for species demarcation of prokaryotes. *Int J Syst Evol Microbiol* **64**, 346-351.

Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol* **16**, 111-120.

Kong, B.-H., Li, Y.-H., Liu, M., Liu, Y., Li, C.-L., Liu, L., Yang, Z.-W. & Yu, R. (2013). *Massilia namucuoensis* sp. nov., isolated from a soil sample. *Int J Syst Evol Microbiol* **63**, 352-357.

La Scola, B., Birtles, R. J., Mallet, M. N. & Raoult, D. (1998). *Massilia timonae* gen. nov., sp. nov., isolated from blood of an immunocompromised patient with cerebellar lesions. *J Clin Microbiol* **36**, 2847-2852.

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.

Lindquist, D., Murrill, D., Burran, W. P., Winans, G., Janda, J. M. & Probert, W. (2003). Characteristics of *Massilia timonae* and *Massilia timonae*-like isolates from human patients, with an emended description of the species. *J Clin Microbiol* **41**, 192-196.

Luo, X., Xie, Q., Wang, J., Pang, H., Fan, J. & Zhang, J. (2013). *Massilia lurida* sp. nov., isolated from soil. *Int J Syst Evol Microbiol* **63**, 2118-2123.

Rodríguez-Díaz, M., Cerrone, F., Sánchez-Penaido, M., SantaCruz-Calvo, L., Pozo, C. & González-López, J. (2014). *Massilia umbonata* sp. nov., able to accumulate poly- β -hydroxybutyrate, isolated from a sewage sludge compost-soil microcosm. *Int J Syst Evol Microbiol* **64**, 131-137.

Shen, L., Liu, Y., Wang, N., Yao, T., Jiao, N., Liu, H., Zhou, Y., Xu, B. & Liu, X. (2013). *Massilia yuzhufengensis* sp. nov., isolated from an ice core. *Int J Syst Evol Microbiol* **63**, 1285-1290.

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

Tamura, K. & Nei, M. (1993). Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol Biol Evol* **10**, 512-526.

Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. & Kumar, S. (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony method. *J Mol Biol Evol* **28**, 2731-2739.

Thompson, J. D., Higgins, D. G. & Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* **22**, 4673-4680.

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 saccharovororum* from various sources. *Syst Appl Microbiol* **13**, 128-130.

Wang, J.-W., Zhang, J.-L., Pang, H., Zhang, Y.-B., Li, Y.-Y. & Fan, J.-P. (2012). *Massilia flava* sp. nov., isolated from soil. *Int J Syst Evol Microbiol* **62**, 580-585.

Weon, H.-Y., Kim, B.-Y., Hong, S.-B., Jeon, Y.-A., Koo, B.-S., Kwon, S.-W. & Stackebrandt, E. (2009). *Massilia niabensis* sp. nov. and *Massilia niasensis* sp. nov., isolated from air samples. *Int J Syst Evol Microbiol* **59**, 1656-1660.

Weon, H.-Y., Kim, B.-Y., Son, J.-A., Jang, H. B., Hong, S. K., Go, S.-J. & Kwon, S.-W. (2008). *Massilia aerilata* sp. nov., isolated from an air sample. *Int J Syst Evol Microbiol* **58**, 1422-1425.

Weon, H.-Y., Yoo, S.-H., Kim, S.-J., Kim, Y.-S., Anandham, R. & Kwon, S.-W. (2010). *Massilia jejuensis* sp. nov. and *Naxibacter suwonensis* sp. nov., isolated from air samples. *Int J Syst Evol Microbiol* **60**, 1938-1943.

Xu, P., Li, W.-J., Tang, S.-K., Zhang, Y.-Q., Chen, G.-Z., Chen, H.-H., Xu, L.-H. & Jiang, C.-L. (2005). *Naxibacter alkalitolerans* gen. nov., sp. nov., a novel member of the family 'Oxalobacteraceae' isolated from China. *Int J Syst Evol Microbiol* **55**, 1149-1153.

Zhang, Y. Q., Li, W.-J., Zhang, K.-Y., Tian, X.-P., Jiang, Y., Xu, L.-H., Jiang, C.-L. & Lai, R. (2006). *Massilia dura* sp. nov., *Massilia albidiflava* sp. nov., *Massilia plicata* sp. nov. and *Massilia lutea* sp. nov., isolated from soils in China. *Int J Syst Bacteriol* **56**, 459-463.

