

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Lehrstuhl für Mikrobielle Ökologie

**Biodiversität von Mikroorganismen
im Produktionsumfeld pharmazeutischer Betriebe**

Gernot Rieser

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. U. M. Kulozik

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. S. Scherer

2. Univ.-Prof. Dr. R. F. Vogel

Die Dissertation wurde am 05.03.2014 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 03.07.2014 angenommen.

Teile der vorliegenden Dissertation wurden bereits vorab veröffentlicht:

Rieser G., Scherer S. und Wenning M., 2013, *Micrococcus cohnii* sp. nov., isolated from the air in a medical practice, *Int J Syst Evol Microbiol* 63:80-85.

Rieser G., Scherer S. und Wenning M., 2013, *Naumannella halotolerans* gen. nov., sp. nov., a Gram-positive coccus of the family *Propionibacteriaceae* isolated from a pharmaceutical clean room and from food, *Int J Syst Evol Microbiol* 62:3042-3048.

Danksagung

Die vorliegende Dissertation wurde unter der Leitung von Prof. Dr. Siegfried Scherer am Lehrstuhl für Mikrobielle Ökologie am Wissenschaftszentrum Weihenstephan, Technische Universität München angefertigt.

Mein ausdrücklicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. Siegfried Scherer für die Überlassung des Themas, für die persönliche Betreuung und für das in mich gesetzte Vertrauen.

Univ.-Prof. Dr. Rudi Vogel möchte ich für die freundliche Übernahme des Koreferates danken.

Mein besonderer Dank gilt meiner Betreuerin Dr. Mareike Wenning für ihre anhaltende Unterstützung und die konstruktiven Anregungen und Diskussionen. Ich möchte mich auch für die Unterstützung bezüglich der Publikationen und für die kritische Durchsicht dieser Arbeit vielmals bei ihr bedanken.

Des Weiteren möchte ich Lisa Rieder und Andreas Bischof ganz herzlich für ihre Hilfsbereitschaft und das freundschaftliche Arbeitsklima im Labor danken. Bei Dr. Herbert Seiler möchte ich mich für die hilfreichen fachlichen Diskussionen und Anregungen bedanken.

Bei allen Kolleginnen und Kollegen der Abteilung Mikrobiologie möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit und die Hilfsbereitschaft bedanken.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mich während der gesamten Zeit meiner Ausbildung in jeglicher Form unterstützten haben.

Inhaltsverzeichnis

ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	IV
TABELLENVERZEICHNIS.....	V
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	VII
ZUSAMMENFASSUNG.....	X
SUMMARY.....	XII
I EINLEITUNG.....	1
1 Pharmazeutisches Produktionsumfeld.....	1
2 FTIR-Spektroskopie	4
3 Taxonomische Einordnung von Bakterienstämmen	6
3.1 Die Gattung <i>Micrococcus</i>	8
3.2 Die Familie <i>Propionibacteriaceae</i>	9
4 Kultivierungsunabhängige, auf PCR-basierende, Methoden zur Untersuchung mikrobieller Gemeinschaften.....	9
5 Zielsetzung	12
II MATERIAL UND METHODEN.....	13
1 FTIR-Spektroskopie	13
1.1 Probenvorbereitung und Messung.....	13
1.2 Spektrenauswertung und Identifizierung.....	13
1.3 Bewertung des Identifizierungsergebnisses.....	13
1.4 Erweiterung der FTIR-Referenzdatenbanken.....	14
1.5 Validierung der FTIR-Referenzdatenbanken durch die Leave-One-Out-Methode.....	14
1.6 Externe Validierung der FTIR-Referenzdatenbanken mittels Praxisisolaten.....	15
2 Gensequenzanalyse kultivierter Bakterienstämme.....	16
2.1 Identifizierung von Bakterienstämmen durch Gensequenzanalyse.....	16
2.2 Phylogenetische Untersuchungen zur Neubeschreibung bakterieller Taxa	17
2.2.1 16S rRNA-Gen	18
2.2.2 recA-Gen	18
3 Identifizierung von Bakterienstämmen mittels API-System.....	19
3.1 Datenauswertung.....	19
4 Phänotypische Charakterisierung neuer bakterieller Taxa.....	19
4.1 Morphologische Charakterisierung	19
4.2 Physiologische Charakterisierung	20

4.2.1 Enzymatische Aktivität und Substratverwertung	20
4.2.2 Wachstumsgrenzen	20
4.3 Chemotaxonomische Charakterisierung	21
4.3.1 Respiratorische Chinone.....	21
4.3.2 Polare Lipide.....	21
4.3.3 Peptidoglykan	21
4.3.4 Zelluläre Fettsäuren.....	22
4.3.5 Ganzzell-Zucker.....	22
4.3.6 G+C-Gehalt	22
5 Methoden zur kultivierungsfreien Untersuchung der mikrobiellen Biodiversität in der Luft pharmazeutischer Reinräume	23
5.1 Herstellen von Zellsuspensionen	23
5.2 Mikroskopische Bestimmung der Zellzahl	23
5.3 Zellaufschluss	24
5.4 DNA-Reinigung	24
5.4.1 Phenol-Chlorophorm Extraktion.....	24
5.4.2 DNA-Reinigungskit	26
5.5 DNA-Fällung	26
5.6 PCR.....	26
5.6.1 Vorversuche zur Sensitivität und Effizienz der PCR.....	26
5.6.2 PCR für kultivierungsfreie Methoden.....	27
III ERGEBNISSE.....	13
1 FTIR-Spektroskopie als Identifizierungsmethode bakterieller Isolate aus pharmazeutischen Reinräumen	31
1.1 Anpassung der FTIR-Referenzdatenbanken an die mikrobielle Biodiversität pharmazeutischer Reinräume.....	31
1.2 Validierung der FTIR-Referenzdatenbanken durch die Leave-One-Out-Methode.....	33
1.3 Externe Validierung der FTIR-Referenzdatenbanken mittels Praxisisolaten.....	35
1.3.1 Detektierte mikrobielle Biodiversität in pharmazeutischen Reinräumen	38
1.3.2 Identifizierung von Reinraumisolaten durch FTIR-Spektroskopie	39
1.3.2.1 Gram-positive, sporenbildende Bakterien	39
1.3.2.2 Gram-positive Kokken.....	40
1.3.3 Identifizierung von Reinraumisolaten durch das API-System	41
1.3.3.1 Gram-positive, sporenbildende Bakterien	41
1.3.3.2 Gram-positive Kokken.....	42
2 Methodenentwicklung zur kultivierungsfreien Untersuchung der mikrobiellen Biodiversität in der Luft pharmazeutischer Reinräume	43
2.1 Vorversuche zur Sensitivität und Effizienz der PCR.....	43
2.1.1 Ermittlung der niedrigstmöglichen Annealingtemperatur.....	43
2.1.2 Überprüfung der Sensitivität	44
2.1.3 Effizienz der 16S rRNA-Genamplifikation in 50µl und 100µl PCR-Ansätzen	45
2.1.4 Mikroskopische Bestimmung der Zellzahl in Zellsuspensionen	45

2.2 Versuche zur Etablierung einer kultivierungsfreien Methode zur Untersuchung der mikrobiellen Biodiversität in niedrig konzentrierten Bakteriensuspensionen.....	46
3 Beschreibung neuer bakterieller Taxa.....	50
3.1 Neubeschreibung der Spezies <i>Micrococcus cohnii</i>	50
3.1.1 Phylogenetische Analysen.....	50
3.1.1.1 16S rRNA-Gen.....	50
3.1.1.2 recA-Gen.....	52
3.1.2 Phänotypische Charakterisierung	55
3.1.2.1 Chemotaxonomische Charakterisierung	56
3.1.2.2 Morphologische und physiologische Charakterisierung	58
3.2 Neubeschreibung der Gattung <i>Naumannella</i>	59
3.2.1 Phylogenetische Analysen.....	59
3.2.1.1 16S rRNA-Gen.....	60
3.2.1.2 recA-Gen.....	63
3.2.2 Phänotypische Charakterisierung	64
3.2.2.1 Chemotaxonomische Charakterisierung	64
3.2.2.2 Morphologische und Physiologische Charakterisierung	66
IV DISKUSSION.....	13
1 FTIR-Spektroskopie als Identifizierungsmethode bakterieller Isolate aus pharmazeutischen Reinräumen	68
1.1 Detektierte Biodiversität in pharmazeutischen Reinräumen.....	68
1.2 Validierung der FTIR-Referenzdatenbanken durch die Leave-One-Out- Methode.....	70
1.3 Externe Validierung der FTIR-Spektroskopie mittels Praxisisolaten	72
1.3.1 Identifizierung der Reinraumisolate durch FTIR-Spektroskopie	73
1.3.2 Identifizierung der Reinraumisolate durch das API-System.....	77
1.3.3 Vergleich der phänotypischen Identifizierungsmethoden.....	79
2 Methodenentwicklung zur kultivierungsfreien Untersuchung der mikrobiellen Biodiversität in der Luft pharmazeutischer Reinräume	81
2.1 Vorversuche zur Sensitivität und Effizienz der PCR.....	82
2.1.1 Ermittlung der niedrigstmöglichen Annealingtemperatur.....	82
2.1.2 Überprüfung der Sensitivität	83
2.2 Versuche zur Etablierung einer kultivierungsfreien Methode zur Untersuchung der mikrobiellen Biodiversität in niedrig konzentrierten Bakteriensuspensionen.....	83
2.2.1 Zellaufschluss	84
2.2.2 DNA-Reinigung.....	85
2.2.3 DNA-Fällung	86
2.2.4 PCR.....	87
2.3 Anwendbarkeit der getesteten Methode und ähnlichen Studien	92
3 Beschreibung neuer bakterieller Taxa.....	94
3.1 Neubeschreibung der Spezies <i>Micrococcus cohnii</i>	94
3.2 Neubeschreibung der Gattung <i>Naumannella</i>	98
4 Ausblick	101

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	FTIR-Spektrum von <i>S. hominis</i> (DSM 20328 ^T).....	6
Abbildung 2	Übliche Ansätze zur kultivierungsunabhängigen Untersuchung mikrobieller Gemeinschaften.	10
Abbildung 3	Validierung der FT-IR Spektren Datenbanken nach der Leave-one-out-Methode	35
Abbildung 4	PCR bei unterschiedlichen Annealingtemperaturen	44
Abbildung 5	Amplifikation des 16S rRNA-Gens aus verschiedenen Verdünnungen eines Zellysats von <i>S. epidermidis</i>	44
Abbildung 6	Phylogenetischer Baum (berechnet nach der Neighbor-Joining-Methode) basierend auf den 16S rRNA-Gensequenzen der Stämme WS4599, WS4601 ^T , WS4602 und den publizierten 16S rRNA-Gensequenzen nahe verwandter Taxa.....	52
Abbildung 7	Schematische Darstellung der Primer zur Amplifizierung und Sequenzierung von <i>recA</i> -Genfragmenten der Gattung <i>Micrococcus</i>	54
Abbildung 8	Phylogenetischer Baum (berechnet nach der Neighbor-Joining-Methode) basierend auf den <i>recA</i> -Gensequenzen der Stämme WS4599, WS4601 ^T , WS4602 und nahe verwandter Spezies der Gattung <i>Micrococcus</i>	55
Abbildung 9	Mittels 2-dimensionaler Dünnschichtchromatographie (DC) aufgetrennte polare Lipide des Stammes WS4601 ^T	57
Abbildung 10	Phylogenetischer Baum (berechnet nach der Neighbor-Joining-Methode) basierend auf den 16S rRNA-Gensequenzen der Stämme WS4616 ^T , WS4617, WS4623, WS4624 und den publizierten 16S rRNA-Gensequenzen nahe verwandter Taxa	62
Abbildung 11	Phylogenetischer Baum (berechnet nach der Neighbor-Joining-Methode) basierend auf den <i>recA</i> -Gensequenzen der Stämme WS4616 ^T , WS4617, WS4623, WS4624 und nahe verwandter Taxa	63
Abbildung 12	Mittels 2-dimensionaler Dünnschichtchromatographie (DC) aufgetrennte polare Lipide des Stammes WS4616 ^T	65

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Einteilung der Reinraumklassen.....	2
Tabelle 2	Empfohlene Obergrenzen der mikrobiellen Kontamination in den unterschiedlichen Reinraumklassen	2
Tabelle 3	Absorption von Zellbestandteilen in spezifischen Bereichen des FTIR-Spektrums.....	5
Tabelle 4	Unterschiede der Methoden M1- M21	25
Tabelle 5	Zur Validierung der Datenbank für sporenbildende Bakterien nach der Leave-one-out-Methode verwendete Spekten.....	33
Tabelle 6	Zur Validierung der Datenbank für Gram-positive, nicht-sporenbildene Bakterien nach der Leave-one-out-Methode verwendete Spekten.....	34
Tabelle 7	Treffsicherheit der FTIR-Spektroskopie und des API-Systems bei der Identifizierung von Gram-positiven Kokken und sporenbildenden Bakterien, isoliert aus pharmazeutischen Reinräumen.. ..	36
Tabelle 8	Sensitivität (SE), Spezifität (SP) und der Positive Predictive Value (PPV), berechnet für die Identifizierung von Gram-positiven Kokken und sporenbildenden Bakterien durch die FTIR-Spektroskopie und das API-System.	37
Tabelle 9	Bildung von PCR-Produkt in PCR-Ansätzen unterschiedlicher Volumina (50µl bzw. 100µl).....	45
Tabelle 10	Vergleich von KbE/ml und Zellzahl/ml in Suspensionen von <i>S.epidermidis</i> (G6524).	46
Tabelle 11	Ergebnisse der PCR der Methoden 1-21.	49
Tabelle 12	Ähnlichkeit der 16S rRNA-Gensequenzen des Stammes WS4616 ^T und allen beschriebenen Spezies der Gattung <i>Micrococcus</i>	51
Tabelle 13	Ähnlichkeit der <i>recA</i> -Gensequenzen des Stammes WS4601 ^T , WS4602 und allen, in die Untersuchung miteinbezogenen, Spezies der Gattung <i>Micrococcus</i>	55
Tabelle 14	Detektierte zelluläre Fettsäuren des Stammes WS4601 ^T und beschriebener Spezies der Gattung <i>Micrococcus</i>	58
Tabelle 15	Detektierte zelluläre Fettsäuren des Stammes WS4616 ^T und den Typspezies nahe verwandter Gattungen.....	66

Tabelle 16	Unterschiedliche phänotypische Merkmale des Stammes WS4601 ^T und beschriebener Spezies der Gattung <i>Micrococcus</i>	97
Tabelle 17	Unterschiedliche phänotypische Merkmale des Stammes WS4616 ^T und nahe verwandter Taxa.	100
Tabelle 18	Unterschiedliche Merkmale der Stämme WS4616 ^T , WS4617, WS4623 und WS4624.	100

Abkürzungsverzeichnis

16S	Kleine ribosomale Untereinheit
Ala	Alanin
API	<i>analytical profile index</i>
Asp	Asparaginsäure
bp	<i>base pairs</i>
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
C/I	Chlorophorm/ Isoamylalkohol
DAP	Diaminopimelinsäure
DB	Datenbank
DC	Dünnschichtchromatographie
DGGE	Denaturierende Gradienten-Gelelektrophorese
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DSMZ	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen
EMBL	<i>european molecular biology laboratory</i>
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
FDA	<i>food and drug administration</i>
FTIR (-Spektroskopie)	Fourier-transform Infrarot (-Spektroskopie)
gDNA	Genomische DNA
gen. nov.	<i>genus novum</i>
Glu	Glutaminsäure
Gly	Glycin
H ₂ O _{dest.}	Destilliertes Wasser
HEPA (-Filter)	<i>high efficiency particulate air (-filter)</i>
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
IR	Infrarot
KbE	Koloniebildende Einheit
KNN	Künstliches neuronales Netz
KNS	Koagulase-negative Staphylokokken

LMG	Laboratorium für Mikrobiologie der Universität Gent (Belgien)
Lys	Lysin
NaAc	Natriumacetat
P/C/I	Phenol/ Chlorophorm/ Isoamylalkohol
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PPV	<i>positive predictive value</i>
qPCR	Quantitative PCR
rpm	<i>rounds per minute</i>
rRNA	Ribosomale Ribonukleinsäure
SDS	<i>sodium dodecyl sulphate</i>
sp.	<i>species</i>
sp.nov.	<i>species nova</i>
spp.	<i>species pluralis</i>
T-RFLP	Terminaler Restriktions-Fragmentlängen-Polymorphismus
TSA	Trypton Soja Agar
TSB	Trypton Soja Bouillon
ÜNK	Übernachtkultur
w/v	<i>weight per volume</i>
WS	Weihenstephaner Mikroorganismensammlung, Freising, Deutschland

Abkürzungen von Gattungsnamen

A.	<i>Aneurinibacillus</i>
B.	<i>Bacillus</i>
Bb.	<i>Brachybacterium</i>
Br.	<i>Brevibacillus</i>
D.	<i>Dermacoccus</i>
E.	<i>Escherichia</i>
G.	<i>Geobacillus</i>

<i>K.</i>	<i>Kocuria</i>
<i>M.</i>	<i>Micrococcus</i>
<i>Ml.</i>	<i>Microlunatus</i>
<i>Mp.</i>	<i>Micropruina</i>
<i>P.</i>	<i>Paenibacillus</i>
<i>Pc.</i>	<i>Propionicicella</i>
<i>Pm.</i>	<i>Propionicimonas</i>
<i>S.</i>	<i>Staphylococcus</i>
<i>T.</i>	<i>Terribacillus</i>

Zusammenfassung

In der pharmazeutischen Industrie findet ein großer Teil der Produktion in Reinräumen statt, um die Gefahr einer Kontamination der Produkte durch belebte und unbelebte Partikel zu minimieren. Die in diesen Räumen auftretenden mikrobiologischen Kontaminanten werden im Rahmen eines Umgebungsmonitorings regelmäßig quantifiziert und identifiziert. Die am häufigsten aus dieser Umgebung isolierten Bakterien sind Gram-positive Kokken und sporenbildende Bakterien.

Um die Fourier transform Infrarot (FTIR)-Spektroskopie als alternative Methode zu in der pharmazeutischen Industrie üblicherweise verwendeten Systemen zur Identifizierung von sporenbildenden Bakterien und Gram-positiven Kokken zu etablieren, wurden in dieser Arbeit bestehende FTIR-Datenbanken an die mikrobielle Biodiversität pharmazeutischer Reinräume angepasst. Zur Validierung dieser Datenbanken wurden 70 sporenbildende Stämme und 170 Stämme Gram-positiver Kokken, die im Zuge eines Umgebungsmonitoring pharmazeutischer Reinräume isoliert wurden, mittels FTIR-Spektroskopie und der 16S rRNA-Gensequenzanalyse als Referenzmethode identifiziert. Zum Vergleich wurden die isolierten Stämme auch mittels API-System, einer in der pharmazeutischen Industrie häufig verwendeten Methode, identifiziert. Der Anteil an auf Speziesebene korrekt identifizierten Stämmen durch die FTIR-Spektroskopie lag in der Gruppe der Gram-positiven Kokken bei 79,4% und bei den sporenbildenden Bakterien bei 84,3%. Die entsprechenden durch das API-System erreichten Anteile lagen nur bei 42,9% und 52,9%. Die FTIR-Spektroskopie erwies sich unter Verwendung der angepassten Referenzdatenbanken in der durchgeführten Validierung als adäquate, im Vergleich zum API-System zuverlässigere und damit besser geeignete Methode zur Identifizierung von Gram-positiven Kokken und sporenbildenden Bakterien aus pharmazeutischen Reinräumen.

Um die Biodiversität in der Luft pharmazeutischer Reinräume ohne Kultivierungsschritt untersuchen zu können, wurden anschließend verschiedene Methoden zur Amplifizierung bakterieller 16S rRNA-Gene aus niedrig konzentrierten Bakteriensuspensionen hinsichtlich ihrer Sensitivität überprüft. Die getesteten Methoden zeigten jedoch eine zu geringe Sensitivität um 16S rRNA-Gene aus Zellsuspensionen zu amplifizieren, deren Zellkonzentrationen in einem für Luftproben aus Reinräumen erwarteten Bereich lagen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden mehrere Stämme aus pharmazeutischen Reinräumen isoliert, die auf Basis einer 16S rRNA-Gensequenzanalyse keiner bekannten Spezies bzw. Gattung eindeutig zugeordnet werden konnten. Zwei dieser Stämme wurden zusammen mit weiteren, aus anderen Quellen isolierten, Stämmen mittels polyphasischem Ansatz charakterisiert. Auf Basis der daraus gewonnenen Daten konnten eine neue Spezies der Gattung *Micrococcus* (*Micrococcus cohnii*) und eine neue Spezies einer neuen Gattung der Familie *Propionibacteriaceae* (*Naumannella halotolerans*) beschrieben werden.

Summary

In the pharmaceutical industry, clean rooms became an indispensable equipment to prevent contamination of products by viable and non-viable particulates. In the course of an environmental monitoring process, the microbiological contamination in clean rooms is continuously observed quantitatively and qualitatively. The most frequently isolated microorganisms from samples of environmental monitoring in the pharmaceutical industry belong to the groups of Gram-positive cocci and spore forming bacteria.

To establish the Fourier-transform infrared (FTIR) spectroscopy as an alternative method for identification of Gram-positive cocci and spore forming bacteria, existing FTIR databases were adapted to the microbial biodiversity present in pharmaceutical clean rooms. To validate these databases, 70 strains of spore forming bacteria and 170 strains of Gram-positive cocci, from a current pharmaceutical clean room monitoring, were identified by FTIR spectroscopy and 16S rRNA gene sequence analyses which served as reference method. The same set of strains was identified by the API system, a conventionally used method for identifying bacterial isolates in the pharmaceutical industry. The rate of strains, correctly identified at species level, by FTIR spectroscopy was 79.4% in the group of Gram-positive cocci and 84.3% in the group of spore forming bacteria. The corresponding values, obtained by the API system were only 42.9% and 52.9%, respectively. The results of the validation shows, that FTIR spectroscopy, in combination with the adapted databases, is an appropriate and in comparison to the routinely used API-system more reliable method for identifying Gram-positive cocci and spore forming bacteria, isolated from pharmaceutical environments.

To investigate the biodiversity in the air of pharmaceutical clean rooms without a cultivation step, several different methods for amplifying 16S rRNA genes from bacterial suspensions with low cell counts were checked regarding their sensitivity. However, the screened methods showed a too low sensitivity for amplifying 16S rRNA genes from suspensions with concentrations expected for airsamples of pharmaceutical clean rooms.

In the course of this study, several bacterial strains were isolated, not assignable unambiguously to a validly described species or genus by 16S rRNA gene sequence analyses. For two of them, strains with high genetic similarity were found, isolated from different habitats. After a characterisation of these strains by a polyphasic

approach three strains could be assigned to a novel species of the genus *Micrococcus* (*Micrococcus cohnii*) and four strains were assigned to a novel species of a novel genus of the family *Propionibacteriaceae*, referred to as *Naumannella halotolerans*.

I. Einleitung

1 Pharmazeutisches Produktionsumfeld

Um eine Kontamination von Produkten durch Mikroorganismen und unbelebte Partikel zu verhindern, findet die industrielle Herstellung pharmazeutischer Produkte zu einem großen Teil in Reinräumen statt. Reinräume zur Herstellung steriler pharmazeutischer Produkte werden abhängig von der maximal zulässigen Konzentration an unbelebten Partikeln definierter Größe und Grenzwerten für die zulässige mikrobiologische Kontamination in verschiedene Klassen unterteilt, die von verschiedenen Richtlinien wie den „EU Guidelines to Good Manufacturing Practice“ (Grades A-D, European Commission 2008) oder den „FDA Guidance for Industry“ (Classes 100-100000, Food and Drug Administration 2004) definiert werden (Tabelle 1, Tabelle 2). Es wird dabei zwischen Grenzwerten unterschieden, die bei Anwesenheit („in operation“) oder Abwesenheit („at rest“) von Personal nicht überschritten werden sollten. Die einzelnen Schritte der Produktion werden jeweils in bestimmten Reinräumen durchgeführt, deren Einteilung von Bereichen für vorbereitende Arbeitsschritte mit einer maximal zulässigen Konzentration von 3.520.000 Partikeln $\geq 0.5\mu\text{m}^3$ (at rest; Grade D, Class 100.000) bis hin zu Reinräumen für kritische Herstellungsschritte, wie der Abfüllung steriler Produkte mit einer maximal zulässigen Konzentration von 3.520 Partikeln $\geq 0.5\mu\text{m}^3$ (at rest; Grade A, Class 100) reicht.

Die Konstruktion von Reinräumen ist darauf ausgerichtet, die Konzentration von Kontaminanten bestimmter Partikelgröße in der Luft zu minimieren. Der Einsatz von „High Efficiency Particulate Air“ (HEPA)-Filtern reduziert das Eindringen von Mikroorganismen und unbelebten Partikeln bestimmter Größe über die zugeführte Luft. Die Bewegungen von Personal und Arbeitsmitteln zwischen Reinräumen unterschiedlicher Reinheitsgrade, die ein hohes Kontaminationsrisiko bergen, sind nur durch das Passieren von Schleusen möglich. Zudem steigt der Luftdruck im Inneren der Reinräume mit der Reinheitsstufe. Dadurch kann eine Kontamination des Reinraums höherer Reinheitsstufe im Zuge dieser Vorgänge eingeschränkt werden. Weitere Maßnahmen wie die Einhaltung von konstanter Temperatur und Luftfeuchtigkeit und die regelmäßige Anwendung von Reinigungs- und Desinfektionsverfahren wirken zusätzlich der Kontamination durch Mikroorganismen entgegen (Lowery & Mueller 2010).

Tabelle 1 Einteilung der Reinraumklassen nach der maximal zulässigen Anzahl an Partikeln/m³ ≥ 0,5 bzw. ≥ 5,0µm nach dem System der EU Guidelines to Good Manufacturing Practice (European-Commission 2008). -, Wert nicht definiert.

Grade	At rest		In operation	
	0,5µm	5,0µm	0,5µm	5,0µm
A	3520	20	3520	20
B	3520	29	352000	2900
C	352000	2900	3520000	29000
D	3520000	29000	-	-

Tabelle 2 Empfohlene Obergrenzen der mikrobiellen Kontamination in den unterschiedlichen Reinraumklassen nach den EU Guidelines to Good Manufacturing Practice (European-Commission 2008); Durchschnittswerte (in operation). -, Wert nicht definiert.

Grade	Luftprobe KbE/m ³	Sedimentationsplatte (90mm Durchmesser) KbE/4h	Abklatschplatte (55mm Durchmesser) KbE/Platte	Handschuh-Abdruck (5 Finger) KbE/Handschuh
A	< 1	< 1	< 1	< 1
B	10	5	5	5
C	100	50	25	-
D	200	100	50	-

Mikrobiologisches Monitoring pharmazeutischer Reinräume

Pharmazeutische Reinräumen werden regelmäßig im Rahmen eines Umgebungsmonitorings auf Kontaminationen überprüft. Dieses Umgebungsmonitoring schließt neben der Quantifizierung unbelebter Partikel bestimmter Größe auch die Quantifizierung und Identifizierung vorhandener Mikroorganismen mit ein. Für das mikrobiologische Monitoring werden unterschiedliche Methoden angewandt. Für das Umgebungsmonitoring werden Luft und Oberflächenproben gezogen wobei im Allgemeinen drei verschiedene Methoden zum Einsatz kommen. Luftproben werden aktiv über Luftkeimsammler und passiv mittels Sedimentationsplatten gezogen. Mit Luftkeimsammlern wird ein definiertes Volumen an Luft angesaugt wobei die darin enthaltenen Mikroorganismen auf ein Nährmedium geschleudert werden. Mit dieser Methode lässt sich die Anzahl an KbE/m³ Luft bestimmen. Sedimentationsplatten sind Petrischalen mit Nährmedium, die im Reinraum geöffnet und über einen bestimmten Zeitraum der Reinraumluft ausgesetzt werden. Die Anzahl an Keimen, die während dieser Zeit auf die Platte fallen, gibt ebenfalls Auskunft über den Grad der Kontamination der Reinraumluft.

Oberflächenproben werden hauptsächlich durch Abklatschplatten genommen, wobei ein Nährmedium mit einer Fläche definierter Größe auf eine Oberfläche gedrückt wird wodurch stichprobenartig die Anzahl an Keimen pro Oberfläche bestimmt werden kann. Zum Umgebungsmonitoring wird in Räumen höherer Reinheitsstufen (Klasse A und B) zusätzlich ein Personalmonitoring durchgeführt. Dabei werden zum Beispiel mittels Abklatschplatten Proben der Oberflächen von Handschuhen des Personals genommen. Grenzwerte für diese mikrobiologischen Proben werden abhängig von der Reinraumklasse definiert (siehe Tabelle 2).

Durch die Identifizierung der isolierten Mikroorganismen können Rückschlüsse über deren Herkunft gezogen und gezielte Maßnahmen zur Vermeidung weiterer Kontamination ergriffen werden (Cundell 2006, Jimenez 2007). Mikrobiologische Kontamination in pharmazeutischen Reinräumen kann von unterschiedlichen Quellen, wie den Produktionsanlagen oder auch der Reinraumumgebung (durch z.B. fehlerhafte HEPA-Filter) stammen. Der häufigste Weg von Mikroorganismen ins Innere von Reinräumen führt jedoch über das Personal und die Bewegungen von Materialien und Werkzeugen durch Schleusen (Lowery & Mueller 2010). Die häufigsten häufigsten Vertreter in Luft- und Oberflächenproben pharmazeutischer Reinräume stellen die beiden Gruppen der Gram-positiven Kokken und sporenbildenden Bakterien dar. Es konnte gezeigt werden, dass in Reinräumen höherer Reinheitsgrade am häufigsten Keime der bakteriellen Flora der menschlichen Haut isoliert werden. Typische Hautkeime sind Spezies der Gattungen *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Kocuria*, *Corynebacterium* oder *Propionibacterium*. Mit abnehmendem Reinheitsgrad der Reinräume steigt der Anteil an sporenbildenden Bakterien wie *Bacillus* spp. aber auch von Schimmelpilzen die aus unkontrollierten Bereichen in diese Räume eingebracht werden können (Jimenez 2007).

Die routinemäßige Identifizierung der Mikroorganismen wird üblicherweise mittels kommerziell erhältlicher Testkits, wie dem API- (bioMérieux, Frankreich), Vitek- (bioMérieux) oder Biolog-System (Biolog, USA), durchgeführt, die eine Identifizierung auf Speziesebene auf Basis eines Substratverwertungs-Profiles ermöglichen (Sutton & Cundell 2004). Diese Identifizierungssysteme beruhen auf mehreren physiologischen Tests, die zur Erstellung eines biochemischen Profils herangezogen werden. Zur Identifizierung der Mikroorganismen anhand dieser Profile ist der Vergleich mit Referenzen in einer Datenbank notwendig. Diese Testkits sind einfach durchzuführende Methoden, die teilweise mit Systemen zur automatisierten

Ablesung der Ergebnisse kombinierbar sind. Die Zuverlässigkeit dieser Methoden ist jedoch auf Grund eines eingeschränkten Datenbankumfangs begrenzt, der einer in Reinräumen vorhandenen mikrobiellen Biodiversität nur bedingt gerecht werden kann. Eine Alternative zu diesen Methoden könnte durch die FTIR-Spektroskopie eröffnet werden, die den Vorteil einfach zu erweiternder Referenzdatenbanken bietet und somit kontinuierlich an eine gegebene Biodiversität angepasst werden kann.

2 FTIR-Spektroskopie

Die Anwendung der FTIR-Spektroskopie zur Identifizierung und Differenzierung von Bakterien wurde bereits in der Mitte der 1950er Jahre von Thomas & Greenstreet (1954) und Riddle *et al.* (1956) beschrieben. Die Berechnung der Fourier-Transformation der Interferogramme war zu dieser Zeit jedoch auf Grund von technologischen Einschränkungen mit hohem Aufwand verbunden, wodurch ein routinemäßiger Einsatz dieser Methode verhindert wurde. Nach der Entwicklung leistungsfähigerer Geräte zur Datenverarbeitung wurde die Idee zur Identifizierung von Mikroorganismen mittels FTIR-Spektroskopie Anfang der 1990er Jahre, von der Gruppe um Dieter Naumann vom Robert Koch-Institut in Berlin erneut aufgegriffen (Helm *et al.* 1991b, Naumann *et al.* 1991). Die darauf folgende Weiterentwicklung der Methode ermöglichte deren routinemäßigen Einsatz zur Identifizierung zahlreicher mikrobieller Taxa, isoliert aus Lebensmitteln, klinischen Proben und dem pharmazeutischen Umfeld (Amiali *et al.* 2007, Bosch *et al.* 2006, Bosch *et al.* 2008, Büchl *et al.* 2008, Coutinho *et al.* 2009, Kümmerle *et al.* 1998, Kuhm *et al.* 2009, Maquelin *et al.* 2003, Oberreuter *et al.* 2002, Rieser *et al.* in preparation, Wenning *et al.* 2010).

Die FTIR-Spektroskopie basiert darauf, dass Atome innerhalb eines Moleküls, nach Anregung durch Energiezufuhr, in Schwingung versetzt werden. Bei der FTIR-Spektroskopie wird zur Anregung der Atome IR-Strahlung im mittleren IR-Bereich ($4000\text{-}500\text{cm}^{-1}$) genutzt. Die notwendige Energiezufuhr zur Anregung bestimmter Atome ist unterschiedlich und von Faktoren wie der Masse der Atome und den Bindungskräften, die zwischen diesen wirken, abhängig. Auf Basis der unterschiedlichen Intensität des IR-Strahls vor und nach dem Passieren der Probe, wird von einem Detektor ein Interferogramm aufgezeichnet woraus im Anschluss über die Fourier-Transformation ein Absorptionsspektrum errechnet wird (Guenzler &

Gremlich 2003). Auf Grund der unterschiedlichen Energiemenge, die zur Anregung der Atome notwendig ist, kann die Absorption bestimmter funktioneller Molekülgruppen spezifischen Wellenzahlen zugeordnet werden (Naumann, *et al.* 1991). Darauf basierend ist es möglich, die Absorption unterschiedlicher Zellbestandteile bestimmten spektralen Bereichen des Spektrums näherungsweise zuzuordnen (Helm, *et al.* 1991b), (Tabelle 3).

Tabelle 3 Absorption von Zellbestandteilen in spezifischen Bereichen des FTIR-Spektrums

Absorbierende Verbindung	Spektraler Bereich
Fettsäuren	3000-2800cm ⁻¹ 1500-1400cm ⁻¹
Phospholipide	ca. 1740cm ⁻¹
Proteine, DNA/RNA	1800-1500cm ⁻¹
Polysaccharide	1200-900cm ⁻¹

Die, für jeden Mikroorganismus charakteristischen, FTIR-Spektren entstehen durch die Absorption aller vorhandenen Zellbestandteile. Das FTIR-Spektrum stellt somit eine Abbildung der gesamten chemischen Zusammensetzung eines Mikroorganismus dar und wird daher auch als dessen Fingerabdruck bezeichnet. Durch die Vielzahl an, im Spektrum abgebildeten, Zellbestandteilen werden die entsprechenden Peaks nicht einzeln und klar voneinander getrennt, sondern als stark überlagernde Banden dargestellt. Um eine Auflösung des Spektrums in deutlicher erkennbare Peaks und damit eine bessere Unterscheidbarkeit der Spektren unterschiedlicher Mikroorganismen zu erreichen, wird zur weiteren Datenauswertung die erste oder zweite Ableitung des Absorptionsspektrums berechnet (Abbildung 1).

Die Identifizierung eines unbekanntes Mikroorganismus, erfolgt über den Vergleich dessen FTIR-Spektrums mit den Spektren bekannter Mikroorganismen in einer Referenzdatenbank. Um eine erfolgreiche Identifizierung, durch den Vergleich von Spektren zu gewährleisten, ist neben einer geeigneten Referenzdatenbank auch eine standardisierte Probenaufbereitung notwendig, um Abweichungen der chemischen Zusammensetzung der Mikroorganismen zu minimieren.

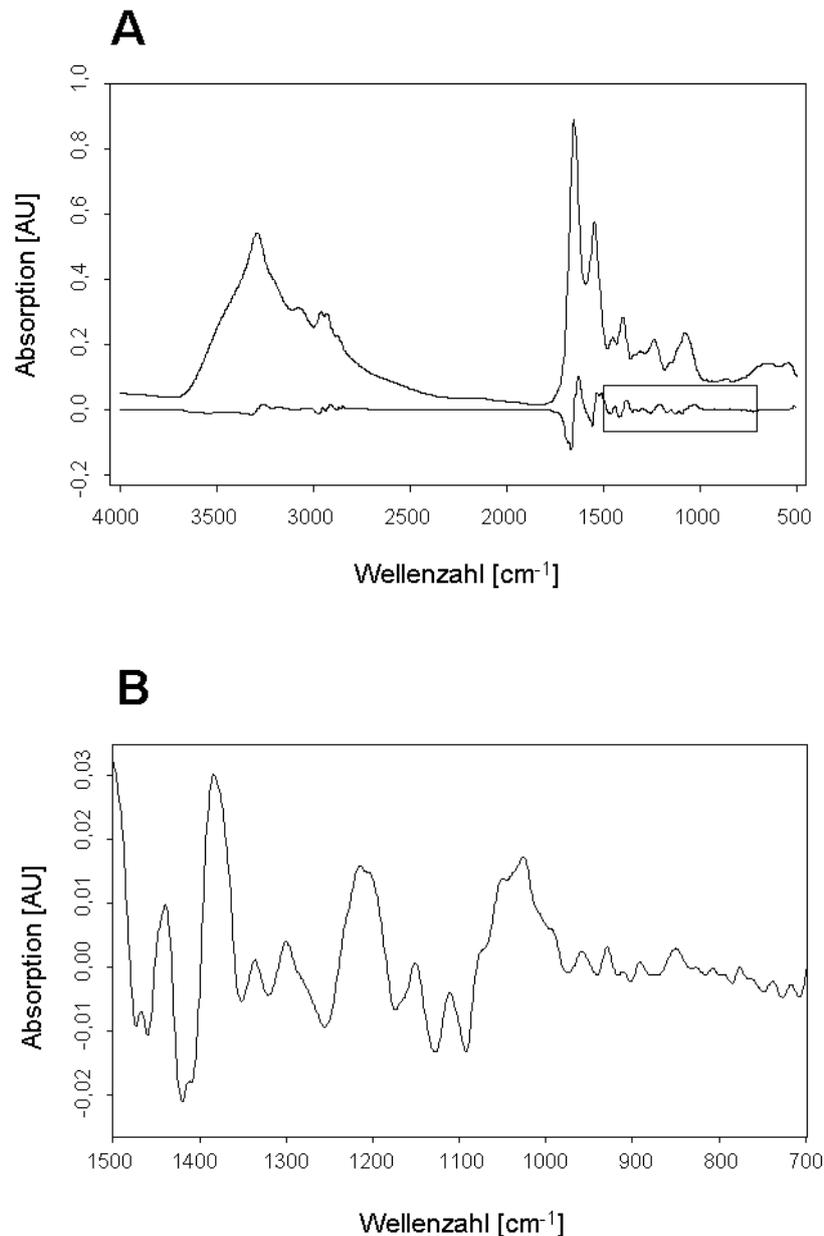


Abbildung 1 FTIR-Spektrum von *S.hominis* (DSM 20328^T) und die daraus berechnete erste Ableitung (A). Im vergrößerten Ausschnitt der ersten Ableitung (1500-700cm⁻¹) ist die Auflösung des Spektrums in deutlicher unterscheidbare Peaks zu erkennen (B).

3 Taxonomische Einordnung von Bakterienstämmen

Die Bakterientaxonomie setzt sich aus den drei Bereichen Klassifizierung, Nomenklatur und Identifizierung zusammen. Die Klassifizierung ist die Zusammenfassung von Organismen in Gruppen (Taxa) auf Basis von Gemeinsamkeiten. Diesen taxonomischen Gruppen werden, nach international gültigen Vorschriften der Nomenklatur, Namen zugewiesen (Lapage *et al.* 1992). In der Identifizierung findet das Klassifikationsschema seine praktische Anwendung in

der Zuordnung von Isolaten zu bekannten oder bisher nicht beschriebenen Taxa. Die wichtigste taxonomische Ebene in der bakteriellen Systematik ist die Spezies (Brenner *et al.* 2005). Für die Spezies gibt es keine offizielle und allgemein gültige Definition, sie kann jedoch grundsätzlich als Gruppe von Stämmen umschrieben werden, die einen hohen Grad an Ähnlichkeit aufweisen und sich in mehreren unabhängigen Merkmalen wesentlich von verwandten Stamm-Gruppen unterscheiden (Colwell *et al.* 1995, Rosselló-Mora & Amann 2001). Die taxonomische Einordnung bakterieller Stämme beruht auf einem polyphasischen Ansatz, wobei die Isolate durch die Untersuchung möglichst vieler unterschiedlicher genotypischer und phänotypischer Merkmale charakterisiert und die Daten anschließend mit jenen beschriebener Taxa verglichen werden (Rosselló-Mora & Amann 2001, Stackebrandt 2006, Vandamme *et al.* 1996). Werden Bakterienstämme einem neuen Taxon zugeordnet, erfolgt nicht nur die Zuordnung der Stämme zu einer neuen Spezies, sondern nach den Vorgaben des bakteriologischen Codes auch zu einer bekannten oder ebenfalls neuen Gattung, die ihrerseits wiederum innerhalb einer Familie in die übergeordneten Taxa des hierarchischen Systems eingegliedert ist oder wird (Lapage, *et al.* 1992, Tindall *et al.* 2010).

Ein erstes Anzeichen dafür, dass ein Stamm einer neuen Spezies isoliert wurde, kann der Vergleich der 16S rRNA-Gensequenz des isolierten Stammes mit den entsprechenden Sequenzen bekannter Spezies liefern. Zahlreiche Untersuchungen geben Hinweise darauf, dass Stämme, die nicht der gleichen Spezies angehören, eine 16S rRNA-Gensequenzähnlichkeit von weniger als 97% aufweisen (Amann *et al.* 1992, Collins *et al.* 1991, Fox *et al.* 1992, Martinez-Murcia *et al.* 1992, Martinez-Murcia & Collins 1990, Tindall, *et al.* 2010). Weist die 16S rRNA-Gensequenz eines Stammes eine Sequenzähnlichkeit von mehr als 97% zur ähnlichsten 16S rRNA-Gensequenz einer beschriebenen Spezies auf, muss für die Neubeschreibung einer Spezies, eine weitere DNA-basierte Analyse, wie die DNA-DNA Hybridisierung oder die Sequenzanalyse eines proteinkodierenden Gens durchgeführt werden um die Abgrenzung der, möglicherweise neuen Spezies, von beschriebenen Spezies zu bestätigen (Stackebrandt *et al.* 2002a, Tindall, *et al.* 2010). Eine 16S rRNA-Gensequenzähnlichkeit von ungefähr 95% zur entsprechenden Sequenz der ähnlichsten beschriebenen Spezies sind hingegen ein Hinweis darauf, dass es sich um einen Stamm einer neuen Gattung handeln könnte (Tindall, *et al.* 2010).

Um die Zugehörigkeit bzw. die Abgrenzbarkeit von Bakterienstämmen von beschriebenen Taxa zu bestätigen, ist eine weiterführende, phänotypische Charakterisierung der Stämme notwendig. Diese sollte neben morphologischen und physiologischen Untersuchungen auch Analysen der Zusammensetzung zellulärer Komponenten wie der Fettsäuren, der respiratorischen Chinone, der polaren Lipide oder des Peptidoglykans umfassen (Smibert & Krieg 1994, Tindall, *et al.* 2010). In den Vergleich isolierter Stämme mit nahe verwandten Taxa werden unabhängig von der hierarchischen Stufe, immer die Typ-Organismen der entsprechenden Taxa einbezogen. Bei der Beschreibung neuer Spezies werden die neuen Stämme also zumindest mit den Typstämmen aller bzw. nahe verwandter, beschriebener Spezies einer Gattung verglichen. Bei der Neubeschreibung einer Gattung werden dazu die Typstämme der Typspezies von nahe verwandten Gattungen herangezogen (Tindall, *et al.* 2010).

Nach diesem Verfahren wurden in dieser Arbeit drei Stämme einer neuen Spezies der Gattung *Micrococcus* und vier Stämme einer neuen Gattung der Familie der *Propionibacteriaceae* zugeordnet.

3.1 Die Gattung *Micrococcus*

Die Gattung *Micrococcus* wurde erstmals von Cohn (1872) beschrieben und wurde von Stackebrandt *et al.* (1995) und Wieser *et al.* (2002) auf Basis der Ergebnisse von Analysen phänotypischer Merkmale und 16S rRNA-Gensequenzen verbessert. Derzeitig umfasst die Gattung *Micrococcus* neben der Typspezies, *M. luteus* (Cohn 1872, Wieser, *et al.* 2002), die sieben valide beschriebenen Spezies *M. lylae* (Kloos *et al.* 1974, Wieser, *et al.* 2002), *M. antarcticus* (Liu *et al.* 2000), *M. flavus* (Liu *et al.* 2007), *M. endophyticus* (Chen *et al.* 2009), *M. yunnanensis* (Zhao *et al.* 2009), *M. terreus* (Zhang *et al.* 2010), und *M. lactis* (Chittipurna *et al.* 2011). Die Beschreibung einer weiteren Spezies, *M. niistensis*, lag bereits vor, wurde jedoch von den Autoren wieder zurückgezogen, da es ihnen nicht möglich war eine Reinkultur des beschriebenen Stammes in einer Stammsammlung zu hinterlegen (Dastager *et al.* retracted from IJSEM Papers in Press and will not be published in print in IJSEM). *M. niistensis* und die dafür beschriebenen Merkmale wurden in die vorliegende Arbeit integriert, um Unterschiede bzw. Gemeinsamkeiten zur hier beschriebenen Spezies *M. cohnii* aufzuzeigen. Die Gattung *Micrococcus* befindet sich taxonomisch innerhalb der Familie der *Micrococcaceae* in der Unterordnung *Micrococccineae* der Ordnung *Actinomycetales*.

