

**Untersuchung der
Kälteanpassungsmechanismen
bakterieller Zellmembranen**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Grades

Doctor throphologiae

(Dr. troph.)

der Landwirtschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt am 14. August 2014

von

Julia Derichs geb. Krüger

aus Dormagen

Referent: Professor Dr. André Lipski

Korreferent: Professor Dr. Andreas Schieber

Tag der mündlichen Prüfung: 9. Februar 2015

Erscheinungsjahr: 2015

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	VI
Kurzfassung.....	VIII
Abstract	IX
Veröffentlichungen.....	X
1. Einführung	1
1.1 Definition Psychrophilie/Psychrotoleranz.....	2
1.1.1 Psychrophile und psychrotolerante Mikroorganismen in der Lebensmittelindustrie.....	3
1.2 Aufbau der Plasmamembran / Das Flüssig-Mosaik-Modell / Funktionen	4
1.3 Fettsäuren in der Zellmembran.....	8
1.3.1 Nomenklatur der Fettsäuren	8
1.3.2 Fettsäurezusammensetzung in der Kälteanpassung.....	9
1.4 sonstige Lipide in der Zellmembran	11
1.4.1 Chinone	12
1.4.2 Carotinoide	15
1.4.3 Weitere Mechanismen in der Kälteanpassung von Bakterien.....	18
1.5 Ziel der Arbeit.....	19
2. Material und Methoden	20
2.1 Herkunft der Bakterienisolate	20
2.2 Verwendete Medien und Kultivierung der Bakterien	23
2.3 Makroskopische und mikroskopische Morphologiebeschreibung.....	23
2.4 Temperaturtoleranztest	23
2.5 Salzkonzentrationstest	23
2.6 Molekularbiologische Methoden	24
2.6.1 Molekularbiologische Identifizierungen anhand von 16S rRNA-Gen- Sequenzanalysen	24

2.6.2 Molekulare Phylogenie-Analyse	26
2.6.3 DNA-DNA Hybridisierung	26
2.7 Chemotaxonomische Methoden	27
2.7.1 Fettsäureanalysen	27
2.7.2 Chinonanalysen	28
2.7.3 Kombinierte polare Lipid- und Chinonanalyse	30
2.7.4 Carotinoideextraktion	31
2.8 Messungen des Zellertrages	34
2.8.1 Messung des Wachstumsverhaltens mittels optischer Dichte	34
2.8.2 Messung des Proteingehaltes	34
2.9 Kälteresistenztest	36
2.10 Überlebenstest - Zellertragsmessung bei 10°C und 30°C in einem Modelllebensmittel.....	36
2.11 Physiologisches Reaktionsprofil	37
3. Ergebnisse	38
3.1 Makroskopische und mikroskopische Isolatbeschreibung	38
3.2 Identifizierung mittels 16S rRNA-Gen Sequenzierung	45
3.2.1 Phylogenetische Beziehung der kälteangepassten Isolate	47
3.3 Neubeschreibung Isolat J22	50
3.3.1 Makroskopische und mikroskopische Zellmorphologie	50
3.3.2 Temperatur- und Salztoleranztest	50
3.3.3 Chemotaxonomische Beschreibung.....	51
3.3.4 physiologisches Reaktionsprofil	53
3.3.5 Molekulare Phylogenie-Analyse und DNA-DNA-Hybridisierung	54
3.3.6 Namensgebung.....	54
3.4 Fettsäuremuster bei 10°C- und 30°C-Inkubation	56
3.5 Chinonmuster und -gehalt bei 10°C- und 30°C-Inkubation	66
3.5.1 Qualitative Chinonanalyse.....	66
3.5.2 Quantitative Chinonanalyse	69