Ziemke, F., Höfle, M. G., Lalucat, J. & Rosselló-Mora, R. (1998). Re-classification of *Shewanella putrefaciens* Owen's genomic group II as *Shewanella baltica* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* **48**, 179-186.

Zul, D., Wanner, G. & Overmann, J. (2008). *Massilia brevitalea* sp. nov., a novel betaproteobacterium isolated from lysimeter soil. *Int J Syst Evol Microbiol* **58**, 1245-1251.

Table 1: Physiological properties of strain NS9^T distinguishing from related *Massilia* species. Strains: 1, NS9^T; 2, *M. niastensis* KACC 12599^T; 3, *M. aerilata* DSM 19289^T; 4, *M. tianshanensis* KACC 14940^T; 5, *M. haematophila* KACC 13771^T (Kämpfer *et al.*, 2011); 6, *M. varians* KACC 13770^T (Kämpfer *et al.*, 2011); 7, *M. aurea* DSM 18055^T (Gallego *et al.*, 2006); 8, *M. niabensis* KACC 12632^T (Weon *et al.*, 2009); 9, *M. suwonensis* 5414S-25^T (Weon *et al.*, 2010); 10, *M. consociata* CCUG 58010^T (Kämpfer *et al.*, 2011); 11, *M. alkalitolerans* KACC 12188^T (Weon *et al.*, 2010); 12, *M. brevitalea* DSM 18925^T (Zul *et al.*, 2008; Weon *et al.*, 2009); 13, *M. jejuensis* 5317J-18^T (Weon *et al.*, 2010) and 14, *M. timonae* DSM 16850^T (Weon *et al.*, 2008). +, positive; (+), weakly positive; -, negative; ND, not determined. Data for taxa 1 to 4 are from this study; all others as given in brackets behind the taxa name or as indicated below.

Characteristics	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Oxidase	-	+	+	+	+	+ ^a	+ ^a	(+) ^b	+	+	-	- ^c	- ^d	+ ^f
Hydrolysis of aesculin	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+ ^e	+	+
Assimilation of														
D-Glucose	(+)	-	-	+	-	-	+	-	(+)	+	+	+ ^e	-	+
L-Arabinose	+	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+	- ^e	-	+
Glucuronate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	- ^e	-	+
Adipate	-	-	-	-	+	-	+	-	+	ND	-	+ ^e	-	-
Citrate	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	- ^e	-	+
L-Rhamnose	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+
Suberate	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-
Lactate	(+)	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+
L-Alanine	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+
3-Hydroxybenzoate	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-
L-Serine	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+
Propionate	-	+	-	-	+	+	(+)	-	+	+	+	+	-	-
L-Histidine	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+
3-Hydroxybutyrate	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+
3-Hydroxybenzoate	+	-	-	-	+	-	-	-	-	ND	-	-	-	-
L-Proline	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+

*Data taken from: ^a, Kämpfer *et al.* (2008); ^b, Gallego *et al.* (2006); ^c, Xu *et al.* (2005); ^d, Zul *et al.* (2008); ^e, Weon *et al.* (2009); ^f, Lindquist *et al.* (2003)

Table 2: Cellular fatty acid compositions of strain NS9^T and closest related *Massilia* type strains including the type species *M. timonae*. Strains: 1, NS9^T; 2, *M. niastensis* KACC 12599^T (in brackets data from Weon *et al.*, 2009); 3, *M. aerilata* DSM 19289^T (in brackets data from Weon *et al.*, 2008); 4, *M. treshamensis* KACC 14940^T; 5, *M. haematophila* KACC 13771^T (Kämpfer *et al.*, 2011); 6, *M. varians* KACC 13770^T (Kämpfer *et al.*, 2011); 7, *M. aurea* DSM 18055^T (Gallego *et al.*, 2006); 8, *M. niabensis* KACC 12632^T (Weon *et al.*, 2009); 9, *M. suwonensis* 5414S-25^T (Weon *et al.*, 2010); 10, *M. consociata* CCUG 58010^T (Kämpfer *et al.*, 2011); 11, *M. alkaliolerans* KACC 12188^T (Weon *et al.*, 2010); 12, *M. brevitalea* DSM 18925^T (Zul *et al.*, 2008; Weon *et al.*, 2009); 13, *M. jejuensis* 5317J-18^T (Weon *et al.*, 2010) and 14, *M. timonae* DSM 16850^T (Weon *et al.*, 2008). Values are percentages of total fatty acids. —, not detected or <1 %. Data for taxa 1 and 4 are from this study; other data were taken from publications as given in brackets behind taxa names.