3.2 Die Familie *Propionibacteriaceae*

Die Familie der *Propionibacteriaceae* wurde erstmals von Delwiche (1957) beschrieben und wurde von Stackebrandt *et al.* (1997) und Zhi *et al.* (2009) auf Basis der Ergebnisse von 16S rRNA-Gensequenzanalysen verbessert. Die Typgattung dieser Familie, *Propionibacterium*, wurde von Orla-Jensen (1909) beschrieben und von Charfreitag *et al.* (1988) durch die Ergebnisse von morphologischen und chemotaxonomischen Untersuchungen erweitert. Die Familie *Propionibacteriaceae* ist eine Familie innerhalb der Unterordnung *Propionibacterineae* der Ordnung *Actinomycetales* und umfasst gegenwärtig, neben der Gattung *Propionibacterium*, die 14 Gattungen *Luteococcus* (Collins *et al.* 2000, Tamura *et al.* 1994), *Propioniferax* (Yokota *et al.* 1994), *Microcunatus* (Nakamura *et al.* 1995), *Friedmanniella* (Schumann *et al.* 1997), *Tessaracoccus* (Maszenan *et al.* 1999), *Micropruina* (Shintani *et al.* 2000), *Propionimicrobium* (Stackebrandt *et al.* 2002b), *Propionicimonas* (Akasaka *et al.* 2003), *Brooklawnia* (Bae *et al.* 2006a), *Propionicicella* (Bae *et al.* 2006b), *Aestuariimicrobium* (Jung *et al.* 2007), *Granulicoccus* (Maszenan *et al.* 2007), *Auraticoccus* (Alonso-Vega *et al.* 2011) und *Propioniciclava* (Sugawara *et al.* 2011).

4 Kultivierungsunabhängige, auf PCR-basierende, Methoden zur Untersuchung mikrobieller Gemeinschaften

Kultivierungsunabhängige, auf PCR-basierende, Methoden zur Untersuchung mikrobieller Lebensgemeinschaften werden mit zunehmender Häufigkeit für Proben unterschiedlichster Herkunft eingesetzt (Gao *et al.* 2007, Peccia & Hernandez 2006, Sipos *et al.* 2010). Diese Methoden können zur Verfolgung unterschiedlicher Ziele eingesetzt werden, wie dem Vergleich von verschiedenen Populationen, der qualitativen und quantitativen Bestimmung einzelner Spezies oder bestimmter Gruppen von Mikroorganismen oder der Untersuchung der gesamten mikrobiellen Zusammensetzung einer Probe (**Abbildung 2**).

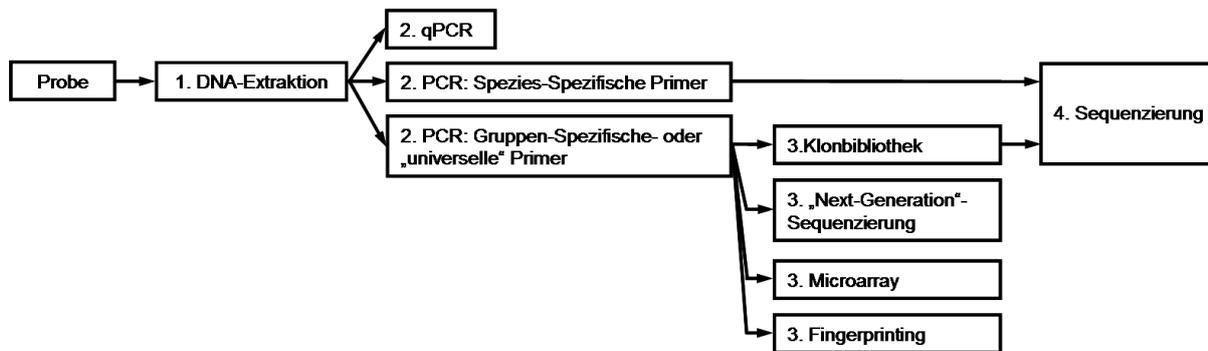


Abbildung 2 Übliche Ansätze zur kultivierungsunabhängigen Untersuchung mikrobieller Gemeinschaften.

Diese unterschiedlichen Ansätze verbindet, dass nach der Probennahme eine direkte Isolierung der DNA aus der Probe erfolgt. Das isolierte Gemisch an DNA unterschiedlicher Taxa wird anschließend als Template einer PCR (Multi-Template-PCR) eingesetzt. Dafür werden entweder spezifische Primer für bestimmte Mikroorganismen oder Gruppen von Mikroorganismen oder auch „universelle“ Primer verwendet, die bestimmte DNA-Abschnitte begrenzen, indem sie an konservierte Bereiche der DNA binden. Durch die Möglichkeit der quantitativen PCR können, je nach Wahl der Primer, direkt Rückschlüsse auf die enthaltene Menge der entsprechenden Mikroorganismen in den untersuchten Proben gezogen werden. Trotz bekannter Probleme, wie der unzureichenden Differenzierbarkeit von Spezies bestimmter Gattungen wie z.B. *Bacillus*, oder der Heterogenität verschiedener Kopien des 16S rRNA-Gens innerhalb einer Spezies, werden unter den „universellen“ Primern am häufigsten Primer zur Amplifizierung des 16S rRNA-Gens gewählt, da für diese Sequenzen die umfangreichsten Datenbanken existieren (Dahllof 2002, Qi *et al.* 2001, Shimizu *et al.* 2001). Für mögliche Alternativen, wie das *rpoB*-Gen (Dahllof *et al.* 2000, Mellmann *et al.* 2006), ist der Umfang der aktuell existierenden Datenbanken nicht ausreichend, um für Biodiversitätsstudien zur Identifizierung auf Speziesebene geeignet zu sein. Wird ein DNA-Fragment Spezies-spezifisch amplifiziert, kann die Detektion der Spezies direkt, durch eine Identifizierungsmethode wie z.B. durch Sequenzanalyse bestätigt werden. Nach der Amplifikation von unterschiedlichen DNA-Fragmenten durch Gruppenspezifische oder „universelle“ Primer stehen mehrere Möglichkeiten zur weiteren Analyse zur Verfügung. Durch die Anwendung von DNA-Fingerprinting-Methoden wie der Denaturierenden Gradienten-Gelelektrophorese (DGGE) oder der terminalen Restriktions-Fragmentlängen-Polymorphismus-Methode (T-RFLP) können auf Basis der amplifizierten Fragmente zwei oder mehrere mikrobielle Populationen anhand

von Bandenmustern miteinander verglichen werden (Marsh 1999, Muyzer 1999, Peccia & Hernandez 2006). Des Weiteren können die Fragmente für Untersuchungen mittels DNA-Microarrays oder andere DNA-Hybridisierungsmethoden (Dahllof 2002, Purdy *et al.* 2001, Ravensschlag *et al.* 2001) verwendet werden um die An- oder Abwesenheit bestimmter Mikroorganismen in einer Probe nachzuweisen (Bodrossy *et al.* 2003, Loy *et al.* 2002, Peccia & Hernandez 2006). Durch Verwendung der PCR-Produkte zur Erstellung einer Klonbibliothek und der anschließenden Sequenzierung der 16S rRNA-Genfragmente oder dem Einsatz von „Next-Generation“-Sequenzierungsmethoden (Ahn *et al.* 2011, Inceoglu *et al.* 2011, MacLean *et al.* 2009), können qualitative aber auch quantitative Aussagen über die Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft in einer Probe getroffen werden (Dahllof 2002).

Diverse Studien belegen, dass nur ein Bruchteil, häufig <1%, der in Umweltproben enthaltenen Mikroorganismen durch Standard-Kultivierungsverfahren detektiert werden kann (Head *et al.* 1998, Hugenholtz *et al.* 1998, La Duc *et al.* 2007, Pace 1997, Peccia & Hernandez 2006). Da bei kultivierungsunabhängigen Methoden die Kultivierbarkeit keine Voraussetzung der Detektion darstellt, können dadurch schwierig zu kultivierende, aber auch bisher unkultivierbare Mikroorganismen detektiert und identifiziert werden (Hongoh *et al.* 2003, Peccia & Hernandez 2006). Dadurch kann eine wirklichkeitsnähere Abbildung einer vorhandenen Biodiversität erreicht werden als es durch klassische kultivierungsabhängige Methoden möglich ist (Sipos, *et al.* 2010). Dennoch gibt es zahlreiche Faktoren innerhalb dieser Methoden, die zu einer verzerrten Abbildung der vorhandenen Biodiversität führen können. Alle notwendigen Schritte zur PCR-basierenden Biodiversitätsanalyse, vom Zellaufschluss bis hin zur Auswertung der Sequenzierungsergebnisse, vor allem aber die Multi-Template-PCR, bergen das Potential, eine solche Verzerrung hervorzurufen, was bei der Versuchsplanung und Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden muss (Ishii & Fukui 2001, Kanagawa 2003, Polz & Cavanaugh 1998, Sipos, *et al.* 2010, Sipos *et al.* 2007, Suzuki & Giovannoni 1996, V. Wintzingerode *et al.* 1997).

5 Zielsetzung

Im Fokus der vorliegenden Arbeit stand die Etablierung der FTIR-Spektroskopie als Routinemethode zur Identifizierung von Gram-positiven Kokken und sporenbildenden Bakterien aus dem Produktionsumfeld pharmazeutischer Betriebe und die Untersuchung der mikrobiellen Biodiversität in dieser Umgebung. Dazu sollten bestehende FTIR-Datenbanken an die mikrobielle Biodiversität pharmazeutischer Reinräume angepasst und anschließend durch die Identifizierung von Reinraumisolaten, die zuvor mittels 16S rRNA-Gensequenzanalyse identifiziert wurden, validiert werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden mehrere Bakterienstämme isoliert, die auf Basis einer 16S rRNA-Gensequenzanalyse keiner bekannten Spezies bzw. Gattung eindeutig zugeordnet werden konnten. Zwei dieser Stämme wurden zusammen mit dazu jeweils sehr ähnlichen Stämmen aus anderen Quellen mittels polyphasischem Ansatz charakterisiert und daraufhin einer neuen Spezies bzw. Gattung zugeordnet.

Um die Biodiversität in der Luft pharmazeutischer Reinräume mittels kultivierungsfreier Methoden untersuchen zu können, sollte anschließend eine Methode etabliert werden, die eine Amplifikation bakterieller 16S rRNA-Gene aus niedrig konzentrierten Bakteriensuspensionen ermöglicht.

II. Material und Methoden

1 FTIR-Spektroskopie

1.1 Probenvorbereitung und Messung

Die Probenvorbereitung und die Erfassung von FTIR-Spektren wurden, wie von Oberreuter *et al.* (2002) beschrieben, durchgeführt, wobei ein Tensor 27 FTIR-Spektrometer in Verbindung mit einem HTS-XT Mikrotitermodul (beide Bruker Optics, Deutschland) verwendet wurde. Die Zellen wurden auf TSA (Trypton Soja Agar, Oxoid) bei 25°C (Sporenbildner) bzw. 30°C (Nicht-Sporenbildner) für 24h inkubiert.

1.2 Spektrenauswertung und Identifizierung

Vor der Identifizierung wurden, wie bereits von Oberreuter *et al.* (2002) beschrieben, Ableitungen der FTIR-Spektren berechnet, wobei für Spektren von nicht-sporenbildenden Stämmen die erste Ableitung und für Spektren von sporenbildenden Stämmen die zweite Ableitung berechnet wurde. Die Identifizierung erfolgte mittels OPUS 5.5 software[®] (Bruker Optics, Deutschland) in Verbindung mit je einer Referenzdatenbank für aerobe sporenbildende Bakterien und für aerobe Gram-positive nicht-sporenbildende Bakterien. Die Spektrale Distanz zwischen zu identifizierenden Spektren und Referenzspektren in den Datenbanken wurde durch die OPUS 5.5 software[®] nach einem von Helm *et al.* (1991a) beschriebenen Algorithmus berechnet und die Ähnlichkeit in Form der Hitqualität quantifiziert. Die 12 ähnlichsten Spektren wurden dabei in einer Hit-Liste gereiht (beginnend bei Hit1 für das ähnlichste Spektrum) dargestellt.

1.3 Bewertung des Identifizierungsergebnisses

Wurden unter den ersten beiden Hits, Spektren der gleichen Spezies gereiht, wurde diese Spezies als Identifizierungsergebnis akzeptiert, wenn die Hitqualität von Hit1 $\leq 1,5$ war. Eine Hitqualität des ersten Hits von $> 1,5$ resultierte immer in eine Klassifizierung als „nicht identifiziert“. Waren unter den ersten beiden Hits Spektren unterschiedlicher Spezies gereiht, wurde die Spezies von Hit1 nur als Identifizierungsergebnis akzeptiert, wenn der Unterschied zwischen den berechneten Hitqualitäten von Hit1 und Hit2 $\geq 0,2$ war. Anderenfalls wurde das Ergebnis auf Speziesebene als „nicht identifiziert“ und nur auf Gattungsebene als „korrekt“ klassifiziert. Bei der Validierung der Referenzdatenbanken (III-1.2, 1.3)

wurde ein akzeptiertes Identifizierungsergebnis als „korrekt“ bezeichnet, wenn es mit dem Identifizierungsergebnis der Referenzmethode übereinstimmte. Anderenfalls wurde es als „falsch identifiziert“ bezeichnet. Als Referenzmethode zur eindeutigen Identifizierung der Referenzstämmen der FTIR-Datenbanken und der Reinraumisolat zur externen Validierung der Datenbanken (III-1.3.) wurde eine Sequenzanalyse des 16S rRNA-Gens (mit Ausnahme der Gattung *Staphylococcus*: *rpoB*-Gen) durchgeführt. Da sich innerhalb der Gattung *Bacillus* zwei Gruppen von Spezies (*Bacillus cereus*-Gruppe: *B. cereus*, *B. anthracis*, *B. thuringensis*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides* und *B. weihenstephanensis*; *Bacillus subtilis*-Gruppe: *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. atrophaeus*, *B. mojavensis*, *B. vallismortis* und *B. velezensis*) auf Grund großer Ähnlichkeit in der 16S rDNA-Sequenz, nur schwer durch diese Methode unterscheiden lassen, wurden die Spezies innerhalb dieser beiden Gruppen bei der Auswertung der Daten als Spezies-Gruppe behandelt. Das Gleiche gilt für die beiden Spezies *Brachybacterium conglomeratum* und *Brachybacterium paraconglomeratum*.

1.4 Erweiterung der FTIR-Referenzdatenbanken

Zur Erweiterung der Referenzdatenbanken wurden FTIR-Spektren von Gram-positiven mesophilen aeroben Sporenbildnern und aeroben Gram-positiven nicht-sporenbildenden Bakterienstämmen aufgenommen und mit Hilfe der entsprechenden Referenzdatenbanken identifiziert. Alle dazu verwendeten Bakterienstämme wurden aus Reinräumen eines pharmazeutischen Produktionsstandortes isoliert. Stämme, die mit Hilfe der bestehenden Referenzdatenbanken nicht eindeutig auf Speziesebene identifiziert werden konnten, wurden mittels Gensequenzanalyse (II-2.1) identifiziert. Die entsprechenden FTIR-Spektren wurden anschließend in die jeweilige Datenbank integriert.

1.5 Validierung der FTIR-Referenzdatenbanken durch die Leave-One-Out-Methode

Zur Validierung der Referenzdatenbanken nach der Leave-One-Out-Methode wurden jeweils die Spektren eines Bakterienstammes aus den Datenbanken entfernt und diese Spektren anschließend durch die entsprechende Datenbank auf Speziesebene identifiziert. Es wurden nur Spektren miteinbezogen, die eindeutig einer valide beschriebenen Spezies zugeordnet werden konnten. Spezies, die in den

Referenzdatenbanken nur von Spektren eines Stammes vertreten wurden, wurden von dieser Validierung ausgeschlossen.

1.6 Externe Validierung der FTIR-Referenzdatenbanken mittels

Praxisisolaten

Für die Externe Validierung der Datenbanken wurden 240 Bakterienstämme (170 Gram-positive Kokken und 70 sporenbildende Bakterien), die im laufenden mikrobiologischen Umgebungsmonitoring pharmazeutischer Reinräume aus der Luft und von diversen Oberflächen isoliert wurden, verwendet. Die Stämme wurden sowohl aus „kritischen“ (Reinraumklassen: Grade A, Class 100) als auch aus „unkritischen“ (übrige Reinraumklassen) Bereichen der pharmazeutischen Produktion isoliert und wurden abhängig vom Beprobungsort, auf Basis der Koloniemorphologie wie folgt vorselektioniert: Bei Proben aus „unkritischen“ Produktionsbereichen wurden nur die am häufigsten vorkommenden Kolonieformen berücksichtigt, wovon jeweils ein Isolat ausgewählt wurde; bei Proben aus „kritischen“ Produktionsbereichen wurde von jeder vorkommenden Kolonieform jeweils ein Isolat ausgewählt. Die Auswahl von Gram-positiven Kokken und sporenbildenden Bakterien wurde mittels Gram-Färbung (Gregersen 1978) und mikroskopischer Untersuchung getroffen. Die auf diese Weise ausgewählten Mikroorganismen wurden von einem pharmazeutischen Betrieb für weitere Untersuchungen zur Verfügung gestellt.

Jeder Stamm wurde mittels FTIR-Spektroskopie, API-System und Gensequenzanalyse identifiziert. Werte für Sensitivität, Spezifität und PPV (Positive Predictive Value) wurden für beide phänotypischen Methoden (FTIR-Spektroskopie und API-System) in Bezug auf die Identifizierungsergebnisse der Referenzmethode (Gensequenzanalyse), wie von Sampimon *et al.* (2009) beschrieben, berechnet:

Die Sensitivität gibt den Anteil an Isolaten einer bestimmten Spezies (durch Sequenzanalyse bestimmt) an der auch durch die phänotypische Methode dieser Spezies zugeordnet werden konnte. Der PPV gibt den Anteil an Isolaten einer bestimmten Spezies (durch die phänotypische Methode bestimmt) an der auch durch die Sequenzanalyse dieser Spezies zugeordnet wurde. Ein PPV von 50% würde also bedeuten, dass nur die Hälfte der Isolate die durch die phänotypische Methode als z.B. *S. epidermidis* identifiziert wurden auch durch die Sequenzanalyse als *S. epidermidis* bestätigt wurden. Die Spezifität gibt an wie häufig eine Spezies

fälschlicherweise das Identifizierungsergebnis einer phänotypischen Methode innerhalb der Isolate war (Anteil falsch positiver Ergebnisse). Sie gibt also den Anteil an den, durch die Sequenzanalyse z.B. als eine andere Spezies als *S. epidermidis* identifizierten, Isolaten an die auch durch die phänotypische Methode als eine andere Spezies als *S. epidermidis* identifiziert wurden. Eine Spezifität einer phänotypischen Methode von 100% für die Spezies *S. epidermidis* würde also bedeuten, dass kein Isolat, dass durch die Sequenzanalyse nicht als *S. epidermidis* identifiziert wurde durch die phänotypische Methode als *S. epidermidis* identifiziert wurde.

2 Gensequenzanalyse kultivierter Bakterienstämme

2.1 Identifizierung von Bakterienstämmen durch Gensequenzanalyse

Zur Identifizierung aller Bakterienstämme wurde eine Sequenzanalyse des 16S rRNA-Gens durchgeführt. Um Stämme der Gattung *Staphylococcus* eindeutig auf Speziesebene identifizieren zu können wurde bei Stämmen dieser Gattung eine Sequenzanalyse des *rpoB*-Gens durchgeführt. Zelllysate wurden, wie von Büchl *et al.* (2008) beschrieben, unter Verwendung von Zirkoniumsilikatperlen (0,1mm; Roth, Deutschland) hergestellt.

PCR-Ansatz:

Komponente	Endkonzentration	Hersteller
Reaction Buffer	1x konzentriert	Thermo Scientific
dNTPs	je 0,1mM	Thermo Scientific
MgCl ₂	1,5mM	Thermo Scientific
Primer	je 0,5µM	Invitrogen
Thermoprime Plus DNA Polymerase	0,01 U/µl	Thermo Scientific
Zelllysate	1µl/50µl	-

PCR-Programm:

Initiale Denaturierung	6min, 94°C	1x
Denaturierung	20s, 94°C	
Annealing	40s, 52°C	35x
Elongation	1min 40s, 72°C	
Finale Elongation	6min, 72°C	1x

PCR-Primer:

rpoB-Gen (Mellmann, *et al.* 2006):

Forward Primer: 1418f (5'- CAA TTC ATG GAC CAA GC -3')

Reverse Primer: 3554r (5'- CCG TCC CAA GTC ATG AAA C -3')

Sequenzierungsprimer: 1418f

16S rRNA-Gen (Lane 1991):

Forward Primer: 27f (5'- AGA GTT TGA TCC TGG CTC A -3')

Reverse Primer: 1492r (5'- CGG CTA CCT TGT TAC GAC -3')

Sequenzierungsprimer: 27f

Die PCR-Produkte wurden mittels QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Deutschland), nach den Vorschriften des Herstellers gereinigt. Die Sequenzierung wurde von der GATC Biotech AG (Konstanz, Deutschland) durchgeführt. Die Sequenzen wurden mittels BlastN-Datenbank (NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) und der Tree-Datenbank (Nadicom GmbH, Karlsruhe, Deutschland) identifiziert.

2.2 Phylogenetische Untersuchungen zur Neubeschreibung bakterieller Taxa

Zur phylogenetischen Untersuchung wurden Zelllysate wie unter Punkt II-2.1 beschrieben hergestellt. Die Amplifikation von DNA-Abschnitten wurde wie unter Punkt II-2.1 (16S rRNA-Gen) und II-2.2.2 (*recA*-Gen) beschrieben durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden mittels GenElute™ PCR Clean-Up Kit (Sigma-Aldrich) gereinigt und unter Verwendung der entsprechenden Sequenzierungsprimer (II-2.2.1, 2.2.2) von der GATC Biotech AG sequenziert. Mittels CLUSTAL_X Version 2.0 (Thompson *et al.* 1997) wurden die Sequenzen überlappender Abschnitte eines

Gens zu einer „Gesamtsequenz“ zusammengesetzt und Gensequenzalignments durchgeführt. Abstandsmatrizen dieser Alignments und phylogenetische Bäume nach der Neighbor-Joining-Methode wurden mittels Treecon-Programm (Van de Peer & De Wachter 1997) berechnet. Werte für die Sequenzähnlichkeit eng verwandter Bakterienstämme wurden unter Verwendung des EzTaxon Servers Version 2.1 (Chun *et al.* 2007) ermittelt.

2.2.1 16S rRNA-Gen

Sequenzierungsprimer (Lane 1991):

27f (5'- AGA GTT TGA TCC TGG CTC A -3')

1492r (5'- CGG CTA CCT TGT TAC GAC -3')

907r (5'- CCG TCA ATT CMT TTG AGT TT -3')

2.2.2 *recA*-Gen

PCR-Ansatz und PCR-Programm wurden wie unter Punkt 2.1 beschrieben, jedoch bei einer Annealingtemperatur von 68°C, durchgeführt.

PCR-Primer

Primerpaar 1 (van Waasbergen *et al.* 2000):

Forward Primer: GPRA-UF2 (5'- GGS AAG GGS KCN GTN ATG CG -3')

Reverse Primer: GPRA-UR2 (5'- CCT TSC CCT GSC CNA RYT -3')

Primerpaar 2*:

Forward Primer: GPRA-UF2

Reverse Primer: 870Rev (5'- GGT GAA CCA BGC RCC GGA -3' ; siehe III-3.1.1.2)*

Sequenzierungsprimer

GPRA-UF2

GPRA-UR2

870Rev*

606Fw (5'- AGA TCG GCG TGT TCT TCG GC -3' ; siehe III-3.1.1.2)*

307Rev (5'- GTG TCC ACS CCG AGC TTG CG -3' ; siehe III-3.1.1.2)*

* Nur für Neubeschreibung der Spezies *Micrococcus cohnii*.

3 Identifizierung von Bakterienstämmen mittels API-System

Zur Identifizierung sporenbildender Bakterien wurden das API 50 CHB und API 20 NE und zur Identifizierung von Gram-positiven, nicht-sporenbildenden Bakterien wurde das ID32 STAPH Testkit (im Folgenden auch als API bezeichnet) nach den Vorschriften des Herstellers (bioMérieux, Frankreich) verwendet.

3.1 Datenauswertung

Die erhaltenen biochemischen Profile wurden unter Verwendung der apiwebTM-Datenbank ausgewertet. Das Identifizierungsergebnis mit der höchsten Wahrscheinlichkeit wurde als Identifizierungsergebnis gewertet. Es wurden keine zusätzlichen Tests zur genaueren Charakterisierung der Stämme durchgeführt. Ein API-Identifizierungsergebnis wurde als „korrekt“ bezeichnet wenn es mit dem Ergebnis der Identifizierung durch Gensequenzanalyse desselben Stammes übereinstimmte, anderenfalls wurde es als „falsch identifiziert“ gewertet. Stämme deren biochemisches Profil von der apiwebTM-Datenbank als „unzulässiges Profil“ gewertet wurde, wurden als „nicht identifiziert“ eingeordnet. Bei der Identifizierung der *B. cereus* und *B. subtilis*-Gruppe und den Spezies *Bb. conglomeratum* und *Bb. paraconglomeratum* wurden für die Identifizierung durch das API-System die gleichen Regeln angewandt wie sie unter Punkt II-1.3 für die FTIR-Spektroskopie beschrieben wurden.

4 Phänotypische Charakterisierung neuer bakterieller Taxa

4.1 Morphologische Charakterisierung

Die morphologischen Ausprägungen wurden nach der Kultivierung der Zellen für drei (Neubeschreibung der Spezies *M. cohnii*, NMC) bzw. vier Tage (Neubeschreibung der Gattung *Naumannella*, NNH) auf Trypton Soja Agar (TSA, Roth) bei 30°C untersucht. Die Zellmorphologie, die Bildung von Endosporen und die Beweglichkeit der Zellen wurden mittels Phasenkontrastmikroskopie (Laborlux S, Leitz) untersucht. Das Gram-Färbeverhalten wurde, wie von Gregersen (1978) beschrieben, ermittelt.

4.2 Physiologische Charakterisierung

4.2.1 Enzymatische Aktivität und Substratverwertung

Die Oxidaseaktivität wurde mittels Bactident® Oxidase -Teststreifen (Merck) nach den Vorschriften des Herstellers überprüft. Die Katalaseaktivität, die Hydrolyse von Stärke, Aesculin und Casein sowie die Produktion von H₂S wurden nach den Methoden von Smibert & Krieg (1994) untersucht. Die Hydrolyse von Gelatine, die Produktion von Indol, die Reduktion von Nitrat und die Aktivität der Enzyme Arginindihydrolase, β-Galaktosidase und Urease wurden durch Verwendung des API 20NE Testsystems (bioMérieux), nach den Vorschriften des Herstellers, ermittelt. Zur Untersuchung der Verwertung weiterer Substrate wurden Übernachtskulturen (ÜNK) der entsprechenden Stämme in Trypton Soja Bouillon (TSB; l⁻¹: 17g Trypton, 3g Sojapepton, 2,5g K₂HPO₄, 2,5g Glukose und 5g NaCl, pH 7,2) hergestellt. Anschließend wurden entweder 10µl der ÜNK in 9ml ISP9-Medium (Shirling & Gottlieb 1966), mit einer Konzentration des jeweiligen Substrates von 0,2% (Kämpfer *et al.* 1991), überimpft und für vier Tage bei 30°C und 200rpm inkubiert (NMC) oder die ÜNK zur Untersuchung der Substratverwertung nach der Methode von Schmidt *et al.* (2012) unter Verwendung des ISP9-Mediums in Kombination mit API 50CH und API 20NE Teststreifen (bioMérieux) verwendet (NNH). Die aerobe Säureproduktion durch die Fermentation verschiedener Substrate wurde mittels API 50CH Teststreifen (bioMérieux) in Kombination mit API 50CHB/E Medium (bioMérieux) nach der Methode von Schmidt *et al.* (2012) untersucht.

4.2.2 Wachstumsgrenzen

Zur Untersuchung der Wachstumsgrenzen wurden Übernachtskulturen der entsprechenden Stämme in TSB hergestellt. Für alle folgenden Untersuchungen wurden 9ml TSB als Basismedium verwendet und jeweils mit 10µl der entsprechenden ÜNK beimpft. Das Wachstum bei unterschiedlichen Temperaturen wurde bei 6, 15, 20, 28, 30, 37, 45 und 50°C (NMC) bzw. bei 6, 15, 28, 30, 37, 40, and 45°C (NNH) überprüft. Die NaCl-Toleranz der Stämme wurde bei einer NaCl-Konzentration von 0, 1, 3, 5, 7, 10 und 15% (NMC) bzw. 0, 1, 3, 5, 7, 8, 9, 10 und 12% (w/v) (NNH) untersucht. Die pH-Toleranz wurde in gepuffertem TSB Medium (Xu *et al.* 2005) bei pH-Werten von 4,0-11,0 (in Schritten von 1,0 pH-Einheit) ermittelt. Alle Ansätze wurden für vier Tage bei 30°C (bzw. den angegebenen Temperaturen)

und 200rpm inkubiert. Das Wachstum unter anaeroben Bedingungen wurde auf TSA im Anaerobiertopf unter Verwendung von Anaerocult A (Merck) nach den Vorschriften des Herstellers untersucht.

4.3 Chemotaxonomische Charakterisierung

Alle Analysen zur chemotaxonomischen Charakterisierung von Bakterienstämmen wurden vom Identifizierungsdienst der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ; Braunschweig, Deutschland) durchgeführt. Das Zellmaterial für die Analyse der respiratorischen Chinone (nur NMC), der polaren Lipide, des G+C-Gehalts der gDNA, der Zusammensetzung des Peptidoglykans der Zellwand und der detektierbaren Zuckerarten, wurde durch Kultivierung der Zellen in TSB Medium bei 30°C für 2 Tage auf einem Schüttler (150rpm) hergestellt. Für die Bestimmung der respiratorischen Chinone zur Neubeschreibung von *Naumanella halotolerans* wurde das Zellmaterial kurz vor der Analyse von der DSMZ hergestellt. Zur Analyse der zellulären Fettsäuren wurde das Zellmaterial durch Inkubation der Zellen auf TSB-Agarplatten für 24h bei 28°C, nach den Vorschriften des Microbial ID-Systems (Sasser 2001), hergestellt.

4.3.1 Respiratorische Chinone

Die respiratorischen Chinone wurden aus 100mg gefriergetrocknetem Zellmaterial, nach der Methode von Tindall (Tindall 1990a, Tindall 1990b) extrahiert. Die Chinone wurden anschließend durch Dünnschichtchromatographie (DC) aufgetrennt und mittels HPLC-Analyse identifiziert (Altenburger *et al.* 1996).

4.3.2 Polare Lipide

Die polaren Lipide wurden mittels Chloroform:Methanol:0.3% wässriger NaCl-Lösung 1:2:0,8 (v/v/v) (abgeändert nach Bligh & Dyer 1959) aus 100mg gefriergetrocknetem Zellmaterial extrahiert und nach Tindall *et al.* (2007) durch 2-dimensionale DC aufgetrennt und anschließend identifiziert.

4.3.3 Peptidoglykan

Zur Isolierung des Peptidoglykans wurden die Zellen unter Verwendung einer Vibrogen-Zellmühle (Johanna Otto GmbH, Deutschland) in Kombination mit Glasperlen aufgeschlossen. Ein anschließender Trypsinverdau und die Behandlung

mit SDS wurden nach der Methode von Schleifer (1985) durchgeführt. Vom Peptidoglykan wurden ein Partialhydrolysat (4N HCl bei 100°C für 16h) und ein Totalhydrolysat (4N HCl bei 100°C für 45min) hergestellt. Vom Peptidoglykan des Stammes *Micrococcus cohnii* WS4601^T wurde zusätzlich ein Totalhydrolysat durch eine Behandlung mit 70% Fluorwasserstoffsäure (8h bei 8°C) hergestellt. Die Hydrolysate wurden mittels DC und 2-dimensionaler DC nach den Methoden von Rhuland et al. (1955) und Schleifer & Kandler (1972) analysiert. Das molare Verhältnis der detektierten Aminosäuren wurde mittels Gaschromatographie und Massenspektrometrie ermittelt (MacKenzie 1987).

4.3.4 Zelluläre Fettsäuren

Um zu erreichen, dass alle Bakterienstämme, die für eine Untersuchung herangezogen wurden, das gleiche physiologische Alter aufwiesen, wurden jeweils Zellen eines bestimmten Quadranten des Ausstrichs für die Analyse geerntet (Sasser 2001). Die Extraktion und die Analyse der Fettsäuren wurden wie von Verberg *et al.* (2008) beschrieben durchgeführt. Es wurden dabei ein Agilent 6890N Gas Chromatograph, ein automatischer Flüssigprobengeber (Agilent 7683A) und die Version 6.1 der MIDI Inc. Sherlock MIS software verwendet (Datenbank MIDI, Inc., TSBA 40 4.10 (NMC) bzw. TSBA 6 6.10 (NNH)).

4.3.5 Ganzzell-Zucker

Zur Bestimmung der Ganzzell-Zucker wurde gefriergetrocknetes Zellmaterial verwendet. Nach der Hydrolyse der Zellen durch Schwefelsäure (1N H₂SO₄ bei 100 °C für 2h) wurde die Schwefelsäure durch Extraktion mit 20% N,N-Dioctylamin in Chloroform entfernt (Staneck & Roberts 1974, Whiton *et al.* 1985). Die Ganzzell-Zucker wurden anschließend mittels DC nach der Methode von Staneck & Roberts (1974) analysiert.

4.3.6 G+C-Gehalt

Nach dem Aufschluss von Zellmaterial mittels French-Press wurde die DNA auf Hydroxylapatit chromatographisch gereinigt (Cashion *et al.* 1977). Die DNA wurde durch Zugabe von P1-Nuklease hydrolysiert und die Nukleotide durch alkalische Phosphatase (aus Rind) dephosphoryliert (Mesbah *et al.* 1989). Die entstandenen Desoxyribonukleoside wurden mittels HPLC-Analyse untersucht (Tamaoka & Komagata 1984). Die mol% G+C-Werte wurden aus dem Verhältnis von

Desoxyguanosin und Thymidin nach der Methode von Mesbah *et al.* (1989) berechnet.

5 Methoden zur kultivierungsfreien Untersuchung der mikrobiellen Biodiversität in der Luft pharmazeutischer Reinräume

Die durchgeführten Methoden (Methode M1- Methode M21) setzen sich jeweils aus den vier Abschnitten Zellaufschluss, DNA-Reinigung, DNA-Fällung und PCR zusammen. Die Methoden unterscheiden sich voneinander durch verschiedene Änderungen des Protokolls innerhalb dieser vier Abschnitte. Die Unterschiede der Methoden sind in Tabelle 4 zusammengefasst. Als Ausgangsmaterial für alle Versuche zur Methodenetablierung wurden Zellsuspensionen mit definierter Zellkonzentration hergestellt.

5.1 Herstellen von Zellsuspensionen

Je eine Kolonie eines aus einem pharmazeutischen Reinraum isolierten Stammes von *S. epidermidis* (G6524) wurde in 1,5ml einer 0,9% NaCl-Lösung suspendiert. Davon wurde eine dezimale Verdünnungsreihe in einer 0,9% NaCl-Lösung bis zu einer Verdünnungsstufe von 10^{-6} hergestellt. Zur Ermittlung der KbE/ml wurden von den Verdünnungsstufen 10^{-3} bis 10^{-6} je zweimal 100µl auf TSA (Tryptone Soy Agar, Roth) ausplattiert und bei 30°C für zwei Tage inkubiert. Die Zellsuspensionen wurden nach dem Verdünnungsschritt bei -20°C gelagert und nach Auswertung der KbE/ml durch Zugabe von 0,9% NaCl-Lösung auf Konzentrationen von 5×10^6 bis 5×10^3 eingestellt. Für die weiteren Versuche wurde je 1ml der jeweiligen Verdünnungsstufe als Ausgangssuspension verwendet. Als Negativkontrolle wurde je 1ml einer 0,9% NaCl-Lösung verwendet.

5.2 Mikroskopische Bestimmung der Zellzahl

Zellsuspensionen mit Zellkonzentrationen zwischen 1×10^7 und 2×10^7 wurden, wie unter Punkt II-5.1 beschrieben, hergestellt und ihre Zellkonzentration mittels Thoma-Zählkammer bestimmt. Es wurden dafür jeweils 4 Zählkammern ausgewertet. Die in diesen Suspensionen enthaltenen KbE/ml wurden zum Vergleich wie unter Punkt II-5.1 beschrieben ermittelt.

5.3 Zellaufschluss

Je 1ml einer Zellsuspension und der Negativkontrolle wurden für 15min bei 95°C inkubiert und anschließend 2min auf Eis gestellt. Nach der Zugabe von Lysozym (Roth; Endkonzentration 5mg/ml) wurden die Proben für 30min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde Proteinase K (Roth; Endkonzentration 2mg/ml) zugegeben und die Proben für 30min bei 55°C inkubiert. Bei 13 der 21 Methoden (Tabelle 4) wurde danach Natriumdodecylsulfat (SDS, Sigma; Endkonzentration 30mg/ml) zugegeben, die Proben für 10min bei Raumtemperatur inkubiert und nach 5 und 10min für 10s geschüttelt (Vortex). Der weitere Zellaufschluss erfolgte entweder unter Verwendung eines FastPrep[®]-24 Geräts (MP Biomedicals) oder durch die Freeze-Thaw Methode. Bei der erstgenannten Methode wurde nach dem Aufteilen des Probenvolumens in zwei gleichgroße Teile, zu jedem Teil Phenol/ Chlorophorm/ Isoamylalkohol (P/C/I; Roth) im Verhältnis 1:1 und Zirkoniumsilikatperlen (0,1mm; Roth) zugegeben und die Zellen in einem FastPrep[®]-24 Gerät bei 6,5m/s für 45s aufgeschlossen. Bei der Freeze-Thaw Methode wurden 8 Zyklen durchgeführt, wobei die Proben je Zyklus für 1min in flüssigem Stickstoff und für 2min bei 65°C inkubiert wurden.

5.4 DNA-Reinigung

5.4.1 Phenol-Chlorophorm Extraktion

Die DNA wurde mittels Phenol-Chlorophorm Extraktion gereinigt. Bei Verwendung des FastPrep[®]-24 Geräts (MP Biomedicals), wurde die erste Zugabe von P/C/I (Roth) bereits zusammen mit dem letzten Schritt des Zellaufschlusses durchgeführt (II-5.3). Bei der Freeze-Thaw Variante wurde das Probenvolumen erst nach dem Zellaufschluss in zwei gleichgroße Teile aufgeteilt, P/C/I (Roth) im Verhältnis 1:1 zugegeben und die Proben für 10s geschüttelt (Vortex). In beiden Varianten folgte auf die erste Phenol-Chlorophorm Extraktion ein Zentrifugationsschritt (15min bei 14000rpm). Die Phenol-Chlorophorm Extraktion wurde anschließend mit der wässrigen Phase wiederholt. Danach wurde der wässrigen Phase Chlorophorm/Isoamylalkohol (C/I, Roth) im Verhältnis 1:1 zugegeben. Die Proben wurden für 10s geschüttelt (Vortex) und der Zentrifugationsschritt wiederholt. Die wässrige Phase (ca. 500µl) wurde weiterverwendet.

Tabelle 4 Unterschiede der Methoden M1- M21, eingeteilt nach der verwendeten Polymerase. In der Tabelle wurden nur die Bestandteile bzw. Schritte berücksichtigt die sich innerhalb der 21 Methoden unterscheiden. Die gesamte Durchführung ist unter den Punkten 5.3 (Zellaufschluss), 5.4 (DNA-Reinigung), 5.5 (DNA-Fällung) und 5.6 (PCR) beschrieben. SDS, Natriumdodecylsulfat; BSA, Rinderserumalbumin; M, Methode; +, verwendet; -, nicht verwendet.

	Thermoprime Plus DNA Pol.								KAPAHiFi™ DNA Pol.						KAPA2G™ Robust DNA Pol.						
	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10	M11	M12	M13	M14	M15	M16	M17	M18	M19	M20	M21
1. Zellaufschluss																					
SDS	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+
FastPrep	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Freeze-Thaw	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2. DNA-Reinigung																					
DNA-Reinigungskit	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+
3. DNA-Fällung																					
Glykogen	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
NaAc	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-
NaCl	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+
4. PCR																					
BSA	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-
Primer 27f-1492r	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-
Primer 515f-1391r	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+

5.4.2 DNA-Reinigungskit

Bei fünf der 21 Methoden (Tabelle 4) wurde für die DNA-Reinigung zusätzlich ein Reinigungskit (DNeasy Blood & Tissue Kit, Qiagen) verwendet. Die Reinigung wurde nach der DNA-Fällung (II-5.5) nach den Vorschriften des Herstellers durchgeführt.

5.5 DNA-Fällung

Den Proben (ca. 500µl) wurde nach der Phenol-Chlorophorm Extraktion (II-5.4) Glykogen (Thermo Scientific, Endkonzentration 50µg/ml) zugegeben (mit Ausnahme von Methode M7). Glykogen wird als Carrier bei der Präzipitation von geringen DNA-Mengen eingesetzt. Proben, bei welchen im Zuge des Zellaufschlusses SDS verwendet wurde, wurden anschließend mit NaCl (Endkonzentration: 0,2M) versetzt (mit Ausnahme der Methode M1 und M2). Allen anderen Proben wurde NaAc (Endkonzentration: 0,3M) zugegeben. Unter Verwendung von SDS wurde NaCl verwendet um die Ausfällung von SDS zu minimieren. Nach der Zugabe von 650µl Isopropanol wurden die Proben für 24h bei -20°C inkubiert. Danach folgte ein Zentrifugationsschritt für 30min bei 14000rpm. Nachdem das DNA-Pellet zweimal mit 500µl eiskaltem EtOH gewaschen wurde, wurde der Überstand entfernt und das Pellet unter der Sterilbank getrocknet. Die gefällte DNA wurde in 34µl H₂O_{dest.} gelöst und die vor der Phenol-Chlorophorm Extraktion getrennten Proben anschließend wieder zusammengeführt, sodass die isolierte DNA aus 1ml Zellsuspension in 68µl Lösung enthalten war.

5.6 PCR

5.6.1 Vorversuche zur Sensitivität und Effizienz der PCR

Die PCR-Ansätze und PCR-Programme der Vorversuche zur Sensitivität und Effizienz der PCR wurden, soweit nicht anders beschrieben, wie unter Punkt II-5.6.2 für die Thermoprime Plus DNA Polymerase (Thermo Scientific) und das Primerpaar 1 durchgeführt. Die verwendeten Lysate wurden, bis auf die beschriebenen Änderungen, wie unter Punkt II-5.6.2 für die Positivkontrollen beschrieben, hergestellt.

Überprüfung der Sensitivität

Die Herstellung einer Zellsuspension und die Bestimmung ihrer Zellkonzentration in KbE/ml wurde wie unter Punkt II-5.1 durchgeführt. Das daraus hergestellte Lysat wurde 1:2 und 1:10 mit H₂O_{dest.} verdünnt. Die 1:10 Verdünnung wurde anschließend in 1:10 Schritten bis zu einer Verdünnungsstufe von 10⁻⁴ weiterverdünnt. Vom unverdünnten Lysat und allen Verdünnungsstufen wurde je 1 µl für eine PCR mit einem Ansatzvolumen von 50 µl verwendet.

Ermittlung der niedrigstmöglichen Annealingtemperatur

Zur Bestimmung der niedrigstmöglichen Annealingtemperatur wurde je 1 µl Lysat in einer PCR mit einem Ansatzvolumen von 50 µl eingesetzt. Die PCR wurde bei Annealingtemperaturen von 49, 50, 51 und 52 °C und unter Verwendung des Primerpaares 1 bzw. 2 durchgeführt.

Effizienz der 16S rRNA-Gen Amplifikation in 50 µl und 100 µl PCR-Ansätzen

Es wurden jeweils drei PCRs mit einem Ansatzvolumen von 50 µl bzw. 100 µl durchgeführt. Dabei wurden 1 µl Lysat für 50 µl PCR-Ansätze und 2 µl Lysat für 100 µl PCR-Ansätze verwendet. Die DNA-Konzentrationen wurden anschließend, nach der Reinigung der PCR-Produkte mittels GenElute™ PCR Clean-Up Kit (Sigma-Aldrich), photometrisch bestimmt (NanoDrop ND-1000 Spektrophotometer mit ND-1000 Software, Version 3.5.2.; ThermoScientific).

5.6.2 PCR für kultivierungsfreie Methoden

Die Amplifizierung der 16S rRNA-Genfragmente wurde bei den Methoden M1-M21 in Ansätzen von jeweils 50 µl und 100 µl Endvolumen durchgeführt. Für PCRs mit einem Endvolumen von 50 µl wurde 1 µl bzw. 10 µl Lysat, für PCRs mit einem Endvolumen von 100 µl wurden 67 µl Lysat (von insgesamt 68 µl, siehe II-5.5) eingesetzt. In sechs von 21 Methoden (Tabelle 4) wurde den PCR-Ansätzen Rinderserumalbumin (BSA; Sigma) in einer Endkonzentration von 0,8 µg/µl zugesetzt da bereits von Kreader *et al.* (1996) eine Verminderung der Wirkung unterschiedlicher PCR-Inhibitoren durch die Zugabe von BSA gezeigt werden konnte. In den getesteten Methoden wurde je eine von drei unterschiedlichen Polymerasen und eines von zwei unterschiedlichen Primerpaaren verwendet. Für die Positivkontrolle wurde derselbe *S. epidermidis*-Stamm (G6524) wie für die übrigen Zellsuspensionen (II.-5.1) verwendet. Zelllysate für die Positivkontrolle wurden nach der Methode von Büchl *et al.* (2008) unter

Verwendung von Zirkoniumsilikatperlen (0,1mm, Roth) hergestellt. 1µl dieses Lysats wurde anschließend für die jeweiligen methodenabhängigen 50µl und 2µl für die 100µl PCR-Reaktionen verwendet.