3.6 Carotinoidgehalt bei 10°C- und 30°C-Inkubation	74
3.7 Wachstumsverhalten.....	79
3.7.1 Wachstumsverlauf einzelner Isolate bei 10°C- und 30°C- Inkubationstemperatur	79
3.7.2 Wachstumsverhalten einzelner Isolate bei 10°C und 30°C im Vergleich zu Typ- bzw. Referenzstämmen	82
3.7.3. Exponentielle Wachstumsraten und maximale OD-Werte	85
3.8 Zelldichte.....	86
3.9 Kälteresistenztest <i>Listeria monocytogenes</i>	88
3.10 Überlebenstest bei 10°C und 30°C in einem Modelllebensmittel	89
4 Diskussion	91
4.1 Isolierung kälteangepasster Bakterien.....	91
4.2 Neubeschreibung <i>Pedobacter nutrimenti</i> J22 ^T	91
4.3 Fettsäurebewertung	93
4.3.1 Taxonomische Bedeutung	93
4.3.2 Bewertung der Fettsäuremuster in der Kälteanpassung.....	94
4.4 Chinone.....	96
4.4.1 Taxonomische Bedeutung der Chinone	96
4.4.2 Chinone in der Kälteanpassung	99
4.5 Carotinoide.....	102
4.5.1 Carotinoide in Bakterien.....	102
4.5.2 Carotinoide in der Kälteanpassung	103
4.6 Zelldichte und Wachstumsverhalten	106
4.7 Kälteresistenztest und Überlebenstest <i>Listeria monocytogenes</i>	108
5. Zusammenfassung	111
6. Literaturverzeichnis.....	113
8. Danksagung	143

Abkürzungsverzeichnis

ATCC	American Type Culture Collection
bp	Basenpaare
CCUG	Culture Collection, University of Göteborg, Sweden
CSP	cold shock proteins
c/t	<i>cis/trans</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DSMZ	Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
ECL	Equivalent Chain Length
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
g	Einheit der Erdbeschleunigung (~ 9,81 m/s ²)
GC	Gaschromatographie
FS	Fettsäure
h	Stunden
HP	Hewlett-Packard
HTA	Hefeextrakt Trypton Soja Agar
HTB	Hefeextrakt Trypton Soja Bouillon
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
IAM	IAM Culture Collection, University of Tokyo
IFO	Institute for Fermentation Osaka
M	molar
mM	milli-Molar
mAU*s	milli-Absorbance-Units pro Sekunde
MK	Menachinon
MTK	Methionachinon
MS	Massenspektrometrie
N	Normalität
OD	Optische Dichte
PCR	Polymerase Chain Reaction
pmol	Pikomol
PQ	Plastochinon
Q	Ubichinon
rpm	Rounds per minute

rRNA	Ribosomale Ribonukleinsäure
spp.	Species pluralis
TSA	Trypton Soja Agar
TSB	Trypton Soja Bouillon
U	Unit (Enzymeinheit)
UV	Ultraviolett

Kurzfassung

Die Lebensmittelindustrie versucht stetig, die Haltbarkeit ihrer Produkte zu verlängern, um ihre Produktivität zu optimieren. Dafür verwendet sie auch Kühlungs- und Gefriertechniken. Durch den Einsatz dieser Techniken sollen die für den Menschen pathogenen Mikroorganismen im Lebensmittel absterben bzw. die Anzahl vermindert werden, da ein Wachstum bei niedrigen Temperaturen nicht mehr möglich oder stark verlangsamt ist. Es gibt jedoch auch psychrophile bzw. psychrotolerante Bakterien, die sich in sehr kalten Regionen der Erde an die dort herrschenden Umwelt- und Klimabedingungen evolutiv angepasst haben. Einige dieser kälteadaptierten Bakterien finden optimale Wachstumsvoraussetzungen bei kühl-schrankähnlichen Bedingungen vor. Gelangen diese Bakterien nun mit Lebensmittelrohstoffen in ein Lebensmittel, bietet sich ihnen ein nährstoffreiches Biotop, in dem sie sich gut vermehren können. Zu diesen psychrophilen bzw. psychrotoleranten Bakterien zählen die Gattungen *Listeria*, *Clostridium*, *Yersinia* und einige für den Menschen pathogene *Bacillus*-Stämme.