Fatty acid	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
C _{10:0} 3-OH	7.4	9.3 (5.5)	6.6 (4.7)	14.7	3.0	3.3	4.8	6.6	5.4	4.3	3.2	4.9	6.1	4.6
C _{12:0}	4.5	7.9 (4.7)	4.5 (3.4)	10.9	3.3	3.7	4.6	8.9	4.4	3.4	3.3	5.0	5.9	3.3
C _{12:0} 2-OH	—	3.4 (2.4)	—	6.3	1.5	2.0	1.9	—	2.4	1.8	2.2	2.0	1.7	2.2
C _{14:0}	3.9	—	2.1 (1.9)	1.8	—	—	0.6	—	1.2	—	—	—	—	—
C _{14:0} 2-OH	2.2	—	2.8 (2.5)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
anteiso-C _{15:0}	—	—	—	—	1.5	—	—	—	—	—	—	—	—	—
C _{16:0}	26.6	18.6 (26.9)	26.5 (30.6)	16.3	26.2	28.5	36.8	23.6	28.8	21.5	26.6	23.0	22.5	30.5
iso-C _{16:0}	—	—	—	—	2.1	—	—	—	—	2.2	—	—	—	—
C _{17:0} cyclo	4.8	3.4	1.7 (6.1)	—	2.7	—	—	—	2.9	—	—	—	1.0	3.7
iso-C _{17:0}	—	—	—	—	1.6	—	—	—	—	—	—	—	—	—
iso-C _{17:1} ω9c	—	—	—	—	1.4	—	—	—	—	—	—	—	—	—
C _{18:1} ω7c	8.9	16.5 (12.3)	8.7 (11.7)	8.1	8.7	8.1	2.5	7.8	7.8	12.8	6.6	9.0	12.1	7.9
C _{20:0}	—	2.6	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Summed feature 3*	41.5	38.1 (38.1)	43.8 (35.2)	40.7	44.7	51.7	48.3	46.0	45.8	54.0	55.2	54.2	49.0	47.0

*Summed feature 3 includes C_{16:1} ω7c and/or iso-C_{15:0} 2-OH. Since branched fatty acids were not detected (exception *M. haematophila* KACC 13771^T) it appears to be more likely that summed feature 3 indicates the presence of C_{16:1} ω7c, only.