Thermoprime Plus DNA Polymerase (Thermo Scientific)

PCR-Ansatz:

Komponente	Endkonzentration	Hersteller
Reaction Buffer	1x konzentriert	Thermo Scientific
dNTP's	je 0,1mM	Thermo Scientific
MgCl ₂	1,5mM	Thermo Scientific
Primer	je 0,5µM	Invitrogen
Polymerase	0,01 U/µl Variabel	Thermo Scientific
Zelllysats	(siehe o., 5.6.2)	-

PCR-Programm:

Initiale Denaturierung	6min, 94°C	1x
Denaturierung	20s, 94°C	
Annealing	40s, 51-52°C*	35x
Elongation	1min 40s, 72°C	
Finale Elongation	6min, 72°C	1x

*51°C bei Primerpaar 27f-1492r, 52°C bei Primerpaar 515f-1391r

KAPAHiFi™ DNA Polymerase (Peqlab)

PCR-Ansatz:

Komponente	Endkonzentration	Hersteller
KAPAHiFi™ Fidelity Buffer	1x konzentriert	Peqlab
dNTPs	je 0,3mM	Peqlab
Primer	je 0,5µM	Invitrogen
Polymerase	0,02 U/µl Variabel	Peqlab
Zelllysats	(siehe o., 5.6.2)	-

PCR-Programm:

Initiale Denaturierung	5min, 95°C	1x
Denaturierung	20s, 98°C	
Annealing	15s, 51-52°C*	35x
Elongation	30s, 72°C	
Finale Elongation	5min, 72°C	1x

*51°C bei Primerpaar 27f-1492r, 52°C bei Primerpaar 515f-1391r

KAPA2G™ Robust DNA Polymerase (Peqlab)

PCR-Ansatz:

Komponente	Endkonzentration	Hersteller
KAPA2G™ Buffer (B)	1x konzentriert	Peqlab
dNTP's	je 0,2mM	Peqlab
Primer	je 0,5µM	Invitrogen
Polymerase	0,02U/µl Variabel	Peqlab
Zelllysat	(siehe o., 5.6.2)	-

PCR-Programm:

Initiale Denaturierung	3min, 95°C	1x
Denaturierung	20s, 95°C	
Annealing	15s, 51-52°C*	35x
Elongation	1min 40s, 72°C	
Finale Elongation	5min, 72°C	1x

*51°C bei Primerpaar 27f-1492r, 52°C bei Primerpaar 515f-1391r

Primer

Es wurden PCRs mit zwei verschiedenen Primerpaaren (Lane 1991) durchgeführt:

Primerpaar 1:

Forward Primer: 27f (5'- AGA GTT TGA TCC TGG CTC A -3')

Reverse Primer: 1492r (5'- CGG CTA CCT TGT TAC GAC -3')

Primerpaar 2:

Forward Primer: 515f (5'- GTG CCA GCM GCC GCG GTA A -3')

Reverse Primer: 1391r (5'- GAC GGG CGG TGW GTR CA -3')

Agarose-Gelelektrophorese

Je 5µl des PCR-Produkts wurden auf ein 1% Agarosegel aufgetragen und die DNA nach der Auftrennung für 30min in einer EtBr-Lösung (1,4mg EtBr/l) gefärbt. Eine unter UV-Licht sichtbare, spezifische, DNA-Bande wurde bei der Methodenetablierung als positives Ergebnis der PCR bzw. der Methode bezeichnet.

III. ERGEBNISSE

1 FTIR-Spektroskopie als Identifizierungsmethode bakterieller Isolate aus pharmazeutischen Reinräumen

Um die FTIR-Spektroskopie als Identifizierungsmethode für Gram-positive Kokken und sporenbildende Bakterien aus pharmazeutischen Reinräumen zu etablieren, wurden die entsprechenden FTIR-Referenzdatenbanken an die bakterielle Diversität von Reinräumen eines pharmazeutischen Produktionsstandortes angepasst. Die Leistungsfähigkeit der Methode wurde anschließend auf unterschiedliche Weise validiert.

1.1 Anpassung der FTIR-Referenzdatenbanken an die mikrobielle Biodiversität pharmazeutischer Reinräume

Die Grundlage der Identifizierung von Mikroorganismen durch die FTIR-Spektroskopie bilden Referenzdatenbanken. Nur Spezies, die in den Datenbanken vertreten sind, können auch korrekt identifiziert werden. Da es möglich ist, die Spektren mehrerer Stämme einer Spezies in die Datenbanken aufzunehmen, können auch unterschiedliche phänotypische Ausprägungen innerhalb einer Spezies erfasst werden, um eine korrekte Identifizierung von Isolaten auch bei deutlichen intraspezifischen Unterschieden zu ermöglichen (Oberreuter, *et al.* 2002). Die Referenzdatenbanken können so auch an die mikrobielle Biodiversität bestimmter Habitate angepasst werden indem sie durch die Spektren von Bakterienstämmen erweitert werden die aus diesem Habitat isoliert wurden. Auf diese Weise können mögliche, für das Habitat charakteristische, phänotypische Ausprägungen von bereits in den Datenbanken enthaltenen oder zusätzlichen Spezies erfasst und die Wahrscheinlichkeit einer korrekten Identifizierung eines aus diesem Habitat stammenden Isolats erhöht werden. Zu diesem Zweck wurden in dieser Arbeit Spektren von Bakterienstämmen, isoliert aus pharmazeutischen Reinräumen eines bestimmten Produktionsstandortes, in bestehende Spektrendatenbanken aufgenommen. Die Anpassung wurde auf aerobe Bakterien und innerhalb dieser Gruppe auf die im pharmazeutischen Produktionsumfeld am häufigsten auftretenden Gruppen der Gram-positiven Sporenbildner und Gram-positiven nicht-sporenbildenden Bakterien beschränkt, für die bereits jeweils eine Datenbank

existierte. In diese wurden jedoch bisher hauptsächlich die Spektren von aus dem Lebensmittelbereich isolierten Bakterienstämmen aufgenommen.

Zur Erweiterung der Referenzdatenbanken wurden FTIR-Spektren von Gram-positiven mesophilen aeroben Sporenbildnern und aeroben Gram-positiven nicht-sporenbildenden Bakterienstämmen aufgenommen die im laufenden mikrobiologischen Umgebungsmonitoring pharmazeutischer Reinräume aus der Luft und von diversen Oberflächen isoliert wurden. Die Stämme wurden sowohl aus „kritischen“ (Reinraumklassen: Grade A, Class 100) als auch aus „unkritischen“ (übrige Reinraumklassen) Bereichen der pharmazeutischen Produktion isoliert und wurden abhängig vom Beprobungsort, auf Basis der Koloniemorphologie wie folgt vorselektioniert: Bei Proben aus „unkritischen“ Produktionsbereichen wurden nur die am häufigsten vorkommenden Kolonieformen berücksichtigt, wovon jeweils ein Isolat ausgewählt wurde; bei Proben aus „kritischen“ Produktionsbereichen wurde von jeder vorkommenden Kolonieform jeweils ein Isolat ausgewählt. Die Auswahl von Gram-positiven Kokken und sporenbildenden Bakterien wurde mittels Gram-Färbung (Gregersen 1978) und mikroskopischer Untersuchung getroffen. Die auf diese Weise ausgewählten Mikroorganismen wurden von einem pharmazeutischen Betrieb für weitere Untersuchungen zur Verfügung gestellt. Diese wurden mit Hilfe der entsprechenden Referenzdatenbanken identifiziert. Stämme, die mit Hilfe der bestehenden Referenzdatenbanken nicht eindeutig auf Speziesebene identifiziert werden konnten, wurden mittels Gensequenzanalyse (II-2.1) identifiziert. Die entsprechenden FTIR-Spektren wurden anschließend in die jeweilige Datenbank integriert.

Im Rahmen der Erweiterung dieser Datenbanken wurden in die Datenbank für Sporenbildner 66 Spektren von 64 Bakterienstämmen aufgenommen (Anhang 1). Damit enthielt diese Datenbank 655 Spektren von 517 Stämmen, die eindeutig einer valide beschriebenen Spezies zugeordnet werden konnten und 36 Spektren von 33 Stämmen die nicht auf Speziesebene identifiziert wurden (Anhang 3). Nach der Erweiterung stammten somit 12,0% der in der Datenbank vertretenen Stämme aus Reinräumen der pharmazeutischen Industrie. In die Datenbank für aerobe Gram-positive nicht-sporenbildende Bakterien wurden 121 Spektren von 119 Stämmen aufgenommen (Anhang 2). In dieser Datenbank befanden sich damit 1966 Spektren von 1847 Stämmen, die eindeutig einer valide beschriebenen Spezies zugeordnet werden konnten und 155 Spektren von 148 Stämmen die nicht auf Speziesebene

identifiziert wurden (Anhang 4). Hier stammten nach der Erweiterung 5,9% der in der Datenbank vertretenen Stämme aus dem Pharmaumfeld.

1.2 Validierung der FTIR-Referenzdatenbanken durch die Leave-One-Out-Methode

Bei der Validierung der Datenbanken durch die Leave-One-Out-Methode wurden die, in den Datenbanken enthaltenen, Spektren unter Verwendung der entsprechenden Datenbank identifiziert. Bei der Datenbank für Sporenbildner wurden 570 Spektren von 471 Stämmen und 57 Spezies in die Validierung einbezogen (Tabelle 5). Es wurden 58,4% der Spektren richtig identifiziert, 33,2% konnten nicht identifiziert werden, d.h. die Identifizierung auf Speziesebene ergab kein eindeutiges Ergebnis (siehe II-1.3) und 8,4% der Spektren wurden falsch identifiziert .

Tabelle 5 Zur Validierung der Datenbank für sporenbildende Bakterien nach der Leave-one-out-Methode ¹ verwendete Spekten und ^{2,3,4} nicht verwendete Spektren. Spektren wurden aus dieser Validierung ausgeschlossen weil: ² die Stämme nur auf Gattungsebene identifiziert wurden, ³ nur ein Stamm einer Spezies (von mehr als einem Spektrum) in der Datenbank vertreten war, ⁴ nur ein Spektrum einer Spezies in der Datenbank enthalten war.

	Spezies	Stämme	Spektren
Validierung¹	57	471	570
Sp. nicht ident.²	-	33	36
1 Stamm³	27	27	66
1 Spektrum⁴	19	19	19
Gesamt	103	550	691

Für die Datenbank der nicht-sporenbildenden Gram-positiven Bakterien wurden 1806 Spektren von 1699 Stämmen und 184 Spezies für die Validierung verwendet (Tabelle 6). Von diesen Spektren wurden 64,7% richtig identifiziert, 28,1% konnten nicht identifiziert werden und 7,2% wurden falsch identifiziert.

Tabelle 6 Zur Validierung der Datenbank für Gram-positive, nicht-sporenbildene Bakterien nach der Leave-one-out-Methode ¹ verwendete Spekten und ^{2,3,4} nicht verwendete Spektren. Spektren wurden aus dieser Validierung ausgeschlossen weil: ² die Stämme nur auf Gattungsebene identifiziert wurden, ³ nur ein Stamm einer Spezies (von mehr als einem Spektrum) in der Datenbank vertreten war, ⁴ nur ein Spektrum einer Spezies in der Datenbank enthalten war.

	Spezies	Stämme	Spektren
Validierung¹	184	1699	1806
Sp. nicht ident.²	-	148	155
1 Stamm³	11	11	23
1 Spektrum⁴	137	137	137
Gesamt	332	1995	2121

Durch die Leave-One-Out-Validierung beider Datenbanken konnte gezeigt werden, dass die Rate an korrekten Identifizierungen innerhalb einer Spezies tendenziell mit der Anzahl an, in der Datenbank vertretenen Stämmen der entsprechenden Spezies, steigt (Abbildung 3, Anhang 5, Anhang 6). Die 57 Spezies, die in die Leave-One-Out-Validierung der Datenbank für sporenbildende Bakterien miteinbezogen wurden, wurden durchschnittlich von acht Stämmen in der Datenbank repräsentiert. Ab einer Anzahl von 7 Stämmen pro Spezies lag der Anteil an korrekt identifizierten Spektren bei mindestens 50%. Von allen Spezies von denen mindestens 7 Stämme in der Datenbank enthalten waren wurden durchschnittlich 69,0% korrekt identifiziert.

Von den 184 Spezies, die in die Leave-One-Out-Validierung der Datenbank für Gram-positive Nicht-Sporenbildner miteinbezogen wurden, waren durchschnittlich neun Stämme in der Datenbank enthalten. Der durchschnittliche Anteil an korrekt identifizierten Spektren pro Spezies lag, ab einer Anzahl von vier Stämmen pro Spezies, mit Ausnahme der Werte bei 14 (25%), 16 (29,4%) und 30 (47,2%) Stämmen pro Spezies, über 50% (Abbildung 3). Ausschlaggebend für die Senkung des durchschnittlichen Wertes unter 50% bei 14, 16 und 30 Stämmen pro Spezies war der niedrige Anteil an korrekt identifizierten Spektren der Spezies *S. warneri* (0% bei 14 Stämmen), *S. pasteurii* (29,4% bei 16 Stämmen) und *S. saprophyticus* (34,4% bei 30 Stämmen).

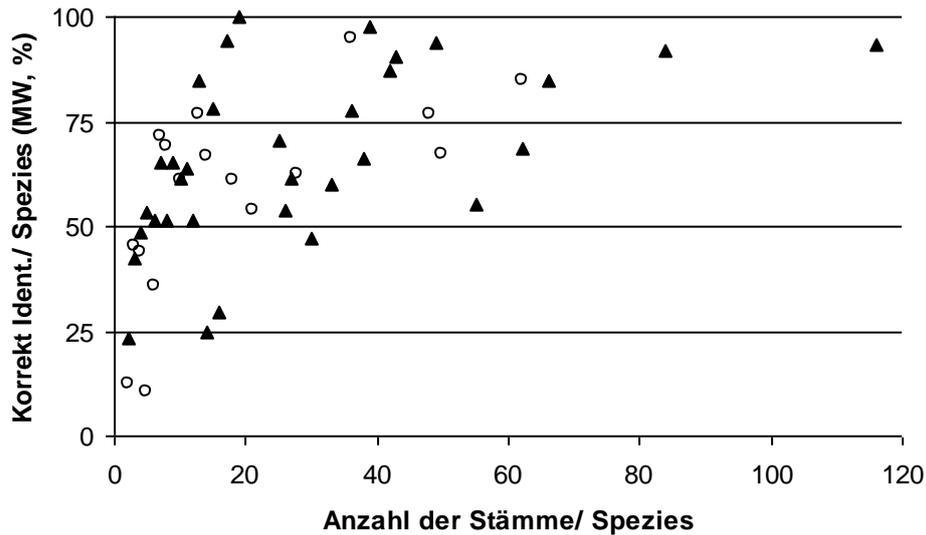


Abbildung 3 Validierung der FT-IR Spektren Datenbanken nach der Leave-one-out-Methode. Jeder Datenpunkt zeigt den Mittelwert des Anteils an korrekt identifizierten Spektren pro Spezies in Abhängigkeit der Anzahl an, in der jeweiligen Datenbank enthaltenen, Stämmen pro Spezies. MW, Mittelwert; Kreise, DB für Sporenbildner; Dreiecke, DB für Nicht-Sporenbildende Bakterien

1.3 Externe Validierung der FTIR-Referenzdatenbanken mittels

Praxisisolaten

Zur externen Validierung der FTIR-Referenzdatenbanken wurden Gram-positive Kokken und sporenbildende Bakterienstämme verwendet die, im Rahmen des routinemäßig durchgeführten Umgebungsmonitoring eines pharmazeutischen Produktionsstandortes, aus den gleichen Bereichen isoliert wurden, aus denen auch die Stämme zur Erweiterung der Datenbanken stammten. Als Referenzmethode, zur eindeutigen Identifizierung der Stämme und zur Untersuchung der vorhandenen mikrobiellen Biodiversität, diente die Gensequenzanalyse (III-1.3.1). Die isolierten Stämme wurden anschließend mit Hilfe der entsprechenden FTIR-Datenbank auf Speziesebene identifiziert (III-1.3.2). Um die Leistungsfähigkeit der FTIR-Spektroskopie mit der einer, in der pharmazeutischen Industrie häufig verwendeten, Methode zur phänotypischen Identifizierung bakterieller Isolate, zu vergleichen, wurden dieselben Bakterienstämme auch mittels API-System identifiziert (III-1.3.3). Die, unter den Punkten III-1.3.1 bis 1.3.3 beschriebenen Ergebnisse wurden in Tabelle 7 und Tabelle 8 zusammengefasst.

Tabelle 7 Treffsicherheit der FTIR-Spektroskopie und des API-Systems bei der Identifizierung von Gram-positiven Kokken und sporenbildenden Bakterien, isoliert aus pharmazeutischen Reinräumen. ¹ Spezies, die nicht in der API-Datenbank enthalten war; ² Spezies, die in den Datenbanken beider Identifizierungssysteme nicht enthalten war; ³ Stamm mit > 3% 16S rRNA-Gensequenzunterschied zur ähnlichsten, zum Zeitpunkt der Durchführung dieser Arbeit valide beschriebenen Spezies; U.a. anhand dieses Stammes wurde mittlerweile die Spezies *Bacillus kochii* neu beschrieben (Seiler *et al.* 2012a) - Nicht in der API-Datenbank enthalten – Die FTIR-Datenbank enthielt ein Spektrum eines Stammes mit identischer 16S rRNA-Gensequenz – Die Identifizierungsergebnisse für diesen Stamm wurden in keiner der Kategorien (K, F, N) gewertet; ⁴ Gram-positive Kokken: ID 32 STAPH, Sporenbildner: API 50 CHB u. API 20 NE; *B. cereus*-Gruppe: *B. cereus*, *B. anthracis*, *B. thuringensis*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides*, und *B. weihenstephanensis*; *B. subtilis*-Gruppe: *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. atrophaeus*, *B. mojavensis*, *B. vallismortis* und *B. velezensis*. K, korrekt identifiziert; F, falsch identifiziert; N, nicht identifiziert.

	Spezies	Stämme n	FTIR-Spektroskopie			API ⁴		
			K	F	N	K	F	N
			%	%	%	%	%	%
Gram-positive Kokken	<i>B. conglomeratum/paraconglomeratum</i> ¹	1	100,0	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0
	<i>K. palustris</i> ¹	4	75,0	0,0	25,0	0,0	100,0	0,0
	<i>K. rhizophila</i> ¹	9	100,0	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0
	<i>M. luteus</i>	46	97,8	0,0	2,2	65,2	28,3	6,5
	<i>M. terreus</i> ²	1	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	100,0
	<i>S. aureus</i>	2	100,0	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0
	<i>S. capitis</i>	6	100,0	0,0	0,0	33,3	66,7	0,0
	<i>S. cohnii</i>	4	100,0	0,0	0,0	75,0	0,0	25,0
	<i>S. devriesei</i> ²	1	0,0	100,0	0,0	0,0	100,0	0,0
	<i>S. epidermidis</i>	37	81,1	2,7	16,2	62,2	37,8	0,0
	<i>S. haemolyticus</i>	7	42,9	28,6	28,6	28,6	57,1	14,3
	<i>S. hominis</i>	37	64,9	13,5	21,6	13,5	75,7	10,8
	<i>S. lugdunensis</i>	2	100,0	0,0	0,0	50,0	0,0	50,0
	<i>S. pasteurii</i> ¹	2	50,0	0,0	50,0	0,0	100,0	0,0
	<i>S. pettenkoferi</i> ¹	1	0,0	0,0	100,0	0,0	100,0	0,0
	<i>S. saprophyticus</i>	7	71,4	14,3	14,3	42,9	42,9	14,3
<i>S. warneri</i>	3	0,0	33,3	66,7	66,7	33,3	0,0	
Gesamt		170	79,4	6,5	14,1	42,9	50,0	7,1
Gram-positive Sporenbildner	<i>B. cereus</i> -Gruppe	14	100,0	0,0	0,0	78,6	21,4	0,0
	<i>B. circulans</i>	8	87,5	12,5	0,0	0,0	75,0	25,0
	<i>B. clausii</i> ¹	1	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	100,0
	<i>B. flexus</i> ¹	2	100,0	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0
	<i>B. licheniformis</i>	5	100,0	0,0	0,0	40,0	0,0	60,0
	<i>B. megaterium</i>	3	66,7	33,3	0,0	66,7	33,3	0,0
	<i>B. pumilus</i>	9	100,0	0,0	0,0	77,8	11,1	11,1
	<i>B. simplex</i> ¹	2	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	100,0
	<i>B. sp. nov.</i> ³	1	-	-	-	-	-	-
	<i>B. subtilis</i> -Gruppe	13	84,6	15,4	0,0	100,0	0,0	0,0
	<i>P. glucanolyticus</i>	7	85,7	0,0	14,3	28,6	71,4	0,0
	<i>P. illinoisensis</i> ²	2	0,0	100,0	0,0	0,0	100,0	0,0
	<i>P. lautus</i>	2	0,0	50,0	50,0	0,0	100,0	0,0
	<i>T. goriensis</i> ¹	1	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	100,0
Gesamt		70	84,3	11,4	2,86	52,9	31,4	14,3

Tabelle 8 Sensitivität (SE), Spezifität (SP) und der Positive Predictive Value (PPV), berechnet für die Identifizierung von Gram-positiven Kokken und sporenbildenden Bakterien durch die FTIR-Spektroskopie und das API-System. ¹ Spezies die nicht in der API-Datenbank enthalten war; ² Spezies die in den Datenbanken beider Identifizierungssysteme nicht enthalten war; ³ Stamm mit > 3% 16S rRNA-Gensequenzunterschied zur ähnlichsten, zum Zeitpunkt der Durchführung dieser Arbeit valide beschriebenen Spezies; U.a. anhand dieses Stammes wurde mittlerweile die Spezies *Bacillus kochii* neu beschrieben (Seiler, et al. 2012a) - Nicht in der API-Datenbank enthalten – Die FTIR-Datenbank enthielt ein Spektrum eines Stammes mit identischer 16S rRNA-Gensequenz; ⁴ Gram-positive Kokken: ID 32 STAPH, Sporenbildner: API 50 CHB u. API 20 NE; -, Wert konnte nicht berechnet werden; *B. cereus*-Gruppe: *B. cereus*, *B. anthracis*, *B. thuringensis*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides*, und *B. weihenstephanensis*; *B. subtilis*-Gruppe: *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. atrophaeus*, *B. mojavensis*, *B. vallismortis* und *B. velezensis*.

	Spezies	FTIR-Spektroskopie			API ⁴		
		SE [%]	SP [%]	PPV [%]	SE [%]	SP [%]	PPV [%]
Gram-positive Kokken	<i>B. conglomeratum/paraconglomeratum</i> ¹	100,0	100,0	100,0	-	-	-
	<i>K. palustris</i> ¹	75,0	100,0	100,0	-	-	-
	<i>K. rhizophila</i> ¹	100,0	100,0	100,0	-	-	-
	<i>M. luteus</i>	97,8	100,0	100,0	65,2	90,3	71,4
	<i>M. terreus</i> ²	-	-	-	-	-	-
	<i>S. aureus</i>	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
	<i>S. capitis</i>	100,0	99,4	85,7	33,3	91,5	12,5
	<i>S. cohnii</i>	100,0	100,0	100,0	75,0	100,0	100,0
	<i>S. devriesei</i> ²	-	-	-	-	-	-
	<i>S. epidermidis</i>	81,1	97,7	91,7	62,2	97,7	88,5
	<i>S. haemolyticus</i>	42,9	100,0	100,0	28,6	100,0	100,0
	<i>S. hominis</i>	64,9	97,0	85,7	13,5	97,7	62,5
	<i>S. lugdunensis</i>	100,0	100,0	100,0	50,0	100,0	100,0
	<i>S. pasteurii</i> ¹	50,0	100,0	100,0	-	-	-
	<i>S. pettenkoferi</i> ¹	0,0	100,0	-	-	-	-
	<i>S. saprophyticus</i>	71,4	100,0	100,0	42,9	100,0	100,0
<i>S. warneri</i>	0,0	98,8	0,0	66,7	97,6	33,3	
Gram-positive Sporenbildner	<i>B. cereus</i> -Gruppe	100,0	98,2	93,3	78,6	100,0	100,0
	<i>B. circulans</i>	87,5	100,0	100,0	0,0	100,0	-
	<i>B. clausii</i> ¹	100,0	100,0	100,0	-	-	-
	<i>B. flexus</i> ¹	100,0	100,0	100,0	-	-	-
	<i>B. licheniformis</i>	100,0	100,0	100,0	40,0	100,0	100,0
	<i>B. megaterium</i>	66,7	100,0	100,0	66,7	100,0	100,0
	<i>B. pumilus</i>	100,0	93,4	69,2	77,8	100,0	100,0
	<i>B. simplex</i> ¹	100,0	100,0	100,0	-	-	-
	<i>B. sp. nov.</i> ³	-	-	-	-	-	-
	<i>B. subtilis</i> -Gruppe	84,6	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
	<i>P. glucanolyticus</i>	85,7	98,4	83,3	28,6	100,0	100,0
	<i>P. illinoisensis</i> ²	-	-	-	-	-	-
	<i>P. lautus</i>	0,0	100,0	-	0,0	98,6	0,0
	<i>T. goriensis</i> ¹	0,0	100,0	-	-	-	-

1.3.1 Detektierte mikrobielle Biodiversität in pharmazeutischen Reinräumen

Die mikrobielle Biodiversität in den erhaltenen Proben wurde auf Basis der Identifizierungsergebnisse der Gensequenzanalysen untersucht. Es wurden insgesamt 170 Gram-positive Kokken und 70 sporenbildende Bakterienstämme aus Reinräumen isoliert und identifiziert. Unter den sporenbildenden Bakterienstämmen wurden Spezies der Gattungen *Bacillus* (82,9%), *Paenibacillus* (15,7%) und *Terribacillus* (1,4%) detektiert (Tabelle 7). Innerhalb der Gattung *Bacillus* konnten 30 Stämme eindeutig einer von sieben Spezies (1,4-12,9%) zugeordnet werden. Darunter befand sich auch *B. pumilus* (12,9%), die am häufigsten isolierte Spezies unter den Sporenbildnern. Zusätzlich wurden 14 *Bacillus*-Stämme der *B. cereus*-Gruppe (20%) und 13 Stämme der *B. subtilis*-Gruppe (18,6%) zugeordnet. In diesen beiden Gruppen wurden Spezies zusammengefasst, die durch die Referenzmethode (Sequenzanalyse des 16S rRNA-Gens) auf Grund großer Ähnlichkeiten in der 16S rDNA-Sequenz, nur schwierig zu unterscheiden sind (*Bacillus cereus*-Gruppe: *B. cereus*, *B. anthracis*, *B. thuringensis*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides* und *B. weihenstephanensis*; *Bacillus subtilis*-Gruppe: *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. atrophaeus*, *B. mojavensis*, *B. vallismortis* und *B. velezensis*; siehe Punkt II-1.3). Ein isolierter sporenbildender Stamm wies im Vergleich von 700bp einen 16S rRNA-Gensequenzunterschied von 3,7% zur ähnlichsten Sequenz eines Typstammes einer valide beschriebenen Spezies (*B. horneckiae*) auf. Bei diesem unbekanntem Stamm handelt es sich um eine zum Zeitpunkt der Durchführung dieser Arbeit noch nicht beschriebene Spezies der Gattung *Bacillus*. Im Folgenden wird dieser Stamm als *Bacillus* sp. nov. bezeichnet. Mittlerweile wurde anhand dieses Stammes die neue Spezies *Bacillus kochii* beschrieben (Seiler, et al. 2012a). Innerhalb der Gattung *Paenibacillus* wurden Stämme der Spezies *P. glucanolyticus* (10%), *P. illinoisensis* (2,9%) und *P. lautus* (2,9%) identifiziert. Die Gattung *Terribacillus* war nur von einem Stamm der Spezies *T. goriensis* unter den isolierten Stämmen vertreten.

Unter den Gram-positiven Kokken wurden 170 Stämme aus 17 Spezies der Gattungen *Staphylococcus* (64,1%), *Micrococcus* (27,7%), *Kocuria* (7,7%) und *Brachybacterium* (0,6%) detektiert (Tabelle 7). Die Zellen der Gattung *Brachybacterium* sind nach dem Überimpfen in frisches Medium oval bis stäbchenförmig ausgeprägt, in der stationären Wachstumsphase nehmen die Zellen jedoch eine kokkoide Form an. Aus diesem Grund wurde der isolierte Stamm dieser Gattung in die Gruppe der Gram-positiven Kokken miteinbezogen (Collins et al. 1988,

Takeuchi *et al.* 1995). Die Gattung mit dem größten Anteil an den isolierten Stämmen der Gram-positiven Kokken, aber auch der höchsten detektierten Spezies-Diversität innerhalb dieser Gruppe war *Staphylococcus*. Insgesamt konnten 109 Stämme einer von 12 Spezies dieser Gattung zugeordnet werden. Darunter befanden sich auch die Spezies *S. epidermidis* und *S. hominis*, welche mit einem Anteil von je 21,8% an allen isolierten Gram-positiven Kokken am häufigsten innerhalb der Gattung *Staphylococcus* vertreten waren. Die Gattung *Micrococcus* war unter den isolierten Stämmen durch die Spezies *M. luteus* (27,1%) und *M. terreus* (0,6%) vertreten. Von letzterer wurde nur ein Stamm isoliert, *M. luteus* hingegen war mit 46 Stämmen die am häufigsten isolierte Spezies in der Gruppe der Gram-positiven Kokken. Die Gattung *Kocuria* war durch die Spezies *K. palustris* (2,4%) und *K. rhizophila* (5,3%) und die Gattung *Brachybacterium* nur durch einen, mittels 16S rRNA-Gensequenzanalyse nicht eindeutig identifizierbaren Stamm der Spezies *Bb. conglomeratum* bzw. *paraconglomeratum* repräsentiert.

1.3.2 Identifizierung von Reinraumisolaten durch FTIR-Spektroskopie

1.3.2.1 Gram-positive, sporenbildende Bakterien

Mittels FTIR-Spektroskopie konnten durch Verwendung der erweiterten FTIR-Referenzdatenbank für sporenbildende Bakterien von 70 sporenbildenden Stämmen 59 (84,3%) korrekt auf Speziesebene identifiziert werden (Tabelle 7).

Von den 13, durch die Referenzmethode identifizierbaren, Spezies wurden *B. clausii*, *B. flexus*, *B. licheniformis*, *B. pumilus*, *B. simplex* und die *B. cereus*-Gruppe, die mit 14 isolierten Stämmen am häufigsten unter den Sporenbildnern vertreten war, mit einer Sensitivität von 100% identifiziert (Tabelle 8). Der PPV und die Spezifität lagen dabei für die Spezies *B. clausii*, *B. flexus*, *B. licheniformis* und *B. simplex* ebenfalls bei 100%. Für die *B. cereus*-Gruppe ergab sich durch die falsche Zuordnung eines *B. megaterium*-Stammes zu dieser Gruppe eine Spezifität von 98,2% und ein PPV von 93,3%. *B. pumilus* wurde mit der niedrigsten Spezifität (93,4%) und dem niedrigsten PPV (69,2%) aller Spezies unter den Sporenbildnern identifiziert, da 50% der insgesamt falsch identifizierten sporenbildenden Stämme (je ein Stamm von *B. circulans* und *T. goriensis* und zwei Stämme der *B. subtilis*-Gruppe) dieser Spezies zugeordnet wurden. Des Weiteren wurden ein Stamm von *P. illinoisensis* als *P. glucanolyticus* und je ein Stamm von *P. lautus* und *P. illinoisensis* als *P. amylolyticus* falsch identifiziert. Insgesamt wurden, in der Gruppe der sporenbildenden Bakterien,

acht Stämme (11,4%) falsch identifiziert und zwei Stämme (2,8%) der Spezies *P. glucanolyticus* und *P. lautus* konnten nicht identifiziert werden (Anhang 7).

Das Identifizierungsergebnis des, als *Bacillus* sp. nov. bezeichneten, Stammes wurde nicht gewertet, obwohl in der Referenzdatenbank das Spektrum eines Stammes enthalten war, dessen 16S rRNA-Gensequenz zur entsprechenden Sequenz des isolierten Stammes (*B.* sp. nov.), identisch ist und dessen Spektrum auch als Identifizierungsergebnis der *Bacillus* sp. nov. ermittelt wurde. Nach der Durchführung dieser Arbeit wurde u.a. anhand dieser beiden Stammes die Spezies *Bacillus kochii* neu beschrieben (Seiler, et al. 2012a). Die FTIR-Referenzdatenbank enthielt damit Spektren aller, in dieser Studie detektierten, Spezies der sporenbildenden Bakterien mit Ausnahme von *P. illinoisensis*. Diese Spezies wurde unter den Isolaten von zwei Stämmen vertreten, die beide falsch identifiziert wurden und dadurch einen Anteil von 25% an allen falsch identifizierten Stämmen dieser Gruppe hatten. Von den übrigen Spezies waren Spektren von durchschnittlich 26 Stämmen in der Datenbank enthalten. Unter diesen Spezies erreichte die FTIR-Spektroskopie die niedrigste Sensitivität (0%) für *T. goriensis* und *P. lautus* die durch einen bzw. zwei Stämme unter den Isolaten und durch die Spektren von einem bzw. vier Stämmen in der Datenbank vertreten waren.

1.3.2.2 Gram-positive Kokken

Von 170 Stämmen Gram-positiver Kokken konnten durch die Verwendung der erweiterten FTIR-Referenzdatenbank für Gram-positive nicht-sporenbildende Bakterien 135 (79,4%) korrekt auf Speziesebene identifiziert werden (Tabelle 7). Von 17, durch die Referenzmethode identifizierbaren, Spezies wurden *K. rhizophila*, *S. aureus*, *S. capitis*, *S. cohnii*, *S. lugdunensis* und *Bb. conglomeratum/paraconglomeratum* mit einer Sensitivität von 100% identifiziert wobei der PPV und die Spezifität für diese Spezies nur bei *S. capitis* unter 100% lagen (Tabelle 8). Die am häufigsten isolierte Spezies, *M. luteus*, wurde mit einer Sensitivität von 97,8% und einer Spezifität und einem PPV von 100% identifiziert. Insgesamt wurden 11 Stämme (6,5%) falsch identifiziert und 24 Stämme (14,1%) konnten nicht identifiziert werden. Der Großteil der nicht korrekten Identifizierungen von Gram-positiven Kokken durch die FTIR-Spektroskopie ist auf eine schwierige Unterscheidung der Spezies der *S. epidermidis*-Gruppe zurückzuführen. Diese Gruppe umfasst die Spezies *S. capitis*, *S. caprae*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S.*

saprophyticus und *S. warneri*, die sich durch eine hohe phänotypische Ähnlichkeit auszeichnen. Abgesehen von der *S. epidermidis*-Gruppe wurde, unter den isolierten Gram-positiven Kokken, nur ein Stamm der Spezies *S. devriesei* (als *S. xylosus*) falsch identifiziert. Je ein Stamm der Spezies *K. palustris*, *M. luteus*, *M. terreus*, *S. pasteurii* und *S. pettenkoferi* konnte nicht identifiziert werden (Anhang 8). Neben *S. warneri* (*S. epidermidis*-Gruppe) wurde nur *S. pettenkoferi* mit einer Sensitivität von 0% und die Spezies *S. capitis*, *S. epidermidis* und *S. hominis* (*S. epidermidis*-Gruppe) mit einem PPV (85,7-91,7%) und einer Spezifität (97,0-99,4%) von unter 100% identifiziert. Von allen, durch die Referenzmethode identifizierbaren Spezies, fehlten in den FTIR-Datenbanken nur *S. devriesei* und *M. terreus*. Diesen beiden Spezies waren 4,1% der nicht identifizierbaren und 9,1% der falsch identifizierten Stämme zugehörig. Von den übrigen Spezies waren durchschnittlich Spektren von 25 Stämmen in der Referenzdatenbank enthalten.

1.3.3 Identifizierung von Reinraumisolaten durch das API-System

1.3.3.1 Gram-positive, sporenbildende Bakterien

Von 70 sporenbildenden Stämmen konnten, durch die kombinierte Anwendung der API 50 CHB und API 20 NE Identifizierungssysteme, 37 (52,9%) korrekt auf Speziesebene identifiziert werden (Tabelle 7). Von den 13, durch die Referenzmethode unterscheidbaren, Spezies zeigte das API-System die höchste Sensitivität bei der Identifizierung der *B. subtilis*- (100%) und *B. cereus*-Gruppe (78,6%) und *B. pumilus* (77,8%). Die Spezifität und der PPV lagen für alle Spezies, für die diese Werte für das API-System berechnet werden konnten, bei 100%, mit Ausnahme der Spezies *P. lautus* die mit einer Spezifität von 98,6% und einem PPV von 0% identifiziert wurde (Tabelle 8). Unter allen, in der API-Datenbank enthaltenen Spezies, zeigte das API-System die niedrigste Sensitivität (0%) für die Identifizierung der Spezies *P. lautus* und *B. circulans*, die mit zwei bzw. acht Stämmen unter den Sporenbildnern vertreten waren, wovon keiner korrekt identifiziert werden konnte. In der API-Datenbank waren 38,5% der, durch die Referenzmethode identifizierbaren, Spezies nicht vertreten. Von den insgesamt acht Stämmen dieser Spezies wurden jeweils vier falsch bzw. nicht identifiziert, wodurch diese Stämme einen Anteil von 18,2% an den falsch und 40,0% an den nicht identifizierbaren sporenbildenden Stämmen hatten. Insgesamt wurden 22 Stämme (31,4%) falsch identifiziert und 10

Stämme (14,3%) konnten nicht identifiziert werden. Die falsch identifizierten Stämme gehörten zu 40,9% der Gattung *Paenibacillus* und zu 59,1% der Gattung *Bacillus* an, die nicht identifizierbaren Stämme gehörten den Gattungen *Bacillus* (90%) und *Terribacillus* (10%) an (Anhang 7). Das Ergebnis der, durch das API-System nicht identifizierbaren, zum Zeitpunkt der Durchführung dieser Arbeit noch nicht beschriebenen neuen Spezies (*B. kochii*), wurde analog zur FTIR-Spektroskopie nicht bewertet.

1.3.3.2 Gram-positive Kokken

Von den 170 Stämmen der Gram-positiven Kokken konnten durch das ID 32 STAPH Identifizierungssystem 73 (42,9%) korrekt auf Speziesebene identifiziert werden (Tabelle 7). Von 17, durch die Referenzmethode identifizierbaren, Spezies wurde die höchste Sensitivität für *S. aureus* (100%) und *S. cohnii* (75,0%), bei einer Spezifität und einem PPV von 100%, erreicht (Tabelle 8). Die am häufigsten isolierte Spezies, *M. luteus*, wurde mit einer Sensitivität von 65,2% und einer Spezifität und einem PPV von 90,3% bzw. 71,4% identifiziert. Mit der niedrigsten Sensitivität (13,5%), unter den Gram-positiven Kokken, identifizierte das API-System die Spezies *S. hominis*, deren Stämme einen Anteil von 33,3% an den nicht identifizierbaren und 32,6% an den falsch identifizierten Stämmen dieser Gruppe hatten. Die übrigen 57 falsch identifizierten Stämme gehörten den Gattungen *Brachybacterium* (1,2%), *Kocuria* (15,3%), *Micrococcus* (15,3%) und *Staphylococcus* (35,3%) an (Anhang 8). Nicht identifiziert werden konnten zusätzlich 8 Stämme der Gattungen *Micrococcus* (33,3%) und *Staphylococcus* (66,6%). Insgesamt wurden 50,0% der Stämme falsch identifiziert und 7,1% konnten nicht identifiziert werden. Den geringsten Wert für Spezifität (91,5%) und PPV (12,5%) erreichte das API-System bei der Identifizierung der Spezies *S. capitis*, die mit 6 Stämmen unter den Isolaten vertreten war und mit einer Sensitivität von 33,3% identifiziert wurde. Auch für die Spezies *M. luteus*, *S. epidermidis*, *S. hominis* und *S. warneri* lagen die berechneten Werte für Spezifität und PPV unter 100%. In der API-Datenbank waren 41,2% der, durch die Referenzmethode identifizierbaren, Spezies nicht vertreten. Von den insgesamt 19 Stämmen dieser Spezies konnte ein Stamm nicht identifiziert werden und 18 wurden falsch identifiziert. Damit hatten diese Stämme einen Anteil von 8,3% an den nicht identifizierbaren und 21,2% an den falsch identifizierten Stämmen.

2 Methodenentwicklung zur kultivierungsfreien Untersuchung der mikrobiellen Biodiversität in der Luft pharmazeutischer Reinräume

Zur Untersuchung der bakteriellen Biodiversität in der Luft pharmazeutischer Reinräume durch eine PCR-basierte, kultivierungsfreie Methode ist auf Grund der geringen durchschnittlichen Bakterienkonzentration in dieser Umgebung eine sensitive Methode zur DNA-Extraktion und 16S rRNA-Gen-Amplifikation notwendig.

Unabhängig von der Methode der Probennahme bildet eine Zellsuspension welche die gesammelten Mikroorganismen aus einem, meist definierten, Volumen der beprobten Luft enthält, das Ausgangsmaterial für kultivierungsfreie Methoden zur Untersuchung der, in der Luft enthaltenen, mikrobiellen Biodiversität (Peccia & Hernandez 2006).

Unter Verwendung geeigneter Luftkeimsammler, in pharmazeutischen Reinräumen der Klasse C (Tabelle 2), wurde auf Basis der durchschnittlichen Ergebnisse früherer Keimzahlbestimmungen an einem bestimmten Produktionsstandort, bei einer Sammelzeit von 24h eine isolierbare Menge von etwa 10^3 KbE angenommen. Das Ziel dieser Arbeit war daher die Entwicklung einer Methode die eine effiziente Extraktion der DNA aus 1ml einer Zellsuspension mit einer Konzentration von 10^3 - 10^4 KbE/ml und eine anschließende Amplifikation der so gewonnenen 16S rDNA ermöglicht. Das PCR-Produkt sollte dabei in ausreichender Menge gebildet werden, um die anschließende Herstellung einer Klonbibliothek zu ermöglichen (siehe Schritte 1-3 in Abbildung 2). Für die Versuche zur Methodenetablierung wurde *S. epidermidis*, als Vertreter von häufig aus Reinräumen isolierten, widerstandsfähigen, Gram-Positiven Kokken, verwendet (Jimenez 2007).

2.1 Vorversuche zur Sensitivität und Effizienz der PCR

2.1.1 Ermittlung der niedrigstmöglichen Annealingtemperatur

Für beide verwendeten Primerpaare wurde die niedrigste Annealingtemperatur, die unter den gewählten Bedingungen zur Bildung eines spezifischen PCR-Produktes führt, ermittelt. Für das Primerpaar 1 (27f-1492r) lag diese Annealingtemperatur bei 51°C. Bei einer Annealingtemperatur von 50°C wurde bereits die Bildung einer Nebenbande festgestellt. Für das Primerpaar 2 (515f-1391r) lag die niedrigste Annealingtemperatur zur Bildung einer spezifischen Bande bei 52°C (Abbildung 4).

Hier wurden ab einer Annealingtemperatur von 51°C mehrere Nebenprodukte gebildet.

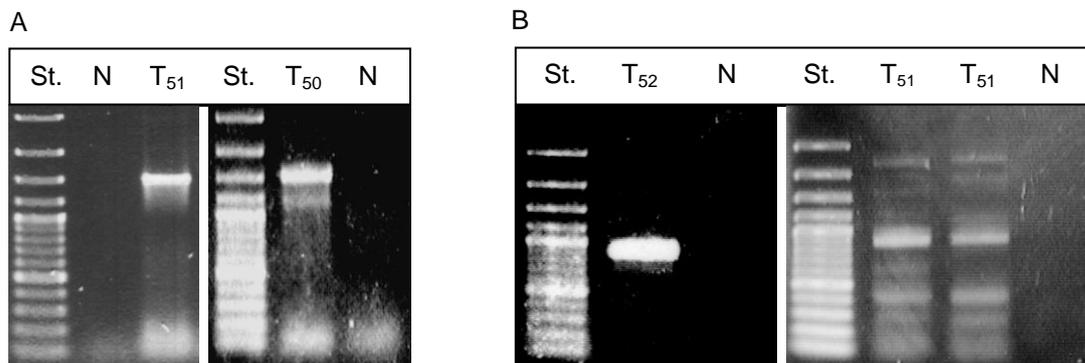


Abbildung 4 PCR bei unterschiedlichen Annealingtemperaturen mit den Primern 27f und 1492r (A) und 515f und 1391r (B). St., DNA-Standard (100bp Leiter); N, Negativkontrolle; T_n, Annealingtemperatur in °C.

2.1.2 Überprüfung der Sensitivität

Um die Sensitivität der PCR unter den gewählten Bedingungen zu überprüfen, wurde eine Zellsuspension mit einer Konzentration von $4,8 \times 10^7$ KbE/ml hergestellt. Ein daraus erzeugtes Lysat wurde mit $H_2O_{dest.}$ verdünnt und je 1µl der verschiedenen Verdünnungsstufen (von 10^0 bis 10^{-5}) wurde für die jeweiligen PCR-Ansätze verwendet. PCR-Produkt konnte bei Verwendung der Verdünnungsstufen 10^0 bis 10^{-3} gebildet werden (Abbildung 5). Unter der Annahme, dass durch den Zellaufschluss die gDNA aller Zellen freigegeben und daher als Template für die PCR verfügbar waren, konnte PCR-Produkt bei Vorhandensein von gDNA von $4,8 \times 10^1$ KbE gebildet werden.

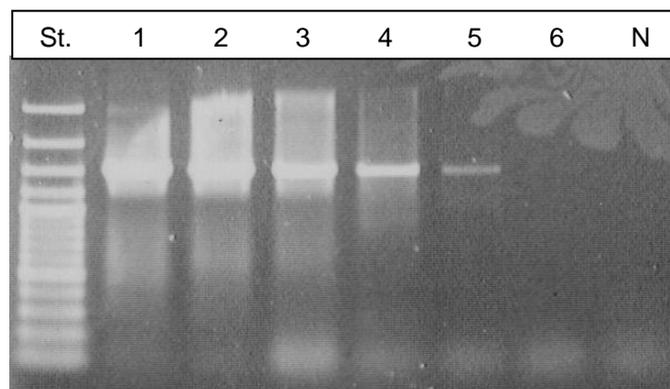


Abbildung 5 Amplifikation des 16S rRNA-Gens aus verschiedenen Verdünnungen eines Zelllysats von *S. epidermidis* unter Verwendung der Thermoprime Plus DNA Polymerase. St., DNA-Standard (100bp Leiter); N, Negativ Kontrolle; Verdünnungsstufen: 1, 10^0 ; 2, 5×10^{-1} ; 3, 10^{-1} ; 4, 10^{-2} ; 5, 10^{-3} ; 6, 10^{-4} .