In dieser Dissertation werden die Kälteanpassungsmechanismen psychrophiler bzw. psychrotoleranter Bakterien näher untersucht. Als Standardmechanismus der Kälteanpassung wird in der herrschenden Literatur die Änderung im Fettsäuremuster innerhalb der bakteriellen Membran definiert, welche sich qualitativ und quantitativ verändern kann. Es gibt aber auch Bakteriengruppen, bei denen dieser Anpassungsmechanismus bei Untersuchungen nicht nachgewiesen werden konnte. Diese Feststellung führt zu der Annahme, dass es weitere Mechanismen der Kälteanpassung bei Bakterien geben muss. Diese sollen im Rahmen der vorliegenden Arbeit gefunden und erläutert werden. Sie konzentriert sich dabei auf die lipophilen Substanzen Chinone und Carotinoide, die Bestandteile der bakteriellen Zellmembran sind. Als Keimquellen dienten lebensmittelassoziierte Habitate.

Diese Arbeit konnte nachweisen, dass bei bestimmten Bakterienarten der Chinongehalt und der Carotinoidgehalt durch Kälteeinfluss verändert wird. Zum Teil kommt es zu einer Erhöhung des Gehaltes, durch den die Kältetoleranz dieser Bakterien erklärt werden kann. Zusätzlich konnte durch diese Arbeit eine erhöhte Zellausbeute bei einer Kühlinkubation gezeigt werden. Dieser Effekt trat nur bei Wildisolaten auf, jedoch nicht bei Referenzstämmen. Die vorliegenden Forschungsergebnisse können in der Lebensmittelindustrie bei der Haltbarmachung von Produkten und in der Medizin angewendet werden. Sie erweitern den Forschungsstand, um besser mit kälteangepassten, potenziell pathogenen Mikroorganismen umzugehen und daraus entstehende Gefahren (für den Menschen) besser beherrschbar zu machen.

Abstract

To increase its productivity, food industry continuously tries to enhance the shelf life of its products. To achieve this objective they employ refrigeration and cooling techniques. These techniques make sure that human-pathogenic microorganisms in food die off or their number decreases because they don't grow at these low temperatures or they grow very slowly. However, there are psychrophilic or psychrotolerant bacteria that have adapted to cold temperatures because of environmental and climate conditions on earth. Some of these cold-adapted bacteria find their growth optimum at refrigerated conditions. Getting in food via e.g. food ingredients these bacteria have a nutrient-rich habitat which allows them to proliferate. These psychrophilic or psychrotolerant bacteria include the genera *Listeria*, *Clostridium*, *Yersinia* and some human-pathogenic *Bacillus*-strains.

This graduate thesis examines the cold adaptation mechanisms of psychrophilic and psychrotolerant bacteria more closely. In literature the qualitatively or quantitatively change in fatty acid pattern inside the bacterial membrane is described as standard mechanism. However, some groups of bacteria obviously don't use this mechanism. This leads to the assumption that other mechanisms exist. The present study tries to find out and explain these mechanisms. The main focus is on the quinones and carotenoids as lipophilic substances that can be components of the bacterial cell membrane. As major source for bacterial isolates food-associated habitats were used.

The results show that quinone content and carotenoid content are altered by cold influence in several types of bacteria. Partly, the content of quinones and carotenoids increased. That affects the cold tolerance of bacteria. Additionally, the graduate thesis resulted in an increased cell yield at cool incubation. This observation occurred only in wild isolates but not in reference strains.

The present results can be applied in food industry and as well in medicine. They deepen knowledge to optimize handling of cold-adapted, potentially human-pathogenic, microorganisms and improve the management of emerging risks.