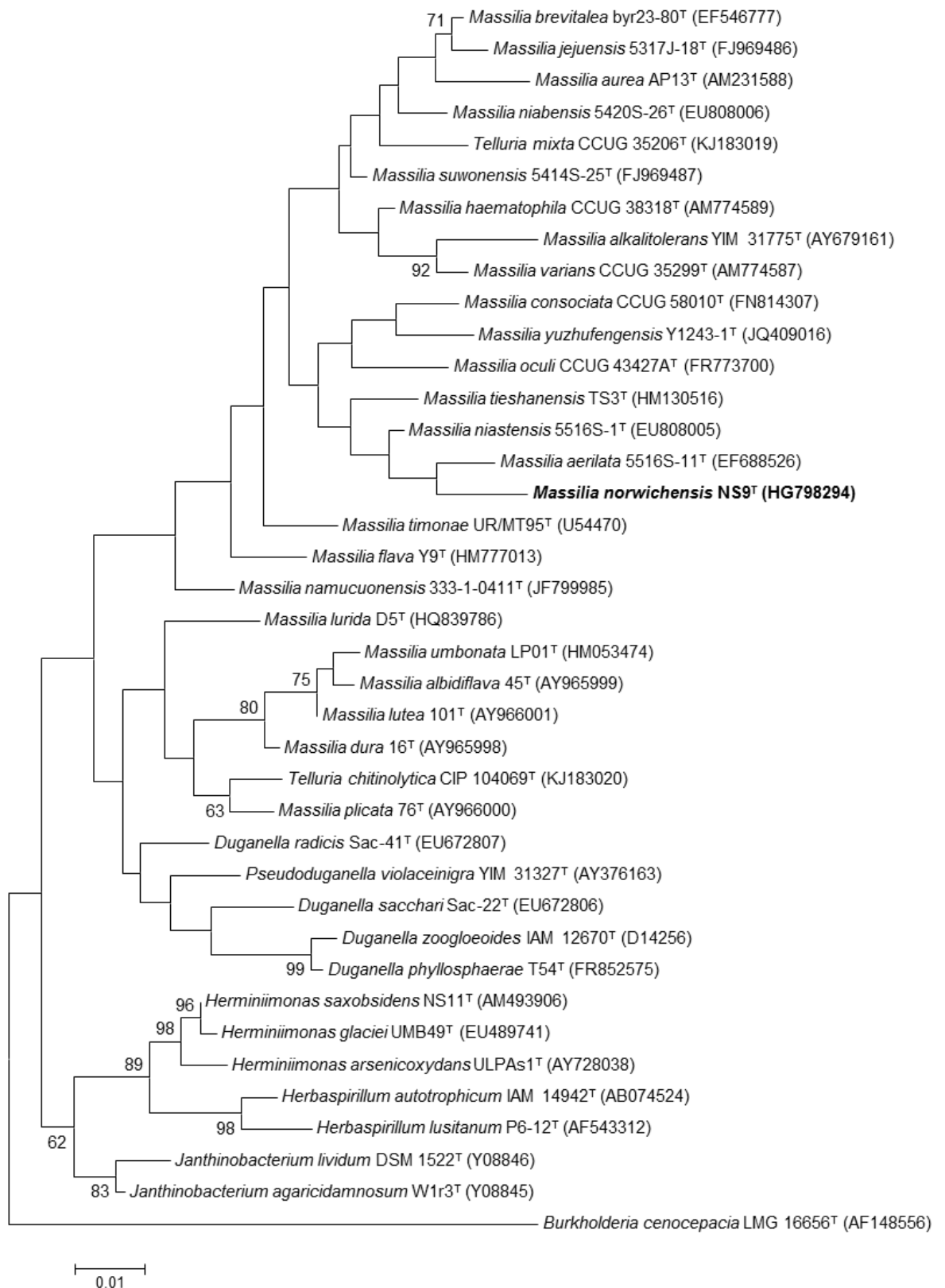


Figure 1: Maximum-likelihood tree based on 16S rRNA gene sequences (1327 nucleotides) showing the phylogenetic position of strain NS9^T. Confidentiality of branching knots was investigated by 1000 bootstrap replications. Only bootstrap values >60 % are shown. The tree was calculated applying the software package MEGA 5.2.2. (Tamura *et al.*, 2011) using the Tamura-Nei evolutionary model (Tamura & Nei, 1993). *Burkholderia cenocepacia* LMG 16656^T was used as an outgroup. Bar, 0.01 accumulated changes per nucleotide.