2.1.3 Effizienz der 16S rRNA-Genamplifikation in 50µl und 100µl PCR-Ansätzen

Zum Vergleich der Effizienz von PCRs mit unterschiedlichem Ansatzvolumen wurden die Konzentrationen der gebildeten DNA-Fragmente in jeweils drei Ansätzen mit 50µl bzw. 100µl Ansatzvolumen bestimmt. Der Versuch wurde wie unter Punkt 5.6.1 beschrieben durchgeführt. Die Ergebnisse zeigen eine ähnliche durchschnittliche Konzentration an gebildetem PCR-Produkt in den 50µl und 100µl PCR-Ansätzen (Tabelle 9).

Tabelle 9 Bildung von PCR-Produkt in PCR-Ansätzen unterschiedlicher Volumina (50µl bzw. 100µl).

Ansatzvolumen	DNA-Konzentration [ng/µl]			Mittelwert
	Ansatz 1	Ansatz 2	Ansatz 3	
50µl	57	91	56	68
100µl	77	52	89	73

Da die durchschnittliche Konzentration der gebildeten PCR-Produkte in 50µl und 100µl ähnlich war, wurden bei allen Varianten der Methode (M1-M21), PCRs beider Volumina durchgeführt.

2.1.4 Mikroskopische Bestimmung der Zellzahl in Zellsuspensionen

Um die maximal mögliche Anzahl von Templates in den jeweiligen PCR-Ansätzen, auf Basis der Bestimmung der KbE/ml in den Ausgangssuspensionen abschätzen zu können, wurden die Ergebnisse der mikroskopischen Zellzahlbestimmung und der Auszählung der KbE in fünf Zellsuspensionen verglichen. Durch die mikroskopische Methode zur Zellzahlbestimmung, können alle Zellen gezählt werden, die potentiell DNA und damit Templates für die PCR beinhalten.

Durchschnittlich wurde durch die mikroskopische Auszählung eine, um 26% höhere Anzahl an Zellen/ml ermittelt als durch die Bestimmung der KbE (Tabelle 10). Auf Basis dieser Ergebnisse wurde die maximal erreichbare Anzahl an Templates in den Lysaten für die PCR, durch die Bestimmung der KbE/ml in den weiteren hergestellten Zellsuspensionen abgeschätzt.

Tabelle 10 Vergleich von KbE/ml und Zellzahl/ml in Suspensionen von *S. epidermidis* (G6524).

	KbE/ml	Zellen/ml	(KbE/ml) / (Zellen/ml) x 100
Suspension 1	8,9x10 ⁶	1,2x10 ⁷	74
Suspension 2	1,5x10 ⁷	1,9x10 ⁷	81
Suspension 3	1,2x10 ⁷	1,7x10 ⁷	70
Suspension 4	1,2x10 ⁷	1,7x10 ⁷	68
Suspension 5	1,1x10 ⁷	1,4x10 ⁷	79
Mittelwerte	1,2x10⁷	1,6x10⁷	74

Die Differenz der Werte der beiden Methoden ist zu einem Teil darauf zurückzuführen, dass eine Verklumpung von Zellen zu einer Reduktion der gebildeten Kolonien führen kann, indem mehrere eng aneinander liegende Zellen den Ausgangspunkt für nur eine sichtbare Kolonie bilden. Des Weiteren sind nicht alle, im Mikroskop sichtbaren, Zellen auch zur Bildung von Kolonien fähig. Die Werte einer mikroskopischen Auszählung liegen daher sowohl in Umweltproben als auch in, unter Laborbedingungen hergestellten, Zellsuspensionen meist höher als die Anzahl an KbE. Lebende und tote Zellen wurden bei der mikroskopischen Auswertung nicht unterschieden, da die maximal mögliche Anzahl an Templates bestimmt werden sollte und auch die gDNA toter Zellen als Template für die PCR dienen kann.

2.2 Versuche zur Etablierung einer kultivierungsfreien Methode zur Untersuchung der mikrobiellen Biodiversität in niedrig konzentrierten Bakteriensuspensionen

Peccia & Hernandez (2006) haben auf Basis der Erkenntnisse früherer Studien ein allgemeines Protokoll zur PCR-basierenden Biodiversitätsanalyse von Luftproben erstellt. Die Methode der vorliegenden Arbeit wurde in Anlehnung an dieses Protokoll erstellt und so verändert, dass eine Steigerung der Sensitivität erzielt werden sollte. Um eine möglichst sensitive Methode zur DNA-Extraktion und 16S rRNA-Gen-Amplifikation aus niedrig konzentrierten Zellsuspensionen zu etablieren, wurden verschiedene Varianten einer Methode (M1-M21) auf ihre Sensitivität hin überprüft. Einzelne Punkte des Protokolls wurden dabei schrittweise verändert, um eine Sensitivität zu erreichen, die eine Bildung von PCR-Produkt bei einer Konzentration von 10³-10⁴ KbE/ml in der Ausgangssuspension ermöglicht (Tabelle 4).

Die verschiedenen Varianten der Methode beinhalteten den Zellaufschluss, einen DNA-Reinigungsschritt, die DNA-Fällung und eine PCR zur Amplifikation bestimmter Abschnitte der 16s rDNA. Jede Variante der Methode beinhaltete sowohl einen enzymatischen als auch einen mechanischen Zellaufschluss, einen DNA-Reinigungsschritt mittels Phenol/Chloroform Extraktion, die DNA-Fällung mittels Isopropanol und NaCl bzw. NaAc und eine PCR unter Verwendung unterschiedlicher Polymerasen. Die Unterschiede zwischen den Varianten der Methode wurden in Tabelle 4 (II.5) zusammengefasst.

Der Vergleich der Sensitivität von verschiedenen Varianten der Methode, die sich nur durch einen Punkt des Protokolls unterscheiden, gibt Aufschluss über die Auswirkungen der einzelnen Veränderungen. Varianten die sich nur durch die physikalische Aufschlussmethode (M1, M2) oder die verwendeten Primer (M3, M4; M9, M10; M13, M14; M15, M16; M20, M21) unterschieden, wiesen keine Unterschiede in der Sensitivität auf (Tabelle 11). Die Varianten M3, M9 und M15 (Gruppe 1), M4, M10 und M16 (Gruppe 2), M5, M11 und M17 (Gruppe 3) und M6, M12 und M19 (Gruppe 4) unterschieden sich jeweils nur durch die verwendete Polymerase, wobei die höchste Sensitivität innerhalb der Gruppen immer durch die Verwendung der Thermoprime Plus DNA Polymerase (Thermo Scientific) erreicht wurde. In den Gruppen 1, 2 und 3 wurde sowohl beim Einsatz von 1µl als auch von 67µl Lysat nur unter Verwendung der Thermoprime Plus DNA Polymerase und der höchsten verwendeten Ausgangskonzentration von 10^6 KbE/ml PCR-Produkt gebildet. In Gruppe 4 wurde bei einer Ausgangskonzentration von 10^6 KbE/ml und dem Einsatz von 1µl Lysat durch alle verwendeten Polymerasen PCR-Produkt gebildet, beim Einsatz von 67µl Lysat war dies nur unter Verwendung der Thermoprime Plus- und KAPA2G™ Robust DNA Polymerase möglich. In dieser Gruppe war unter Verwendung der Thermoprime Plus DNA Polymerase und dem Einsatz von 1µl Lysat (M6), die Bildung von PCR-Produkt bei einer Ausgangskonzentration von 10^5 KbE/ml möglich. Einen positiven Effekt auf die Sensitivität zeigte auch die Verwendung des DNA-Reinigungskits (M9, M13; M10, M14; M15, M20; M16, M21) und der Einsatz von Glykogen (M6, M7) bzw. BSA (M5, M6; M11, M12; M15, M18; M17, M19). Ein kumulativer, positiver Effekt dieser Veränderungen konnte jedoch nicht gezeigt werden. Negativ wirkte sich SDS auf die Sensitivität der Methode aus, wenn NaAc für die DNA-Fällung verwendet wurde (100µl PCR-Ansätze; M2, M5). Dieser Effekt konnte durch die Verwendung von NaCl

anstelle von NaAc aufgehoben werden (100µl PCR-Ansätze; M2, M3). Es konnte jedoch kein Unterschied in der Sensitivität von Varianten ohne SDS (mit NaAc) und Varianten mit SDS (mit NaCl) gezeigt werden (M3, M5; M9, M11; M15, M17; M18, M19). Bei allen Varianten der Methode wurden PCRs mit 50µl und 100µl Ansätzen mit je 1µl bzw. 67µl der DNA-Lösung durchgeführt. Bei Zugabe von 1µl des Zelllysats ist die Konzentration der Templates, aber auch die Konzentration der möglichen PCR-Inhibitoren im PCR-Ansatz geringer als bei 67µl. Bei Verwendung einer Zellsuspension mit der höchsten Ausgangskonzentration von 10^6 KbE/ml konnte beim Einsatz von 1µl des Lysats bei 15 überprüften Methoden (M1-M8, M12, M13, M14, M18-M21) PCR-Produkt gebildet werden. Bei PCR-Ansätzen mit höherem Anteil an Lysat (10µl bzw. 67µl) wurde PCR-Produkt nur bei den Varianten M3-M6, M8, M18-M21 unter Verwendung der Thermoprime Plus DNA Polymerase bzw. KAPA2G™ Robust DNA Polymerase gebildet. Durch den Einsatz der KAPAHiFi™ DNA Polymerase konnte PCR-Produkt nur bei Ansätzen mit 1µl Lysat gebildet werden. Unter allen Varianten der Methode war die Bildung eines PCR-Produktes bei einer Ausgangskonzentration von 10^5 KbE/ml nur durch die Varianten M6 und M8 (Thermoprime Plus DNA Polymerase) und nur beim Einsatz von 1µl Lysat möglich. Keine der 21 getesteten Varianten war ausreichend sensitiv, um PCR-Produkt bei einer Konzentration der Zellsuspension von unter 10^5 KbE/ml zu bilden.

Tabelle 11 Ergebnisse der PCR der Methoden 1-21, eingeteilt nach der verwendeten Polymerase. M, Methode; +, positives Ergebnis (gebildetes PCR-Produkt); -, kein PCR-Produkt; kD, keine Daten; *Maximal mögliche Anzahl an KbE deren Genome pro Ansatz enthalten sein konnten (bei 100% Effizienz der DNA-Extraktion).

PCR-Ansatz	KbE/ml	Templates/Ansatz*	Thermoprime Plus DNA Pol.								KAPAHiFi™ DNA Pol.						KAPA2G™ Robust DNA Pol.						
			M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10	M11	M12	M13	M14	M15	M16	M17	M18	M19	M20	M21
50µl (1µl Lysat)	5x10 ⁶	5x10 ³	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+
	5x10 ⁵	5x10 ²	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	5x10 ⁴	50	-	-	-	-	-	-	-	-	kD	kD	kD	kD	-	-	kD	kD	kD	kD	kD	-	-
	5x10 ³	5	-	-	-	-	-	-	-	-	kD	kD	kD	kD	-	-	kD	kD	kD	kD	kD	-	-
50µl (10µl Lysat)	5x10 ⁶	5x10 ⁴	kD	kD	kD	kD	kD	+	kD	+	kD	kD	kD	kD	kD	kD	kD	kD	kD	kD	kD	kD	kD
	5x10 ⁵	5x10 ³	kD	kD	kD	kD	kD	-	kD	-	kD	kD	kD	kD	kD	kD	kD	kD	kD	kD	kD	kD	kD
	5x10 ⁴	5x10 ²	kD	kD	kD	kD	kD	-	kD	-	kD	kD	kD	kD	kD	kD	kD	kD	kD	kD	kD	kD	kD
100µl (67µl Lysat)	5x10 ⁶	4,9x10 ⁶	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
	5x10 ⁵	4,9x10 ⁵	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	5x10 ⁴	4,9x10 ⁴	-	-	-	-	-	-	-	-	kD	kD	kD	kD	-	-	kD	kD	kD	kD	kD	-	-
	5x10 ³	4,9x10 ³	-	-	-	-	-	-	-	-	kD	kD	kD	kD	-	-	kD	kD	kD	kD	kD	-	-

3 Beschreibung neuer bakterieller Taxa

3.1 Neubeschreibung der Spezies *Micrococcus cohnii*

Im Zuge der Untersuchung der mikrobiellen Diversität in pharmazeutischen Reinräumen und verschiedenen Arztpraxen bzw. der Anpassung von FTIR-Referenzdatenbanken an die mikrobielle Flora der entsprechenden Umgebungen (III-1, Speil 2007) wurden zwei Bakterienstämme aus einer Arztpraxis, WS4601^T (Untersuchungszimmer) und WS4602 (Garderobe) und ein Stamm aus einem pharmazeutischen Reinraum, WS4599, isoliert, deren partielle 16S rRNA-Gensequenzen (839-902bp) im Vergleich von 839bp identisch waren. Da diese Stämme auf Basis dieser partiellen Sequenzen keiner bekannten Spezies eindeutig zugeordnet werden konnten, wurde eine exakte taxonomische Einordnung der Stämme mittels polyphasischem Ansatz, der morphologische, physiologische, chemotaxonomische und phylogenetische Untersuchungen der Stämme WS4599, WS4601^T und WS4602 umfasste, vorgenommen.

3.1.1 Phylogenetische Analysen

Die phylogenetische Position der Stämme WS4599, WS4601^T und WS4602 wurde auf Basis der 16S rRNA- und *recA*-Gensequenzen bestimmt. Gensequenzen der neuen Stämme wurden in der Nucleotide-Sequence-Database des European- Molecular-Biology-Laboratory (EMBL) hinterlegt (Anhang 10).

3.1.1.1 16S rRNA-Gen

Zur phylogenetischen Einordnung der Stämme WS4599, WS4601^T und WS4602, auf Basis der 16S rRNA-Gensequenz, wurde annähernd die gesamte Sequenz des 16S rRNA-Gens der drei Stämme ermittelt (1407-1411bp). Im Vergleich von 1407bp waren die Sequenzen der drei Stämme zu 100% identisch. Die höchste Ähnlichkeit zur 16S rRNA-Gensequenz der drei Stämme, wiesen unter allen Typstämmen bekannter Spezies, die Sequenzen der 16S rRNA-Gene von *M. yunnanensis* (98.0%), *M. antarcticus* (97.9%), *M. luteus*

(97.9%) und *M. terreus* (97.9%) auf. Die Werte für die Ähnlichkeit der 16S rRNA-Gensequenzen von WS4601^T und den entsprechenden, publizierten Sequenzen der Typstämme aller bekannten Spezies der Gattung *Micrococcus* wurden in Tabelle 12 zusammengefasst.

Tabelle 12 Ähnlichkeit der 16S rRNA-Gensequenzen des Stammes WS4616^T und allen beschriebenen Spezies der Gattung *Micrococcus*.

Stamm	Sequenzähnlichkeit [%]									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
1. WS4601^T (FR832424)										
2. <i>M. yunnanensis</i> (FJ214355)	98,0									
3. <i>M. luteus</i> (AJ536198)	97,9	99,7								
4. <i>M. antarcticus</i> (AJ005932)	97,9	98,5	98,3							
5. <i>M. terreus</i> (FJ423763)	97,9	97,8	98,0	97,1						
6. <i>M. endophyticus</i> (EU005372)	97,8	99,4	99,1	98,1	97,1					
7. <i>M. lylae</i> (X80750)	97,5	98,2	98,4	97,6	97,1	97,9				
8. <i>M. niistensis</i> (FJ897464)	96,8	97,5	96,9	95,9	98,2	97,2	96,6			
9. <i>M. flavus</i> (DQ491453)	96,7	98,3	97,8	97,6	96,7	98,1	96,9	96,4		
10. <i>M. lactis</i> (FN673681)	96,1	96,7	96,6	96,8	97,2	96,9	96,6	96,8	95,3	

Der phylogenetische Baum, der auf Basis der 16S rRNA-Gensequenzen der Stämme WS4599, WS4601^T, WS4602 und den publizierten 16S rRNA-Gensequenzen aller bekannten Spezies der Gattung *Micrococcus* und nahe verwandten Taxa erstellt wurde, zeigt, dass die drei neuen Stämme eine eigene, von den übrigen Spezies abgetrennte Abstammungslinie innerhalb der Gattung *Micrococcus* bilden (Abbildung 6).

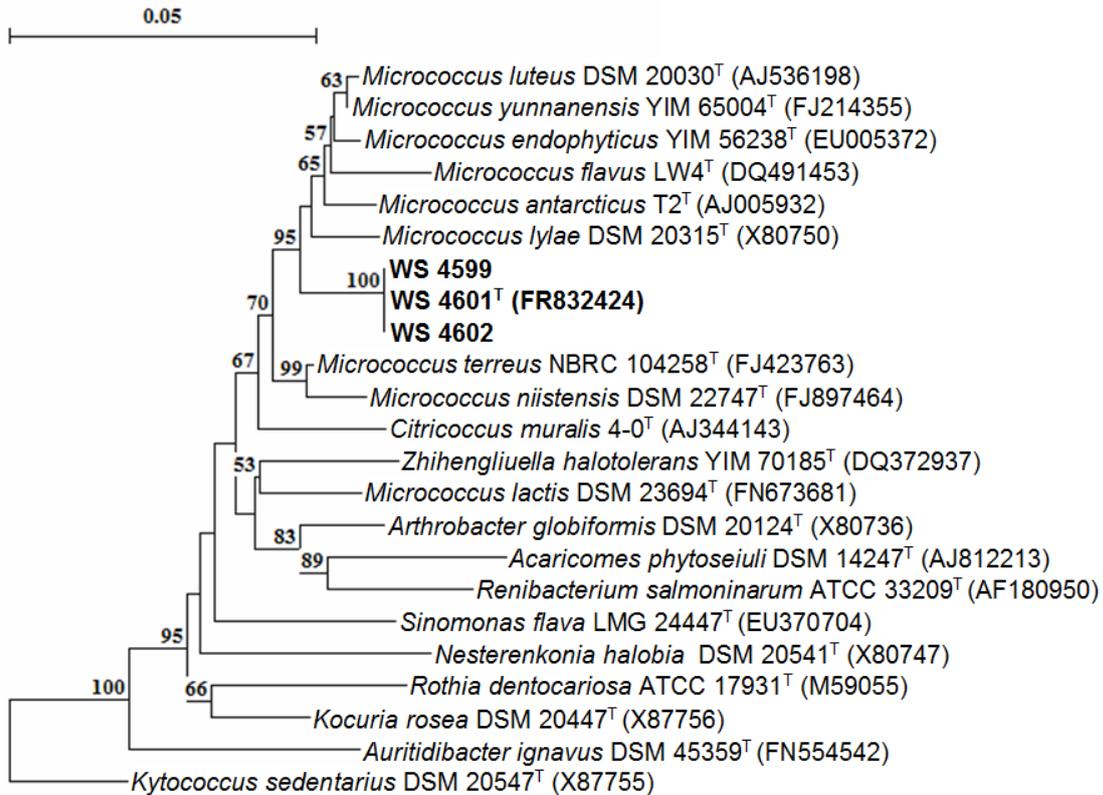


Abbildung 6 Phylogenetischer Baum (berechnet nach der Neighbor-Joining-Methode) basierend auf den 16S rRNA-Gensequenzen der Stämme WS4599, WS4601^T, WS4602 und den publizierten 16S rRNA-Gensequenzen nahe verwandter Taxa. Nur Bootstrap-Werte über 50% (500 Wiederholungen) wurden an den Verzweigungspunkten angegeben. Die 16S rRNA-Gensequenz von *Kytococcus sedentarius* DSM 20547^T (X87755) wurde als Outgroup verwendet. Die Länge des eingezeichneten Balkens entspricht einem Sequenzunterschied von 5%.

3.1.1.2 *recA*-Gen

In die phylogenetische Analyse, auf Basis der *recA*-Gensequenzen, wurden die Stämme WS4599, WS4601^T, WS4602 und die Typstämme aller bekannten Spezies der Gattung *Micrococcus*, mit Ausnahme der Spezies *M. antarcticus*, *M. niistensis* und *M. lactis* einbezogen. *M. lactis* wurde bei der Untersuchung der *recA*-Gensequenzen nicht berücksichtigt, da diese Spezies, unter allen bekannten *Micrococcus*-Spezies, den größten 16S rRNA-Gensequenzunterschied (3,9%) zu den drei neuen Stämmen aufwies und sich im, auf den 16S rRNA-Gensequenzen basierenden, phylogenetischen Baum nicht innerhalb der Gruppe der *Micrococcus*-Spezies befand. Die *recA*-Gensequenz von *M. antarcticus* und *M. niistensis* konnte aus folgenden Gründen nicht bestimmt werden: Der Typstamm von *M. antarcticus* konnte von

keiner der beiden Stammsammlungen, in denen dieser Stamm hinterlegt wurde (CGMCC, China General Microbiological Culture Collection Center und JCM, Japan Collection of Microorganisms) bezogen werden, da dessen Abgabe aufgrund von Unstimmigkeiten in Bezug auf die Identität der hinterlegten Stämme unterbunden wurde. Die 16S rRNA-Gensequenz, die im Rahmen dieser Arbeit vom Typstamm der Spezies *M. niistensis* (bezogen von der DSMZ, DSM 22747^T) bestimmt wurde (1411bp), wies zur 16S rRNA-Gensequenz, die für den Typstamm von *M. niistensis* NII-0909^T (FJ897464) publiziert wurde, einen Sequenzunterschied von 2,9% auf. Dies lässt darauf schließen, dass der beschriebene Typstamm und der bei der DSMZ hinterlegte Stamm nicht identisch sind.

Zur Amplifizierung von *recA*-Genfragmenten der Stämme WS4599, WS4601^T, WS4602 und der Typstämme von *M. lylae* (DSM 20315^T), *M. endophyticus* (DSM 17945^T), *M. flavus* (DSM 19079^T), *M. yunnanensis* (DSM 21948^T) und *M. terreus* (NBRC 104258^T) wurden in einem ersten Schritt die, von van Waasbergen *et al.* (2000) für *Arthrobacter*-Spezies entworfenen Primer GPRA-UF2 und GPRA-UR2 verwendet. Ein spezifisches PCR-Produkt wurde jedoch nur bei den Spezies *M. lylae*, *M. flavus*, *M. yunnanensis* und den Stämmen WS4599, WS4601^T und WS4602 gebildet, was darauf hindeutet, dass die Bindung der verwendeten Primer an die Zielsequenz nicht bei allen *Micrococcus*-Spezies möglich ist. Die erhaltenen *recA*-Genfragmente wurden mit Hilfe des Primers GPRA-UF2 sequenziert. Auf Basis dieser Sequenzen und der publizierten *recA*-Gensequenz von *M. luteus* (CP001628) wurden anschließend die Primer 307Rev und 606Fw entworfen (Abbildung 7, Anhang 9) und zur Sequenzierung der oben beschriebenen PCR-Produkte verwendet, um die Sequenzen an den 5'- und 3'-Enden zu verlängern. Die so erhaltenen Sequenzen wurden daraufhin als Basis für die Entwicklung des Primers 870Rev verwendet (Abbildung 7, Anhang 9). Durch den Einsatz dieses Primers, in Kombination mit dem Primer GPRA-UF2, konnte das *recA*-Genfragment aller, in die Untersuchung einbezogener *Micrococcus*-Spezies amplifiziert und anschließend sequenziert werden.

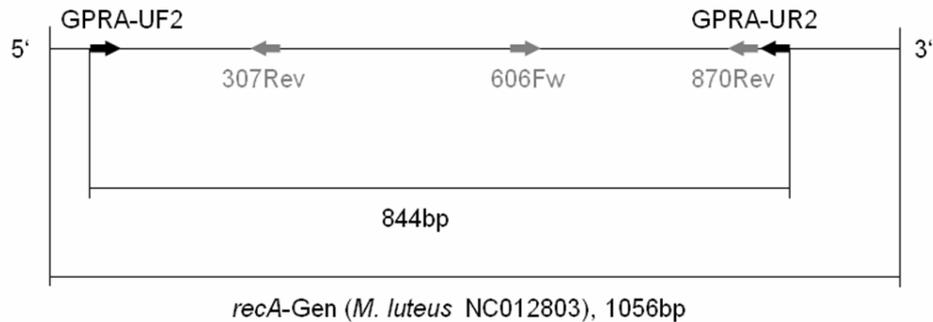


Abbildung 7 Schematische Darstellung der Primer zur Amplifizierung und Sequenzierung von *recA*-Genfragmenten der Gattung *Micrococcus*. Pfeile: Schwarz, Primer von van Waasbergen *et al.*(2000); Grau, in dieser Arbeit entwickelte Primer.

Zur phylogenetischen Analyse, auf Basis der *recA*-Gensequenz, standen somit Sequenzen mit einer Länge von mindestens 815bp zur Verfügung. Im Vergleich von 815bp ergaben sich für WS4599 und WS4601^T identische *recA*-Gensequenzen, die eine Ähnlichkeit von 99,3% zur entsprechenden Sequenz von WS4602 aufwiesen. Unter allen, in diese Untersuchung miteinbezogenen *Micrococcus*-Spezies, zeigten *M. lylae* (88,7-88,8%) und *M. endophyticus* (87,0-87,1%) die größte Ähnlichkeit in der *recA*-Gensequenz zu den Stämmen WS4599, WS4601^T und WS4602. Die Werte für die Ähnlichkeit der *recA*-Gensequenzen von WS4601^T, WS4602 und den entsprechenden Sequenzen der nahe verwandten *Micrococcus*-Spezies wurden in Tabelle 13 zusammengefasst. Der phylogenetische Baum, der auf Basis der *recA*-Gensequenzen der Stämme WS4599, WS4601^T, WS4602 und den *recA*-Gensequenzen nahe verwandter Spezies der Gattung *Micrococcus* erstellt wurde, zeigt, dass die drei neuen Stämme, innerhalb der Gattung *Micrococcus*, eine eigene, von den übrigen Spezies abgetrennte Abstammungslinie bilden (Abbildung 8).

Tabelle 13 Ähnlichkeit der *recA*-Gensequenzen des Stammes WS4601^T, WS4602 und allen, in die Untersuchung miteinbezogenen, Spezies der Gattung *Micrococcus*.

Stamm	Sequenzähnlichkeit [%]						
	1	2	3	4	5	6	7
1. WS4601 ^T (FR832427)							
2. WS4602 (FR832429)	99,3						
3. <i>M. yunnanensis</i> (FR837954)	86,7	86,6					
4. <i>M. luteus</i> (CP001628)	86,7	86,6	98,3				
5. <i>M. terreus</i> (FR837955)	85,3	85,4	86,8	86,5			
6. <i>M. endophyticus</i> (FR837952)	87,0	87,1	94,4	93,5	86,9		
7. <i>M. lylae</i> (FR837951)	88,7	88,8	90,8	90,0	88,1	91,4	
8. <i>M. flavus</i> (FR837953)	85,6	85,8	94,2	93,5	87,2	92,3	92,3

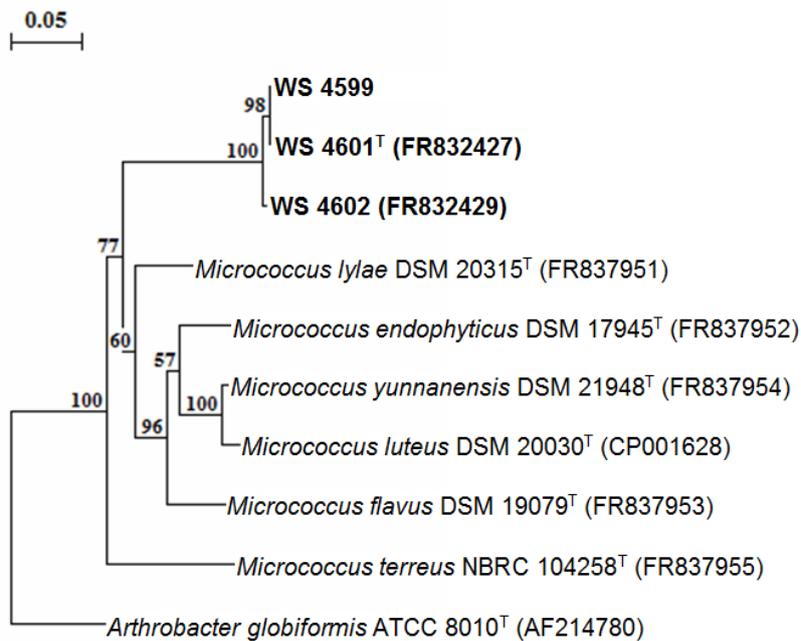


Abbildung 8 Phylogenetischer Baum (berechnet nach der Neighbor-Joining-Methode) basierend auf den *recA*-Gensequenzen der Stämme WS4599, WS4601^T, WS4602 und nahe verwandter Spezies der Gattung *Micrococcus*. Nur Bootstrap-Werte über 50% (500 Wiederholungen) wurden an den Verzweigungspunkten angegeben. Die *recA*-Gensequenz von *Arthrobacter globiformis* ATCC 8010^T (AF214780) wurde als Outgroup verwendet. Die Länge des eingezeichneten Balkens entspricht einem Sequenzunterschied von 5%.

3.1.2 Phänotypische Charakterisierung

Zur genaueren Charakterisierung der Stämme und dem Vergleich mit nahe Verwandten Taxa wurden morphologische und physiologische Merkmale der Stämme WS4599, WS4601^T, WS4602 und nahe verwandter Spezies

untersucht. Die chemotaxonomischen Charakteristika wurden in dieser Studie für den Stamm WS4601^T und zum Teil auch für nahe verwandte Spezies ermittelt.

3.1.2.1 Chemotaxonomische Charakterisierung

Die Analyse von Zellbestandteilen des Stammes WS4601^T ergab folgende Resultate. Im Peptidoglykan-Totalhydrolysat (4N HCl) wurden die Aminosäuren Alanin (Ala), Glutaminsäure (Glu), Lysin (Lys) und Asparaginsäure (Asp) nachgewiesen. Zudem wurde das schwer hydrolysierbare Peptid Asp-Lys gefunden, das jedoch nach der Behandlung mit Fluorwasserstoffsäure nicht mehr detektiert werden konnte und offensichtlich von einem Peptidoglykanassoziierten Polymer stammte. Das Peptidoglykan war frei von Leucin und Isoleucin und enthielt somit keine Proteinkontaminationen. Das, durch Behandlung mit Fluorwasserstoffsäure, entstandene Totalhydrolysat des Peptidoglykans enthielt die detektierten Aminosäuren in folgendem Verhältnis: 2,4 Ala : 0,1 Asp : 0,4 Glu : 1,0 Lys. Der geringe Anteil an Asparaginsäure stammte dabei vermutlich aus Resten des Begleitpolymers. Im Partialhydrolysat wurden die Peptide L-Ala–D-Glu, L-Ala–L-Lys, L-Lys–D-Ala, L-Ala–L-Lys–D-Ala, D-Ala–L-Ala und L-Ala–D-Glu gefunden. Aus den vorliegenden Daten wurde für den Stamm WS4601^T der Peptidoglykantyp A3 α (L-Lys–L-Ala) nach Schleifer & Kandler (1972) geschlussfolgert.

Die dominierenden unter den detektierten zellulären Fettsäuren waren anteiso-C_{15:0} (78,2%) und iso-C_{15:0} (10,5%). Die Fettsäuren iso-C_{14:0} (4,3%) und iso-C_{16:0} (4,3%) hatten ebenfalls einen Anteil von über 1% an den insgesamt detektierten Fettsäuren (Tabelle 14). Bei der Untersuchung der vorhandenen polaren Lipide wurden Diphosphatidylglycerol, Phosphatidylglycerol, zwei unbekannte Phospholipide und drei unbekannte Glykolipide gefunden (Abbildung 9).

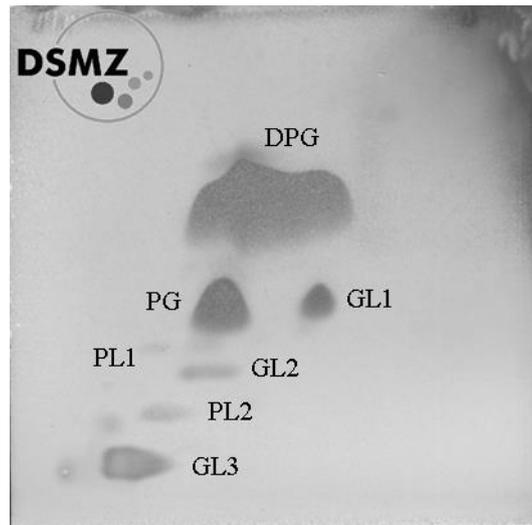


Abbildung 9 Mittels 2-dimensionaler Dünnschichtchromatographie (DC) aufgetrennte polare Lipide des Stammes WS4601^T. DPG, Diphosphatidylglycerol; PG, Phosphatidylglycerol; PL1 und PL2, unbekannte Phospholipide; GL1-GL3 unbekannte Glykolipide.

Die detektierbaren Menachinone waren MK7(II-H₂) (35%) und MK8(II-H₂) (65%). Der ermittelte G+C-Gehalt des Stammes WS4601^T lag bei 70,4 mol%.

Um vergleichbare Ergebnisse von, unter gleichen Bedingungen kultivierten, Stämmen zu erhalten, wurden die zellulären Fettsäuren in dieser Studie auch für die Typstämme der, zu den vier neuen Stämmen, nahe verwandten Spezies *M. yunnanensis* (DSM 21948^T), *M. luteus* (DSM 20030^T), *M. terreus* (NBRC 104258^T), *M. endophyticus* (DSM 17945^T) und *M. lylae* (DSM 20315^T) bestimmt. Die Ergebnisse dieser Analyse wurden zusammen mit den entsprechenden, publizierten Ergebnissen, für die Spezies *M. niistensis* (DSM 22747^T), *M. flavus* (DSM 19079^T), *M. antarcticus* (AS 1.2372^T) und *M. lactis* (DSM 23694^T) in Tabelle 14 zusammengefasst.

Tabelle 14 Detektierte zelluläre Fettsäuren des Stammes WS4601^T und beschriebener Spezies der Gattung *Micrococcus*. Stämme: 1, WS4601^T; 2, *M. yunnanensis* DSM 21948^T; 3, *M. luteus* DSM 20030^T; 4, *M. terreus* NBRC 104258^T; 5, *M. endophyticus* DSM 17945^T; 6, *M. lylae* DSM 20315^T (Daten aus dieser Arbeit); 7, *M. niistensis* DSM 22747^T (Daten von Dastager et al., retracted from IJSEM Papers in Press and will not be published in print in IJSEM); 8, *M. flavus* DSM 19079^T (Daten von Liu et al., 2007); 9, *M. antarcticus* AS 1.2372^T (Daten von Liu et al., 2000); 10, *M. lactis* DSM 23694^T (Daten von Chittipurna et al., 2011). Summed feature 1 enthält iso-C_{15:1} H und/oder C_{13:0} 3-OH. Summed feature 3 enthält C_{16:1} ω6c und/oder C_{16:1} ω7c. Die angegebenen Werte sind die jeweiligen Anteile an den gesamten zellulären Fettsäuren in Prozent; - nicht detektiert bzw. keine Daten; tr, Wert unter 1%.*Die Neubeschreibung der Spezies *M. niistensis* wurde von den Autoren wieder zurückgezogen, da es ihnen nicht möglich war eine Reinkultur des beschriebenen Stammes bei einer Stammsammlung zu hinterlegen. Die Neubeschreibung von *M. niistensis* wird daher nicht als Print-Version in IJSEM veröffentlicht.

Fettsäure	1	2	3	4	5	6	7*	8	9	10
iso-C _{11:0} 3-OH	-	-	-	-	-	-	2,9	-	-	-
iso-C _{13:0}	-	tr	tr	-	tr	tr	-	1,3	tr	-
C _{14:0}	tr	tr	3,9	tr	1,6	1,2	-	1,4	1,3	1,0
iso-C _{14:0}	4,3	2,5	tr	4,0	1,6	4,7	tr	1,7	5,3	2,5
iso-C _{15:0}	10,5	14,6	29,1	9,9	43,9	33,3	36,1	31,7	12,5	7,3
anteiso-C _{15:0}	78,2	72,8	49,7	81,0	44,8	52,2	33,0	32,2	71,1	68,1
iso-C _{15:1}	-	-	-	-	-	-	-	19,2	-	-
C _{16:0}	tr	tr	2,1	tr	1,2	tr	3,1	2,1	1,1	-
iso-C _{16:0}	4,3	3,3	2,1	3,1	2,1	4,2	3,8	tr	4,8	2,9
C _{16:1} ω7c	-	-	-	-	-	-	-	1,8	-	-
iso-C _{16:1} H	-	tr	tr	-	-	-	-	-	-	8,7
iso-C _{17:0}	-	tr	tr	-	tr	tr	8,1	-	tr	-
anteiso-C _{17:0}	tr	2,2	3,1	tr	1,3	1,0	11,8	tr	3,2	tr
anteiso-C _{17:1} ω9c	-	tr	tr	-	-	-	-	1,5	-	6,9
Summed feature 1	-	tr	tr	-	tr	-	-	-	-	1,8
Summed feature 3	-	tr	6,3	-	tr	-	-	-	-	-

3.1.2.2 Morphologische und physiologische Charakterisierung

Die Stämme WS4599, WS4601^T und WS4602 wurden auf deren morphologische und physiologische Charakteristika hin untersucht. Die Zellen aller drei Stämme sind Gram-positive, unbewegliche, nicht-sporenbildende aerobe Kokken mit einem Durchmesser von 1,0-1,3 µm. Die drei Stämme bilden auf TSA weiße, runde Kolonien mit glatter Oberfläche.

Unter den gewählten Bedingungen war ein Wachstum der Zellen bei Temperaturen zwischen 15 und 37°C, bei pH-Werten von pH 7-9 und NaCl-Konzentrationen von 0-10% (w/v) möglich. Die Zellen zeigten Oxidase-, Katalase- und Urease-Aktivität und waren zur Hydrolyse von Casein, Stärke

und Gelatine fähig. Es konnte jedoch weder eine Aktivität von Arginindihydrolase und β -Galaktosidase noch die Fähigkeit zur Reduktion von Nitrat, der Produktion von Indol und H_2S und der Hydrolyse von Aesculin festgestellt werden. Als einzige Kohlenstoffquelle konnten D-Glukose, D-Maltose, D-Saccharose und D-Trehalose aber nicht D-Mannose, D-Mannitol, D-Melibiose, D-Sorbitol, L-Arabinose und L-Rhamnose genutzt werden. Säureproduktion konnte beim Einsatz der Substrate D-Glukose, D-Maltose, D-Saccharose, D-Trehalose und D-Turanose nachgewiesen werden, war jedoch bei allen anderen, im API 50CH Teststreifen enthaltenen, Substraten nicht feststellbar.

In dieser Studie ermittelte physiologische Merkmale, nahe verwandter Spezies der Stämme WS4599, WS4601^T und WS4602 wurden in Tabelle 16 angeführt.

3.2 Neubeschreibung der Gattung *Naumannella*

Im Zuge der Untersuchung der mikrobiellen Diversität in pharmazeutischen Reinräumen und der Anpassung von FTIR-Referenzdatenbanken an die mikrobielle Flora dieser Umgebung (III-1), wurde im April 2009 der Stamm WS4616^T isoliert, der auf Basis der ermittelten partiellen 16S rRNA-Gensequenz (633bp) weder einer bekannten Spezies noch einer bekannten Gattung eindeutig zugeordnet werden konnte. In den darauf folgenden Monaten wurden drei Stämme, WS4617 (aus einem industriell gefertigten, milchhaltigen Dessertprodukt, Oktober 2009), WS4623 und WS4624 (beide aus der gleichen Rohmilchprobe, Januar 2010) gefunden, deren partielle 16S rRNA-Gensequenzen (865-981bp), im Vergleich von 633bp, zu 100% mit der entsprechenden Sequenz des Stammes WS4616^T identisch waren. Zur exakten taxonomischen Einordnung der Stämme WS4616^T, WS4617, WS4623 und WS4624 wurde ein polyphasischer Ansatz gewählt, der morphologische, physiologische, chemotaxonomische und phylogenetische Untersuchungen dieser vier Stämme umfasste.

3.2.1 Phylogenetische Analysen

Die phylogenetische Position der Stämme WS4616^T, WS4617, WS4623 und WS4624 wurde auf Basis von 16S rRNA- und *recA*-Gensequenzen bestimmt.

Gensequenzen der neuen Stämme wurden in der Nucleotide-Sequence-Database des European- Molecular-Biology-Laboratory (EMBL) hinterlegt (Anhang 11).

3.2.1.1 16S rRNA-Gen

Zur phylogenetischen Einordnung der Stämme WS4616^T, WS4617, WS4623 und WS4624, auf Basis der 16S rRNA-Gensequenz, wurde annähernd die gesamte Sequenz des 16S rRNA-Gens der vier Stämme ermittelt (1407bp). Im Vergleich von 1407bp waren die Sequenzen der vier Stämme, mit Ausnahme eines einzigen, unterschiedlichen Nukleotids in der Sequenz des Stammes WS4616^T, an der Position 1243 (*E. coli* numbering system, Brosius *et al.* 1978), identisch. Die größte Ähnlichkeit zur 16S rRNA-Gensequenz dieser vier Stämme, wiesen unter allen Typstämmen bekannter Spezies, die Sequenzen der 16S rRNA-Gene von *Ml. panaciterrae* (95,1-95,2%), *Ml. ginsengisoli* (94,5%) und *Pm. paludicola* (94,1-94,2%) auf, die der Familie der *Propionibacteriaceae* angehören. Die Ähnlichkeit der 16S rRNA-Gensequenz der Stämme WS4616^T, WS4617, WS4623 und WS4624 zu den entsprechenden Sequenzen der Typspezies aller Gattungen der Familie *Propionibacteriaceae* lag zwischen 90,3 und 94,1%. Der phylogenetische Baum, der auf Basis der 16S rRNA-Gensequenzen der Stämme WS4616^T, WS4617, WS4623, WS4624 und den publizierten 16S rRNA-Gensequenzen nahe verwandter Spezies aus der Familie der *Propionibacteriaceae* erstellt wurde, zeigt, dass die vier neuen Stämme eine eigene, von den übrigen Gattungen abgetrennte Abstammungslinie innerhalb eines Clusters mit *Pc. superfundia*, *Pm. paludicola* und *Mp. glycogenica* bilden (Abbildung 10). Die, von Stackebrandt *et al.* (1997) ermittelten, für die Familie der *Propionibacteriaceae*, charakteristischen Nukleotide (Signature Nucleotides) stimmten mit den entsprechenden Nukleotiden der 16S rRNA-Gensequenz der Stämme WS4616^T, WS4617, WS4623 and WS4624 in allen Positionen überein.

Im Gegensatz dazu wurden Unterschiede zu den, von Zhi *et al.* (2009) für die Familie der *Proponibacteriaceae* festgelegten, Signature Nucleotides an den Positionen 827(U), 828(A), 832:854(G-U), 833:853(U-G) und 844(A) festgestellt, an denen sich laut Zhi *et al.* (2009) die Nukleotide C, U, U-C, G-U und U

befinden. Die Signature Nucleotides für die Familie *Propionibacteraceae* wurden jedoch von Zhi *et al.* (2009) auf Grund eines fehlerhaften Sequenzalignments nicht korrekt bestimmt und werden in einer überarbeiteten Version der Publikation korrigiert (Zhi, pers. com.).

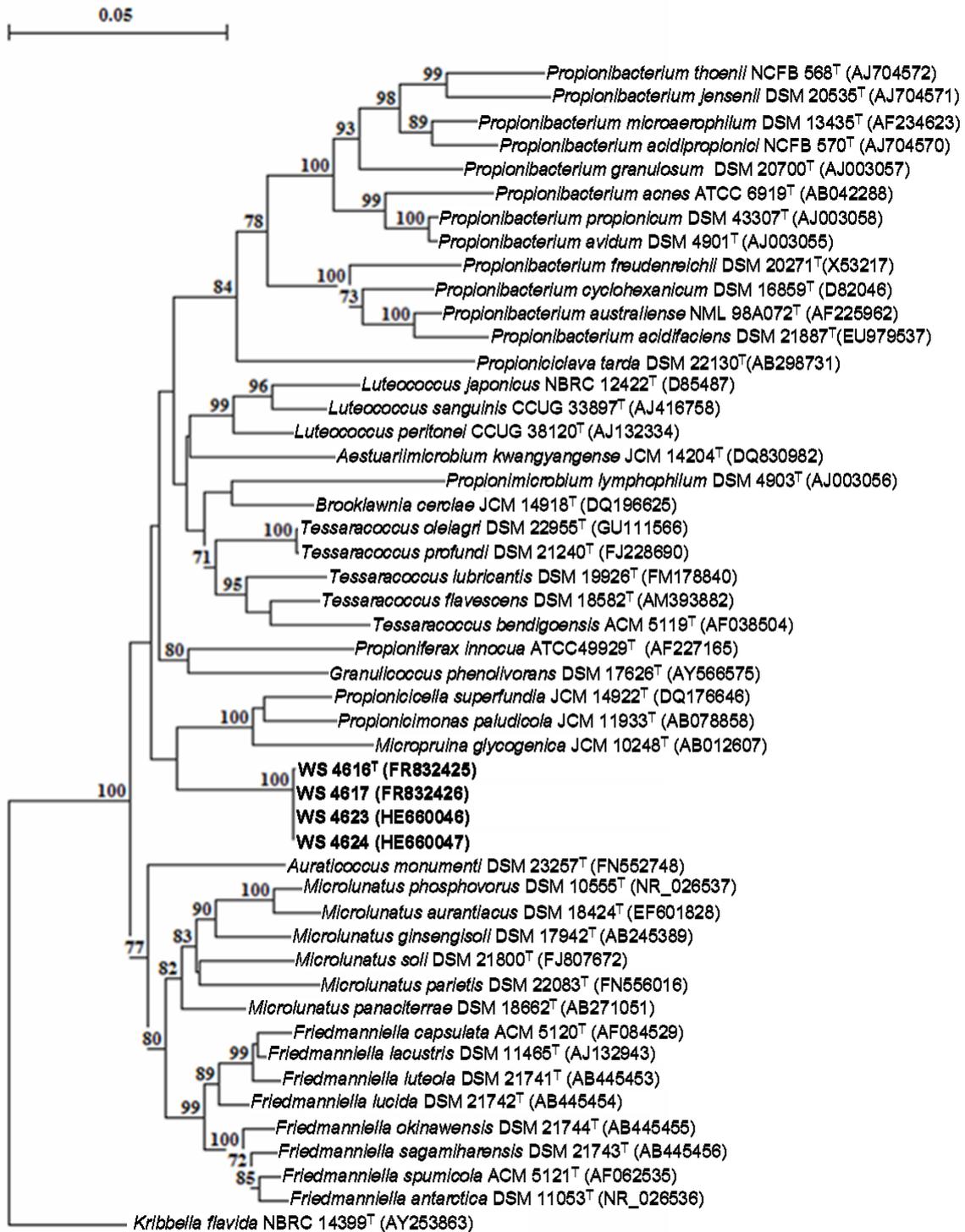


Abbildung 10 Phylogenetischer Baum (berechnet nach der Neighbor-Joining-Methode) basierend auf den 16S rRNA-Gensequenzen der Stämme WS4616^T, WS4617, WS4623, WS4624 und den publizierten 16S rRNA-Gensequenzen nahe verwandter Taxa. Nur Bootstrap-Werte über 70% (500 Wiederholungen) wurden an den Verzweigungspunkten angegeben. Die 16S rRNA-Gensequenz von *Kribbella flavida* NBRC 14399^T (AY253863) wurde als Outgroup verwendet. Die Länge des eingezeichneten Balkens entspricht einem Sequenzunterschied von 5%.