Veröffentlichungen

Beiträge bei Fachtagungen

Derichs, J. & Lipski, A. (2012): Fatty-acid independent adaptation of bacterial membranes to cold temperatures. Posterpräsentation auf der VAAM Jahrestagung, Tübingen, 18.-21.03.2012

Derichs, J., Falkenberg, F., Fritsch, C., Verbeek, J. & Lipski, A. (2013): Low growth temperatures elevate cell yield for mesophilic isolates from food. Posterpräsentation auf der VAAM Jahrestagung, Bremen, 10.-13.03.2013

Publikation

Derichs, J., Kämpfer, P. & Lipski, A. (2014): *Pedobacter nutrimenti* sp. nov., isolated from chilled food. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **64**, 1310-1316.

1. Einführung

Organismen sind in der Lage, in vielen ökologischen Nischen zu überleben und sich zu vermehren. Dafür notwendig ist die Bildung von Enzymen, die dem Organismus die Synthese und den Abbau der Substrate ermöglichen, die für das Überleben in der jeweiligen Umgebung notwendig sind. (Georlette et al. 2004)

In weiten Teilen der Erdbiosphäre, wie Ozeanböden, den Polarregionen oder Hochgebirgsregionen herrschen das ganze Jahr über Temperaturen von unter 5°C. Diese permanent kalten Lebensräume bilden eine Wachstumsnische für psychrophile und psychrotolerante Mikroorganismen, die sich auf unterschiedliche Art und Weise den dortigen Umweltbedingungen angepasst haben. Für eine lange Zeit wurden Psychrophile als exotische Organismen bezeichnet, aber in den letzten Jahren wurden immer mehr psychrophile Isolate untersucht (Helmke und Weyland 2004). So stieg die Anzahl der Neubeschreibungen psychrophiler Mikroorganismen pro Jahr im *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* von 25 im Jahr 2000 auf 73 im Jahr 2013 an.

Aufgrund des regen Interesses, z.B. aus der Biotechnologie, wurde die Erforschung der Mechanismen der Kälteanpassung in den letzten Jahren vorangetrieben (Margesin et al. 2008). Die Weiterentwicklung der industriellen Produktion von Lebensmitteln und der immer häufigere Einsatz von Kühlung bzw. Tiefgefrieren zur Konservierung sorgen dafür, dass psychrophile und psychrotolerante Mikroorganismen auch in Lebensmitteln entsprechende Habitate vorfinden und an Bedeutung gewinnen (Hébraud und Potier 1999). Dies ist besonders im Zusammenhang mit den heutigen modernen Anforderungen an die Lebensmittelproduktion wichtig, da Konservierungsmittel vom Konsumenten nur teilweise toleriert werden, da natürlicher Geschmack und Bekömmlichkeit an oberster Stelle stehen (Russell 2002).

Es gibt psychrophile und psychrotrophe Bakterienspezies, die als Lebensmittelverderbniserreger oder sogar Lebensmittelpathogene bezeichnet werden. Als Verderbniserreger gelten u.a. *Brochothrix thermosphacta*, *Pseudomonas* spp., *Micrococcus* spp. oder *Lactobacillus*-Arten. Zu den lebensmittelassoziierten Pathogenen zählen beispielsweise *Listeria monocytogenes*, *Clostridium botulinum* oder *Yersinia enterocolitica* (Laksanalamai et al. 2011; Russell 2002). Diese nehmen großen Einfluss auf die Lebensmittelsicherheit. Die Bakterien gelangen durch Kontamination von ihren natürlichen Standorten in gekühlte Lebensmittelrohstoffe bzw. –produkte und finden dort ein nährstoffreiches Habitat vor. Dadurch können sie sich

vermehrten und somit auch ihre Stoffwechselprodukte oder gegebenenfalls Toxine ansammeln, welche letztlich die Eigenschaften des Produktes verändern oder die Gesundheit des Lebensmittelkonsumenten schädigen können. (Kraft 1992)