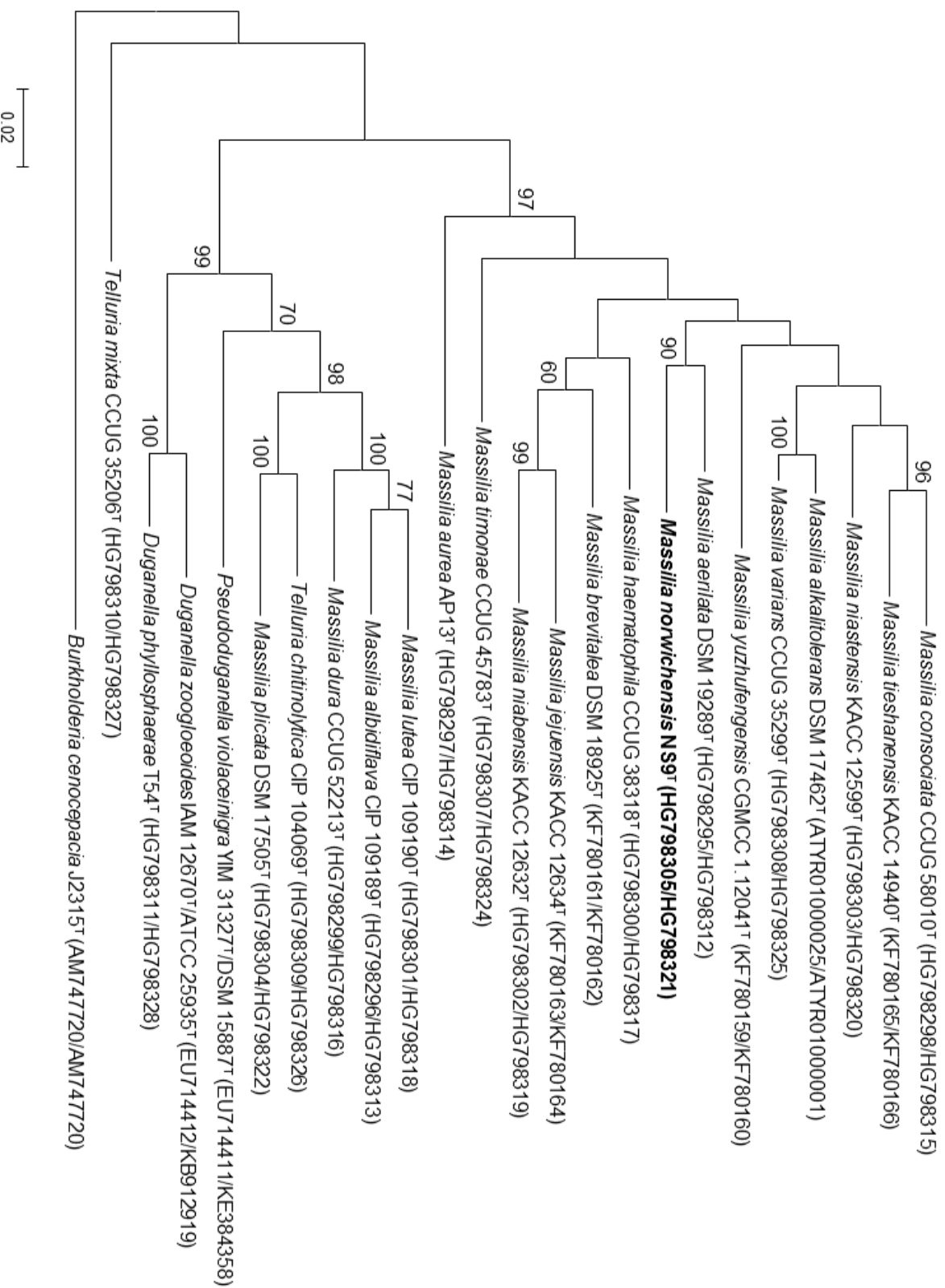


Figure 2: Phylogenetic tree based on concatenated partial *gypB* and *lepA* gene sequences applying the maximum-likelihood algorithm. The tree was constructed using the software package MEGA 5.2.2. (Tamura *et al.*, 2011) and confidentiality of branching knots was analysed by 1000 bootstrap replications. Only bootstrap values > 60 % are indicated. *Burkholderia cenocepacia* J2315^T was used as an outgroup. Bar, 0.02 accumulated changes per nucleotide.