3.2.1.2 *recA*-Gen

In die phylogenetische Analyse, auf Basis der *recA*-Gensequenzen, wurden die Stämme WS4616^T, WS4617, WS4623, WS4624 und die Typspezies der nahe verwandten Gattungen *Propionicimonas*, *Propioniceella*, *Microlunatus* und *Micropruina* einbezogen. Im Vergleich von 815bp ergaben sich identische *recA*-Gensequenzen für die Stämme WS4617, WS4623 und WS4624, deren *recA*-Gensequenz eine Ähnlichkeit von 99,3% (sechs unterschiedliche Nukleotide) zur entsprechenden Sequenz des Stammes WS4616^T aufwies. Im Vergleich der *recA*-Gensequenzen der vier Stämme und der Typstämme nahe verwandter Spezies ergaben sich Sequenzähnlichkeiten von 85,6-85,8% mit *Pm. paludicola*, 83,2-83,4% mit *Pc. superfundia*, 84,2-84,4% mit *Ml. phosphovorus* und 82,9-83,0% mit *Mp. glycogenica*. Der phylogenetische Baum, der auf Basis der *recA*-Gensequenzen der Stämme WS4616^T, WS4617, WS4623, WS4624 und der Typstämme der Spezies *Pm. paludicola*, *Pc. superfundia*, *Ml. phosphovorus* und *Mp. glycogenica* erstellt wurde zeigt, dass die vier neuen Stämme eine eigene, von den nahe verwandten Gattungen abgetrennte Abstammungslinie bilden (Abbildung 11).

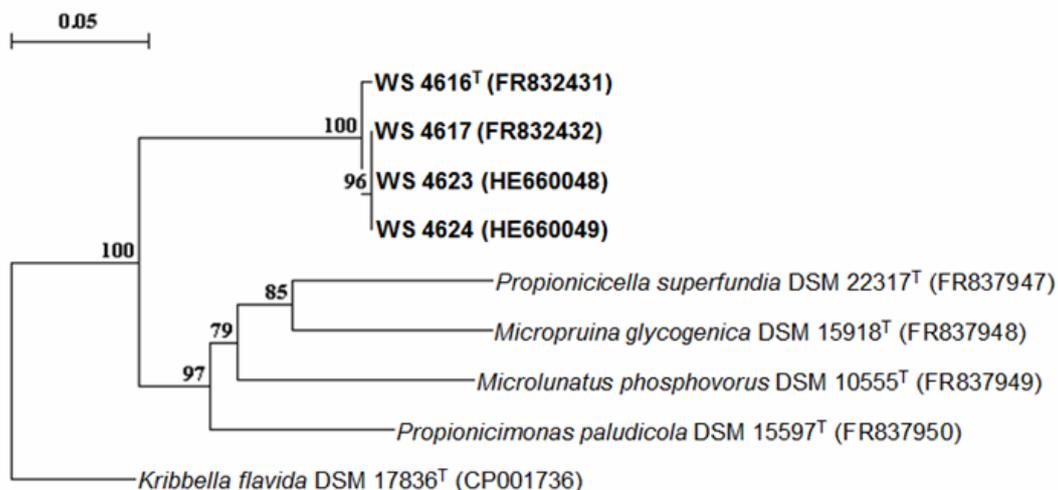


Abbildung 11 Phylogenetischer Baum (berechnet nach der Neighbor-Joining-Methode) basierend auf den *recA*-Gensequenzen der Stämme WS4616^T, WS4617, WS4623, WS4624 und nahe verwandter Taxa. Nur Bootstrap-Werte über 70% (500 Wiederholungen) wurden an den Verzweigungspunkten angegeben. Die *recA*-Gensequenz von *Kribbella flavida* DSM 17836^T (CP001736) wurde als Outgroup verwendet. Die Länge des eingezeichneten Balkens entspricht einem Sequenzunterschied von 5%.

3.2.2 Phänotypische Charakterisierung

Zur genaueren Charakterisierung der Stämme und dem Vergleich mit nahe verwandten Taxa wurden morphologische und physiologische Merkmale der Stämme WS4616^T, WS4617, WS4623, WS4624 und der Typspezies nahe verwandter Gattungen untersucht. Die chemotaxonomischen Charakteristika wurden in dieser Studie für den Stamm WS4616^T und zum Teil auch für nahe verwandte Taxa ermittelt.

3.2.2.1 Chemotaxonomische Charakterisierung

Die Analyse von Zellbestandteilen des Stammes WS4616^T ergab folgende Resultate: Im Peptidoglykan-Totalhydrolysat wurden die Aminosäuren LL-Diaminopimelinsäure (LL-DAP), Alanin, Glycin (Gly) und Glutaminsäure in einem molaren Verhältnis von 1,0 LL-DAP : 1,7 Ala : 0,9 Gly : 0,5 Glu detektiert. Das Partialhydrolysat enthielt zusätzlich die Peptide L-Ala–D-Glu und LL-DAP–D-Ala. Die Peptide Gly–D-Glu und Gly₃ waren nicht im Partialhydrolysat enthalten, wodurch die Peptidoglykantypen A3_γ (LL-DAP-Gly₃) und A3_γ' (LL-DAP-Gly) ausgeschlossen werden konnten. Auf Basis dieser Ergebnisse wurde für den Stamm WS4616^T der Peptidoglykantyp A3_γ (LL-DAP-Gly) nach Schleifer & Kandler (1972) geschlussfolgert. Die dominierende unter den detektierten zellulären Fettsäuren war mit einem Anteil von 77,3% anteiso-C_{15:0}. Die Fettsäuren anteiso-C_{17:0} (7,4%) iso-C_{16:0} (6,8%) und iso-C_{15:0} (5,5%) hatten ebenfalls einen Anteil von über 1% an den insgesamt detektierten Fettsäuren (Tabelle 15). Bei der Untersuchung der vorhandenen polaren Lipide wurden Diphosphatidylglycerol, Phosphatidylglycerol, ein unbekanntes Phospholipid und vier unbekannte Glykolipide gefunden (Abbildung 12).

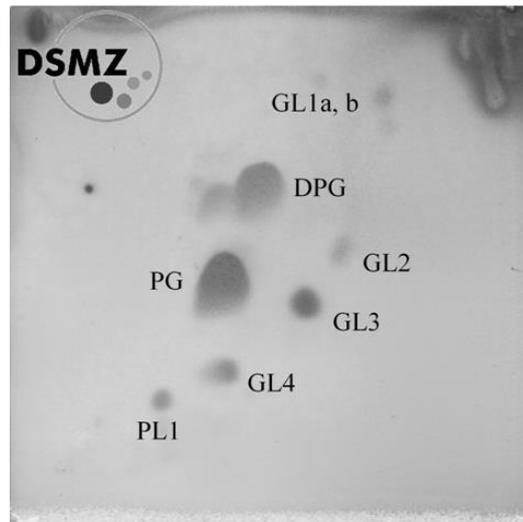


Abbildung 12 Mittels 2-dimensionaler DC aufgetrennte polare Lipide des Stammes WS4616^T. DPG, Diphosphatidylglycerol; PG, Phosphatidylglycerol; PL1, unbekanntes Phospholipid; GL1a, GL1b und GL2-GL4, unbekannte Glykolipide.

Die detektierbaren Menachinone waren MK-9(H₄) (76%) und MK-8(H₄) (24%). Bei der Bestimmung der Ganzzell-Zucker wurden Ribose, Mannose, Arabinose, Glukose and Galaktose als Bestandteile identifiziert. Der ermittelte G+C-Gehalt des Stammes WS4616^T lag bei 67,7mol%.

Um vergleichbare Ergebnisse von, unter gleichen Bedingungen kultivierten, Stämmen zu erhalten, wurden die zellulären Fettsäuren in dieser Studie auch für die Typstämme der Typspezies der nahe verwandten Gattungen *Propionicecella* und *Microlunatus* bestimmt. Die Ergebnisse dieser Analyse wurden zusammen mit den entsprechenden, publizierten Ergebnissen, für die Typstämme der Typspezies der Gattungen *Propionimonas* und *Micropruina* in Tabelle 15 zusammengefasst.

Tabelle 15 Detektierte zelluläre Fettsäuren des Stammes WS4616^T und den Typspezies nahe verwandter Gattungen: 1, Stamm WS4616^T; 2, *Propionicimonas paludicola* DSM 15597^T; 3, *Propionicicella superfundia* DSM 22317^T; 4, *Micropruina glycogenica* DSM 15918^T; 5, *Microlunatus phosphovorius* DSM 10555^T. Die Daten für WS4616^T, *Propionicicella superfundia*, und *Microlunatus phosphovorius* wurden im Rahmen dieser Studie ermittelt. Die angegebenen Werte sind die jeweiligen Anteile an den gesamten zellulären Fettsäuren in Prozent; Die Fettsäuren mit dem größten Anteil wurden fett gedruckt dargestellt. Summed feature 2 enthält C_{12:0} aldehyde und/oder eine unbekannte Fettsäure mit einem ermittelten Wert für die Kettenlänge von 10,928; Summed feature 4 enthält iso-C_{17:1} I und/oder anteiso-C_{17:1} B; - nicht detektiert bzw. keine Daten; tr, Wert unter 1%; Daten von ^aBae *et al.* (2006b), ^b Shintani *et al.*(2000).

Fettsäure	1	2 ^a	3	4 ^b	5
C _{13:0}	-	2,3	1,0	-	-
anteiso-C _{13:0}	-	-	1,0	-	tr
C _{14:0}	-	tr	2,0	3,7	tr
C _{14:0} 2-OH	-	-	2,0	-	-
iso-C _{14:0}	tr	10,4	4,0	14,1	2,8
iso-C _{14:0} 3-OH	-	-	-	-	5,2
C _{15:0}	-	33,6	-	5,9	-
iso-C _{15:0}	5,5	tr	1,0	2,2	32,6
anteiso-C _{15:0}	77,3	41,7	57,1	37,1	45,2
C _{16:0}	-	1,5	1,1	12,9	1,2
iso-C _{16:0}	6,8	5,5	6,7	10,8	6,2
C _{17:0}	tr	4,5	tr	-	-
iso-C _{17:0}	1,3	-	-	-	4,1
anteiso-C _{17:0}	7,4	tr	4,7	-	tr
C _{18:0}	-	-	-	4,6	-
Summed feature 2	-	-	14,4	-	-
Summed feature 4	-	-	2,5	-	tr

3.2.2.2 Morphologische und Physiologische Charakterisierung

Die Zellen der Stämme WS4616^T, WS4617, WS4623 und WS4624 sind Gram-positive, unbewegliche, nicht-sporenbildende, aerobe Kokken mit einem Durchmesser von 1,0-1,3 µm. Die vier Stämme bilden auf TSA hellgelbe, runde Kolonien mit glatter Oberfläche, die nach vier Tagen bei 30°C einen Durchmesser von ungefähr 1mm erreichen.

Für die Stämme WS4617, WS4623 und WS4624 war das Wachstum bei Temperaturen von 15-40°C, für den Stamm WS4616^T hingegen nur von 15-37°C möglich. Alle vier Stämme zeigten Wachstum bei pH-Werten von pH 6-8 und NaCl-Konzentrationen von 0-10% (w/v). Die Zellen aller vier Stämme

zeigten Oxidase-, Katalase- und β -Galaktosidase-Aktivität und waren zur Hydrolyse von Stärke fähig. Es konnte jedoch weder eine Aktivität von Arginindihydrolase noch die Fähigkeit zur Reduktion von Nitrat, der Produktion von Indol oder der Hydrolyse von Casein und Gelatine festgestellt werden. Die Hydrolyse von Aesculin konnte nur beim Stamm WS4617 und nur in schwacher Ausprägung festgestellt werden. Ureaseaktivität wurde nur bei den Stämmen WS4616^T und WS4617 beobachtet. Als einzige Kohlenstoffquelle konnten D-Arabinose, D-Fruktose, D-Galaktose, D-Glukose, D-Maltose, D-Mannose, D-Mannitol, D-Ribose, D-Saccharose, D-Trehalose, D-Turanose, Adonitol, D-Arabitol, Erythritol, Glycerol und D-Sorbitol aber nicht Adipat, Phenylacetat, Caprat, Citrat, Malat, L-Arabinose, D-Cellobiose, Gentiobiose, D-Melibiose, D-Melezitose, D-Raffinose, D-Xylose, Methyl- α D-Glukopyranosid, Methyl- α D-Mannopyranosid, Glykogen, Inositol, Dulcitol, Salicin und Amygdalin genutzt werden. Die Fähigkeit zur Verwertung von N-Acetylglukosamin, D-Laktose und L-Rhamnose konnte nur bei den Stämmen WS4617, WS4623 und WS4624 nachgewiesen werden. Die Verwertung von D-Lyxose war hingegen nur durch den Stamm WS4616^T möglich. In dieser Studie ermittelte physiologische Merkmale von Typspezies, nahe verwandter Gattungen der Stämme WS4616^T, WS4617, WS4623 und WS4624, wurden in Tabelle 17 angeführt.

IV. DISKUSSION

1 FTIR-Spektroskopie als Identifizierungsmethode bakterieller Isolate aus pharmazeutischen Reinräumen

1.1 Detektierte Biodiversität in pharmazeutischen Reinräumen

Aus der Luft und von Oberflächen pharmazeutischer Reinräume werden hauptsächlich Gram-positive Kokken und sporenbildende Bakterien isoliert. Bei den Isolaten aus der Gruppe der Gram-positiven Kokken handelt es sich dabei am häufigsten um Spezies der normalen menschlichen Hautflora, die über das Personal in die Reinräume gelangen (Lowery & Mueller 2010). Sporenbildende Bakterien dringen meist in Verbindung mit Staubpartikeln in die Reinräume ein, wobei ihr Anteil an der gesamten mikrobiellen Kontamination mit abnehmendem Reinheitsgrad der Reinräume steigt (Jimenez 2007).

In der vorliegenden Arbeit konnten die identifizierten Gram-positiven Kokken zu 99,4% als Spezies der Gattungen *Micrococcus*, *Staphylococcus* und *Kocuria* identifiziert werden. Vertreter dieser Gattungen sind als häufige Hautkeime bekannt (Costello *et al.* 2009, Edmond *et al.* 2005, Kloos, *et al.* 1974, Roth & James 1988). Insgesamt 43,5% der Stämme wurden als *S. epidermidis* (21,8%) oder *S. hominis* (21,8%) identifiziert, die von Roth & James (1988) als die häufigsten bakteriellen Spezies auf der menschlichen Haut beschrieben wurden. Nur Spezies der Gattung *Brachybacterium*, die unter den Reinraumisolaten durch einen Stamm vertreten war, wurden bislang häufiger aus anderen Quellen, wie Milchprodukten und verschiedenen Umweltproben, isoliert (Chou *et al.* 2007, Heyrman *et al.* 2002, Schubert *et al.* 1996). Die Ergebnisse lassen daher vermuten, dass die menschliche Haut die Hauptquelle der isolierten Gram-positiven Kokken darstellt. In der Gruppe der Gram-positiven Kokken wurden nur vier Gattungen detektiert, wobei 70,6% der identifizierten Stämme den drei Spezies *M. luteus* (27,1%), *S. epidermidis* (21,8%) und *S. hominis* (21,8%) zugeordnet werden konnten.

Sporenbildende Bakterien sind widerstandsfähige und ubiquitär in der Umwelt vorhandene Mikroorganismen, die häufig aus Boden- und Luftproben isoliert werden (Jimenez 2007, McSpadden Gardener 2004, Nicholson 2002). In dieser Gruppe konnten im Vergleich zu den Gram-positiven Kokken keine stark dominierenden Spezies ermittelt werden. Die identifizierten Stämme verteilten sich hier auf nur drei Gattungen. Die, für diese Studie verwendeten, Stämme wurden im Rahmen eines laufenden Umgebungsmonitoring aus Bereichen unterschiedlicher Reinheitsstufen isoliert, wobei vor der Auswahl der Gram-positiven Kokken und sporenbildenden Bakterien eine Vorselektion der Isolate auf Basis der Koloniemorphologie durchgeführt wurde (II-1.6). Dieser Vorgang wird routinemäßig im Umgebungsmonitoring durchgeführt, um die dominanten Gruppen der vorhandenen Mikroorganismen zu ermitteln. Da viele verschiedene Spezies bzw. auch Gattungen eine ähnliche Koloniemorphologie aufweisen, kann eine Biodiversitätsstudie auf Basis der so ausgewählten Isolate nur eingeschränkt durchgeführt werden. Da auch die Isolate für die Erweiterung der Datenbanken auf diese Weise vorausgewählt wurden ist es wahrscheinlich, dass seltener vorkommende Spezies nicht erfasst wurden. Bei der externen Validierung durch Praxisisolate waren bis auf drei Spezies, die erst kurz vor (*S. devriesei*, *M. terreus*) bzw. erst nach Durchführung dieser Arbeit (*B. kochii*) beschrieben wurden, alle durch die Referenzmethode identifizierten Spezies in den Datenbanken enthalten. Trotz der Einschränkungen durch diese Vorauswahl konnte sowohl im Zuge der Datenbankerweiterung als auch im Rahmen der Validierung durch Praxisisolate je eine *Bacillus*-Spezies mit > 3% 16S rRNA-Gensequenzunterschied zur ähnlichsten, zum Zeitpunkt der Durchführung dieser Arbeit valide beschriebenen, Spezies gefunden werden. Anhand dieser Stämme konnten in weiterer Folge zwei neue Spezies, *B. kochii* (Seiler, et al. 2012a) und *B. gottheilii* (Seiler et al. 2012b), beschrieben werden. Wie in der vorliegenden Arbeit, wurde *Staphylococcus* auch in anderen Studien, die die bakterielle Biodiversität in unterschiedlichen Reinräumen untersucht haben, als am häufigsten in diesen Umgebungen vorkommende Gattung beschrieben (Favero et al. 1966, Moissl et al. 2007b, Riedel et al. 1996).

Die bakterielle Biodiversität in pharmazeutischen Reinräumen wurde in einer Studie von Riedel *et al.* (1996) auf Gattungsebene untersucht. Die größten Gruppen unter den Isolaten in dieser Studie bildeten die Gattungen *Staphylococcus* mit einem Anteil von 72% und *Micrococcus* mit einem Anteil von 9%. Nur 2,8% der Isolate wurden den Sporenbildnern (*Bacillus* spp.) zugeordnet. Die von Riedel *et al.* (1996) verwendeten Isolate stammen aus zwei Reinräumen höherer Reinheitsstufe, die Isolate der vorliegenden Arbeit hingegen stammen auch aus Räumen niedrigerer Reinheitsstufe wodurch im Vergleich zur Studie von Riedel *et al.* (1996) in dieser Arbeit auch ein höherer Anteil an sporenbildenden Bakterien zu erwarten war.

Die Gesamtheit der identifizierten Stämme wies eine Biodiversität auf, die charakteristisch für Proben aus dem Umgebungsmonitoring pharmazeutischer Reinräume ist und ist daher gut für die Verwendung zur externen Validierung der FTIR-Referenzdatenbanken geeignet.

1.2 Validierung der FTIR-Referenzdatenbanken durch die Leave-One-Out- Methode

Um eine externe Validierung durchführen zu können, bei der alle Spezies einer Datenbank berücksichtigt werden, würde man von jeder in der Datenbank enthaltenen Spezies mindestens einen Bakterienstamm benötigen, der noch nicht von einem Spektrum in der Datenbank repräsentiert wird. Eine Alternative dazu ist die Durchführung einer Validierung nach der Leave-One-Out-Methode, bei der jeweils die Spektren eines Stammes einer Spezies aus der Datenbank entfernt werden um sie anschließend mit Hilfe der verbleibenden Spektren der Datenbank zu identifizieren. Dieser Vorgang imitiert eine externe Validierung, bei der jedoch nur Spezies berücksichtigt werden können, die durch mehr als einen Stamm in der Datenbank vertreten sind.

Die Validierung der beiden Datenbanken zeigte eine tendenziell steigende Rate an korrekten Identifizierungen innerhalb einer Spezies mit zunehmender Anzahl an, in der Datenbank vertretenen, Stämmen der entsprechenden Spezies. Die Gesamtergebnisse der Validierung der beiden Datenbanken wiesen im

Vergleich zur externen Validierung mit Praxisisolaten (III-1.3) einen relativ geringen Anteil an korrekt identifizierten Spektren auf. Bei der Validierung der Datenbank für Gram-positive nicht-sporenbildende Bakterien zeigte sich auch bei Spezies, die von überdurchschnittlich (> 9 Stämme) vielen Stämmen in der Datenbank vertreten waren, durchschnittliche Raten an korrekt identifizierten Spektren pro Spezies unter 50%. Bei der Bewertung der Ergebnisse einer derartigen Validierung muss jedoch berücksichtigt werden, dass das Ergebnis durch mehrere Faktoren negativ beeinflusst werden kann. Zum einen werden auch selten isolierte Spezies, von denen nur wenige Stämme zur Verfügung stehen, in die Referenzdatenbanken aufgenommen um die Spezies-Diversität in den Datenbanken zu erhöhen. Dadurch stehen zur Identifizierung von Stämmen dieser Spezies nur Referenzspektren weniger Stämme zur Verfügung. Zudem wird immer ein Stamm aus der Datenbank entfernt wodurch die Leistungsfähigkeit der FTIR-Spektroskopie insgesamt eingeschränkt wird. Zum anderen werden im Rahmen des Datenbankaufbaues für alle Spezies, Spektren von möglichst vielen Stämmen mit unterschiedlichen phänotypischen Ausprägungen in die Datenbanken aufgenommen, um intraspezifische Unterschiede bestmöglich zu erfassen. Dies schließt auch Stämme mit Spezies-untypischen Ausprägungen mit ein. Diese Maßnahmen erhöhen die Wahrscheinlichkeit einer korrekten Identifizierung unbekannter Stämme bestimmter Spezies, können allerdings bei der Leave-One-Out-Methode dazu führen, dass Spektren der Referenzdatenbank nicht identifiziert werden können, da sie sich von den Spektren anderer Stämme dieser Spezies zu stark unterscheiden. Dies kann auch den Anteil an korrekt identifizierten Stämmen innerhalb von Spezies vermindern, die von Spektren von vergleichsweise vielen Stämmen in den Datenbanken vertreten sind. Der insgesamt Anteil an korrekten Identifizierungsergebnissen ist bei dieser Methode daher meist geringer, als bei einer vergleichbar umfangreichen externen Validierung.

1.3 Externe Validierung der FTIR-Spektroskopie mittels

Praxisisolaten

Durch die externe Validierung sollte die Zuverlässigkeit der erweiterten FTIR-Referenzdatenbanken bei der Identifizierung von Gram-positiven Kokken und sporenbildenden Bakterien aus dem pharmazeutischen Produktionsumfeld unter realistischen Bedingungen überprüft werden. Dazu wurden 240 Bakterienstämme, die aus dem laufenden mikrobiologischen Umgebungsmonitoring eines pharmazeutischen Produktionsstandortes isoliert wurden, mittels FTIR-Spektroskopie und der Referenzmethode identifiziert.

Um die Treffsicherheit der FTIR-Spektroskopie bei der Identifizierung dieser Stämme mit einer, in der pharmazeutischen Industrie häufig verwendeten, Methode zur Identifizierung von Mikroorganismen zu vergleichen, wurden die selben Stämme auch durch Verwendung des API-Systems identifiziert. Für beide phänotypischen Methoden wurden die Sensitivität, die Spezifität und der PPV für die Identifizierung der detektierten Spezies ermittelt. Die Sensitivität steht dabei für den Anteil an richtig identifizierten Stämmen einer Spezies, die Spezifität und der PPV geben Auskunft über die Zuverlässigkeit eines Identifizierungsergebnisses innerhalb der untersuchten Biodiversität.

Die Sensitivität gibt den Anteil an Isolaten einer bestimmten Spezies (durch Sequenzanalyse bestimmt) an der auch durch die phänotypische Methode dieser Spezies zugeordnet werden konnte. Der PPV gibt den Anteil an Isolaten einer bestimmten Spezies (durch die phänotypische Methode bestimmt) an der auch durch die Sequenzanalyse dieser Spezies zugeordnet wurde. Ein PPV von 50% würde also bedeuten, dass nur die Hälfte der Isolate die durch die phänotypische Methode als z.B. *S. epidermidis* identifiziert wurden auch durch die Sequenzanalyse als *S. epidermidis* bestätigt wurden. Die Spezifität gibt an wie häufig innerhalb der Isolate eine Spezies fälschlicherweise das Identifizierungsergebnis einer phänotypischen Methode war (Anteil falsch positiver Ergebnisse). Sie gibt also den Anteil an den, durch die Sequenzanalyse z.B. als eine andere Spezies als *S. epidermidis* identifizierten, Isolaten an die auch durch die phänotypische Methode als eine andere Spezies als *S. epidermidis* identifiziert wurden. Eine Spezifität einer phänotypischen

Methode von 100% für die Spezies *S. epidermidis* würde also bedeuten, dass kein Isolat, das durch die Sequenzanalyse als eine andere Spezies als *S. epidermidis* identifiziert wurde durch die phänotypische Methode als *S. epidermidis* identifiziert wurde.

1.3.1 Identifizierung der Reinraumisolate durch FTIR-Spektroskopie

Die Grundlage der Identifizierung von Mikroorganismen durch die FTIR-Spektroskopie bilden die Referenzdatenbanken. Nur Spezies, die in den Datenbanken enthalten sind können mit Hilfe dieser Methode identifiziert werden. In der Gruppe der sporenbildenden Bakterien konnten durch die Referenzmethode 13 Spezies identifiziert werden, wovon 12 (92,3%) in der entsprechenden FTIR-Datenbank enthalten waren. Zudem war bereits ein Stamm enthalten der eine identische 16S rRNA-Gensequenz zur isolierten, zum Zeitpunkt der Durchführung dieser Arbeit noch nicht beschriebenen neuen Spezies (*B. kochii*) aufwies. Unter den Gram-positiven Kokken waren 15 (88,2%) der 17 Spezies, die durch die Referenzmethode identifiziert wurden, in der entsprechenden FTIR-Datenbank enthalten. Nur die erst kürzlich beschriebenen Spezies *S. devriesei* (Supre *et al.* 2010) und *M. terreus* (Zhang, *et al.* 2010) waren noch nicht in der Datenbank vertreten. Die Datenbanken enthielten somit bereits einen Großteil der detektierten Spezies beider Gruppen. Da die FTIR-Referenzdatenbanken ständig erweiterbar sind, ist es zudem möglich, die bisher noch nicht in den Datenbanken enthaltenen Spezies aufzunehmen, um die Methode weiter an die Biodiversität der beprobten Umgebung anzupassen.

Von 170 Stämmen Gram-positiver Kokken konnten durch die Verwendung der FTIR-Spektroskopie 135 (79,4%) korrekt auf Speziesebene identifiziert werden. Insgesamt wurden 11 Stämme (6,5%) falsch identifiziert und 24 Stämme (14,1%) konnten nicht identifiziert werden. Schwierigkeiten bei der Identifizierung von Gram-positiven Kokken zeigten sich hauptsächlich bei Stämmen der Spezies der *S. epidermidis*-Gruppe und waren auf Grund der hohen phänotypischen Ähnlichkeit dieser Spezies vorwiegend auf die schwierige Unterscheidung der Spezies innerhalb dieser Gruppe zurückzuführen (Takahashi *et al.* 1999). Unter den Gram-positiven Kokken

waren insgesamt 83,3% der falsch identifizierten und 82,6% der nicht identifizierten Stämme Vertreter dieser Gruppe. Obwohl die Spezies der *S. epidermidis*-Gruppe nur schwer auf Spezieslevel zu trennen waren war in den meisten Fällen eine korrekte Zuordnung zur *S. epidermidis*-Gruppe möglich. Bei einer Datenauswertung für die Spezies der *S. epidermidis*-Gruppe auf Gruppenlevel (wie sie in der Gruppe der sporenbildenden Bakterien zur Identifizierung der *B. cereus*- und *B. subtilis*-Gruppe angewandt wurde) konnten 100% der auf Spezieslevel nicht identifizierbaren und 78,9% der auf Spezieslevel falsch identifizierten Stämme der *S. epidermidis*-Gruppe korrekt identifiziert werden.

Um die Identifizierungsleistung der FTIR-Spektroskopie in der Gruppe der Gram-positiven Kokken weiter zu verbessern, muss daher eine bessere Differenzierbarkeit der Spezies der *S. epidermidis*-Gruppe erzielt werden. Dies könnte durch die Verwendung der FTIR-Spektroskopie in Verbindung mit einem künstlichen neuronalen Netzwerk (KNN) erreicht werden. Durch den Einsatz dieser selbstlernenden Systeme steht eine mathematische Datenauswertung zur Verfügung, die eine Unterscheidung auch von sehr ähnlichen Spektren ermöglichen kann, wie es bereits erfolgreich in früheren Studien für unterschiedliche Taxa gezeigt werden konnte (Büchl, *et al.* 2008, Rebuffo-Scheer *et al.* 2007, Rebuffo *et al.* 2006).

Die detektierten, in der Datenbank enthaltenen, Spezies der Gram-positiven nicht-sporenbildenden Bakterien, waren durchschnittlich mit 25 Stämmen in der Datenbank vertreten. Neben *S. warneri* (*S. epidermidis*-Gruppe) zeigte die FTIR-Spektroskopie die niedrigste Sensitivität für die Spezies *S. pettenkoferi*, die nur durch drei Stämme und damit, unter den detektierten Spezies dieser Gruppe, durch die geringste Anzahl an Stämmen in der Datenbank repräsentiert wurde. Oberreuter *et al.* (2002) kamen bei der Identifizierung von Coryneformen Bakterien und dazu verwandten Taxa durch FTIR-Spektroskopie zum Ergebnis, dass eine Spezies in der Datenbank mit 5 bis 10 Stämmen vertreten sein sollte um eine hinreichende Identifizierbarkeit der Spezies zu gewährleisten. Eine verbesserte Identifizierbarkeit von *S. pettenkoferi*-Stämmen ist daher vermutlich auch durch die Aufnahme von Spektren weiterer Stämme

dieser Spezies in die Datenbank möglich. Insgesamt wurden die Gram-positiven Kokken mit hoher Spezifität und hohem PPV identifiziert, wodurch bei der gegebenen Biodiversität eine hohe Zuverlässigkeit der FTIR-Spektroskopie bei der Zuordnung eines unbekanntes Stammes zu einer der detektierten Spezies gezeigt werden konnte.

Mittels FTIR-Spektroskopie konnten 84,3% der Isolate korrekt auf Speziesebene identifiziert werden. Acht Stämme (11,4%) wurden falsch identifiziert und zwei Stämme (2,8%) konnten nicht identifiziert werden. Schwierigkeiten bei der Identifizierung von sporenbildenden Bakterien durch die FTIR-Spektroskopie ergaben sich für die Spezies *P. lautus* und *T. goriensis*, die beide mit einer Sensitivität von 0% identifiziert wurden. Hier ist wie bei den Gram-positiven Kokken ebenfalls der Zusammenhang zwischen geringster Sensitivität und einer niedrigen Anzahl an Stämmen dieser Spezies in den Datenbanken zu beobachten. Die in den Datenbanken enthaltenen Spezies waren von den Spektren von durchschnittlich 26 Stämmen in der Datenbank vertreten. Von den Spezies *T. goriensis* und *P. lautus* waren hingegen nur Spektren von einem bzw. vier Stämmen in der Datenbank enthalten. Unter den berechneten Werten für PPV und Spezifität ergab der PPV für *B. pumilus* (69,2%) den geringsten Wert. Alle neun, in der Probe enthaltenen, Stämme dieser Spezies wurden korrekt identifiziert, jedoch wurden auch vier weitere Stämme der Spezies *B. megaterium*, *T. goriensis* und der *B. subtilis*-Gruppe falsch als *B. pumilus* identifiziert. Hier könnte es sich möglicherweise um untypische Vertreter dieser Spezies mit hoher phänotypischer Ähnlichkeit zu *B. pumilus* handeln.

Im Allgemeinen zeigte sich, mit Ausnahme weniger Spezies, eine gute Identifizierbarkeit für die Gram-positiven Kokken und sporenbildenden Bakterien aus pharmazeutischem Produktionsumfeld. Eine weitere Verbesserung der allgemeinen Identifizierungsleistung der FTIR-Spektroskopie könnte durch die Verwendung von KNN's für die Identifizierung der Spezies der *S. epidermidis*-Gruppe und die zusätzliche Aufnahme von Spektren unterschiedlicher Stämme erreicht werden, deren Spezies in dieser Studie nur durch wenige Stämme oder nur durch Stämme aus anderen Habitaten in den Datenbanken vertreten waren.

Bereits 1996 wurde von Riedel *et al.* (1996) eine Studie zur Identifizierung von Bakterien aus dem pharmazeutischen Umfeld mittels FTIR Spektroskopie publiziert. Dabei wurden 338 Stämme durch diese Methode identifiziert und das Ergebnis mit dem Identifizierungsergebnis konventioneller Methoden (klassische mikrobiologische Methoden in Verbindung mit API-Testsystemen) verglichen. Es wurde in dieser Studie nur eine Identifizierung der Isolate auf Gattungsebene durchgeführt. Im Vergleich mit den konventionellen Methoden ergaben sich bei den spektroskopisch untersuchten Isolaten übereinstimmende Differenzierungsergebnisse auf Gattungsebene in 95,9% der Fälle. In der vorliegenden Arbeit wurden 98,3% der Isolate (98,2% Kokken, 98,6% Bazillen) korrekt auf Gattungsebene identifiziert. Hier wurde als Referenzmethode jedoch die Sequenzanalyse herangezogen.

Die größten Gruppen unter den Isolaten in der Studie von Riedel *et al.* (1996) bildeten die Gattungen *Staphylococcus* mit einem Anteil von 72% und *Micrococcus* mit einem Anteil von 9%. Nur 2,8% der Isolate wurden den Sporenbildnern (*Bacillus* spp.) zugeordnet. In der vorliegenden Arbeit lag der Anteil an Sporenbildnern bei 29,2%. Wie bereits unter Punkt IV-1.1 beschrieben steigt der Anteil an Sporenbildnern an der gesamten mikrobiellen Kontamination mit abnehmendem Reinheitsgrad der Reinräume (Jimenez 2007). Die von Riedel *et al.* (1996) verwendeten Isolate stammen aus zwei Reinräumen höherer Reinheitsstufe, die Isolate der vorliegenden Arbeit hingegen stammen auch aus Räumen niedrigerer Reinheitsstufe wodurch im Vergleich zur Studie von Riedel *et al.* (1996) in dieser Arbeit auch ein höherer Anteil an sporenbildenden Bakterien zu erwarten war.

In der Arbeit von Riedel *et al.* (1996) wurden die Identifizierungsergebnisse der FTIR Spektroskopie mit den Ergebnissen konventioneller Methoden verglichen. In der aktuellen Studie stimmte das Identifizierungsergebnis der API-Systeme auf Gattungsebene nur bei 60,6% der Gram positiven Kokken und 75,7% der Sporenbildner mit dem Ergebnis der Sequenzanalyse überein. Eine Sequenzanalyse wurde in der Studie von Riedel *et al.* (1996) nicht durchgeführt. Die Ergebnisse der beiden Studien sind daher nur bedingt miteinander vergleichbar.

1.3.2 Identifizierung der Reinraumisolate durch das API-System

Das API-System ist ein Identifizierungssystem für Mikroorganismen, das in der pharmazeutischen Industrie häufig, im Rahmen des Umgebungsmonitoring zur Identifizierung von bakteriellen Isolaten eingesetzt wird. Dieses Identifizierungssystem beruht auf mehreren physiologischen Tests, die zur Erstellung eines biochemischen Profils herangezogen werden. Zur Identifizierung der Mikroorganismen anhand dieser Profile ist, wie auch bei der FTIR-Spektroskopie, der Vergleich mit Referenzen in einer Datenbank notwendig. Auch für das API-System gilt also, dass Stämme nur dann korrekt identifiziert werden können, wenn die entsprechende Spezies in der Datenbank enthalten ist. Obwohl die detektierte Spezies-Diversität durch die Vorselektion (II-1.6) der Isolate bereits eingeschränkt wurde, fehlten in der API-Datenbank insgesamt 12 der 30 durch die Referenzmethode identifizierbaren Spezies, wodurch bereits die korrekte Identifizierung von 11,3% der Stämme auf Speziesebene unmöglich war. Die Datenbanken des API-Systems, aber auch von anderen, nach ähnlichem Prinzip arbeitenden, phänotypischen Identifizierungsmethoden, wurden für die Identifizierung klinischer Isolate entwickelt und enthalten meist nur die wichtigsten, in diesem Umfeld vorkommenden, Spezies. Zudem können diese Systeme, durch die immer schneller ansteigende Zahl an jährlich neu beschriebenen Spezies, nur schwer auf einem aktuellen Stand gehalten werden (Christensen *et al.* 2001). Abgesehen davon, können in den Datenbanken meist nur ein oder wenige Stämme einer Spezies berücksichtigt werden wodurch intraspezifische Unterschiede nicht oder nur in geringem Ausmaß erfasst werden können (Zadoks & Watts 2009).

Durch die kombinierte Anwendung der API 50 CHB und API 20 NE Identifizierungssysteme konnten 52,9% der Isolate korrekt auf Speziesebene identifiziert werden. Insgesamt wurden 22 Stämme (31,4%) falsch identifiziert und 10 Stämme (14,3%) konnten nicht identifiziert werden. Unter den isolierten sporenbildenden Bakterien konnte nur die *B. subtilis*-Gruppe mit einer Sensitivität von 100% identifiziert werden. Die zweithöchste Sensitivität wurde mit 78,6% für die *B. cereus*-Gruppe erreicht. Die hohe Treffsicherheit des API-

Systems bei der Identifizierung dieser beiden Gruppen ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass in diesen Fällen nahe verwandte, phänotypisch ähnliche Spezies, für die Auswertung auf Gruppen-Level zusammengefasst wurden. Die Spezifität und der PPV lagen mit Ausnahme von *P. lautus* (0%) bei allen detektierten sporenbildenden Spezies bei 100%, da 21 der 22 falsch identifizierten Stämme einer Spezies zugeordnet wurden die nicht unter den Isolaten vertreten waren. Mit der geringsten Sensitivität (0%) wurden die Spezies *B. circulans* und *P. lautus* identifiziert. Zwei der acht *B. circulans*-Stämme konnten nicht identifiziert werden und sechs Stämme wurden als *B. lentus* falsch identifiziert. Die beiden Stämme der Spezies *P. lautus* wurden beide als *P. polymyxa* falsch identifiziert. Möglicherweise handelt es sich bei den isolierten Stämmen der Spezies *B. circulans* und *P. lautus* um Stämme mit untypischer phänotypischer Ausprägung deren biochemisches Profil dadurch am ähnlichsten zu den Spezies *B. lentus* bzw. *P. polymyxa* ist.

Von den Gram-positiven Kokken konnte ebenfalls nur eine Spezies mit einer Sensitivität von 100% identifiziert werden. Hierbei handelt es sich um *S. aureus*, die einzige detektierte Koagulase-positive Spezies der Gattung *Staphylococcus*. Die fehlerfreie Identifizierung von *S. aureus* kann zwar nicht auf die Koagulaseproduktion zurückgeführt werden, da diese im ID 32 STAPH Teststreifen nicht überprüft wird, die Spezies *S. aureus* ist jedoch mit vier Stämmen, unter allen detektierten Spezies, durch die meisten Stämme in der API-Datenbank vertreten. Die Abdeckung mehrerer unterschiedlicher Ausprägungsformen durch die Datenbank führte möglicherweise zur guten Identifizierbarkeit dieser Spezies durch das API-System. Zudem ist *S. aureus* phylogenetisch deutlich von den übrigen *Staphylococcus*-Spezies abgegrenzt (Takahashi, *et al.* 1999). Möglicherweise unterscheidet sich das Substratverwertungs-Profil dieser Spezies so von den übrigen Spezies dieser Gattung dass die Verwechslungsgefahr mit einer anderen Spezies geringer ist als bei anderen Spezies dieser Gattung. Die geringste Sensitivität zeigte das API-System für die Identifizierung von *S. hominis*-Stämmen (13,5%). Dieses Ergebnis steht im Einklang mit den, bereits von Ieven *et al.* (1995) und Sampimon *et al.* (2009) beschriebenen Schwierigkeiten bei der Identifizierung

dieser Spezies durch das ID 32 STAPH-Kit. Der Großteil der isolierten Gram-positiven Kokken (62,9%) lies sich durch die Referenzmethode der Gruppe der Koagulase-negativen Staphylococcen (KNS) zuordnen. In dieser Gruppe konnten nur 38,3% der Stämme korrekt durch das API-System identifiziert werden. Ähnlich niedrige Anteile an korrekt identifizierten KNS durch das ID 32 STAPH und das API STAPH Identifizierungssystem ergaben jedoch auch frühere Studien zur identifizierbarkeit von *Staphylococcus*-Stämmen, die aus dem klinischen Bereich und von Rindern isoliert wurden (Alexopoulou *et al.* 2006, Langlois *et al.* 1983, Sampimon, *et al.* 2009). Insgesamt wurden die Reinraumisolate mit sehr geringer Treffsicherheit richtig identifiziert. Zudem führt der hohe Anteil an falsch identifizierten Stämmen zu einer verzerrten Abbildung der vorhandenen mikrobiellen Biodiversität. Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten daher darauf hin, dass das API-System nur bedingt zur Identifizierung von Gram-positiven Kokken und sporenbildenden Bakterien aus dem mikrobiologischen Umgebungsmonitoring pharmazeutischer Betriebe geeignet ist.

1.3.3 Vergleich der phänotypischen Identifizierungsmethoden

Da der gleiche Satz an Bakterienstämmen durch die FTIR-Spektroskopie und das API-System identifiziert wurde, kann die Zuverlässigkeit der Methoden, bei der Identifizierung Gram-positiver Kokken und sporenbildender Bakterien aus pharmazeutischen Reinräumen direkt verglichen werden.

Beide Methoden beruhen auf der Untersuchung phänotypischer Ausprägungen und nutzen die gewonnenen Daten anschließend zur Identifizierung der Bakterienstämme mit Hilfe von Referenzdatenbanken. Hier zeigte sich im Vergleich zum API-System, eine deutlich bessere Anpassung der FTIR-Datenbanken an die detektierte Spezies-Diversität der beprobten Umgebung, wodurch eine exaktere Abbildung der vorhandenen mikrobiellen Biodiversität durch die FTIR-Spektroskopie möglich wurde. Darüber hinaus können die FTIR-Datenbanken kontinuierlich durch die Spektren von Bakterienstämmen erweitert werden, die entweder eine untypische phänotypische Ausprägung einer bereits in den Datenbanken enthaltenen Spezies aufweisen oder einer noch nicht in den Datenbanken enthaltenen Spezies angehören, wodurch eine weitere

Anpassung der FTIR-Spektroskopie an die mikrobielle Biodiversität pharmazeutischer Reinträume stattfinden kann. Von den insgesamt 30, durch die Referenzmethode identifizierbaren Spezies, waren 18 in der API-Datenbank und 27 in den FTIR-Datenbanken enthalten. Berücksichtigt man nur die 18 Spezies, die in den Datenbanken beider Identifizierungsmethoden vertreten waren, zeigt sich für die Gram-positiven Kokken und die sporenbildenden Bakterien eine höhere Sensitivität der FTIR-Spektroskopie für 80,0% bzw. 62,5% der Spezies und die gleiche Sensitivität für 10,0% bzw. 25,0% der Spezies im Vergleich zum API-System. Das API-System zeigte nur für die Spezies *S. warneri* und die *B. subtilis*-Gruppe höhere Sensitivität als die FTIR-Spektroskopie. In praktischen Anwendungen der beiden Methoden können nicht identifizierbare Stämme durch den Einsatz zusätzlicher Methoden, wie z.B. der Gensequenzanalyse, identifiziert werden. Falsch identifizierte Stämme hingegen können nicht als solche erkannt werden und führen dadurch zu einer verzerrten Abbildung der vorhandenen Biodiversität. Der Anteil an falsch identifizierten Stämmen sollte daher sowohl insgesamt als auch unter den nicht korrekt identifizierten Stämmen möglichst gering sein. Im Vergleich der 18, in den Datenbanken beider Methoden vertretenen, Spezies war die Anzahl an falsch identifizierten Stämmen durch das API-System für die Gram-positiven Kokken um das 6,7-fache und für die sporenbildenden Bakterien um das 3,6-fache höher als bei der Identifizierung durch die FTIR-Spektroskopie. Der Anteil der falsch identifizierten Stämme an den insgesamt nicht korrekt identifizierten Stämmen dieser 18 Spezies, war bei der Identifizierung durch das API-System im Vergleich zur FTIR-Spektroskopie in der Gruppe der sporenbildenden Bakterien gleich und unter den Gram-positiven Kokken um das 2,8-fache höher. Von 17 der 18 Spezies, die in den Datenbanken beider Methoden enthalten waren (Spezies der Gattungen *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Bacillus* und *Paenibacillus*), enthielt die FTIR-Datenbank Spektren von Stämmen die vom gleichen pharmazeutischen Produktionsstandort stammen von dem auch die Praxisisolate für die externe Validierung stammen. Nur von der Spezies *P. lautus* wurde im Rahmen der Datenbankanpassung kein Spektrum eines Stammes vom betreffenden Produktionsstandort aufgenommen. Unter den

Praxisisolaten befanden sich zwei Stämme dieser Spezies. Beide Stämme konnten durch die FTIR-Spektroskopie nicht korrekt identifiziert werden. Diese beiden Stämme konnten jedoch auch durch das API-System nicht korrekt identifiziert werden was möglicherweise auf eine außergewöhnliche phänotypischen Ausprägung dieser Stämme zurückzuführen sein könnte. Von den übrigen 17 Spezies waren in den FTIR-Datenbanken durchschnittlich die Spektren von vier Stämmen enthalten welche aus dem Umfeld des betroffenen pharmazeutischen Standortes stammen (siehe Anhang 1 und 2). Die Datenbanken des API-Systems hingegen wurden für die Identifizierung klinischer Isolate entwickelt und können nicht an die spezifischen phänotypischen Ausprägungen von Spezies eines bestimmten Standortes angepasst werden.