1.1 Definition Psychrophilie/Psychrotoleranz

Neben der Toleranz von hohen Temperaturen, extremen pH-Werten und begrenzter Verfügbarkeit von Sauerstoff oder Wasser, stellt die Kälteanpassung eine notwendige Adaption für die Bakterien dar (Morita 1975). Eine niedrige Temperatur ist ein wesentlicher Umweltfaktor und hat großen Einfluss auf das Wachstum und die Entwicklung von lebenden Organismen (Suutari und Laakso 1994). Diese Organismen werden als psychrophil und psychrotolerant bezeichnet. Durch die Fähigkeit psychrophiler Organismen auch bei den niedrigsten Temperaturen überleben zu können, sind sie in der Lage große Teile der Erdoberfläche zu besiedeln. Diese extremophilen Organismen, entweder prokaryotisch oder eukaryotisch, stellen damit eine wichtige Klasse der belebten Welt dar, wenn wir die Weitläufigkeit dieser dauerhaft kalten Regionen der Welt, wie beispielweise polare und alpine Regionen, betrachten. Die erfolgreiche Ansiedlung von Psychrophilen in solch extremen ökologischen Nischen, wurde in den letzten Jahren immer intensiver erforscht. (Feller und Gerday 1997)

Diese genannte Fähigkeit von Bakterien in kalter Umgebung zu überleben und sogar sich vermehren zu können, zählt somit zu den bedeutsamsten Anpassungen an unterschiedliche und teils extreme Umwelteinflüsse. Tiefe Temperaturen führen zu einer Verlangsamung des bakteriellen Stoffwechsels bis hin zum Wachstumsstillstand (Busta 1978). Im Normalfall beeinflusst die Temperatur die Wachstumsrate welche durch die Enzymaktivität bestimmt wird. Im drastischen Fall würde es zu Konformationsänderung zellulärer Makromoleküle und Denaturierung kommen, was einen Zelltod zur Folge hätte. (Ratkowsky et al. 1982) Dieser Zusammenhang zwischen Temperatur und Enzymaktivität wird durch die Arrhenius-Gleichung beschrieben (Russell et al. 1990).

Mit Hilfe der unterschiedlichsten Mechanismen können Mikroorganismen Lebensräume mit Temperaturen unter 5°C besiedeln. Es gibt zwei Arten von Kältetoleranz. Psychrophile Mikroorganismen besitzen bezogen auf die Wachstumsgeschwindigkeit ein Temperaturoptimum von unter 15°C, und können auch bei -5°C noch wachsen. Psychrotolerante Bakterien haben ebenfalls ein Temperaturminimum bei -5°C, das Wachstumsoptimum liegt dagegen zwischen 20 und 40°C. (Morita 1975; Gounot und Russell 1999) Somit sind diese auch bei Kühlschranktemperaturen vermehrungsfähig.

Mit sinkender Temperatur können jedoch teilweise die Generationszeiten im Wachstumsverlauf ansteigen und die lag-Phase sich verlängern. (Krämer 2007).

Kältetolerante Vertreter der Gram-negativen Bakterien, der Gram-positiven Bakterien, der Archaeen, der Hefen, der Pilze und der Mikroalgen spiegeln sehr auffallend die Merkmale der Kälteanpassung wieder. (Deming 2002; Gounot und Russell 1999; Morita 1975; Russell et al. 1990). Beispielsweise können psychrophile Bakterien in einem Vollmedium bei 4°C Verdopplungszeiten aufweisen wie der mesophile *Escherichia coli* bei 37°C; nur können psychrophile Bakterien bei dieser hohen Temperatur nicht wachsen (Feller und Gerday 1997). Die meisten zellulären Anpassungsmechanismen an niedrige Temperaturen sind noch nicht vollständig verstanden und werden noch untersucht. Dazu gehören Studien über die Regulierung der Membranfluidität, die Aufrechterhaltung der Proteinsynthese und die Produktion von Kälte-Proteine und die speziellen Mechanismen der Kältetoleranz. (Saunders et al. 2003)