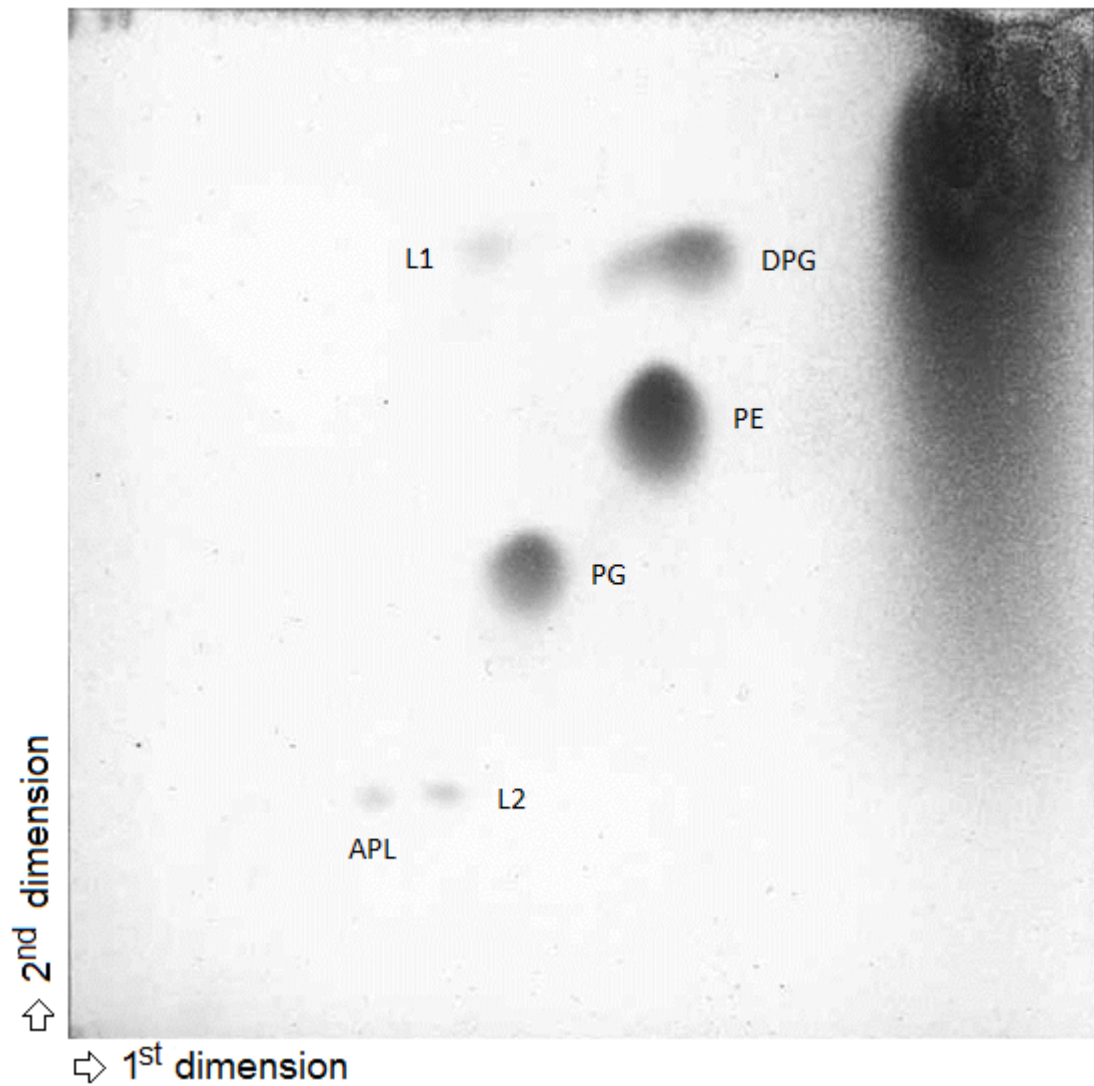
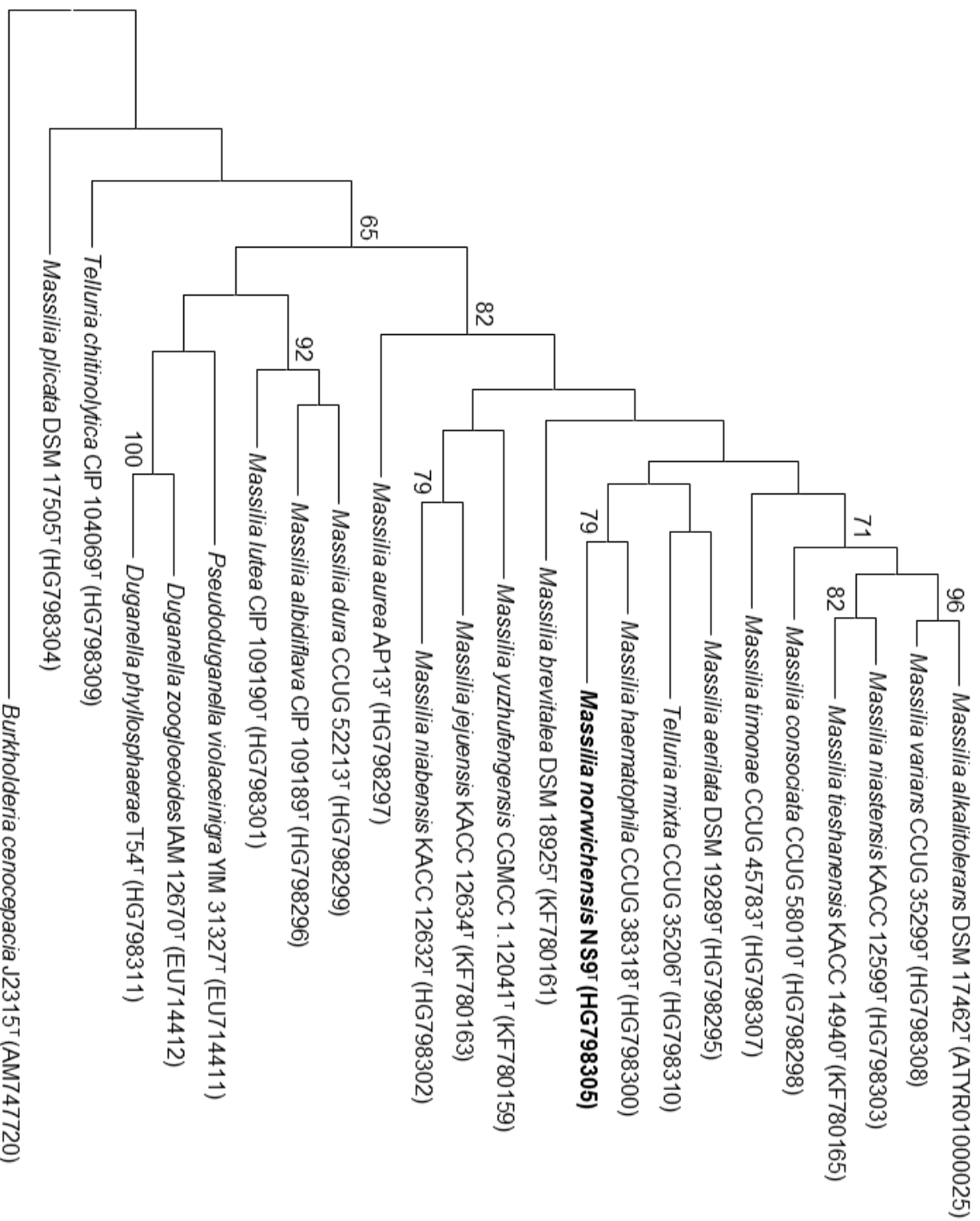