Unter den gegebenen Bedingungen erwies sich die FTIR-Spektroskopie im Vergleich zum API-System als zuverlässigere und damit besser geeignete Methode zur Identifizierung von Gram-positiven Kokken und sporenbildenden Bakterien aus pharmazeutischen Reinräumen.

2 Methodenentwicklung zur kultivierungsfreien

Untersuchung der mikrobiellen Biodiversität in der Luft pharmazeutischer Reinräume

Im pharmazeutischen Umgebungsmonitoring erfolgt die quantitative Untersuchung von Mikroorganismen in der Luft meist durch die Bestimmung der detektierbaren KbE auf bestimmten Medien. Auf Basis der Anzahl an KbE die in verschiedenen Reinräumen der Klasse C im Umgebungsmonitoring eines bestimmten Produktionsstandortes durchschnittlich detektiert wurden, wurde bei einer Sammelzeit von 24h mit geeigneten Sammelmethode, mit einer isolierbaren Anzahl von Bakterien in einer Größenordnung von 10^3 KbE gerechnet. Unter der Annahme, dass nur etwa 10% der, in Reinräumen vorkommenden Bakterien, durch Standardmethoden auch kultivierbar sind (La Duc, *et al.* 2007), würde die Zellzahl bei 10^3 detektierbaren KbE in einer Größenordnung von 10^4 Zellen liegen. In früheren Publikationen mit

beschriebenen Methoden zur kultivierungsfreien Analyse der mikrobiellen Biodiversität in Umweltproben fehlt häufig die Angabe der Zellzahl, die der Analyse zugrunde liegt (Brooks *et al.* 2007, Frank *et al.* 2003, Gao, *et al.* 2007, He *et al.* 2007, Hutter *et al.* 2003, La Duc *et al.* 2009, Moissl *et al.* 2007a, Moissl, *et al.* 2007b). Für Publikationen, in denen diese Zellzahl genannt wird, wurden stets mehr als 10^5 Zellen als Ausgangsmaterial zur Herstellung von Klonbibliotheken verwendet (Angenent *et al.* (2005): 10^5 - 10^8 Zellen; Paez-Rubio *et al.* (2005): 10^7 - 10^9 Zellen; Maron (2005): 10^5 - 10^6 Zellen). Peccia & Hernandez (2006) haben auf Basis der Erkenntnisse früherer Studien ein allgemeines Protokoll zur PCR-basierenden Biodiversitätsanalyse von Luftproben erstellt. Die Methode der vorliegenden Arbeit wurde in Anlehnung an dieses Protokoll erstellt und so verändert, dass eine Steigerung der Sensitivität erzielt werden sollte. Im Folgenden werden die Vorversuche und die Änderungen des Protokolls und deren Auswirkungen auf die Sensitivität der Methode im Einzelnen diskutiert.

2.1 Vorversuche zur Sensitivität und Effizienz der PCR

2.1.1 Ermittlung der niedrigstmöglichen Annealingtemperatur

In Multi-Template-PCRs tritt unter Verwendung von „universellen“ Primern, häufig eine bevorzugte Amplifizierung von DNA-Fragmenten bestimmter Taxa auf. Dies ist durch kleine Unterschiede in den Sequenzen zu erklären, die als Zielsequenzen für diese Primer dienen. Die „universellen“ Primer binden dabei mit der höchsten Effizienz an Templates, mit denen eine zu 100% korrekte Basenpaarung möglich ist. Wird das gebildete PCR-Produkt im Anschluss zur Untersuchung der Biodiversität verwendet (Abbildung 2), kann diese ungleiche Amplifikation zu einer verzerrten Abbildung der vorhandenen Biodiversität führen. Es konnte in früheren Studien gezeigt werden, dass dieser Effekt durch die Senkung der Annealingtemperatur minimiert und die Komplexität der detektierten Biodiversität dadurch gesteigert werden konnte (Hongoh, *et al.* 2003, Ishii & Fukui 2001). Sipos *et al.* (2010) empfehlen die PCR bei der niedrigstmöglichen Annealingtemperatur, bei der kein Nebenprodukt gebildet

wird, durchzuführen. Alle PCRs der Methoden M1-M21 wurden daher bei den entsprechenden, für die jeweiligen Primerpaare ermittelten, „niedrigstmöglichen“ Annealingtemperaturen durchgeführt.

2.1.2 Überprüfung der Sensitivität

Durch Verwendung von verschiedenen Verdünnungen eines Lysats, einer hochkonzentrierten ($4,8 \times 10^7$ KbE/ml) Zellsuspension, als Template, sollte die Sensitivität der PCR unter den gegebenen Bedingungen überprüft werden. Die höchste Verdünnungsstufe, bei der ein PCR-Produkt gebildet werden konnte war 10^{-3} .

Im PCR-Ansatz, mit dem am niedrigsten konzentrierten Lysat, das zur Bildung von PCR-Produkt führte, stand also theoretisch gDNA von bis zu 48KbE/50 μ l Ansatz als Template zur Verfügung. Da bei den Methoden M1-M21 die isolierte DNA in 68 μ l H₂O gelöst wurde, könnte sich bei der Verwendung von Zellsuspensionen mit einer Konzentration von 5×10^3 KbE/ml maximal die gDNA von zwischen 7×10^1 KbE/50 μ l (1 μ l Lysat) und 2×10^3 KbE/50 μ l (67 μ l Lysat) im PCR-Ansatz befunden haben.

Die gewählten PCR-Bedingungen weisen also theoretisch (unter der Voraussetzung einer geeigneten, effizienten DNA-Extraktionsmethode) eine ausreichende Sensitivität zur Amplifizierung von 16S rRNA-Genfragmenten aus Lysaten von Zellsuspensionen der angestrebten Ausgangskonzentrationen von 10^3 - 10^4 KbE/ml auf.

2.2 Versuche zur Etablierung einer kultivierungsfreien Methode zur Untersuchung der mikrobiellen Biodiversität in niedrig konzentrierten Bakteriensuspensionen

Im Folgenden werden jene Schritte diskutiert, die verändert wurden um eine Sensitivitätssteigerung der Methode, zur Isolierung von gDNA und Amplifizierung von rRNA-Genfragmenten aus Zellsuspensionen, zu erreichen.

2.2.1 Zellaufschluss

Bei Biodiversitätsanalysen mittels kultivierungsfreier Methoden, hat die Zellaufschlussmethode maßgeblichen Einfluss auf das Ergebnis der phylogenetischen Untersuchung (de Liphay *et al.* 2004). Da nicht bekannt ist, welche Bakterien in den Luftproben enthaltenen sind und die Anzahl der Bakterien vor allem in Luftproben von Reinräumen sehr gering ist, ist eine effiziente Zellaufschlussmethode zu wählen die sowohl zum Aufschluss von Gram-negativen als auch von widerstandsfähigeren Gram-positiven Bakterien geeignet ist. Um eine verzerrte Abbildung der vorhandenen Biodiversität zu verhindern, sollte der Zellaufschluss im Idealfall mit der gleichen Effizienz auf alle vorhandenen Bakterien wirken. Von Peccia & Hernandez (2006) werden für diesen Zweck Methoden empfohlen, die aus einer Kombination von enzymatischen, chemischen und physikalischen Aufschlussschritten bestehen, wie sie bereits in frühen Studien zur Untersuchung der mikrobiellen Diversität verschiedener Habitats angewandt wurden (Angenent, *et al.* 2005, Frank, *et al.* 2003, Maron, *et al.* 2005, Paez-Rubio, *et al.* 2005). Den enzymatischen Teil des Zellaufschlusses bildeten in dieser Studie immer Lysozym zur Hydrolyse von Peptidoglykan und Proteinase K zum Abbau von Proteinen in bakteriellen Zellwänden. Das anionische Tensid SDS wurde nur in 13 der 21 Varianten der Methode verwendet. Ein physikalischer Aufschluss der Zellen wurde durch die Freeze-Thaw oder die Fast-Prep Methode erreicht (Tabelle 4).

SDS

Tenside wie SDS führen zum Lösen von Lipiden aus den Zellmembranen und zur Denaturierung von Proteinen und können dadurch die Effizienz der Aufschlussmethode steigern. SDS kann jedoch in der folgenden PCR schon in geringen Mengen inhibitorisch wirken. Rossen *et al.* (1992) und Kreader (1996) konnten einen inhibitorischen Effekt von SDS auf PCRs ab einer Konzentration von 0,01% bzw. 0,03% nachweisen. Um die SDS-Konzentration in den Lysaten zu minimieren, wurde für die DNA-Fällung in SDS beinhaltenden Proben NaCl anstelle von NaAc verwendet (mit Ausnahme der Methoden M1 und M2). SDS bleibt dadurch auch nach Zugabe von Isopropanol beim DNA-Fällungsschritt

löslich und wird nicht mit der DNA ausgefällt. Um einen negativen Effekt von SDS auf die Sensitivität der Methode auszuschließen wurde der Zellaufschluss in mehreren Varianten ohne SDS durchgeführt (Tabelle 4). Die Verwendung von SDS hatte bei den überprüften Varianten keinen negativen Einfluss auf die Sensitivität, wenn die DNA-Fällung anschließend mit Hilfe von NaCl durchgeführt wurde. Die Verwendung von NaAc in Kombination mit SDS hat die Bildung von PCR-Produkt beim Einsatz von 67µl Lysat (100µl PCR-Ansatz) verhindert, hatte jedoch keinen negativen Einfluss auf die Effizienz der PCR bei der Verwendung von 1µl Lysat (50µl PCR-Ansatz). Dies deutet darauf hin, dass SDS bei Verwendung von NaAc, im Zuge des Fällungsschrittes teilweise ausgefällt wurde, dadurch in größerem Umfang ins Lysat gelangte als bei Verwendung von NaCl und sich bei einem höheren Lysat-Anteil inhibitorisch auf die PCR auswirkte. Da die Methode nur mit *S. epidermidis* getestet wurde, SDS in Kombination mit NaCl keinen nachweisbaren inhibitorischen Effekt auf die PCR hatte und SDS möglicherweise die Effizienz der DNA-Isolierung aus anderen Bakterienspezies steigert, wurde SDS als Bestandteil der Methode beibehalten.

Fast-Prep /Freeze-Thaw

Da in früheren Studien gezeigt werden konnte, dass die zusätzliche Anwendung physikalischer Aufschlussmethoden zu einer signifikanten Erhöhung der isolierten DNA-Menge aus Boden- und Luftproben führt, bildeten in jeder getesteten Variante acht Freeze-Thaw Zyklen oder die Fast-Prep Methode den letzten Schritt des Zellaufschlusses (Haugland *et al.* 2002, Miller *et al.* 1999, Peccia & Hernandez 2006). Die Varianten M1 (Freeze-Thaw) und M2 (Fast-Prep) unterscheiden sich nur durch die verwendete physikalische Methode. Da sich die Sensitivität der beiden Varianten nicht voneinander unterscheidet, wurde für die übrigen Varianten die weniger zeitaufwendige Fast-Prep Methode verwendet.

2.2.2 DNA-Reinigung

Um die DNA von Zellresten und anderen Kontaminationen zu trennen, wurde in allen Varianten der Methode ein Reinigungsschritt in Form einer Phenol-

Chlorophorm Extraktion durchgeführt, wie sie auch bei ähnlichen kultivierungsfreien Methoden in früheren Studien eingesetzt wurde (Frank *et al.* 2008, Huber *et al.* 2009, Moissl, *et al.* 2007b, Peccia & Hernandez 2006).

Reinigungskit

Um PCR-Inhibitoren, die möglicherweise nach der Phenol-Chlorophorm Extraktion und der DNA-Fällung im Lysat enthalten waren, zu entfernen, wurde in fünf der 21 Varianten der Methode eine zweite Reinigung der DNA nach der Fällung, durch Verwendung eines Reinigungskits (DNeasy Blood & Tissue Kit, Qiagen) durchgeführt (M8, M13, M14, M20, M21). Im Vergleich von Varianten, die sich nur durch die Verwendung des Reinigungskits unterscheiden, konnte trotz möglicher DNA-Verluste durch den zusätzlichen Reinigungsschritt in vier von fünf Fällen eine Sensitivitätssteigerung durch Verwendung des Reinigungskits gezeigt werden.

Die zusätzliche DNA-Reinigung hatte nur bei Variante M8 im Vergleich zu Variante M6 keine Sensitivitätssteigerung zur Folge. Variante M5 unterscheidet sich von M6 nur durch die Zugabe von BSA zum PCR-Ansatz, wodurch eine Sensitivitätssteigerung erreicht wurde. Methode M8 unterscheidet sich von M6 wiederum nur durch die Verwendung des Reinigungskits. Eine mögliche Erklärung für das Ausbleiben eines sensitivitätssteigernden Effekts durch den zusätzlichen Reinigungsschritt ist, dass durch Zugabe von BSA in den PCR-Ansatz die Wirkung der gleichen Inhibitoren reduziert wird, die durch das Reinigungskit zumindest teilweise entfernt werden. Ein kumulativer Effekt, durch die Verwendung des Reinigungskits und von BSA, könnte somit nicht erreicht werden.

2.2.3 DNA-Fällung

Durch die DNA-Fällung kann das Probenvolumen verringert werden, sodass anschließend entweder ein Aliquot der DNA-Lösung oder die gesamte isolierte gDNA als Template für eine PCR eingesetzt werden kann.

Bei sehr geringen Mengen an DNA kann Glykogen als Carrier bei der Präzipitation eingesetzt werden, um den Verlust von DNA bei der Fällung zu

verringern (Peccia & Hernandez 2006, Williams *et al.* 2001). Eine inhibitorische Wirkung von Glykogen auf die enzymatische Amplifikation von Nukleinsäuren konnte erst ab Konzentrationen von 0,8% Glykogen nachgewiesen werden (Atmar *et al.* (1993); Herstellerangaben, ThermoScientific). In allen, in dieser Arbeit getesteten, Varianten der Methode war Glykogen in PCR-Ansätzen maximal in einer Konzentration von 0,1% enthalten. Um die Auswirkung von Glykogen auf die Sensitivität der Methoden zu überprüfen wurden zwei Methoden verglichen (M6 und M7), deren Durchführung sich nur durch die Zugabe von Glykogen in der DNA-Fällung einer Methode (M6) unterschieden (Tabelle 4). Da gezeigt werden konnte, dass sich die Verwendung von Glykogen positiv auf die Sensitivität von Methode M6 auswirkte, wurde in den anschließend getesteten Methoden Glykogen verwendet.

2.2.4 PCR

Bei kultivierungsfreien Methoden zur Untersuchung der mikrobiellen Diversität hat die Wahl der PCR-Bedingungen den größten Einfluss auf das Ergebnis der Untersuchung (Sipos, *et al.* 2010). In dieser Arbeit wurde versucht, eine Sensitivitätssteigerung der Methode durch Veränderungen der PCR-Bedingungen zu erreichen. Neben der Sensitivitätssteigerung wurde jedoch auch das Ziel einer möglichst umfassenden Abbildung einer gegebenen Biodiversität durch die verwendete Methode angestrebt.

Polymerase

Den letzten Schritt der Methode bildet eine PCR. Hier wurde je eine von drei unterschiedlichen Polymerasen eingesetzt. Als Standard-Polymerase wurde die Thermoprime Plus *Taq* DNA Polymerase (Thermo Scientific) verwendet. Um die Effizienz der PCR und damit die Sensitivität der Methoden zu steigern wurden die KAPA2GTM Robust (Peqlab) und KAPAHiFiTM (Peqlab) als alternative DNA-Polymerasen verwendet.

Die KAPA2GTM Robust DNA Polymerase wurde entwickelt, um in PCRs unter Vorhandensein von PCR-Inhibitoren eingesetzt zu werden und weist, im Vergleich zur Wild-Typ *Taq* DNA-Polymerase, laut Herstellerangaben unter

anderem eine höhere Toleranz gegenüber Zusätzen wie NaCl, NaAc, SDS, Isopropanol, Ethanol und Phenol auf, die auch in allen hier getesteten Varianten der Methode eingesetzt wurden. Die KAPAHiFi™ DNA-Polymerase wurde mittels Protein-Engineering entwickelt und weist laut Herstellerangaben im Vergleich zur Wild-Typ *Taq* DNA-Polymerase eine höhere Affinität zu DNA und eine höhere Prozessivität auf. Zwei, die Sensitivität möglicherweise einschränkende, Faktoren sollten durch die Verwendung der alternativen Polymerasen ausgeglichen werden. Der Einsatz der Polymerase KAPA2G™ Robust sollte eine Steigerung der Sensitivität durch eine Erhöhung der Effizienz der PCR bei vorhandenen PCR-Inhibitoren bewirken. Die Sensitivität kann jedoch auch durch einen ineffizienten Zellaufschluss und einer damit verbundenen niedrigen Konzentration an Template-DNA in den PCRs eingeschränkt werden. In diesem Fall könnte der Einsatz der KAPAHiFi™ DNA Polymerase im Vergleich zur Thermoprime Plus *Taq* DNA Polymerase zu einer Erhöhung der Sensitivität der Methode und damit zur Bildung von PCR-Produkt bei geringer konzentrierten Ausgangssuspensionen führen. Die Ergebnisse zeigen jedoch, dass die Sensitivität durch die Verwendung der alternativen Polymerasen nicht gesteigert werden konnte. Die höchste Sensitivität wurde entgegen den Erwartungen durch den Einsatz der Thermoprime Plus *Taq* DNA Polymerase erreicht. Die Tatsache, dass beim Einsatz von 67µl Lysat nur unter Verwendung der KAPAHiFi™ DNA Polymerase kein PCR-Produkt gebildet werden konnte, weist darauf hin, dass möglicherweise trotz der Reinigungsschritte PCR-Inhibitoren in die PCR-Ansätze gelangten, gegen welche die Thermoprime Plus *Taq* DNA Polymerase und die KAPA2G™ Robust Polymerase eine höhere Resistenz aufwiesen als die KAPAHiFi™ DNA Polymerase.

Primer

Bei den PCRs kultivierungsfreier Methoden zur Biodiversitätsanalyse handelt es sich um Multi-Template PCRs, in deren Ansätzen sich die gDNA verschiedener Taxa in einem bestimmten Verhältnis befindet. Damit sich dieses Verhältnis

unter den PCR-Produkten widerspiegelt, sollten die verwendeten Primer im Idealfall die gleiche Affinität zur Zielsequenz aller relevanten Taxa aufweisen. Zur Identifizierung von Prokaryonten durch Sequenzanalyse wird am häufigsten die Sequenz des 16S rRNA-Gens herangezogen, wobei die Primer an konservierte Bereiche dieses Gens binden. Auf Grund von Unterbrechungen in den konservierten Bereichen des 16S rRNA-Gens ist die Entwicklung von universellen Primern, die eine zu 100% korrekte Basenpaarung mit der Zielsequenz aller Bakterien eingehen können, nicht möglich. Es können daher nur annähernd universelle Primer verwendet werden. Eine Folge davon ist die, bereits unter Punkt IV-2.1.1 diskutierte, bevorzugte Bindung der Primer an die Zielsequenz von Organismen mit höherer Sequenzübereinstimmung und ein dadurch hervorgerufener Einfluss der Primer auf die Abbildung der Biodiversität (Sipos, *et al.* 2010). Auch die Sensitivität der kultivierungsfreien Methode kann durch die Wahl der Primer beeinflusst werden. Die Effizienz der PCR kann dabei nicht nur durch die Sequenz (Spezifität, GC-Gehalt) und Länge der Primer, sondern auch durch die Länge des amplifizierten Fragments beeinflusst werden. In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass Polymerasen im direkten Vergleich kurze Fragmente effizienter amplifizieren als längere Fragmente (Becker *et al.* 2000, Huber, *et al.* 2009, Kleter *et al.* 1998, Suzuki & Giovannoni 1996). In Untersuchungen von Suzuki & Giovannoni (1996) konnte durch die Verkürzung der Fragmentlänge von 888bp auf 312bp die Anzahl der produzierten Fragmente um das bis zu 9-fache gesteigert werden. Für eine präzise Untersuchung der Biodiversität auf Basis von 16S rRNA-Genfragmenten ist es jedoch nicht möglich, die Fragmentgröße beliebig zu verkürzen, da diese Kürzung mit einem Verlust an Informationen verbunden ist (Huber, *et al.* 2009). In dieser Arbeit wurden zwei Primerpaare verwendet, die zur Bildung unterschiedlich langer PCR-Produkte führten. Eines der Primerpaare bildeten die, in vergleichbaren Studien, am häufigsten verwendeten „universellen“ Primer 27f und 1492r (Lane 1991). Das, durch diese Primer begrenzte, Fragment mit einer Länge von 1466bp umfasst annähernd den gesamten Bereich des 16S rRNA-Gens. Als alternatives Primerpaar wurden die, ebenfalls „universellen“ Primer 515f und 1391r verwendet (Lane

1991). Diese werden von Peccia & Hernandez (2006) als Primer zur Untersuchung der Biodiversität von Mikroorganismen in Aerosolen vorgeschlagen und begrenzen einen DNA-Abschnitt von 877bp. Unabhängig von der verwendeten Polymerase, konnte die Sensitivität der Methode durch die Verwendung des alternativen Primerpaares und die dadurch verringerte Fragmentgröße nicht gesteigert werden. Die Länge und Sequenz der Primer wurde auf Grund der Verwendung bereits beschriebener „universeller“ Primer nicht verändert. Auch in den Untersuchungen von Suzuki und Giovannoni (1996) wurden „universelle“ Primer verwendet. Der effizienzsteigernde Effekt wurde hier jedoch bei einer Reduktion der Fragmentgröße um 65% auf eine Länge von 312bp beobachtet. Durch die Verwendung der alternativen Primer 515f und 1391r wurde das Fragment nur um 40% gekürzt und das entstehende Fragment mit einer Länge von 877bp ist um das 2,8-fache länger als das, von Suzuki und Giovannoni (1996) beschriebene, gekürzte Fragment. Die Ergebnisse zeigen, dass der Einfluss der Kürzung des Fragments in der durchgeführten Form nicht ausreichend ist, um die Sensitivität der untersuchten Methode soweit zu steigern, dass die Bildung von PCR-Produkt, im Vergleich zur Amplifikation des längeren Fragments, bei Ausgangssuspensionen mit einer 10-fach geringeren Zellkonzentration möglich ist.

BSA

Durch die Zugabe von BSA zu PCR-Ansätzen konnten von Kreader *et al.* (1996) eine Verminderung der Wirkung, sowohl von verschiedenen bekannten (z.B. ProteinaseK, NaCl) als auch von unbekanntem PCR-Inhibitoren (z.B. unbekannte Bestandteile von Umweltproben) gezeigt werden. In jedem Schritt der DNA-Extraktion wurden bei den getesteten Methoden Substanzen bzw. Enzyme eingesetzt, die inhibierend auf die PCR wirken können (Rossen, *et al.* 1992). Um eine Sensitivitätssteigerung zu erreichen, wurde den PCR-Ansätzen der Methoden M6, M7, M8, M12, M18 und M19, BSA zugegeben um eine mögliche Inhibierung der PCRs durch Reste dieser Bestandteile aufzuheben bzw. zu vermindern. Die Methoden M6, M12, M18 und M19 unterscheiden sich jeweils nur durch die Zugabe von BSA von den Methoden M5, M11, M15 und

M17. Im Vergleich dieser Methoden konnte immer ein sensitivitätssteigernder Effekt durch BSA beobachtet werden. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass BSA die Wirkung von PCR-Inhibitoren vermindert, die sich trotz der Durchführung der Reinigungsschritte in den PCR-Ansätzen befanden.

Lysatanteil am PCR-Ansatz

Durch die Erhöhung des Lysatanteils am PCR-Ansatz von 2% (1µl Lysat/ 50µl PCR-Ansatz) auf 67% (67µl Lysat/ 100µl PCR-Ansatz) des Volumens, sollte die Anzahl der Templates im PCR-Ansatz gesteigert werden. Würde das Lysat keine PCR-Inhibitoren beinhalten, könnte diese Steigerung eine Erhöhung der Sensitivität der Methode bewirken. Bei enthaltenen PCR-Inhibitoren hingegen wird neben der Templatekonzentration auch die Inhibitorenkonzentration gesteigert.

Obwohl die Konzentration an Templates durch den Einsatz von 10µl bzw. 67µl Lysat in den PCR-Ansätzen, im Vergleich zu Ansätzen mit 1µl Lysat, um das 10- bzw. 33,5-fache erhöht wurde konnte dadurch die Sensitivität der Methode nicht gesteigert werden. Dies lässt auf, im Lysat enthaltene, PCR-Inhibitoren schließen. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Wirkung der Inhibitoren bei Verwendung der Thermoprime Plus *Taq* DNA Polymerase und die KAPA2G™ Robust DNA Polymerase durch den Einsatz hoher Templatekonzentrationen (Lysate von Zellsuspensionen mit 5×10^6 cfu/ml) bei den Varianten M3-M6, M8 und M18-M21 kompensiert werden konnte. Unter Verwendung der KAPAHiFi™ DNA Polymerase und den Varianten M1, M2, M7 (Thermoprime Plus *Taq* DNA Polymerase) und M15-M17 (KAPA2G™ Robust DNA Polymerase) wurde dieser Effekt nicht beobachtet. Bei den Varianten M1 und M2 führte möglicherweise eine, aus der kombinierten Verwendung von SDS und NaAc resultierende, erhöhte SDS-Konzentration im Lysat zur Inhibierung aller PCRs im 100µl-Ansatz. Bei Methode M7 könnte eine, durch das Weglassen von Glykogen bei der DNA-Fällung bedingte, geringere Templatekonzentration im Lysat dazu geführt haben, dass die Wirkung von Inhibitoren beim Einsatz von 67µl Lysat nicht kompensiert werden konnte. Durch den Einsatz der KAPA2G™ Robust DNA Polymerase war die Bildung

von PCR-Produkt in 100µl Ansätzen nur nach zusätzlicher Reinigung des Lysats durch das DNA-Reinigungskit möglich. Hier könnte eine leichte Reduktion von PCR-Inhibitoren die Kompensation des inhibitorischen Effekts durch hohe Templatekonzentrationen ermöglicht haben.

2.3 Anwendbarkeit der getesteten Methode und ähnliche Studien

Die getesteten Varianten der Methode waren nicht ausreichend sensitiv um PCR-Produkt bei einem Ausgangsmaterial von 10^3 - 10^4 KbE zu bilden. Die Änderungen am Protokoll der Methode hatten zum Teil eine Sensitivitätssteigerung zur Folge, es konnte jedoch kein kumulativer Effekt dieser sensitivitätssteigernden Änderungen gezeigt werden.

Peccia & Hernandez (2006) haben auf Basis der Erkenntnisse früherer Studien ein allgemeines Protokoll zur PCR-basierenden Biodiversitätsanalyse von Luftproben erstellt. Als Grundlage für die Entwicklung dieses Protokolls dienten Arbeiten mit unterschiedlichen Ansätzen. In den meisten dieser Studien wurden Gene bestimmter Spezies amplifiziert. Häufig wurde hier nach dem Schritt der DNA-Extraktion spezifisch für bestimmte Spezies eine „nested PCR“ durchgeführt (z.B.: McCluskey *et al.* (1996), Wakefield (1996), Stärk *et al.* (1998)). Diese Methode kann eingesetzt werden um die Sensitivität der PCR zu erhöhen, ist aber vor allem für das Amplifizieren von Genfragmenten einer bestimmten Gruppe von Mikroorganismen geeignet. Bei der Untersuchung der gesamten mikrobiellen Diversität kann diese Methode durch die bevorzugte Bindung von Primern an Gene bestimmter Taxa zusätzlich zu einer verzerrten Abbildung der Biodiversität führen (Sipos *et al.* 2010). Ähnliche Ziele wie in der vorliegenden Arbeit haben unter den, dem Protokoll von Peccia & Hernandez (2006) zugrunde liegenden Studien, Angenent *et al.* (2005) und Maron *et al.* (2005) verfolgt. In diesen Arbeiten standen allerdings 10^5 - 10^8 Zellen als Ausgangsmaterial zur Verfügung (Angenent *et al.* (2005): 10^5 - 10^8 Zellen; Maron *et al.* (2005): 10^5 - 10^6 Zellen).

In einer Studie von Moissl *et al.* (2007b) wurde die mikrobielle Diversität in Oberflächenproben aus Reinräumen der NASA (US-Luft- und

Raumfahrtbehörde) molekularbiologisch untersucht. Die in den Proben enthaltene Zellzahl wurde in dieser Studie nicht bestimmt. Die Standorte der Probennahme (Reinräume der Klassen 10-100K) und die Größe der beprobten Oberflächen (0,37-1m²) lassen jedoch auf eine Ausgangsmenge von < 10² Zellen pro untersuchter Probe schließen. Die Durchführung der DNA-Extraktion wird in dieser Publikation jedoch nur soweit beschrieben, dass die DNA mittels Standardprozedere nach Ausubel *et al.* (2001) extrahiert wurde. Es wurde also ein Zellaufschluss mittels Proteinase durchgeführt mit einer anschließenden Reinigung der DNA mittels Phenol-Chlorophorm Extraktion. Genauere Angaben zur Durchführung der DNA-Extraktion sowie zur verwendeten DNA-Polymerase für die PCR wurden nicht gemacht. Ein direkter Vergleich mit der, in dieser Studie verwendeten Methode ist daher nicht möglich.

Laut La Duc *et al.* (2007) sind etwa 10% der, in Reinräumen vorkommenden Bakterien, durch Standardmethoden kultivierbar. Diverse Studien belegen ebenfalls, dass nur ein Bruchteil, häufig <1%, der in Umweltproben enthaltenen Mikroorganismen durch kultivierungsabhängige Methoden detektiert werden kann (Head, *et al.* 1998, Hugenholtz, *et al.* 1998, La Duc, *et al.* 2007, Pace 1997, Peccia & Hernandez 2006). Auf Basis kultivierungsabhängiger Methoden wurde festgestellt, dass die häufigsten Vertreter in Luft- und Oberflächenproben pharmazeutischer Reinräume die beiden Gruppen der Gram-positiven Kokken und Gram-positiven sporenbildenden Bakterien darstellen. Es konnte gezeigt werden, dass in Reinräumen höherer Reinheitsgrade am häufigsten Keime der bakteriellen Flora der menschlichen Haut isoliert werden. Typische Hautkeime sind Spezies der Gattungen *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Kocuria*, *Corynebacterium* oder *Propionibacterium*. Mit abnehmendem Reinheitsgrad der Reinräume steigt der Anteil an Gram-positiven sporenbildenden Bakterien wie *Bacillus* spp. die aus unkontrollierten Bereichen in diese Räume eingebracht werden können. Im Vergleich dazu bilden die Gram-negativen einen nur geringen Anteil an den durch kultivierungsabhängige Methoden in Reinräumen detektierten Keimen (Jimenez 2007). In der Studie von Moissl *et al.* (2007b) waren die, durch die Sequenzanalyse detektierten Bakterien, am häufigsten den Abteilungen Firmicutes und Proteobacteria zuzuordnen. Auffällig ist, dass

bis zu 90% der Klone der erstellten Klonbibliotheken Sequenzen enthielten die der Familie der Proteobacteria und damit den Gram-negativen Bakterien zugeordnet werden konnten. Da die Anzahl an Keimen in Reinräumen in der Praxis nur durch kultivierungsabhängige Methoden bestimmt werden und hier hauptsächlich Gram-positive Bakterien detektiert werden, legt auch dieses Ergebnis nahe, dass die Zahl der, in Reinräumen vorhandenen Keime weitaus höher ist als es die kultivierungsabhängigen Methoden vermuten lassen.

Die Methode der vorliegenden Arbeit wurde in Anlehnung an das Protokoll von von Peccia & Hernandez (2006) erstellt und so verändert, dass eine Steigerung der Sensitivität erzielt werden sollte. Durch Anwendung einzelner Varianten der Methode mit unterschiedlichen Änderungen des Protokolls konnte PCR-Produkt bei einer Ausgangsmenge von 10^5 KbE gebildet werden (Protokolle M6 und M8). Die Anzahl der notwendigen KbE für eine erfolgreiche DNA-Extraktion und anschließende PCR konnte jedoch nicht unter 10^5 KbE gesenkt werden. Insgesamt weisen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit darauf hin, dass die Sensitivität der unterschiedlichen Protokolle hauptsächlich durch PCR-Inhibitoren reduziert wurde. Durch die Methoden M6 und M8 konnte PCR-Produkt bei Proben mit einer enthaltenen Zellzahl in einer Größenordnung von 10^5 Zellen gebildet werden. Berücksichtigt man, dass sich in Proben aus Reinräumen möglicherweise die 10-100-fache Anzahl an Bakterien befinden könnte, die durch kultivierungsabhängige Methoden detektiert werden können, wären die Methoden M6 bzw. M8 möglicherweise sensitiv genug um eine kultivierungsfreie Biodiversitätsanalyse von Luftproben aus pharmazeutischen Reinräumen der Klasse C zu ermöglichen.

3 Beschreibung neuer bakterieller Taxa

3.1 Neubeschreibung der Spezies *Micrococcus cohnii*

Die Ergebnisse der phylogenetischen Untersuchung auf Basis der 16S rRNA-Gensequenzen ließen auf Grund des Sequenzunterschieds der Stämme WS4599, WS4601^T und WS4602 zur entsprechenden Sequenz bekannter *Micrococcus*-Spezies und der Position der drei Stämme im phylogenetischen

Baum auf die Zugehörigkeit der Stämme WS4599, WS4601^T und WS4602 zu einer neuen Spezies der Gattung *Micrococcus* schließen. Die phylogenetische Untersuchung auf Basis der *recA*-Gensequenzen bestätigte die abgegrenzte phylogenetische Position der drei Stämme innerhalb der Spezies der Gattung *Micrococcus* und die nahe Verwandtschaft der drei Stämme untereinander. Die Ergebnisse der Analysen der respiratorischen Chinone, der zellulären Fettsäuren und des G+C-Gehalts der genomischen DNA des Stammes WS4601^T zeigten große Übereinstimmungen mit den entsprechenden Ergebnissen bisher beschriebener Spezies der Gattung *Micrococcus* und sprechen daher ebenfalls für die Zuordnung der drei neuen Stämme zu dieser Gattung (Tabelle 14, Tabelle 16). Die dominanten zellulären Fettsäuren waren sowohl im Stamm WS4601^T als auch in allen bekannten *Micrococcus*-Spezies anteiso-C_{15:0} und iso-C_{15:0} und der G+C-Gehalt der genomischen DNA des Stammes WS4601^T lag in einem ähnlichen Bereich wie bei den übrigen *Micrococcus*-Spezies. Des weiteren waren die detektierten respiratorischen Chinone des Stammes WS4601^T, MK7(H₂) und MK8(H₂), ebenfalls die einzigen detektierbaren Chinone in den Typstämmen der Spezies *M. yunnannensis*, *M. endophyticus*, *M. niistensis* und *M. flavus* und wurden auch in *M. terreus* und *M. lactis* nachgewiesen (Tabelle 16). Die, für den Stamm WS4601^T, gefundene Zusammensetzung der Aminosäuren im Peptidoglykan ist ebenfalls typisch für die Spezies der Gattung *Micrococcus*, der Peptidoglykantyp A3 α wurde jedoch bisher in keiner anderen Spezies dieser Gattung nachgewiesen. Der Peptidoglykantyp nach Schleifer & Kandler (1972) wurde allerdings erst für drei weitere Spezies der Gattung *Micrococcus* ermittelt und ergab den Typ A4 α für *M. lylae* (Wieser, et al. 2002) und *M. lactis* (Chittipurna, et al. 2011) und A2 für *M. luteus* (Wieser, et al. 2002). Der Peptidoglykantyp scheint also innerhalb der Gattung *Micrococcus* variabel zu sein, wodurch auch der, für den Stamm WS4601^T, ermittelte Typ nicht im Widerspruch zur Zuordnung dieses Stammes zur Gattung *Micrococcus* steht. Ein Unterschied in der Zusammensetzung von Zellkomponenten des Stammes WS4601^T zu bereits beschriebenen *Micrococcus*-Spezies konnte bei der Untersuchung der polaren Lipide festgestellt werden. Alle *Micrococcus*-Spezies, für die diese Zellkomponenten

untersucht wurden (keine Daten für *M. flavus* and *M. antarcticus*), wiesen Phosphatidylinositol als Bestandteil auf. Im Stamm WS4601^T wurde jedoch kein Phosphatidylinositol detektiert (Tabelle 16). Des Weiteren unterscheiden sich die Stämme WS4599, WS4601^T und WS4602 von allen bekannten *Micrococcus*-Spezies durch physiologische Merkmale die in Tabelle 16 zusammengefasst wurden. Innerhalb der drei neuen Stämme wurden keine unterschiedlichen physiologischen Merkmale gefunden. Die Stämme WS4599 und WS4601^T wiesen zum Stamm WS4602 jedoch geringe Unterschiede in der *recA*-Gensequenz auf und der Stamm WS4599 unterscheidet sich von den Stämmen WS4601^T und WS4602 durch seine Herkunft aus dem pharmazeutischen Produktionsumfeld.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen führen daher zur Annahme, dass es sich bei den Stämmen WS4599, WS4601^T und WS4602 um drei Stämme einer einzigen neuen Spezies innerhalb der Gattung *Micrococcus* handelt. Für die neue Spezies wird, nach dem Botaniker und Bakteriologen Ferdinand Cohn, der die Gattung *Micrococcus* im Jahr 1872 beschrieben hat, der Name *Micrococcus cohnii* sp. nov. (coh'ni.i. N.L. masc. gen. n. cohnii) vorgeschlagen. Als Typstamm der Spezies wurde der Stamm WS4601^T ausgewählt, der in den Stammsammlungen der DSMZ und des Laboratoriums für Mikrobiologie der Universität Gent (Belgien) hinterlegt wurde (Anhang 10).

Tabelle 16 Unterschiedliche phänotypische Merkmale des Stammes WS4601^T und beschriebener Spezies der Gattung *Micrococcus* (siehe nächste Seite)

Charakteristikum	1	2	3	4	5	6	7^{oo}	8	9	10
Oxidaseaktivität	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-
Ureaseaktivität	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+
Nitratreduktion	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
Hydrolyse von:										
Casein	+	+	w [#]	+ ^{**}	+	w [#]	-	-	ND	+
Stärke	+	w [*]	-	-	+ ^o	+	+	+	+	-
Gelatine	-	+ [*]	-	+	- ^o	+	+	-	-	ND
Säureproduktion von:										
L-Arabinose	-	-	-	-	- ^o	-	+	-	ND	ND
L-Fucose	-	w	-	-	-	-	ND	-	ND	ND
Glycerol	-	w	-	-	-	-	ND	-	-	ND
D-Glukose	+	w	+	-	+	+	ND	+	-	-
D-Mannose	-	-	+	-	+	-	ND	+	ND	ND
D-Maltose	+	+	+	+	+	+	ND	+	-	ND
D-Melibiose	-	- [*]	-	-	-	-	+	-	ND	ND
L-Rhamnose	-	-	-	-	-	-	w	-	ND	ND
D-Sorbitol	-	-	-	-	- ^o	-	w	-	ND	ND
D-Saccharose	+	+	+	+	+	+	ND	+	-	-
G+C-Gehalt (mol %)	70,4	70,0 ^a	70,0 ^b	67,2 ^c	72,9 ^d	71,4 ^b	70,4	69,0 ^e	66,4	68,0
Polare Lipide										
	DPG	DPG	DPG	DPG	DPG	DPG	DPG	ND	ND	DPG
	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PG			PG
	GL1-3	PI	PI	PI	PI	PI	PI			PI
	PL1-2	PL1 ^a	GL1 PL1-2 ^b	GL1-3 PL1 ^c	PL1 ^d	GL1 PL1-2 ^b				PC GL1-2 PL1
Respiratorische-Chinone	MK-7(H ₂), MK-8(H ₂)	MK-7(H ₂), MK-8(H ₂) ^a	MK-8, MK-8(H ₂) ^b	MK-7, MK-7(H ₂), MK-8, MK-8(H ₂) ^c	MK-7(H ₂), MK-8(H ₂) ^d	MK-8(H ₂) ^b	MK-7(H ₂), MK-8(H ₂)	MK-7(H ₂), MK-8(H ₂) ^e	MK-8, MK-8(H ₂)	MK-7, MK-7(H ₂), MK-8(H ₂), MK-9(H ₂)

Tabelle 16 (siehe vorherige Seite) Unterschiedliche phänotypische Merkmale des Stammes WS4601^T und beschriebener Spezies der Gattung *Micrococcus*. Stämme: 1, WS4601^T; 2, *M. yunnanensis* DSM 21948^T; 3, *M. luteus* DSM 20030^T; 4, *M. terreus* NBRC 104258^T; 5, *M. endophyticus* DSM 17945^T; 6, *M. lylae* DSM 20315^T; 7, *M. niistensis* DSM 22747^T; 8, *M. flavus* DSM 19079^T; 9, *M. antarcticus* AS 1.2372^T; 10, *M. lactis* DSM 23694^T. Die Daten für 1, 2, 3, 4, 5, 6 und 8 wurden, wenn nicht anders angegeben, in dieser Arbeit unter identischen Wachstumsbedingungen ermittelt. Die Daten für 7, 9 und 10 stammen von Dastager *et al.* (retracted from IJSEM Papers in Press and will not be published in print in IJSEM), Liu *et al.* (2000) bzw. Chittipurna *et al.* (2011). Daten aus ^aZhao *et al.* (2009); ^bWieser *et al.* (2002); ^cZhang *et al.* (2010); ^dChen *et al.* (2009); ^eLiu *et al.* (2007). +, positiv; -, negativ; w, schwach positiv; ND, keine Daten verfügbar; DPG, Diphosphatidylglycerol; PG, Phosphatidylglycerol; PI, Phosphatidylinositol; PC, Phosphatidylcholin; PL1 and PL2, unbekannte Phospholipide; GL1-GL3 unbekannte Glykolipide. Abweichende Ergebnisse wurden von * Zhao *et al.* (2009); #Wieser *et al.* (2002); ** Zhang *et al.* (2010); ° Chen *et al.* (2009) ermittelt. °°Die Neubeschreibung der Spezies *M. niistensis* wurde von den Autoren wieder zurückgezogen, da es ihnen nicht möglich war eine Reinkultur des beschriebenen Stammes bei einer Stammsammlung zu hinterlegen. Die Neubeschreibung von *M. niistensis* wird daher nicht als Print-Version in IJSEM veröffentlicht.

3.2 Neubeschreibung der Gattung *Naumannella*

Die phylogenetische Analyse auf Basis der 16S rRNA-Gensequenzen zeigte, dass die Stämme WS4616^T, WS4617, WS4623 und WS4624 im phylogenetischen Baum, eine eigene, von den übrigen Gattungen abgetrennte, Abstammungslinie innerhalb der Familie der *Propionibacteriaceae* bilden. Die vier Stämme lagen dabei in einem Cluster mit *Pc. superfundia*, *Pm. paludicola* und *Mp. glycogenica*. Im paarweisen Vergleich der 16S rRNA-Gensequenzen wies jedoch die Spezies *Ml. panaciterrae* die größte Ähnlichkeit zu den vier neuen Stämmen auf. Die phylogenetische Analyse auf Basis der *recA*-Gensequenzen bestätigte die abgegrenzte phylogenetische Position der Stämme WS4616^T, WS4617, WS4623 und WS4624 im Vergleich zur Typspezies der Gattung *Micrococcus* und anderen nahe verwandten Gattungen innerhalb der Familie der *Propionibacteriaceae* und die nahe Verwandtschaft der vier neuen Stämme zueinander. Die Übereinstimmung der, für die Familie *Propionibacteriaceae* bestimmten Signature Nucleotides mit den Nukleotiden an den entsprechenden Positionen der 16S rRNA-Gensequenzen der Stämme WS4616^T, WS4617, WS4623 und WS4624 bestätigte die Zugehörigkeit der vier Stämme zu dieser Familie. Chemotaxonomische Merkmale des Stammes WS4616^T, die zur Unterscheidung von nahe verwandten Gattungen herangezogen werden können, wurden bei der Analyse der respiratorischen Chinone und des Peptidoglykants ermittelt. Der Stamm WS4616^T enthält die Menachinone MK-8(H₄) und MK-9(H₄) und unterscheidet sich dadurch von *Ml. panaciterrae*, *Pc. superfundia*, *Pm. paludicola* und *Mp. glycogenica*. Im Peptidolykan des Stammes WS4616^T wurde die Diaminosäure LL-DAP nachgewiesen, wodurch sich WS4616^T von *Pc. superfundia*,

Pm. paludicola und *Mp. glycogenica* unterscheidet. Morphologisch unterscheiden sich die Stämme WS4616^T, WS4617, WS4623 und WS4624 durch ihre kokkoide Zellform von den stäbchenförmigen Zellen der Gattungen *Propionicimonas* und *Propionnicella*. Unterschiede in physiologischen Merkmalen des Stammes WS4616^T und den Typspezies nahe verwandter Gattungen wurden in Tabelle 17 zusammengefasst. Die Stämme WS4616^T, WS4617, WS4623 und WS4624 wurden innerhalb von zehn Monaten aus drei unterschiedlichen Quellen isoliert. Die 16S rRNA- und *recA*-Gensequenzen der Stämme WS4617, WS4623 und WS4624 sind identisch und unterscheiden sich nur geringfügig von den entsprechenden Sequenzen des Stammes WS4616^T. Die vier Stämme unterscheiden sich voneinander zudem nur durch wenige Merkmale, die in Tabelle 18 zusammengefasst wurden. Bei WS4623 und WS4624 handelt es sich vermutlich um Klone eines Stammes, da sie aus der gleichen Rohmilchprobe isoliert wurden und sich weder in den Sequenzen der analysierten Gene noch in den untersuchten physiologischen Merkmalen unterscheiden.