1.1.1 Psychrophile und psychrotolerante Mikroorganismen in der Lebensmittelindustrie

Mehrere Studien zeigen, dass psychrophile und psychrotolerante Bakterien oft in der Lebensmittelmatrix auftreten können. Diese Veröffentlichungen beschäftigen sich entweder mit Lebensmittelverderbniserregern oder mit Pathogenen, die unter kalten Bedingungen wachsen können. (Scherer und Neuhaus 2006)

Beispielsweise wurden psychrotolerante Milchsäurebakterien als Hauptursache für den Verderb von Schweinefleisch-Wurstwaren verantwortlich gemacht (Hamasaki et al. 2003). Außerdem wurden als Hauptbesiedler von kühlgelagerten Schweinefleisch die Gattungen *Pseudomonas*, *Aeromonas* und *Acinetobacter* identifiziert. (Olsson et al. 2003) Aber auch andere für die Lebensmittelindustrie wichtige Mikroorganismen sind in der Lage bei niedrigen Temperaturen zu überleben und sich sogar zu vermehren. Die Fähigkeit von *Campylobacter jejuni* Kühl- und Gefriertemperaturen zu überleben, hat eine hohe Relevanz für die Lebensmittelsicherheit und die öffentliche Gesundheit (Chan et al. 2001). Andere Beispiele für lebensmittelassoziierte Spezies, die sich bei kalten Temperaturen vermehren können sind *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus* und *Yersinia enterocolitica*. (Lechner et al. 1998; Guenlcr und Linton 2003; Harrison et al. 2000; Kalinowski et al. 2003; Steele und Wright 2001; Zhao et al. 2003).

Die Reduzierung psychrophiler und psychrotoleranter Bakterien spielt daher eine sehr wichtige Rolle in der Lebensmittelindustrie. Jedoch ist die Strategie, wie sich Bakterien genau in einer Lebensmittelmatrix bei kalter Umgebungstemperatur vermehren können nur wenig aufgeklärt. (Scherer und Neuhaus 2006)

1.2 Aufbau der Plasmamembran / Das Flüssig-Mosaik-Modell / Funktionen

In der Bakterienzelle ist neben der Proteinsynthese, Enzymaktivität und Nährstoffaufnahme auch die Zusammensetzung, Integrität und Struktur der Zellmembran temperaturabhängig (Suutari und Laakso 1994). Der Erhalt der Membranfluidität ist von wesentlicher Bedeutung für die Funktion der Transportvorgänge und die Signaltransduktion und daher überlebenswichtig (Berg et al. 2003). Bei Senkung der Temperatur reagieren Bakterien in den meisten Fällen mit einer Beibehaltung der Membranfluidität durch Veränderung im Fettsäureprofil. Der Begriff „homeoviscous adaptation“ wurde im Jahr 1974 für diese Anpassung geprägt (Sinensky 1974). Dadurch wird die Funktionsfähigkeit der bakteriellen Zellen in bestimmten Stresssituationen wie Kälteeinfluss aufrechterhalten. (Heller et al. 1993)

Darüber hinaus gibt es spezielle Verbindungen zur Anpassung an einen Kälteschock, die in der Zelle produziert werden. So ist beispielsweise die Anpassung nach Kälteeinfluss bei Bakterien auch durch sogenannte „cold induced proteins“ (CSP) reguliert. Bei diesen CSP's handelt es sich um circa 7 KDa große Proteine, die den generellen Metabolismus, die Translation und die Proteinfaltung beeinflussen können. (Graumann et al. 1996). Neben den CSP's können auch weitere Stoffgruppen zur Akklimatisation der Zellen bei Kälte beitragen. Es ist bekannt, dass kompatible Solute (z.B. Betain, Treholose und Ectoin) die Zellen bei Stress schützen können. Es wird davon ausgegangen, dass kompatible Solute als chemische Chaperone gegen die Denaturierung und Aggregation von Proteinen bei niedrigen Temperaturen und gegen oxidativen Stress als Radikalfänger wirken. Weiterhin wird vermutet, dass sie die Membran stabilisieren und schützen sowie als mögliches Frostschutzmittel fungieren können. (Kandror et al. 2002) Kompatible Solute können entweder synthetisiert (Kandror et al. 2002) oder mit Hilfe von spezifischen Transportern aus der Umgebung aufgenommen werden. (Brigulla et al. 2003; Mendum und Smith 2002) Diese Stoffe werden jedoch im Cytoplasma eingelagert und nicht in der Plasmamembran (Cleland et al. 2004).