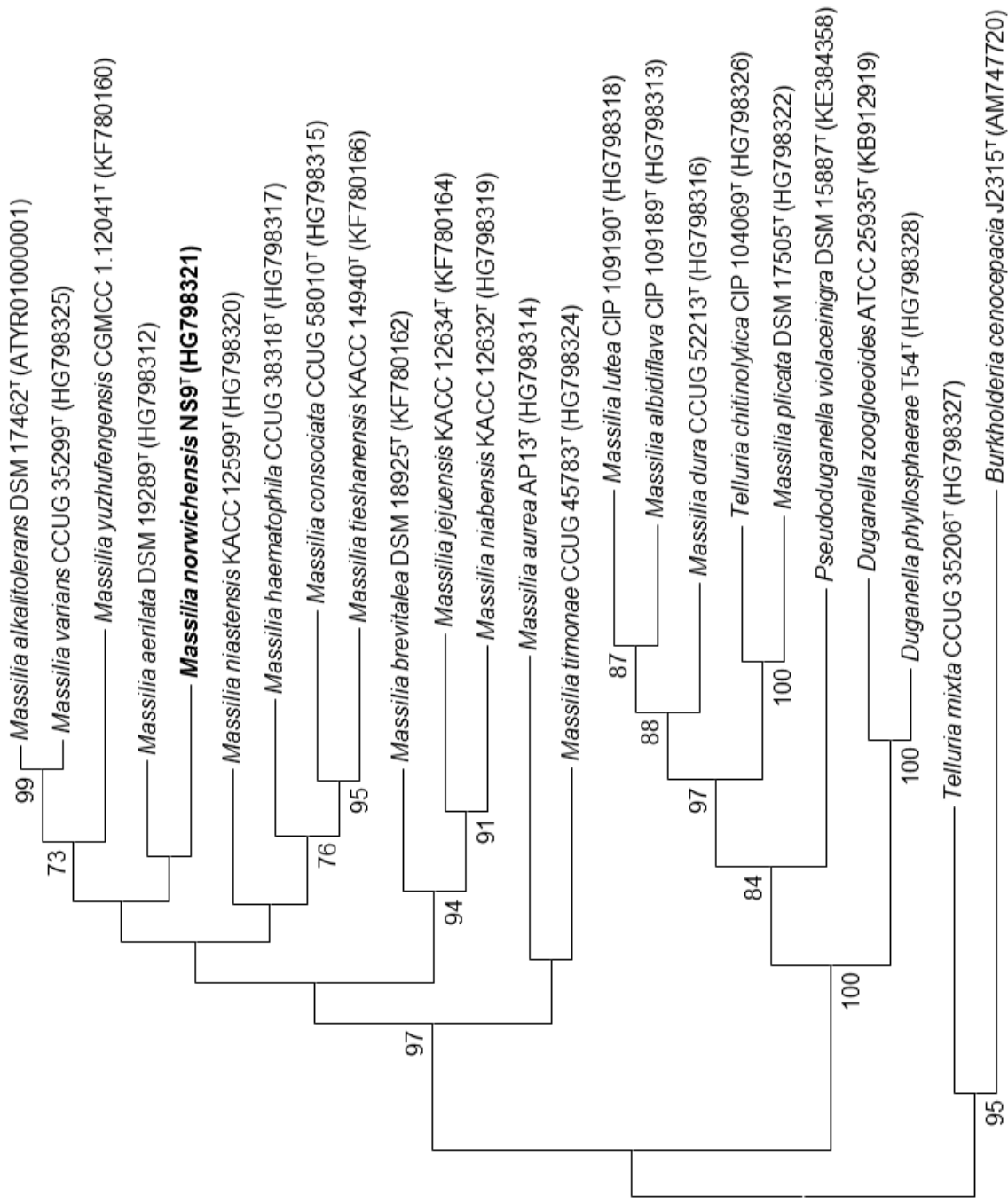
Figure 3: Two-dimensional thin-layer chromatogram displaying the polar lipid profile of *Massilia norwichensis* sp. nov. NS9^T after detection with molybdophosphoric acid. DPG, diphosphatidylglycerol; PE, phosphatidylethanolamine; PG, phosphatidylglycerol; L1-2, unidentified polar lipids; APL, unidentified aminophospholipid.