Die vorliegenden Daten lassen darauf schließen, dass es sich bei WS4616^T, WS4617, WS4623 und WS4624 um drei Stämme einer Spezies einer neuen Gattung innerhalb der Familie der *Propionibacteriaceae* handelt, für die der Name *Naumannella halotolerans* sp. nov. vorgeschlagen wird. Die Gattung *Naumannella* (Nau.man'nel.la. N.L. fem. dim. n.) wurde dabei nach Dieter Naumann, dem ehemaligen Leiter der Abteilung für biomedizinische Spektroskopie am Robert Koch-Institut in Berlin, benannt. Für die Typspezies der Gattung wurde, auf Grund einer NaCl-Toleranz von bis zu 10% (w/v), der Name *Naumannella halotolerans* (ha.lo.to'le.rans. Gr. n. *hals halos* Salz; L. part. adj. *tolerans* tolerierend; N.L. part. adj. *halotolerans* Salz tolerierend) gewählt. Als Typstamm der Spezies wurde der Stamm WS4616^T ausgewählt, der in den Stammsammlungen der DSMZ und des Laboratoriums für Mikrobiologie der Universität Gent (Belgien) hinterlegt wurde (Anhang 11).

Tabelle 17 Unterschiedliche phänotypische Merkmale des Stammes WS4616^T und nahe verwandter Taxa: 1, Stamm WS4616^T; 2, *Propionimonas paludicola* DSM 15597^T; 3, *Propioniceella superfundia* DSM 22317^T; 4, *Micropruina glycogenica* DSM 15918^T; 5, *Micrococcus phosphovorius* DSM 10555^T. Die Daten wurden, wenn nicht anders angegeben, in dieser Arbeit ermittelt. Für den mol% G+C-Gehalt der Gattung *Micrococcus* (5) wurde der Bereich angegeben, in dem sich alle verfügbaren Werte für den mol% G+C-Gehalt beschriebener *Micrococcus*-Arten befinden. Daten von ^a Akasaka *et al.* (2003), ^b Bae *et al.* (2006a), ^c Shintani *et al.* (2000), ^d Nakamura *et al.* (1995), ^e An *et al.* (2008), ^f Cui *et al.* (2007), ^g Wang *et al.* (2008). +, positiv; -, negativ; ND, keine Daten verfügbar.

Charakteristikum	1	2	3	4	5
Zellform	Kokken	Stäbchen	Stäbchen	Kokken	Kokken
O ₂ Bedarf	Aerob	Fakultativ anaerob	Fakultativ anaerob	Aerob	Aerob
Oxidase	+	-	-	+	w
Katalase	+	-	-	+	+
β-Galaktosidase	+	+	-	+	+
Reduktion von Nitrat	-	-	-	+	+
Hydrolyse von Stärke	+	-	-	+	+
NaCl-Toleranz	10 %	2 %	4 %	3 %	6 %
Peptidoglykantyp	A3 _γ	ND	A1 _γ ^b	ND	ND
Diaminosäure im Peptidoglykan	LL-DAP	meso-DAP ^a	meso-DAP ^b	meso-DAP ^c	LL-DAP ^d
Respiratorische Chinone	MK-8(H ₄) MK-9(H ₄)	MK-9(H ₄) ^a MK-10(H ₄)	MK-9 ^b	MK-9(H ₄) ^c	MK-9(H ₄) ^d
G+C-Gehalt (mol%)	67,7	67,4-68,7 ^a	69,9 ^b	70,5 ^c	65,1-70,9 ^{d-g}

Tabelle 18 Unterschiedliche Merkmale der Stämme WS4616^T, WS4617, WS4623 und WS4624.

Charakteristikum	WS4616 ^T	WS4617	WS4623	WS4624
Isolierungsdatum	Apr. 2009	Okt. 2009	Jan. 2010	Jan. 2010
Isolierungsquelle	Reinraum	Dessert	Rohmilch	Rohmilch
Hydrolyse von Aesculin	-	w	-	-
Ureaseaktivität	+	+	-	-
Verwertung von:				
D-Lyxose	+	-	-	-
N-Acetylglucosamine	-	+	+	+
D-Laktose	-	+	+	+
L-Rhamnose	-	+	+	+
Wachstum bei 40°C	-	+	+	+

4 Ausblick

Durch die Validierung der, in dieser Arbeit erweiterten FTIR-Datenbanken, konnte gezeigt werden, dass die FTIR-Spektroskopie eine adäquate Methode zur Identifizierung von, aus pharmazeutischen Reinräumen isolierten, Gram-positiven Kokken und sporenbildenden Bakterien, darstellt. Zur Optimierung der Identifizierungsleistung dieser Methode könnte eine weitere Anpassung der FTIR-Spektroskopie vorgenommen werden, indem der Anteil an, aus dem pharmazeutischen Produktionsumfeld isolierten, Stämmen in den Referenzdatenbanken erhöht wird. Im Besonderen sollte dabei die Anzahl an Stämmen erhöht werden, deren Spezies derzeit nur durch wenige Stämme in den Datenbanken vertreten sind. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit an die mikrobielle Biodiversität in pharmazeutischen Reinräumen angepassten Datenbanken, umfassen bislang die beiden, in diesem Habitat am häufigsten vorkommenden bakteriellen Gruppen. Der Einsatzbereich der FTIR-Spektroskopie könnte jedoch, durch die Anpassung von entsprechenden Referenzdatenbanken, auch auf die Identifizierung bakterieller Gruppen ausgeweitet werden, die weniger häufig aus pharmazeutischen Reinräumen, isoliert werden.

Die Methode zur Amplifizierung der 16S rRNA-Gene von nicht-kultivierten Bakterien war aus Zellsuspensionen bis zu einer Konzentration von 5×10^5 KbE/ml erfolgreich. Durch eine Quantifizierung der isolierten gDNA mittels qPCR könnten die Ergebnisse verschiedener Varianten der Methode verglichen und einzelne Schritte optimiert werden. Die Anzahl an insgesamt vorhandenen kultivierbaren und unkultivierbaren Zellen in der Luft der, zur Untersuchung ausgewählten pharmazeutischen Reinräume, wurde zur Etablierung der Methode nur abgeschätzt. Da die Anzahl an nicht-kultivierbaren Bakterien in den Reinräumen weitaus höher sein könnte als angenommen, sollte die Methode mit Luftproben aus diesem Habitat wiederholt werden um zu überprüfen, ob die getestete Methode eine ausreichende Sensitivität zur Amplifizierung der 16S rRNA-Gene von Bakterien aus Reinraumproben aufweist.

V. Literatur

- Ahn, J., Yang, L., Paster, B. J., Ganly, I., Morris, L., Pei, Z. & Hayes, R. B. (2011). Oral Microbiome Profiles: 16S rRNA Pyrosequencing and Microarray Assay Comparison. *PLoS ONE* **6**, e22788.
- Akasaka, H., Ueki, A., Hanada, S., Kamagata, Y. & Ueki, K. (2003). *Propionicimonas paludicola* gen. nov., sp. nov., a novel facultatively anaerobic, Gram-positive, propionate-producing bacterium isolated from plant residue in irrigated rice-field soil. *Int J Syst Evol Microbiol* **53**, 1991-1998.
- Alexopoulou, K., Foka, A., Petinaki, E., Jelastopulu, E., Dimitracopoulos, G. & Spiliopoulou, I. (2006). Comparison of two commercial methods with PCR restriction fragment length polymorphism of the *tuf* gene in the identification of coagulase-negative staphylococci. *Letters in Applied Microbiology* **43**, 450-454.
- Alonso-Vega, P., Carro, L., Martínez-Molina, E. & Trujillo, M. E. (2011). *Auraticoccus monumenti* gen. nov., sp. nov., an actinomycete isolated from a deteriorated sandstone monument. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **61**, 1098-1103.
- Altenburger, P., Kämpfer, P., Makristathis, A., Lubitz, W. & Busse, H.-J. (1996). Classification of bacteria isolated from a medieval wall painting. *Journal of Biotechnology* **47**, 39-52.
- Amann, R. I., Lin, C., Key, R., Montgomery, L. & Stahl, D. A. (1992). Diversity among *Fibrobacter* isolates: Towards a phylogenetic classification. *Systematic and Applied Microbiology* **15**, 23-31.
- Amiali, N. M., Mulvey, M. R., Sedman, J., Louie, M., Simor, A. E. & Ismail, A. A. (2007). Rapid identification of coagulase-negative staphylococci by Fourier transform infrared spectroscopy. *Journal of Microbiological Methods* **68**, 236-242.
- An, D.-S., Im, W.-T. & Yoon, M.-H. (2008). *Microlunatus panaciterrae* sp. nov., a β -glucosidase-producing bacterium isolated from soil in a ginseng field. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **58**, 2734-2738.
- Angenent, L. T., Kelley, S. T., St Amand, A., Pace, N. R. & Hernandez, M. T. (2005). Molecular identification of potential pathogens in water and air of a hospital therapy pool. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 4860-4865.
- Atmar, R. L., Metcalf, T. G., Neill, F. H. & Estes, M. K. (1993). Detection of enteric viruses in oysters by using the polymerase chain reaction. *Applied and environmental microbiology* **59**, 631-635.
- Ausubel, F., Brent, R., Kingston, R., Moore, D., Seidman, J., Smith, J. & Struhl, K. (2001). Preparation and analysis of DNA. In *Current Protocols in Molecular Biology*, pp. pp. 2.01–02.14.08. Edited by C. VB. New York: John Wiley & Sons, Inc.
- Bae, H.-S., Moe, W. M., Yan, J., Tiago, I., da Costa, M. S. & Rainey, F. A. (2006a). *Brooklawnia cerclae* gen. nov., sp. nov., a propionate-forming bacterium isolated from chlorosolvent-contaminated groundwater. *Int J Syst Evol Microbiol* **56**, 1977-1983.
- Bae, H.-S., Moe, W. M., Yan, J., Tiago, I., da Costa, M. S. & Rainey, F. A. (2006b). *Propionicicella superfundia* gen. nov., sp. nov., a chlorosolvent-tolerant propionate-forming, facultative anaerobic bacterium isolated from contaminated groundwater. *Systematic and Applied Microbiology* **29**, 404-413.
- Becker, S., Boger, P., Oehlmann, R. & Ernst, A. (2000). PCR Bias in Ecological Analysis: a Case Study for Quantitative Taq Nuclease Assays in Analyses of Microbial Communities. *Appl Environ Microbiol* **66**, 4945-4953.
- Bligh, E. G. & Dyer, W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* **37**, 911-917.

- Bodrossy, L., Stralis-Pavese, N., Murrell, J. C., Radajewski, S., Weilharter, A. & Sessitsch, A. (2003).** Development and validation of a diagnostic microbial microarray for methanotrophs. *Environmental microbiology* **5**, 566-582.
- Bosch, A., Golowczyc, M. A., Abraham, A. a. G., Garrote, G. L., De Antoni, G. L. & Yantorno, O. (2006).** Rapid discrimination of lactobacilli isolated from kefir grains by FT-IR spectroscopy. *International Journal of Food Microbiology* **111**, 280-287.
- Bosch, A., Minàn, A., Vescina, C., Degrossi, J., Gatti, B., Montanaro, P., Messina, M., Franco, M., Vay, C., Schmitt, J., Naumann, D. & Yantorno, O. (2008).** Fourier Transform Infrared Spectroscopy for Rapid Identification of Nonfermenting Gram-Negative Bacteria Isolated from Sputum Samples from Cystic Fibrosis Patients. *Journal of clinical microbiology* **46**, 2535-2546.
- Brenner, D. J., Staley, J. T., Krieg, N. R., Brenner, D. J., Krieg, N. R., Staley, J. T. & Garrity, G. M. (2005).** Classification of Prokaryotic Organisms and the Concept of Bacterial Speciation In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, pp. 27-32: Springer US.
- Brooks, J. P., Gerba, C. P. & Pepper, I. L. (2007).** Diversity of aerosolized bacteria during land application of biosolids. *Journal of Applied Microbiology* **103**, 1779-1790.
- Brosius, J., Palmer, M. L., Kennedy, P. J. & Noller, H. F. (1978).** Complete nucleotide sequence of a 16S ribosomal RNA gene from *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **75**, 4801-4805.
- Büchl, N. R., Wenning, M., Seiler, H., Mietke-Hofmann, H. & Scherer, S. (2008).** Reliable identification of closely related *Issatchenkia* and *Pichia* species using artificial neural network analysis of Fourier-transform infrared spectra. *Yeast (Chichester, England)* **25**, 787-798.
- Cashion, P., Hodler-Franklin, M. A., McCully, J. & Franklin, M. (1977).** A rapid method for base ratio determination of bacterial DNA. *Anal Biochem* **81**, 461-466.
- Charfreitag, O., Collins, M. D. & Stackebrandt, E. (1988).** Reclassification of *Arachnia propionica* as *Propionibacterium propionicus* comb. nov. *Int J Syst Bacteriol* **38**, 354-357.
- Chen, H.-H., Zhao, G.-Z., Park, D.-J., Zhang, Y.-Q., Xu, L.-H., Lee, J.-C., Kim, C.-J. & Li, W.-J. (2009).** *Micrococcus endophyticus* sp. nov., isolated from surface-sterilized *Aquilaria sinensis* roots. *Int J Syst Evol Microbiol* **59**, 1070-1075.
- Chittipurna, Singh, P. K., Verma, D., Pinnaka, A. K., Shanmugam, M. & Korpole, S. (2011).** *Micrococcus lactis* sp. nov., isolated from a dairy industry waste treatment. *Int J Syst Evol Microbiol*, (In press).
- Chou, J. H., Lin, K. Y., Lin, M. C., Sheu, S. Y., Wei, Y. H., Arun, A. B., Young, C. C. & Chen, W. M. (2007).** *Brachybacterium phenoliresistens* sp. nov., isolated from oil-contaminated coastal sand. *Int J Syst Evol Microbiol* **57**, 2674-2679.
- Christensen, H., Bisgaard, M., Frederiksen, W., Mutters, R., Kuhnert, P. & Olsen, J. E. (2001).** Is characterization of a single isolate sufficient for valid publication of a new genus or species? Proposal to modify recommendation 30b of the Bacteriological Code (1990 Revision). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **51**, 2221-2225.
- Chun, J., Lee, J.-H., Jung, Y., Kim, M., Kim, S., Kim, B. K. & Lim, Y.-W. (2007).** EzTaxon: a web-based tool for the identification of prokaryotes based on 16S ribosomal RNA gene sequences. *Int J Syst Evol Microbiol* **57**, 2259-2261.
- Cohn, F. (1872).** Untersuchung über Bakterien. *Beitr Biol Pflanz* **1**, 127-244.
- Collins, M. D., Brown, J. & Jones, D. (1988).** *Brachybacterium faecium* gen. nov., sp. nov., a Coryneform Bacterium from Poultry Deep Litter. *Int J Syst Bacteriol* **38**, 45-48.
- Collins, M. D., Lawson, P. A., Nikolaitchouk, N. & Falsen, E. (2000).** *Luteococcus peritonei* sp. nov., isolated from the human peritoneum. *Int J Syst Evol Microbiol* **50**, 179-181.
- Collins, M. D., Rodrigues, U., Ash, C., Aguirre, M., Farrow, J. A. E., Martinez-Murcia, A., Phillips, B. A., Williams, A. M. & Wallbanks, S. (1991).** Phylogenetic analysis of the

- genus *Lactobacillus* and related lactic acid bacteria as determined by reverse transcriptase sequencing of 16S rRNA. *FEMS microbiology letters* **77**, 5-12.
- Colwell, R. R., Clayton, R. A., Ortiz-Conde, B. A., Jacobs, D. & Russek-Cohen, E. (1995).** The microbial species concept and biodiversity. In *Microbial Diversity and Ecosystem Function*, pp. 3-15. Edited by D. Allsopp, R. R. Colwell and D. L. Hawksworth. Oxon: CAB International.
- Costello, E. K., Lauber, C. L., Hamady, M., Fierer, N., Gordon, J. I. & Knight, R. (2009).** Bacterial Community Variation in Human Body Habitats Across Space and Time. *Science* **326**, 1694-1697.
- Coutinho, C. P., Sá-Correia, I. & Almeida Lopes, J. (2009).** Use of Fourier transform infrared spectroscopy and chemometrics to discriminate clinical isolates of bacteria of the *Burkholderia cepacia* complex from different species and ribopatterns. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **394**, 2161-2171.
- Cui, Y.-S., Im, W.-T., Yin, C.-R., Yang, D.-C. & Lee, S.-T. (2007).** *Microclunatus ginsengisoli* sp. nov., isolated from soil of a ginseng field. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **57**, 713-716.
- Cundell, A. M. (2006).** Microbial identification strategies in the pharmaceutical industry. *PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology* **60**, 111-123.
- Dahllöf, I. (2002).** Molecular community analysis of microbial diversity. *Current opinion in biotechnology* **13**, 213-217.
- Dahllöf, I., Baillie, H. & Kjelleberg, S. (2000).** rpoB-Based Microbial Community Analysis Avoids Limitations Inherent in 16S rRNA Gene Intraspecies Heterogeneity. *Applied and environmental microbiology* **66**, 3376-3380.
- Dastager, S. G., Raziuddin, S., Deepa, C. K., Tang, S.-K., Li, W.-J. & Pandey, A. (retracted from IJSEM Papers in Press and will not be published in print in IJSEM).** *Micrococcus niistensis* sp. nov., isolated from forest soil, India. *Int J Syst Evol Microbiol.*
- de Liphay, J. R., Enzinger, C., Johnsen, K., Aamand, J. & Sorensen, S. J. (2004).** Impact of DNA extraction method on bacterial community composition measured by denaturing gradient gel electrophoresis. *Soil Biology and Biochemistry* **36**, 1607-1614.
- Delwiche, E. A. (1957).** Family XI. *Propionibacteriaceae* fam. nov. In *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, pp. 569. Edited by R. S. Breed, E. G. D. Murray and N. R. Smith. London: Ballière, Tindall & Cox.
- Edmond, M., Chris, W., Kristi, L., Edmond, C., Yam, W. C. & Angus, C. (2005).** *Kocuria kristinae* infection associated with acute cholecystitis. *BMC Infect Dis* **5**, 60.
- European-Commission (2008).** EU Guidelines to Good Manufacturing Practice (Revision of Annex 1).
- Favero, M. S., Puleo, J. R., Marshall, J. H. & Oxborrow, G. S. (1966).** Comparative levels and types of microbial contamination detected in industrial clean rooms. *Applied microbiology* **14**, 539-551.
- Food-and-Drug-Administration (2004).** Guidance for Industry, Sterile Drug Products Produced by Aseptic Processing - Current Good Manufacturing Practice. In US Department of Health and Human Services. Washington.
- Fox, G. E., Wisotzkey, J. D. & Jurtshuk, P. (1992).** How Close Is Close: 16S rRNA Sequence Identity May Not Be Sufficient To Guarantee Species Identity. *International Journal of Systematic Bacteriology* **42**, 166-170.
- Frank, D. N., Spiegelman, G. B., Davis, W., Wagner, E., Lyons, E. & Pace, N. R. (2003).** Culture-independent molecular analysis of microbial constituents of the healthy human outer ear. *Journal of clinical microbiology* **41**, 295-303.
- Frank, J. A., Reich, C. I., Sharma, S., Weisbaum, J. S., Wilson, B. A. & Olsen, G. J. (2008).** Critical Evaluation of Two Primers Commonly Used for Amplification of Bacterial 16S rRNA Genes. *Appl Environ Microbiol* **74**, 2461-2470.

- Gao, Z., Tseng, C. H., Pei, Z. & Blaser, M. J. (2007).** Molecular analysis of human forearm superficial skin bacterial biota. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 2927-2932.
- Gregersen, T. (1978).** Rapid Method for Disitinction of Gram-negative From Gram-positive Bacteria. *Appl Microbiol Biotech* **5**, 123-127.
- Guenzler, H. & Gremlich, H. (2003).** *IR-Spektroskopie*. Weinheim: Wiley-VCH, 4. Aufl.
- Haugland, R. A., Brinkman, N. & Vesper, S. J. (2002).** Evaluation of rapid DNA extraction methods for the quantitative detection of fungi using real-time PCR analysis. *J Microbiol Methods* **50**, 319-323.
- He, Z., Xie, X., Xiao, S., Liu, J. & Qiu, G. (2007).** Microbial diversity of mine water at Zhong Tiaoshan copper mine, China. *Journal of Basic Microbiology* **47**, 485-495.
- Head, I. M., Saunders, J. R. & Pickup, R. W. (1998).** Microbial Evolution, Diversity, and Ecology: A Decade of Ribosomal RNA Analysis of Uncultivated Microorganisms. *Microbial Ecology* **35**, 1-21.
- Helm, D., Labischinski, H. & Naumann, D. (1991a).** Elaboration of a procedure for identification of bacteria using Fourier-Transform IR spectral libraries: a stepwise correlation approach. *Journal of Microbiological Methods* **14**, 127-142.
- Helm, D., Labischinski, H., Schallehn, G. & Naumann, D. (1991b).** Classification and identification of bacteria by Fourier-transform infrared spectroscopy. *Journal of general microbiology* **137**, 69-79.
- Heyrman, J., Balcaen, A., De Vos, P., Schumann, P. & Swings, J. (2002).** *Brachybacterium fresconis* sp. nov. and *Brachybacterium sacelli* sp. nov., isolated from deteriorated parts of a medieval wall painting of the chapel of Castle Herberstein (Austria). *Int J Syst Evol Microbiol* **52**, 1641-1646.
- Hongoh, Y., Yuzawa, H., Ohkuma, M. & Kudo, T. (2003).** Evaluation of primers and PCR conditions for the analysis of 16S rRNA genes from a natural environment. *FEMS microbiology letters* **221**, 299-304.
- Huber, J. A., Morrison, H. G., Huse, S. M., Neal, P. R., Sogin, M. L. & Mark Welch, D. B. (2009).** Effect of PCR amplicon size on assessments of clone library microbial diversity and community structure. *Environmental microbiology* **11**, 1292-1302.
- Hugenholtz, P., Goebel, B. M. & Pace, N. R. (1998).** Impact of Culture-Independent Studies on the Emerging Phylogenetic View of Bacterial Diversity. *Journal of Bacteriology* **180**, 4765-4774.
- Hutter, G., Schlagenhaut, U., Valenza, G., Horn, M., Burgemeister, S., Claus, H. & Vogel, U. (2003).** Molecular analysis of bacteria in periodontitis: evaluation of clone libraries, novel phylotypes and putative pathogens. *Microbiology* **149**, 67-75.
- Ieven, M., Verhoeven, J., Pattyn, S. R. & Goossens, H. (1995).** Rapid and economical method for species identification of clinically significant coagulase-negative staphylococci. *Journal of clinical microbiology* **33**, 1060-1063.
- Inceoglu, Ö., Al-Soud, W. A., Salles, J. F., Semenov, A. V. & van Elsas, J. D. (2011).** Comparative Analysis of Bacterial Communities in a Potato Field as Determined by Pyrosequencing. *PLoS ONE* **6**, e23321.
- Ishii, K. & Fukui, M. (2001).** Optimization of Annealing Temperature To Reduce Bias Caused by a Primer Mismatch in Multitemplate PCR. *Appl Environ Microbiol* **67**, 3753-3755.
- Jimenez, L. (2007).** Microbial Diversity in Pharmaceutical Product Recalls and Environments. *PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology* **61**, 383-399.
- Jung, S.-Y., Kim, H.-S., Song, J. J., Lee, S.-G., Oh, T.-K. & Yoon, J.-H. (2007).** *Aestuariimicrobium kwangyangense* gen. nov., sp. nov., an LL-diaminopimelic acid-containing bacterium isolated from tidal flat sediment. *Int J Syst Evol Microbiol* **57**, 2114-2118.

- Kämpfer, P., Steiof, M. & Dott, W. (1991).** Microbiological characterization of a fuel-oil contaminated site including numerical identification of heterotrophic water and soil bacteria. *Microbial Ecology* **21**, 227-251.
- Kanagawa, T. (2003).** Bias and artifacts in multitemplate polymerase chain reactions (PCR). *Journal of Bioscience and Bioengineering* **96**, 317-323.
- Kleter, B., van Doorn, L.-J., ter Schegget, J., Schrauwen, L., van Krimpen, K., Burger, M., ter Harmsel, B. & Quint, W. (1998).** Novel Short-Fragment PCR Assay for Highly Sensitive Broad-Spectrum Detection of Anogenital Human Papillomaviruses. *The American journal of pathology* **153**, 1731-1739.
- Kloos, W. E., Tornabene, T. G. & Schleifer, K. H. (1974).** Isolation and Characterization of Micrococci From Human Skin, Including Two New Species: *Micrococcus lylae* and *Micrococcus kristinae*. *Int J Syst Bacteriol* **24**, 79-101.
- Kreader, C. A. (1996).** Relief of amplification inhibition in PCR with bovine serum albumin or T4 gene 32 protein. *Applied and environmental microbiology* **62**, 1102-1106.
- Kümmerle, M., Scherer, S. & Seiler, H. (1998).** Rapid and reliable identification of food-borne yeasts by Fourier-transform infrared spectroscopy. *Applied and environmental microbiology* **64**, 2207-2214.
- Kuhm, A. E., Suter, D., Felleisen, R. & Rau, J. (2009).** Identification of *Yersinia enterocolitica* at the species and subspecies levels by Fourier transform infrared spectroscopy. *Applied and environmental microbiology* **75**, 5809-5813.
- La Duc, M. T., Dekas, A., Osman, S., Moissl, C., Newcombe, D. & Venkateswaran, K. (2007).** Isolation and Characterization of Bacteria Capable of Tolerating the Extreme Conditions of Clean Room Environments. *Applied and environmental microbiology* **73**, 2600-2611.
- La Duc, M. T., Osman, S., Vaishampayan, P., Piceno, Y., Andersen, G., Spry, J. A. & Venkateswaran, K. (2009).** Comprehensive Census of Bacteria in Clean Rooms by Using DNA Microarray and Cloning Methods. *Appl Environ Microbiol* **75**, 6559-6567.
- Lane, D. J. (1991).** 16S/ 23S rRNA Sequencing. In *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*, pp. 115-175. Edited by E. Stackebrandt and M. Goodfellow. Chichester, England: John Wiley & Sons.
- Langlois, B. E., Harmon, R. J. & Akers, K. (1983).** Identification of *Staphylococcus* species of bovine origin with the API Staph-Ident system. *Journal of clinical microbiology* **18**, 1212-1219.
- Lapage, S. P., Sneath, P. H. A., Lessel, E. F., Skerman, V. B. D., Seeliger, H. P. R. & Clark, W. A. (1992).** *International Code of Nomenclature of Bacteria*. Washington (DC): ASM Press.
- Liu, H., Xu, Y., Ma, Y. & Zhou, P. (2000).** Characterization of *Micrococcus antarcticus* sp. nov., a psychrophilic bacterium from Antarctica. *Int J Syst Evol Microbiol* **50**, 715-719.
- Liu, X.-Y., Wang, B.-J., Jiang, C.-Y. & Liu, S.-J. (2007).** *Micrococcus flavus* sp. nov., isolated from activated sludge in a bioreactor. *Int J Syst Evol Microbiol* **57**, 66-69.
- Lowery, S. A. & Mueller, M. (2010).** Designing and validating a contamination control program. In *Environmental Monitoring*, pp. 1-54. Edited by J. Moldenhauer. Bethesda: DHI Publishing.
- Loy, A., Lehner, A., Lee, N., Adamczyk, J., Meier, H., Ernst, J., Schleifer, K.-H. & Wagner, M. (2002).** Oligonucleotide Microarray for 16S rRNA Gene-Based Detection of All Recognized Lineages of Sulfate-Reducing Prokaryotes in the Environment. *Applied and environmental microbiology* **68**, 5064-5081.
- MacKenzie, S. L. (1987).** Gas chromatographic analysis of amino acids as the N-heptafluorobutyryl isobutyl esters. *Journal - Association of Official Analytical Chemists* **70**, 151-160.

- MacLean, D., Jones, J. D. G. & Studholme, D. J. (2009).** Application of 'next-generation' sequencing technologies to microbial genetics. *Nat Rev Micro* **7**, 287-296.
- Maquelin, K., Kirschner, C., Choo-Smith, L. P., Ngo-Thi, N. A., van Vreeswijk, T., Stammler, M., Endtz, H. P., Bruining, H. A., Naumann, D. & Puppels, G. J. (2003).** Prospective study of the performance of vibrational spectroscopies for rapid identification of bacterial and fungal pathogens recovered from blood cultures. *Journal of clinical microbiology* **41**, 324-329.
- Maron, P.-A., Lejon, D. H., Carvalho, E., Bizet, K., Lemanceau, P., Ranjard, L. & Mougel, C. (2005).** Assessing genetic structure and diversity of airborne bacterial communities by DNA fingerprinting and 16S rDNA clone library. *Atmospheric Environment* **39**, 3687-3695.
- Marsh, T. L. (1999).** Terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP): An emerging method for characterizing diversity among homologous populations of amplification products. *Current Opinion in Microbiology* **2**, 323-327.
- Martinez-Murcia, A. J., Benlloch, S. & Collins, M. D. (1992).** Phylogenetic Interrelationships of Members of the Genera *Aeromonas* and *Plesiomonas* as Determined by 16S Ribosomal DNA Sequencing: Lack of Congruence with Results of DNA-DNA Hybridizations. *International Journal of Systematic Bacteriology* **42**, 412-421.
- Martinez-Murcia, A. J. & Collins, M. D. (1990).** A phylogenetic analysis of the genus *Leuconostoc* based on reverse transcriptase sequencing of 16 S rRNA. *FEMS microbiology letters* **70**, 73-83.
- Maszenan, A. M., Jiang, H. L., Tay, J.-H., Schumann, P., Kroppenstedt, R. M. & Tay, S. T.-L. (2007).** *Granulicoccus phenolivorans* gen. nov., sp. nov., a Gram-positive, phenol-degrading coccus isolated from phenol-degrading aerobic granules. *Int J Syst Evol Microbiol* **57**, 730-737.
- Maszenan, A. M., Seviour, R. J., Patel, B. K. C., Schumann, P. & Rees, G. N. (1999).** *Tessaracoccus bendigoensis* gen. nov., sp. nov., a Gram-positive coccus occurring in regular packages or tetrads, isolated from activated sludge biomass. *Int J Syst Bacteriol* **49**, 459-468.
- McCluskey, R., Sandin, R. & Greene, J. (1996).** Detection of airborne cytomegalovirus in hospital rooms of immunocompromised patients. *Journal of Virological Methods* **56**, 115-118.
- McSpadden Gardener, B. B. (2004).** Ecology of *Bacillus* and *Paenibacillus* spp. in Agricultural Systems. *Phytopathology* **94**, 1252-1258.
- Mellmann, A., Becker, K., von Eiff, C., Keckevoet, U., Schumann, P. & Harmsen, D. (2006).** Sequencing and staphylococci identification. *Emerging infectious diseases* **12**, 333-336.
- Mesbah, M., Premachandran, U. & Whitman, W. B. (1989).** Precise Measurement of the G+C Content of Deoxyribonucleic Acid by High-Performance Liquid Chromatography. *Int J Syst Bacteriol* **39**, 159-167.
- Miller, D. N., Bryant, J. E., Madsen, E. L. & Ghiorse, W. C. (1999).** Evaluation and optimization of DNA extraction and purification procedures for soil and sediment samples. *Applied and environmental microbiology* **65**, 4715-4724.
- Moissl, C., Hosoya, N., Bruckner, J., Stuecker, T., Roman, M. & Venkateswaran, K. (2007a).** Molecular microbial community structure of the Regenerative Enclosed Life Support Module Simulator air system. *International Journal of Astrobiology* **6**, 131-145.
- Moissl, C., Osman, S., La Duc, M. T., Dekas, A., Brodie, E., DeSantis, T. & Venkateswaran, K. (2007b).** Molecular bacterial community analysis of clean rooms where spacecraft are assembled. *FEMS microbiology ecology* **61**, 509-521.
- Muyzer, G. (1999).** DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. *Current Opinion in Microbiology* **2**, 317-322.
- Nakamura, K., Hiraishi, A., Yoshimi, Y., Kawaharasaki, M., Masuda, K. & Kamagata, Y. (1995).** *Micrococcus phosphovorans* gen. nov., sp. nov., a New Gram-Positive

Polyphosphate-Accumulating Bacterium Isolated from Activated Sludge. *Int J Syst Bacteriol* **45**, 17-22.

Naumann, D., Helm, D. & Labischinski, H. (1991). Microbiological characterizations by FT-IR spectroscopy. *Nature* **351**, 81-82.

Nicholson, W. L. (2002). Roles of *Bacillus* endospores in the environment. *Cell Mol Life Sci* **59**, 410-416.

Oberreuter, H., Seiler, H. & Scherer, S. (2002). Identification of coryneform bacteria and related taxa by Fourier-transform infrared (FT-IR) spectroscopy. *Int J Syst Evol Microbiol* **52**, 91-100.

Orla-Jensen, S. (1909). Die Hauptlinien des natürlichen Bakteriensystems. *Zentralbl Bakteriol Parasitenkd Infektionskr Hyg Abt 2* **22**, 305-346.

Pace, N. R. (1997). A Molecular View of Microbial Diversity and the Biosphere. *Science* **276**, 734-740.

Paez-Rubio, T., Viau, E., Romero-Hernandez, S. & Peccia, J. (2005). Source bioaerosol concentration and rRNA gene-based identification of microorganisms aerosolized at a flood irrigation wastewater reuse site. *Applied and environmental microbiology* **71**, 804-810.

Peccia, J. & Hernandez, M. (2006). Incorporating polymerase chain reaction-based identification, population characterization, and quantification of microorganisms into aerosol science: A review. *Atmospheric Environment* **40**, 3941-3961.

Polz, M. F. & Cavanaugh, C. M. (1998). Bias in Template-to-Product Ratios in Multitemplate PCR. *Applied and environmental microbiology* **64**, 3724-3730.

Purdy, K. J., Nedwell, D. B., Martin Embley, T. & Takii, S. (2001). Use of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes to investigate the distribution of sulphate-reducing bacteria in estuarine sediments. *FEMS microbiology ecology* **36**, 165-168.

Qi, Y., Patra, G., Liang, X., Williams, L. E., Rose, S., Redkar, R. J. & DeVecchio, V. G. (2001). Utilization of the rpoB Gene as a Specific Chromosomal Marker for Real-Time PCR Detection of *Bacillus anthracis*. *Applied and environmental microbiology* **67**, 3720-3727.

Ravenschlag, K., Sahm, K. & Amann, R. (2001). Quantitative Molecular Analysis of the Microbial Community in Marine Arctic Sediments (Svalbard). *Applied and environmental microbiology* **67**, 387-395.

Rebuffo-Scheer, C. A., Schmitt, J. & Scherer, S. (2007). Differentiation of *Listeria monocytogenes* serovars by using artificial neural network analysis of Fourier-transformed infrared spectra. *Applied and environmental microbiology* **73**, 1036-1040.

Rebuffo, C. A., Schmitt, J., Wenning, M., von Stetten, F. & Scherer, S. (2006). Reliable and rapid identification of *Listeria monocytogenes* and *Listeria* species by artificial neural network-based Fourier transform infrared spectroscopy. *Applied and environmental microbiology* **72**, 994-1000.

Rhuland, L. E., Work, E., Denman, R. F. & Hoare, D. S. (1955). The behaviour of the isomers of α,ϵ -diaminopimelic acid on paper chromatograms. *J Am Chem Soc* **77**, 4844-4846.

Riddle, J. W., Kabler, P. W., Kenner, B. A., Bordner, R. H., Rockwood, S. W. & Stevenson, H. J. R. (1956). Bacterial identification by infrared spectrophotometry. *Journal of Bacteriology* **72**, 593-603.

Riedel, A., Vocke, T. & Zimmermann, G. (1996). Use of Fourier Transformation Infrared Spectroscopy for the Identification of Microorganism. *Pharm Ind* **58**, 853-860.

Rieser, G., Wenning, M., von Brehmer, S., Schuffenhauer, G. & Scherer, S. (in preparation). Fourier transform infrared spectroscopy as a tool for identifying Gram-positive cocci and sporeforming bacteria, isolated from pharmaceutical clean rooms.

Rosselló-Mora, R. & Amann, R. (2001). The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiology Reviews* **25**, 39-67.

- Rossen, L., Norskov, P., Holmstrom, K. & Rasmussen, O. F. (1992). Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assays and DNA-extraction solutions. *International Journal of Food Microbiology* **17**, 37-45.
- Roth, R. R. & James, W. D. (1988). Microbial ecology of the skin. *Annual review of microbiology* **42**, 441-464.
- Sampimon, O. C., Zadoks, R. N., De Vlieghe, S., Supre, K., Haesebrouck, F., Barkema, H. W., Sol, J. & Lam, T. J. (2009). Performance of API Staph ID 32 and Staph-Zym for identification of coagulase-negative staphylococci isolated from bovine milk samples. *Veterinary microbiology* **136**, 300-305.
- Sasser, M. (2001). Identification of Bacteria by Gas Chromatography of Cellular Fatty Acids. In Technical Note #101. Newark, USA: MIDI, Inc.
- Schleifer, K. H. (1985). Analysis of the chemical composition and primary structure of murein. *Methods Microbiol* **18**, 123-156.
- Schleifer, K. H. & Kandler, O. (1972). Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. *Bacteriological reviews* **36**, 407-477.
- Schmidt, V. S. J., Wenning, M. & Scherer, S. (2012). *Sphingobacterium lactis* sp. nov. and *Sphingobacterium alimentarium* sp. nov., isolated from raw milk and a dairy environment. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **62**, 1506-1511.
- Schubert, K., Ludwig, W., Springer, N., Kroppenstedt, R. M., Accolas, J. P. & Fiedler, F. (1996). Two coryneform bacteria isolated from the surface of French Gruyere and Beaufort cheeses are new species of the genus *Brachybacterium*: *Brachybacterium alimentarium* sp. nov. and *Brachybacterium tyrofermentans* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* **46**, 81-87.
- Schumann, P., Prauser, H., Rainey, F. A., Stackebrandt, E. & Hirsch, P. (1997). *Friedmanniella antarctica* gen. nov., sp. nov., an LL-Diaminopimelic Acid-Containing Actinomycete from Antarctic Sandstone. *Int J Syst Bacteriol* **47**, 278-283.
- Seiler, H., Schmidt, V., Wenning, M. & Scherer, S. (2012a). *Bacillus kochii* sp. nov., isolated from foods and a pharmaceuticals manufacturing site. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **62**, 1092-1097.
- Seiler, H., Wenning, M., Schmidt, V. & Scherer, S. (2012b). *Bacillus gottheilii* sp. nov., isolated from a pharmaceutical manufacturing site. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*.
- Shimizu, T., Ohshima, S., Ohtani, K., Hoshino, K., Honjo, K., Hayashi, H. & Shimizu, T. (2001). Sequence Heterogeneity of the Ten rRNA Operons in *Clostridium perfringens*. *Systematic and Applied Microbiology* **24**, 149-156.
- Shintani, T., Liu, W. T., Hanada, S., Kamagata, Y., Miyaoka, S., Suzuki, T. & Nakamura, K. (2000). *Micropruina glycogenica* gen. nov., sp. nov., a new Gram-positive glycogen-accumulating bacterium isolated from activated sludge. *Int J Syst Evol Microbiol* **50**, 201-207.
- Shirling, E. B. & Gottlieb, D. (1966). Methods for characterization of *Streptomyces* species. *Int J Syst Bacteriol* **16**, 313-340.
- Sipos, R., Székely, A., Revesz, S. & Marialigeti, K. (2010). Addressing PCR biases in environmental microbiology studies. *Methods Mol Biol* **599**, 37-58.
- Sipos, R., Székely, A. J., Palatinszky, M., Révész, S., Márialigeti, K. & Nikolausz, M. (2007). Effect of primer mismatch, annealing temperature and PCR cycle number on 16S rRNA gene-targeting bacterial community analysis. *FEMS microbiology ecology* **60**, 341-350.
- Smibert, R. M. & Krieg, N. R. (1994). Phenotypic characterization. In *Methods for general and molecular bacteriology*. Edited by M. R. Gerhardt P, Wood WA, Krieg NR. Washington D.C.: American Society for Microbiology.

- Speil, E. (2007).** *Identifizierung der bakteriellen Luftkeimflora aus Arztpraxen und Reinräumen mittels FTIR-Spektroskopie*: Diplomarbeit am Zentralinstitut für Ernährungs- und Lebensmittelwissenschaften, TU-München.
- Stackebrandt, E. (2006).** Defining Taxonomic Ranks. In *The Prokaryotes*, pp. 29-57. Edited by M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer and E. Stackebrandt. New York: Springer Science+Business Media, Inc.
- Stackebrandt, E., Frederiksen, W., Garrity, G. M., Grimont, P. A. D., Kämpfer, P., Maiden, M. C. J., Nesme, X., Rosselló-Móra, R., Swings, J., Trüper, H. G., Vauterin, L., Ward, A. C. & Whitman, W. B. (2002a).** Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **52**, 1043-1047.
- Stackebrandt, E., Koch, C., Gvozdiak, O. & Schumann, P. (1995).** Taxonomic Dissection of the Genus *Micrococcus*: *Kocuria* gen. nov., *Nesterenkonia* gen. nov., *Kytococcus* gen. nov., *Dermaococcus* gen. nov., and *Micrococcus* Cohn 1872 gen. emend. *Int J Syst Bacteriol* **45**, 682-692.
- Stackebrandt, E., Rainey, F. A. & Ward-Rainey, N. L. (1997).** Proposal for a New Hierarchic Classification System, *Actinobacteria* classis nov. *Int J Syst Bacteriol* **47**, 479-491.
- Stackebrandt, E., Schumann, P., Schaal, K. P. & Weiss, N. (2002b).** *Propionimicrobium* gen. nov., a new genus to accommodate *Propionibacterium lymphophilum* (Torrey 1916) Johnson and Cummins 1972, 1057(AL) as *Propionimicrobium lymphophilum* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* **52**, 1925-1927.
- Staneck, J. L. & Roberts, G. D. (1974).** Simplified approach to identification of aerobic actinomycetes by thin-layer chromatography. *Appl Microbiol Biotech* **28**, 226-231.
- Stärk, K. D. C., Nicolet, J. & Frey, J. (1998).** Detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* by Air Sampling with a Nested PCR Assay. *Applied and environmental microbiology* **64**, 543-548.
- Sugawara, Y., Ueki, A., Abe, K., Kaku, N., Watanabe, K. & Ueki, K. (2011).** *Propioniciclava tarda* gen. nov., sp. nov., isolated from a methanogenic reactor treating waste from cattle farms. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **61**, 2298-2303.
- Supre, K., De Vlieghe, S., Cleenwerck, I., Engelbeen, K., Van Trappen, S., Piepers, S., Sampimon, O. C., Zadoks, R. N., De Vos, P. & Haesebrouck, F. (2010).** *Staphylococcus devriesei* sp. nov., isolated from teat apices and milk of dairy cows. *Int J Syst Evol Microbiol* **60**, 2739-2744.
- Sutton, S. V. W. & Cundell, A. M. (2004).** Microbial Identification in the Pharmaceutical Industry. *Pharmacoepial Forum* **30**, 1884-1894.
- Suzuki, M. T. & Giovannoni, S. J. (1996).** Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR. *Applied and environmental microbiology* **62**, 625-630.
- Takahashi, T., Satoh, I. & Kikuchi, N. (1999).** Phylogenetic relationships of 38 taxa of the genus *Staphylococcus* based on 16S rRNA gene sequence analysis. *International Journal of Systematic Bacteriology* **49**, 725-728.
- Takeuchi, M., Fang, C.-X. & Yokota, A. (1995).** Taxonomic Study of the Genus *Brachybacterium*: Proposal of *Brachybacterium conglomeratum* sp. nov., nom. rev., *Brachybacterium paraconglomeratum* sp. nov., and *Brachybacterium rhamnosum* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* **45**, 160-168.
- Tamaoka, J. & Komagata, K. (1984).** Determination of DNA base composition by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *FEMS microbiology letters* **25**, 125-128.
- Tamura, T., Takeuchi, M. & Yokota, A. (1994).** *Luteococcus japonicus* gen. nov., sp. nov., a New Gram-Positive Coccus with LL-Diaminopimelic Acid in the Cell Wall. *Int J Syst Bacteriol* **44**, 348-356.

- Thomas, L. C. & Greenstreet, J. E. S. (1954).** The identification of micro-organisms by infrared spectrophotometry. *Spectrochimica Acta* **6**, 302-319.
- Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. & Higgins, D. G. (1997).** The CLUSTAL_X Windows Interface: Flexible Strategies for Multiple Sequence Alignment Aided by Quality Analysis Tools. *Nucleic Acids Research* **25**, 4876-4882.
- 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 Letts* **66**, 199-202.
- Tindall, B. J., Rosselló-Móra, R., Busse, H. J., Ludwig, W. & Kämpfer, P. (2010).** Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **60**, 249-266.
- Tindall, B. J., Sikorski, J., Smibert, R. M. & Krieg, N. R. (2007).** Phenotypic characterization and the principles of comparative systematics. In *Methods for General and Molecular Microbiology*, pp. 330-393. Edited by C. A. Reddy, T. J. Beveridge, J. A. Breznak, G. Marzluf, T. M. Schmidt and L. R. Snyder. Washington D.C: ASM Press.
- V. Wintzingerode, F., Göbel, U. B. & Stackebrandt, E. (1997).** Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. *FEMS Microbiology Reviews* **21**, 213-229.
- Van de Peer, Y. & De Wachter, R. (1997).** Construction of evolutionary distance trees with TREECON for Windows: accounting for variation in nucleotide substitution rate among sites. *Comput Appl Biosci* **13**, 227-230.
- van Waasbergen, L. G., Balkwill, D. L., Crocker, F. H., Bjornstad, B. N. & Miller, R. V. (2000).** Genetic Diversity among *Arthrobacter* Species Collected across a Heterogeneous Series of Terrestrial Deep-Subsurface Sediments as Determined on the Basis of 16S rRNA and recA Gene Sequences. *Appl Environ Microbiol* **66**, 3454-3463.
- Vandamme, P., Pot, B., Gillis, M., de Vos, P., Kersters, K. & Swings, J. (1996).** Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiological reviews* **60**, 407-438.
- Verborg, S., Frühling, A., Cousin, S., Brambilla, E., Gronow, S., Lünsdorf, H. & Stackebrandt, E. (2008).** *Biostraticola tofi* gen. nov., spec. nov., a novel member of the family *Enterobacteriaceae*. *Current Microbiology* **56**, 603-608.
- Wakefield, A. E. (1996).** DNA sequences identical to *Pneumocystis carinii* f. sp. *carinii* and *Pneumocystis carinii* f. sp. *hominis* in samples of air spora. *Journal of clinical microbiology* **34**, 1754-1759.
- Wang, Y.-X., Cai, M., Zhi, X.-Y., Zhang, Y.-Q., Tang, S.-K., Xu, L.-H., Cui, X.-L. & Li, W.-J. (2008).** *Microlunatus aurantiacus* sp. nov., a novel actinobacterium isolated from a rhizosphere soil sample. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **58**, 1873-1877.
- Wenning, M., Büchl, N. R. & Scherer, S. (2010).** Species and strain identification of lactic acid bacteria using FTIR spectroscopy and artificial neural networks. *Journal of Biophotonics* **3**, 493-505.
- Whiton, R. S., Lau, P., Morgan, S. L., Gilbert, J. & Fox, A. (1985).** Modifications in the alditol acetate method for analysis of muramic acid and other neutral and amino sugars by capillary gas chromatography-mass spectrometry with selected ion monitoring. *J Chromatogr A* **347**, 109-120.
- Wieser, M., Denner, E. B. M., Kämpfer, P., Schumann, P., Tindall, B., Steiner, U., Vybiral, D., Lubitz, W., Maszenan, A. M., Patel, B. K. C., Seviour, R. J., Radax, C. & Busse, H. J. (2002).** Emended descriptions of the genus *Micrococcus*, *Micrococcus luteus* (Cohn 1872) and *Micrococcus lylae* (Kloos et al. 1974). *Int J Syst Evol Microbiol* **52**, 629-637.

- Williams, R. H., Ward, E. & McCartney, H. A. (2001).** Methods for integrated air sampling and dna analysis for detection of airborne fungal spores. *Applied and environmental microbiology* **67**, 2453-2459.
- 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.
- Yokota, A., Tamura, T., Takeuchi, M., Weiss, N. & Stackebrandt, E. (1994).** Transfer of *Propionibacterium innocuum* Pitcher and Collins 1991 to *Propioniferax* gen. nov. as *Propioniferax innocua* comb. nov. *Int J Syst Bacteriol* **44**, 579-582.
- Zadoks, R. N. & Watts, J. L. (2009).** Species identification of coagulase-negative staphylococci: Genotyping is superior to phenotyping. *Veterinary Microbiology* **134**, 20-28.
- Zhang, J.-Y., Liu, X.-Y. & Liu, S.-J. (2010).** *Agrococcus terreus* sp. nov. and *Micrococcus terreus* sp. nov., isolated from forest soil. *Int J Syst Evol Microbiol* **60**, 1897-1903.
- Zhao, G.-Z., Li, J., Qin, S., Zhang, Y.-Q., Zhu, W.-Y., Jiang, C.-L., Xu, L.-H. & Li, W.-J. (2009).** *Micrococcus yunnanensis* sp. nov., a novel actinobacterium isolated from surface-sterilized *Polyspora axillaris* roots. *Int J Syst Evol Microbiol* **59**, 2383-2387.
- Zhi, X.-Y., Li, W.-J. & Stackebrandt, E. (2009).** An update of the structure and 16S rRNA gene sequence-based definition of higher ranks of the class *Actinobacteria*, with the proposal of two new suborders and four new families and emended descriptions of the existing higher taxa. *Int J Syst Evol Microbiol* **59**, 589-608.

VI. Anhang

Anhang 1 Zur Erweiterung der Spektrendatenbank für sporenbildende Bakterien verwendete Stämme aus dem Umfeld pharmazeutischer Produktion. ¹Stämme mit > 3% 16S rRNA-Gensequenzunterschied zur ähnlichsten, zum Zeitpunkt der Durchführung dieser Arbeit valide beschriebenen Spezies; Anhand dieser beiden Stämme wurde mittlerweile die Spezies *Bacillus gottheilii* neu beschrieben (Seiler, *et al.* 2012b). G-Nr., Stammsammlung der Abteilung Mikrobiologie, ZIEL Weihenstephan, Freising, Deutschland.

Spezies	Stamm (G-Nr.)
<i>Bacillus aquimaris</i>	G6020
<i>Bacillus cereus</i>	G5263
<i>Bacillus cereus</i>	G5270
<i>Bacillus circulans</i>	G4878
<i>Bacillus circulans</i>	G6154
<i>Bacillus clausii</i>	G5042
<i>Bacillus clausii</i>	G5231
<i>Bacillus clausii</i>	G6199
<i>Bacillus firmus</i>	G5770
<i>Bacillus flexus</i>	G6678
<i>Bacillus gibsonii</i>	G6044
<i>Bacillus horneckiae</i>	G6055
<i>Bacillus idriensis</i>	G5234
<i>Bacillus infantis</i>	G6676
<i>Bacillus licheniformis</i>	G5260
<i>Bacillus licheniformis</i>	G5786
<i>Bacillus licheniformis</i>	G5781
<i>Bacillus licheniformis</i>	G6161
<i>Bacillus litoralis</i>	G6166
<i>Bacillus megaterium</i>	G4750
<i>Bacillus megaterium</i>	G6240
<i>Bacillus niabensis</i>	G6202
<i>Bacillus pichinoty</i>	G6029
<i>Bacillus pocheonensis</i>	G6033
<i>Bacillus pocheonensis</i>	G6218
<i>Bacillus psychrodurans</i>	G6668
<i>Bacillus psychrodurans</i>	G5757
<i>Bacillus pumilus</i>	G5687
<i>Bacillus pumilus</i>	G5788
<i>Bacillus pumilus</i>	G6151
<i>Bacillus pumilus</i>	G6152
<i>Bacillus pumilus</i>	G5265
<i>Bacillus pumilus</i>	G5758
<i>Bacillus pumilus</i>	G5773
<i>Bacillus pumilus</i>	G6160
<i>Bacillus simplex</i>	G5224
<i>Bacillus simplex</i>	G5253
<i>Bacillus simplex</i>	G6163
<i>Bacillus simplex</i>	G6205
<i>Bacillus sonorensis</i>	G6049
<i>Bacillus</i> sp. nov. ¹	G6155
<i>Bacillus</i> sp. nov. ¹	G5266
<i>Bacillus subtilis</i>	G5229
<i>Bacillus subtilis</i>	G6156

Spezies (Fortsetzung Anhang 1)	Stamm (G-Nr.)
<i>Bacillus subtilis</i>	G5261
<i>Bacillus subtilis</i>	G6149
<i>Bacillus subtilis</i>	G6157
<i>Bacillus subtilis</i>	G6159
<i>Brevibacillus borstelensis</i>	G5774
<i>Brevibacillus borstelensis</i>	G6170
<i>Gracilibacillus</i> sp.	G5782
<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	G5779
<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	G6041
<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	G6039
<i>Paenibacillus borealis</i>	G6692
<i>Paenibacillus chitinolyticus</i>	G5226
<i>Paenibacillus glucanolyticus</i>	G6158
<i>Paenibacillus glucanolyticus</i>	G6162
<i>Paenibacillus glucanolyticus</i>	G5262
<i>Paenibacillus glucanolyticus</i>	G6150
<i>Paenibacillus glucanolyticus</i>	G6153
<i>Paenibacillus lactis</i>	G6164
<i>Sporosarcina ginsengisoli</i>	G5225
<i>Sporosarcina ginsengisoli</i>	G5771

Anhang 2 Zur Erweiterung der Spektrendatenbank für aerobe, mesophile, nicht-sporenbildende, Gram-positive Bakterien verwendete Stämme aus dem Umfeld pharmazeutischer Produktion. ¹Stämme mit > 3% 16S rRNA-Gensequenzunterschied zur ähnlichsten valide beschriebenen Spezies. G-Nr., Stammsammlung der Abteilung Mikrobiologie, ZIEL Weihenstephan, Freising, Deutschland. -, Stamm ist nicht in der Stammsammlung enthalten.

Spezies	Stamm (G-Nr.)
<i>Aerococcus viridans</i>	G4751
<i>Agrococcus jenensis</i>	G5805
<i>Arthrobacter polychromogenes</i>	G5768
<i>Arthrobacter</i> sp.	G6214
<i>Arthrobacter sulfonivorans</i>	G6190
<i>Brevibacterium samyangensis</i>	G5825
<i>Corynebacterium aurimucosum</i>	G6697
<i>Corynebacterium aurimucosum</i>	G5189
<i>Corynebacterium imitans</i>	G6691
<i>Dermabacter hominis</i>	G6054
<i>Dermabacter hominis</i>	G6035
<i>Dermabacter hominis</i>	G6629
<i>Enterococcus devriesei/pseudoavium</i>	G4883
<i>Enterococcus faecium</i>	G4886
<i>Exiguobacterium homiense</i>	G6673
<i>Jeotgalicoccus marinus</i>	G6669
<i>Kocuria kristinae</i>	G6025
<i>Kocuria kristinae</i>	G6122
<i>Kocuria kristinae</i>	G4989
<i>Kocuria marina</i>	G6130
<i>Kocuria palustris</i>	G4986
<i>Kocuria palustris</i>	G6126

Spezies (Fortsetzung Anhang 2)	Stamm (G-Nr.)
<i>Kocuria palustris</i>	G6701
<i>Kocuria palustris</i>	G5247
<i>Kocuria rhizophila</i>	G4754
<i>Kocuria rhizophila</i>	G4971
<i>Kocuria rhizophila</i>	G6125
<i>Kocuria rhizophila</i>	G6141
<i>Kocuria rhizophila</i>	G5251
<i>Kocuria rhizophila</i>	G5254
<i>Kocuria rhizophila</i>	G5188
<i>Kocuria rhizophila</i>	G6142
<i>Kocuria rhizophila</i>	G5252
<i>Kytococcus schroeteri</i>	G6215
<i>Kytococcus sedentarius</i>	G5767
<i>Kytococcus sedentarius</i>	G6203
<i>Kytococcus sedentarius</i>	G6204
<i>Leifsonia aquatica</i>	G6226
<i>Macrococcus equipercicus</i>	G6211
<i>Microbacterium maritypicum</i>	G6693
<i>Microbacterium oleovorans</i>	G6017
<i>Microbacterium oxydans</i>	G5754
<i>Microbacterium testaceum</i>	G6106
<i>Micrococcus luteus</i>	G6018
<i>Micrococcus luteus</i>	G6239
<i>Planomicrobium okeanokoites</i>	G6030
<i>Propionibacterium acnes</i>	-
<i>Propionibacterium acnes</i>	-
<i>Rhodococcus erythropolis</i>	G6134
<i>Rhodococcus</i> sp. nov. ¹	G6132
<i>Rothia aerea</i>	G6704
<i>Rothia dentocariosa</i>	G6143
<i>Rothia dentocariosa</i>	G4972
<i>Rothia dentocariosa</i>	G6703
<i>Rothia mucilaginosa</i>	G6705
<i>Staphylococcus aureus</i>	G6123
<i>Staphylococcus auricularis</i>	G5248
<i>Staphylococcus auricularis</i>	G6117
<i>Staphylococcus auricularis</i>	G6148
<i>Staphylococcus capitis</i>	G4979
<i>Staphylococcus capitis</i>	G5664
<i>Staphylococcus capitis</i>	G6108
<i>Staphylococcus capitis</i>	G6140
<i>Staphylococcus capitis</i>	G6241
<i>Staphylococcus capitis</i>	G5183
<i>Staphylococcus cohnii</i>	G4985
<i>Staphylococcus cohnii</i>	G5184
<i>Staphylococcus cohnii</i>	G5185
<i>Staphylococcus cohnii</i> ssp. <i>cohnii</i>	G5257
<i>Staphylococcus cohnii</i> ssp. <i>urealyticus</i>	G5256
<i>Staphylococcus condimenti</i>	G6119
<i>Staphylococcus condimenti</i>	G4988
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	G5182
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	G4890
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	G4990
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	G4983

Spezies (Fortsetzung Anhang 2)	Stamm (G-Nr.)
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	G4987
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	G5186
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	G5192
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	G6124
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	G6135
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	G6139
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	G6710
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	G4756
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	G6129
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	G6146
<i>Staphylococcus hominis</i>	G6136
<i>Staphylococcus hominis</i>	G5187
<i>Staphylococcus hominis</i>	G4755
<i>Staphylococcus hominis</i>	G6116
<i>Staphylococcus hominis</i>	G6145
<i>Staphylococcus hominis</i>	G6149
<i>Staphylococcus hominis</i>	G6707
<i>Staphylococcus hominis</i>	G6708
<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	G4974
<i>Staphylococcus nepalensis</i>	G4973
<i>Staphylococcus nepalensis</i>	G6109
<i>Staphylococcus pasteurii</i>	G6113
<i>Staphylococcus pasteurii</i>	G4757
<i>Staphylococcus pasteurii</i>	G5250
<i>Staphylococcus pettenkoferi</i>	G6131
<i>Staphylococcus pettenkoferi</i>	G6675
<i>Staphylococcus pettenkoferi</i>	G6677
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	G4976
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	G6121
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	G6147
<i>Staphylococcus</i> sp. nov. ¹	G6626
<i>Staphylococcus</i> sp. nov. ¹	G6120
<i>Staphylococcus</i> sp. nov. ¹	G6137
<i>Staphylococcus warneri</i>	G6138
<i>Staphylococcus xylosum</i>	G5191
<i>Staphylococcus xylosum</i>	G6133
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	G6115
<i>Streptococcus equi</i>	G6111
<i>Streptococcus equi</i>	G5190
<i>Streptococcus equi</i> ssp. <i>zooepidemicus</i>	G5227
<i>Streptococcus pyogenes</i>	G5255
<i>Streptococcus salivarius</i>	G5258
<i>Vagococcus fluvialis</i>	G4885

Anhang 3 Zusammensetzung der FTIR-Spektrendatenbank für sporenbildende Bakterien. ¹Anzahl eindeutig identifizierter Spezies, ²Anteil an Stämmen unbekannter Spezies, ³Anteil an Spektren unbekannter Spezies.

Gattung	Spezies ¹	Stämme	U-Stämme ² [%]	Spektren	U-Spektr. ³ [%]
<i>Aneurinibacillus</i>	1	3	0,0	4	0,0
<i>Bacillus</i>	54	386	4,7	467	4,3
<i>Brevibacillus</i>	8	31	3,2	43	2,3
<i>Geobacillus</i>	1	2	0,0	3	0,0
<i>Gracilibacillus</i>	-	1	100,0	1	100,0
Gram-neg. Bakterium	-	4	100,0	4	100,0
<i>Lysinibacillus</i>	2	17	0,0	21	0,0
<i>Ornithinibacillus</i>	1	1	0,0	2	0,0
<i>Paenibacillus</i>	25	80	11,3	112	8,9
<i>Solibacillus</i>	1	6	0,0	6	0,0
<i>Sporolactobacillus</i>	1	1	0,0	2	0,0
<i>Sporosarcina</i>	6	14	0,0	19	0,0
<i>Terribacillus</i>	1	1	0,0	3	0,0
<i>Virgibacillus</i>	1	2	0,0	3	0,0
<i>Viridibacillus</i>	1	1	0,0	1	0,0
Gesamt	103	550	6,4	691	5,2

Anhang 4 Zusammensetzung der FTIR-Spektrendatenbank für aerobe, Gram-positive, mesophile, nicht-sporenbildende Bakterien. ¹Anzahl eindeutig identifizierter Spezies, ²Anteil an Stämmen unbekannter Spezies, ³Anteil an Spektren unbekannter Spezies, ⁴Stamm mit > 6% 16S rRNA-Gensequenzunterschied zur ähnlichsten valide beschriebenen Spezies.

Gattung	Spezies ¹	Stämme	U-Stämme ² [%]	Spektren	U-Spektr. ³ [%]
<i>Actinobacterium</i>	-	1	100,0	1	100,0
<i>Actinobaculum</i>	-	1	100,0	1	100,0
<i>Actinomyces</i>	1	2	0,0	2	0,0
<i>Aerococcus</i>	2	10	0,0	10	0,0
<i>Aeromicrobium</i>	1	3	0,0	3	0,0
<i>Agreia</i>	2	8	0,0	8	0,0
<i>Agrococcus</i>	1	2	0,0	2	0,0
<i>Agromyces</i>	4	8	0,0	8	0,0
<i>Arthrobacter</i>	26	185	21,6	197	21,8
<i>Bavariicoccus</i>	1	8	0,0	8	0,0
<i>Beutenbergia</i>	1	2	0,0	2	0,0
<i>Brachybacterium</i>	8	42	9,5	43	9,3
<i>Brevibacterium</i>	9	147	2,0	152	2,0
<i>Brochothrix</i>	2	3	0,0	3	0,0
<i>Cellulomonas</i>	9	16	0,0	17	0,0
<i>Cellulosimicrobium</i>	1	13	0,0	13	0,0
<i>Clavibacter</i>	1	39	0,0	39	0,0
<i>Corynebacterium</i>	38	252	3,6	258	3,5
Coryneformes Bakterium	-	5	100,0	5	100,0
<i>Curtobacterium</i>	5	53	1,9	53	1,9

Gattung (Fortsetzung Anhang 4)	Spezies¹	Stämme	U-Stämme² [%]	Spektren	U-Spektr.³ [%]
<i>Deinococcus</i>	1	1	0,0	1	0,0
<i>Demetria</i>	1	1	0,0	1	0,0
<i>Dermabacter</i>	1	4	0,0	4	0,0
<i>Dermacoccus</i>	1	2	0,0	2	0,0
<i>Dermatophilus</i>	1	1	0,0	1	0,0
<i>Dietzia</i>	5	12	8,3	12	8,3
<i>Enterococcus</i>	14	43	2,3	44	2,3
<i>Exiguobacterium</i>	4	29	27,6	34	23,5
<i>Frigoribacterium</i>	1	3	33,3	5	60,0
Gen.nov. ⁴	-	5	100,0	5	100,0
<i>Gordonia</i>	11	24	0,0	30	0,0
<i>Halomonas</i>	1	2	0,0	2	0,0
<i>Intrasporangium</i>	1	1	0,0	1	0,0
<i>Janibacter</i>	2	7	0,0	7	0,0
<i>Jeotgalicoccus</i>	2	2	0,0	2	0,0
<i>Jonesia</i>	1	1	0,0	2	0,0
<i>Kocuria</i>	7	62	1,6	65	1,5
<i>Kurthia</i>	2	9	11,1	9	11,1
<i>Kytococcus</i>	2	10	0,0	10	0,0
<i>Lactococcus</i>	3	15	0,0	17	0,0
<i>Leifsonia</i>	3	6	33,3	6	33,3
<i>Leucobacter</i>	2	3	33,3	3	33,3
<i>Leuconostoc</i>	1	1	0,0	1	0,0
<i>Listeria</i>	1	1	0,0	1	0,0
<i>Luteococcus</i>	1	1	0,0	1	0,0
<i>Macrococcus</i>	2	12	0,0	12	0,0
<i>Microbacterium</i>	26	194	11,9	201	11,4
<i>Micrococcus</i>	5	47	6,4	52	5,8
<i>Mycobacterium</i>	5	14	50,0	14	50,0
<i>Nesterenkonia</i>	3	3	0,0	3	0,0
<i>Nocardia</i>	5	6	0,0	6	0,0
<i>Nocardioides</i>	1	3	0,0	3	0,0
<i>Ornithinicoccus</i>	1	2	0,0	2	0,0
<i>Ornithinimicrobium</i>	1	1	0,0	1	0,0
<i>Pediococcus</i>	1	3	0,0	5	0,0
<i>Planococcus</i>	2	3	33,3	3	33,3
<i>Planomicrobium</i>	1	2	50,0	2	50,0
<i>Plantibacter</i>	-	13	100,0	15	100,0
<i>Promicromonospora</i>	3	3	0,0	3	0,0
<i>Propionibacterium</i>	3	5	0,0	5	0,0
<i>Pseudoclavibacter</i>	1	4	25,0	4	25,0
<i>Psychrobacter</i>	1	1	0,0	1	0,0
<i>Rathayibacter</i>	6	16	0,0	17	0,0
<i>Rhodococcus</i>	12	109	5,5	116	5,2
<i>Rothia</i>	4	15	0,0	15	0,0
<i>Sanguibacter</i>	3	4	0,0	4	0,0
<i>Staphylococcus</i>	36	442	1,6	497	1,4
<i>Streptococcus</i>	11	16	0,0	16	0,0
<i>Terrabacter</i>	1	2	0,0	2	0,0
<i>Terracoccus</i>	1	1	0,0	1	0,0
<i>Tessaracoccus</i>	1	3	0,0	3	0,0
<i>Tetrasphaera</i>	1	2	0,0	2	0,0
<i>Trichococcus</i>	4	4	0,0	4	0,0

Gattung (Fortsetzung Anhang 4)	Spezies ¹	Stämme	U-Stämme ² [%]	Spektren	U-Spekt. ³ [%]
<i>Tsukamurella</i>	5	6	0,0	7	0,0
<i>Turicella</i>	1	1	0,0	1	0,0
<i>Vagococcus</i>	3	10	0,0	11	0,0
<i>Xenophilus</i>	1	1	0,0	1	0,0
<i>Zimmermannella</i>	-	1	100,0	1	100,0
Gesamt	332	1995	7,4	2121	7,3

Anhang 5 Validierung der FTIR-Spektrendatenbank für Sporenbildende Bakterien nach der Leave-one-out-Methode. [#]Mittelwerte des Anteils an korrekt identifizierten Spektren pro Spezies in Abhängigkeit der Anzahl an, in der Datenbank enthaltenen, Spektren pro Spezies. ^{*}Anteil der korrekt identifizierten Spektren an allen 570 Spektren (kein Mittelwert).

Stämme/Spezies	Spezies	Stämme	Spektren	Korrekt identifiziert [%] [#]
2	22	44	58	12,2
3	7	21	35	45,2
4	5	20	36	44,0
5	5	25	24	10,5
6	3	18	20	35,7
7	1	7	7	71,4
8	2	16	19	68,9
10	3	30	38	61,1
13	1	13	17	76,5
14	1	14	15	66,7
18	1	18	23	60,9
21	1	21	26	53,8
28	1	28	32	62,5
36	1	36	37	94,6
48	1	48	53	76,9
50	1	50	58	67,2
62	1	62	72	84,7
-	57	471	570	58,4*

Anhang 6 Validierung der FTIR-Spektrendatenbank für aerobe, mesophile, Gram-Positive, nicht-sporenbildende Bakterien nach der Leave-one-out-Methode. [#]Mittelwerte des Anteils an korrekt identifizierten Spektren pro Spezies in Abhängigkeit der Anzahl an, in der Datenbank enthaltenen, Spektren pro Spezies. ^{*}Anteil der korrekt identifizierten Spektren an allen 1806 Spektren (kein Mittelwert).

Stämme/Spezies	Spezies	Stämme	Spektren	Korrekt identifiziert [%] [#]
2	54	108	115	23,5
3	33	99	109	42,5
4	16	64	70	48,4
5	9	45	45	53,3
6	10	60	61	51,6
7	6	42	43	65,2
8	7	56	58	51,2

Stämme/Spezies (Fortsetzung Anhang 6)	Spezies	Stämme	Spektren	Korrekt identifiziert [%] [#]
9	6	54	55	65,2
10	8	80	82	61,6
11	3	33	33	63,6
12	5	60	63	51,3
13	1	13	13	84,6
14	2	28	32	25,0
15	2	30	36	78,1
16	1	16	17	29,4
17	1	17	18	94,4
19	1	19	24	100,0
25	1	25	27	70,4
26	1	26	28	53,6
27	1	27	31	61,3
30	2	60	62	47,2
33	1	33	38	60,1
36	2	72	80	77,6
38	2	76	88	66,3
39	1	39	39	97,4
42	1	42	47	87,2
43	1	43	43	90,7
49	1	49	49	93,9
55	1	55	56	55,4
62	1	62	64	68,8
66	1	66	72	84,7
84	1	84	87	92,0
116	1	116	121	93,4
-	184	1699	1806	64,7*

Anhang 7 Ergebnisse der Identifizierung von 70 Gram-positiven, sporenbildenden Bakterien durch die FTIR-Spektroskopie und das API 50CHB/ API 20NE Identifizierungssystem. G-Nr., Stammsammlung der Abteilung Mikrobiologie, ZIEL Weihenstephan, Freising, Deutschland; K, Korrekt identifiziert; N, Nicht identifizierbar; Grau hinterlegt, Falsch identifiziert; *Richtig identifiziert auf Gattungsebene; ¹ Spezies die nicht in der API-Datenbank enthalten war; ² Spezies die in den Datenbanken beider Identifizierungssysteme nicht enthalten war; ³ Stämme mit > 3% 16S rRNA-Gensequenzunterschied zur ähnlichsten, zum Zeitpunkt der Durchführung dieser Arbeit valide beschriebenen Spezies; U.a. anhand dieser beiden Stämme wurde mittlerweile die Spezies *Bacillus kochii* neu beschrieben (Seiler, et al. 2012a) - Nicht in der API-Datenbank enthalten – Die FTIR-Datenbank enthielt ein Spektrum eines Stammes mit identischer 16S rRNA Gensequenz – Die Identifizierungsergebnisse für diesen Stamm wurden in keiner der Kategorien (K, F, N) gewertet; ^c *Bacillus cereus*-Gruppe: *B. cereus*, *B. anthracis*, *B. thuringensis*, *B. mycoides*, *B. pseudomycooides*, und *B. weihenstephanensis*; ^s *Bacillus subtilis*-Gruppe: *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. atrophaeus*, *B. mojavensis*, *B. vallismortis* und *B. velezensis*.

Stamm (G-Nr.)	Spezies	FTIR	API
5705	<i>B. cereus</i> ^c	K	K
5703	<i>B. cereus</i> ^c	K	K
5710	<i>B. cereus</i> ^c	K	K
5689	<i>B. cereus</i> ^c	K	K
5688	<i>B. cereus</i> ^c	K	K

Stamm (G-Nr.) (Fortsetzung Anhang 7)	Spezies	FTIR	API
5707	<i>B. cereus</i> ^c	K	K
5711	<i>B. cereus</i> ^c	K	K
5693	<i>B. cereus</i> ^c	K	K
5691	<i>B. cereus</i> ^c	K	<i>Br. laterosporus</i>
5694	<i>B. cereus</i> ^c	K	<i>Br. laterosporus</i>
5692	<i>B. cereus</i> ^c	K	K
6476	<i>B. cereus</i> ^c	K	<i>Br. laterosporus</i>
6477	<i>B. cereus</i> ^c	K	K
5736	<i>B. circulans</i>	K	<i>B. lentus</i> *
5726	<i>B. circulans</i>	K	<i>B. lentus</i> *
5732	<i>B. circulans</i>	K	N
5730	<i>B. circulans</i>	K	<i>B. lentus</i> *
5722	<i>B. circulans</i>	K	N
5724	<i>B. circulans</i>	K	<i>B. lentus</i> *
5739	<i>B. circulans</i>	K	<i>B. lentus</i> *
5735	<i>B. circulans</i>	<i>B. pumilus</i> *	<i>B. lentus</i> *
5695	<i>B. clausii</i> ¹	K	N
5738	<i>B. flexus</i> ¹	K	<i>G. stearothermophilus</i>
5741	<i>B. flexus</i> ¹	K	<i>G. stearothermophilus</i>
5721	<i>B. licheniformis</i>	K	K
6479	<i>B. licheniformis</i>	K	N
6491	<i>B. licheniformis</i>	K	N
6498	<i>B. licheniformis</i>	K	K
6535	<i>B. licheniformis</i>	K	N
6451	<i>B. megaterium</i>	K	K
6490	<i>B. megaterium</i>	<i>B. cereus</i> *	K
6497	<i>B. megaterium</i>	K	<i>G. stearothermophilus</i>
5742	<i>B. mycooides</i> ^c	K	K
5725	<i>B. pumilus</i>	K	K
5737	<i>B. pumilus</i>	K	N
5704	<i>B. pumilus</i>	K	K
5687	<i>B. pumilus</i>	K	K
5729	<i>B. pumilus</i>	K	K
6484	<i>B. pumilus</i>	K	K
6499	<i>B. pumilus</i>	K	<i>A. aneurinilyticus</i>
6501	<i>B. pumilus</i>	K	K
6532	<i>B. pumilus</i>	K	K
5709	<i>B. simplex</i> ¹	K	N*
5718	<i>B. simplex</i> ¹	K	N*
5700	<i>B. subtilis</i> ^s	<i>B. pumilus</i> *	K
5719	<i>B. subtilis</i> ^s	K	K
5713	<i>B. subtilis</i> ^s	K	K
5740	<i>B. subtilis</i> ^s	K	K
5696	<i>B. subtilis</i> ^s	K	K
5715	<i>B. subtilis</i> ^s	K	K
5714	<i>B. subtilis</i> ^s	K	K
5712	<i>B. subtilis</i> ^s	K	K

Stamm (G-Nr.) (Fortsetzung Anhang 7)	Spezies	FTIR	API
5723	<i>B. subtilis</i> ^s	K	K
6492	<i>B. subtilis</i> ^s	K	K
5699	<i>B. subtilis</i> / <i>amyloliquefaciens</i> ^s	K	K
5702	<i>B. subtilis</i> / <i>amyloliquefaciens</i> ^s	<i>B. pumilus</i> *	K
6488	<i>B. subtilis</i> ^s	K	K
5690	<i>B. sp. nov.</i> ³	(<i>B. sp. nov.</i> , G6821) ³	(N*) ³
5734	<i>P. lautus</i>	<i>P. amylolyticus</i> *	<i>P. polymyxa</i> *
5698	<i>P. gluconolyticus</i>	K	<i>P. amylolyticus</i> *
5727	<i>P. gluconolyticus</i>	N*	<i>B. lentus</i>
5697	<i>P. gluconolyticus</i>	K	K
5701	<i>P. gluconolyticus</i>	K	K
5708	<i>P. gluconolyticus</i>	K	<i>P. amylolyticus</i> *
5717	<i>P. gluconolyticus</i>	K	<i>P. amylolyticus</i> *
5731	<i>P. gluconolyticus</i>	K	<i>P. amylolyticus</i> *
5720	<i>P. illinoisensis</i> ²	<i>P. gluconolyticus</i> *	<i>P. lautus</i> *
5728	<i>P. illinoisensis</i> ²	<i>P. amylolyticus</i> *	<i>P. polymyxa</i> *
5706	<i>P. lautus</i>	N*	<i>P. polymyxa</i> *
5733	<i>T. goriensis</i> ¹	<i>B. pumilus</i>	N

Anhang 8 Ergebnisse der Identifizierung von 170 Gram-positiven Kokken durch die FTIR-Spektroskopie und das API ID 32 STAPH Identifizierungssystem. G-Nr., Stammsammlung der Abteilung Mikrobiologie, ZIEL Weihenstephan, Freising, Deutschland; K, Korrekt identifiziert; N, Nicht identifizierbar; Grau hinterlegt, Falsch identifiziert; *Richtig identifiziert auf Gattungsebene; ¹ Spezies die nicht in der API-Datenbank enthalten war; ² Spezies die in den Datenbanken beider Identifizierungssysteme nicht enthalten war.

Stamm (G-Nr.)	Spezies	FTIR	API
5683	<i>B. conglomeratum</i> <i>/paraconglomeratum</i> ¹	K	<i>D. nishinomiyaensis</i>
5624	<i>K. palustris</i> ¹	K	<i>K. varians</i> *
5586	<i>K. palustris</i> ¹	K	<i>K. rosea</i> *
6511	<i>K. palustris</i> ¹	N*	<i>K. rosea</i> *
6519	<i>K. palustris</i> ¹	K	<i>K. rosea</i> *
5673	<i>K. rhizophila</i> ¹	K	<i>S. auricularis</i>
5619	<i>K. rhizophila</i> ¹	K	<i>K. kristinae</i> *
5620	<i>K. rhizophila</i> ¹	K	<i>S. auricularis</i>
6500	<i>K. rhizophila</i> ¹	K	<i>M. luteus</i>
6505	<i>K. rhizophila</i> ¹	K	<i>M. luteus</i>
6506	<i>K. rhizophila</i> ¹	K	<i>M. luteus</i>
6523	<i>K. rhizophila</i> ¹	K	<i>M. luteus</i>
6530	<i>K. rhizophila</i> ¹	K	<i>M. luteus</i>
6531	<i>K. rhizophila</i> ¹	K	<i>D. nishinomiyaensis</i>
5666	<i>M. luteus</i>	K	<i>M. lylae</i> *

Stamm (G-Nr.) (Fortsetzung Anhang 8)	Spezies	FTIR	API
5654	<i>M. luteus</i>	K	K
5622	<i>M. luteus</i>	K	K
5614	<i>M. luteus</i>	K	K
5659	<i>M. luteus</i>	K	K
5641	<i>M. luteus</i>	K	K
5662	<i>M. luteus</i>	K	K
5663	<i>M. luteus</i>	K	K
5643	<i>M. luteus</i>	K	K
5678	<i>M. luteus</i>	K	K
5679	<i>M. luteus</i>	K	N
5590	<i>M. luteus</i>	K	K
5627	<i>M. luteus</i>	K	K
5628	<i>M. luteus</i>	K	K
5605	<i>M. luteus</i>	K	K
5615	<i>M. luteus</i>	K	<i>M. lylae</i> *
5607	<i>M. luteus</i>	K	<i>M. lylae</i> *
5594	<i>M. luteus</i>	K	K
5601	<i>M. luteus</i>	K	K
5603	<i>M. luteus</i>	K	K
5618	<i>M. luteus</i>	K	K
5655	<i>M. luteus</i>	K	K
5652	<i>M. luteus</i>	K	K
5636	<i>M. luteus</i>	K	K
5638	<i>M. luteus</i>	K	K
5657	<i>M. luteus</i>	K	K
5634	<i>M. luteus</i>	K	<i>M. lylae</i> *
5685	<i>M. luteus</i>	K	<i>D. nishinomiyaensis</i>
5674	<i>M. luteus</i>	K	K
5667	<i>M. luteus</i>	K	<i>M. lylae</i> *
5668	<i>M. luteus</i>	K	<i>M. lylae</i> *
5684	<i>M. luteus</i>	K	N
5675	<i>M. luteus</i>	K	K
6450	<i>M. luteus</i>	K	<i>M. lylae</i> *
6455	<i>M. luteus</i>	K	<i>M. lylae</i> *
6457	<i>M. luteus</i>	K	N
6463	<i>M. luteus</i>	K	<i>M. lylae</i> *
6475	<i>M. luteus</i>	K	K
6481	<i>M. luteus</i>	K	<i>M. lylae</i> *
6486	<i>M. luteus</i>	K	K
6487	<i>M. luteus</i>	K	<i>M. lylae</i> *
6495	<i>M. luteus</i>	K	K
6503	<i>M. luteus</i>	K	K
6508	<i>M. luteus</i>	N	K
6510	<i>M. luteus</i>	K	K
6517	<i>M. luteus</i>	K	<i>M. lylae</i> *
6515	<i>M. terreus</i> ²	N	N
5644	<i>S. aureus</i>	K	K

Stamm (G-Nr.) (Fortsetzung Anhang 8)	Spezies	FTIR	API
6527	<i>S. aureus</i>	K	K
5664	<i>S. capitis</i>	K	<i>K. rosea</i>
5597	<i>S. capitis</i>	K	K
6449	<i>S. capitis</i>	K	<i>K. rosea</i>
6465	<i>S. capitis</i>	K	<i>D. nishinomiyaensis</i>
6472	<i>S. capitis</i>	K	<i>S. auricularis*</i>
6518	<i>S. capitis</i>	K	K
5613	<i>S. cohnii</i>	K	K
5682	<i>S. cohnii</i>	K	K
5625	<i>S. cohnii</i>	K	N
5661	<i>S. cohnii</i>	K	K
6471	<i>S. devriese²</i>	<i>K. rosea</i>	<i>K. rosea</i>
5606	<i>S. epidermidis</i>	K	K
5645	<i>S. epidermidis</i>	K	<i>S. capitis*</i>
5677	<i>S. epidermidis</i>	K	K
5671	<i>S. epidermidis</i>	K	<i>K.rosea</i>
5598	<i>S. epidermidis</i>	K	K
5611	<i>S. epidermidis</i>	K	<i>S. capitis*</i>
5609	<i>S. epidermidis</i>	K	K
5600	<i>S. epidermidis</i>	K	K
5587	<i>S. epidermidis</i>	K	K
5599	<i>S. epidermidis</i>	K	K
5591	<i>S. epidermidis</i>	K	K
5604	<i>S. epidermidis</i>	K	K
5649	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. hominis*</i>	K
5648	<i>S. epidermidis</i>	K	K
5676	<i>S. epidermidis</i>	K	<i>S. capitis*</i>
5670	<i>S. epidermidis</i>	K	<i>S. capitis*</i>
6445	<i>S. epidermidis</i>	N*	K
6453	<i>S. epidermidis</i>	K	<i>K. rosea</i>
6461	<i>S. epidermidis</i>	K	<i>S. capitis*</i>
6462	<i>S. epidermidis</i>	K	K
6464	<i>S. epidermidis</i>	N*	<i>S. capitis*</i>
6466	<i>S. epidermidis</i>	K	<i>K. rosea</i>
6467	<i>S. epidermidis</i>	N*	<i>S. hominis*</i>
6468	<i>S. epidermidis</i>	N*	<i>S. capitis*</i>
6470	<i>S. epidermidis</i>	N*	K
6478	<i>S. epidermidis</i>	K	K
6480	<i>S. epidermidis</i>	K	K
6482	<i>S. epidermidis</i>	K	<i>S. capitis*</i>
6483	<i>S. epidermidis</i>	K	<i>S. capitis*</i>
6485	<i>S. epidermidis</i>	K	K
6493	<i>S. epidermidis</i>	N*	K
6502	<i>S. epidermidis</i>	K	K
6509	<i>S. epidermidis</i>	K	K
6513	<i>S. epidermidis</i>	K	K
6524	<i>S. epidermidis</i>	K	K

Stamm (G-Nr.) (Fortsetzung Anhang 8)	Spezies	FTIR	API
6529	<i>S. epidermidis</i>	K	K
6539	<i>S. epidermidis</i>	K	<i>S. hominis</i> *
5658	<i>S. haemolyticus</i>	<i>S. hominis</i> *	<i>K. kristinae</i> *
5681	<i>S. haemolyticus</i>	<i>S. hominis</i> *	<i>S. capitis</i> *
5642	<i>S. haemolyticus</i>	N*	<i>M. lylae</i>
5635	<i>S. haemolyticus</i>	K	N
6448	<i>S. haemolyticus</i>	N*	<i>M. lylae</i>
6454	<i>S. haemolyticus</i>	K	K
6521	<i>S. haemolyticus</i>	K	K
5656	<i>S. hominis</i>	K	K
5637	<i>S. hominis</i>	K	<i>M. luteus</i>
5650	<i>S. hominis</i>	<i>S. warneri</i> *	<i>S. warneri</i> *
5640	<i>S. hominis</i>	K	K
5616	<i>S. hominis</i>	N*	<i>S. epidermidis</i> *
5632	<i>S. hominis</i>	K	<i>M. luteus</i>
5596	<i>S. hominis</i>	K	<i>S. capitis</i> *
5588	<i>S. hominis</i>	<i>S. warneri</i> *	<i>S. warneri</i> *
5631	<i>S. hominis</i>	K	<i>K. rosea</i>
5602	<i>S. hominis</i>	K	<i>S. capitis</i> *
5608	<i>S. hominis</i>	K	K
5592	<i>S. hominis</i>	K	<i>S. capitis</i> *
5595	<i>S. hominis</i>	K	<i>M. luteus</i>
5651	<i>S. hominis</i>	K	<i>S. epidermidis</i> *
5653	<i>S. hominis</i>	K	<i>S. epidermidis</i> *
6446	<i>S. hominis</i>	K	<i>K. rosea</i>
6452	<i>S. hominis</i>	N*	<i>K. rosea</i>
6458	<i>S. hominis</i>	K	K
6459	<i>S. hominis</i>	K	<i>K. rosea</i>
6460	<i>S. hominis</i>	K	<i>K. rosea</i>
6494	<i>S. hominis</i>	K	<i>K. rosea</i>
6496	<i>S. hominis</i>	K	<i>K. rosea</i>
6504	<i>S. hominis</i>	K	<i>K. rosea</i>
6507	<i>S. hominis</i>	N*	<i>K. rosea</i>
6516	<i>S. hominis</i>	N*	<i>K. rosea</i>
6520	<i>S. hominis</i>	K	<i>M. luteus</i>
6522	<i>S. hominis</i>	N*	<i>K. rosea</i>
6525	<i>S. hominis</i>	K	N
6526	<i>S. hominis</i>	K	N
6528	<i>S. hominis</i>	<i>S. epidermidis</i> *	<i>K. rosea</i>
6533	<i>S. hominis</i>	N*	N
6534	<i>S. hominis</i>	<i>S. epidermidis</i> *	<i>K. rosea</i>
6536	<i>S. hominis</i>	K	K
6537	<i>S. hominis</i>	N*	<i>K. rosea</i>
6538	<i>S. hominis</i>	N*	N
6540	<i>S. hominis</i>	<i>S. epidermidis</i> *	<i>S. capitis</i> *
6541	<i>S. hominis</i>	K	<i>M. luteus</i>
5672	<i>S. lugdunensis</i>	K	N

Stamm (G-Nr.) (Fortsetzung Anhang 8)	Spezies	FTIR	API
5610	<i>S. lugdunensis</i>	K	K
5617	<i>S. pasteurii</i> ¹	K	<i>S. warneri</i> *
5633	<i>S. pasteurii</i> ¹	N*	<i>S. warneri</i> *
5612	<i>S. pettenkoferi</i> ¹	N*	<i>K. rosea</i>
5647	<i>S. saprophyticus</i>	K	K
5639	<i>S. saprophyticus</i>	K	N
5665	<i>S. saprophyticus</i>	K	K
5680	<i>S. saprophyticus</i>	<i>S. hominis</i> *	<i>S. hominis</i> *
5669	<i>S. saprophyticus</i>	K	<i>M. luteus</i>
5629	<i>S. saprophyticus</i>	N*	<i>K. varians</i>
5589	<i>S. saprophyticus</i>	K	K
5630	<i>S. warneri</i>	N*	<i>M. luteus</i>
5593	<i>S. warneri</i>	<i>S. capitis</i> *	K
5623	<i>S. warneri</i>	N*	K

Anhang 9 Primer zur Amplifizierung und Sequenzierung von *recA*-Genfragmenten von *Micrococcus* spp. und die, dem Primerdesign zugrunde liegenden, Sequenzen (5'-3'). Abschnitt von 580bp-610bp (A), 305bp-335bp (B), 845bp-875bp (C) innerhalb des *recA*-Gens von *M. luteus* (NC012803). * Primer: „Reverse/Complement“

A

Primer 606Fw	AGATCGGCGTGTTCCTCGGC
<i>M.luteus</i>	CGCGAGAAGATCGGCGTGTTCCTCGGCTCCC
<i>M.yunnanensis</i>	CGCGAGAAGATCGGCGTGTTCCTCGGCTCCC
<i>M.flavus</i>	CGCGAGAAGATCGGCGTGTTCCTCGGCTCCC
<i>M.lylae</i>	CGCGAGAAGATCGGCGTGTTCCTCGGCTCGC
WS 4599	CGCGAGAAGATCGGCGTGTTCCTCGGCTCGC
WS 4601 ^T	CGCGAGAAGATCGGCGTGTTCCTCGGCTCGC
WS 4602	CGCGAGAAGATCGGCGTGTTCCTCGGCTCGC

B

<i>M.luteus</i>	CCCGCAAGCTCGGGGTGGACACGGACGCCCT
<i>M.yunnanensis</i>	CCCGCCAGCTCGGGGTGGACACGGACGCCCT
<i>M.flavus</i>	CCCGCAAGCTCGGGGTGGACACGGACGCCCT
<i>M.lylae</i>	CCCGCAAGCTCGGGGTGGACACGGACGCCCT
WS 4599	CCCGCAAGCTCGGGGTGGACACGGACGCCCT
WS 4601 ^T	CCCGCAAGCTCGGGGTGGACACGGACGCCCT
WS 4602	CCCGCAAGCTCGGGGTGGACACGGACGCCCT
Primer 307Rev*	CGCAAGCTCGGSGTGGACAC
Primer 307Rev	GTGTCCACSCCGAGCTTGCG

C

<i>M.luteus</i>	TCAAGAAGTCCGGCGCGTGGTTCACCTATGA
<i>M.yunnanensis</i>	TCAAGAAGTCCGGCGCGTGGTTCACCTATGA
<i>M.flavus</i>	TCAAGAAGTCCGGCGCGTGGTTCACCTATGA
<i>M.lylae</i>	TGCGCAAGTCCGGTGCCTGGTTCACCTATGA
WS 4599	TCAAGAAGTCCGGTGCATGGTTCACCTACGA
WS 4601 ^T	TCAAGAAGTCCGGTGCATGGTTCACCTACGA
WS 4602	TCAAGAAGTCCGGTGCATGGTTCACCTACGA
Primer 870Rev*	TCCGGYGCVTGGTTCACC
Primer 870Rev	GGTGAACCBGCRCCGGA

Anhang 10 Erkennungsnummern von hinterlegten Stämmen und Gensequenzen von Stämmen der Spezies *Micrococcus cohnii* sp. nov.

***Micrococcus cohnii* sp. nov.**

Stamm	Stammsammlung		EMBL Gensequenz-Datenbank	
	DSMZ	LMG	16S rRNA-Gen	<i>recA</i> -Gen
WS4601 ^T	DSM 23974 ^T	LMG 26183 ^T	FR832424	FR832427
WS4602	-	-	-	FR832429

Anhang 11 Erkennungsnummern von hinterlegten Stämmen und Gensequenzen von Stämmen der Spezies *Naumannella halotolerans* gen. nov., sp. nov.

***Naumannella halotolerans* gen. nov., sp. nov.**

Stamm	Stammsammlung		EMBL Gensequenz-Datenbank	
	DSMZ	LMG	16S rRNA-Gen	<i>recA</i> -Gen
WS4616 ^T	DSM 24323 ^T	LMG 26184 ^T	FR832425	FR832431
WS4617	-	-	FR832426	FR832432
WS4623	-	-	HE660046	HE660048
WS4624	-	-	HE660047	HE660049