C. Manuskript

Supplementary Figure S1: Phylogenetic maximum-likelihood tree based on partial *gyrB* gene sequences (810 nucleotides). Bootstrap values

≥65 % shown at the nodes are the result from 1000 replications. The tree was constructed employing the software package MEGA 5.2.2. (Tamura *et al.*, 2011). *Burkholderia cenocepacia* J2315^T was used as an outgroup. Bar, 0.05 accumulated changes per nucleotide.



Supplementary Figure S2: Maximum-likelihood tree based on partial *lepA* gene sequences (1299 nucleotides). The tree was constructed using the software package MEGA 5.2.2. (Tamura *et al.*, 2011). Bootstrap values >60 % shown at the nodes are the result of 1000 replications. *Burkholderia cenocepacia* J2315^T was used as an outgroup. Bar, 0.02 accumulated changes per nucleotide.

D. Curriculum vitae

Ivana Orthová, BSc
Ruthnergasse 56-60/14/09
1210 Wien

geboren am 24. Mai 1986 in Banská Bystrica (Slowakei)
slowakische Staatsbürgerin
seit 1998 in Österreich lebend

e-mail: ivio@gmx.at

Ausbildung

1992-1998 Grundschule in der Slowakei

1998-2000 Integrationshauptschule Brüllgasse 18 in Wien

2000-2004 BRG 7 Kandlgasse 39 in Wien

Okt. 2004 Bakkalaureatsstudium Biologie an der Universität Wien

Abschluss Bakkalaureat

Masterstudium Molekulare Mikrobiologie und Immunbiologie

März 2012 Masterarbeit im Labor von Univ.-Doz. Dipl.-Biol. Dr.rer.nat. H.-J. Busse

Bereich der chemotaxonomischen Charakterisierung und phylogenetischen Einordnung von Umweltisolaten

Sept. 2012 Tutorin bei der Übung in molekularer Mikrobiologie und Systematik

Okt. 2014 Abschluss des Masterstudiums Molekulare Mikrobiologie und Immunbiologie

E. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein Dank gilt Frau O. Univ.-Prof. Dr.rer.nat. Renate Rosengarten und dessen Nachfolgerin Univ.-Prof. Dipl.-Ing. Dr.rer.nat. Monika Ehling-Schulz sowie meinem Betreuer, Univ.-Doz. Dipl.-Biol. Dr.rer.nat. Hans-Jürgen Busse für die Möglichkeit, meine Masterarbeit am Institut für Bakteriologie, Mykologie und Hygiene durchzuführen, sowie allen Mitarbeitern für die gute Aufnahme am Institut. Bei Dr.med.vet. Igor Lončarić und Dr.rer.nat. Ivana Indiková möchte ich mich für ihre wertvollen Tipps bei den PCR's bedanken.

Ebenfalls möchte ich mich bei meiner Laborkollegin Sandra Baumgardt, bei meiner Familie und Freunden dafür bedanken, dass sie immer ein offenes Ohr für mich hatten und mich unterstützt haben. Besonderer Dank gilt hier Dominika Orthová und Michael Braunöder.