Für die optimale Funktionstüchtigkeit der Plasmamembran ist es notwendig, dass sich die Membranlipide in einem sogenannten flüssig-kristallinen Zustand befinden. Unter normalen physiologischen Bedingungen ist dies auch der Fall. Wenn allerdings die

Umgebungstemperatur der Bakterien absinkt, wird durch Veränderung der Membrankomponenten die normalerweise fluide Membran viskös; nun befindet sie sich in der Gelphase. Diese Fluidität der Zellmembranen spielt aber eine sehr wichtige Rolle bei den biologischen Prozessen, die zwischen dem Extrazellulär- und dem Intrazellulärraum stattfinden. Dadurch wird unter anderem die normale Funktion der Enzyme beeinträchtigt. Somit müssen einige Anpassungen zur Erhaltung dieser Fluidität vorgenommen werden. (Beales 2004; Sinensky 1974).

Daher ist das Verständnis des Phasenüberganges von Gelphase (lipid-geordnet) zu flüssig-kristallinen Phase (flüssig-ungeordnet) sehr wichtig (Abb.1). Dieser Zustand, in dem sich die Kohlenwasserstoffketten der Lipide befinden und der die Fluidität der Membran bestimmt, ist der wesentliche Parameter für die Funktion biologischer Membranen. Bei der für eine Lipidsorte spezifischen Phasenübergangstemperatur T_c findet ein reversibler Phasenübergang statt. T_c hängt dabei von der Fettsäurezusammensetzung und der Kopfgruppenstruktur der Lipide sowie von Umgebungsvariablen, wie dem pH-Wert und der Ionenkonzentration im umgebenden Medium, ab. (Heller et al. 1993)

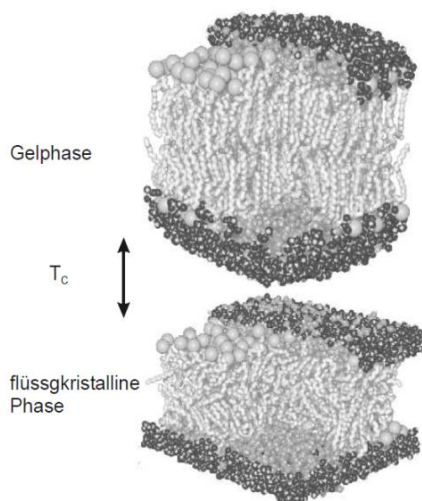


Abbildung 1: Simulation der Membranstruktur in der Gelphase (oben) und der flüssigkristallinen Phase (unten) in Bezug auf die Temperatur (Heller et al. 1993).

Mit der Abnahme der Umgebungstemperatur, sind eine Reihe von Veränderungen im Fettsäuremuster der Bakterienzellmembranen bekannt. Dadurch wird die laterale Diffusion innerhalb der Membran aufrechterhalten. (Chattopadhyay 2006)

Viele Studien haben adaptive Veränderungen in der Fettsäurezusammensetzung mit dem Hauptaugenmerk auf ungesättigte und verzweigt-kettige Fettsäuren gezeigt. Die

wichtigsten Anpassungsmechanismen werden durch Gounot & Russell (1999), Chintalapati et al. (2004) und Scherer & Neuhaus (2006) beschrieben. Dazu zählen der Ersatz von gesättigten durch ungesättigte Fettsäuren, das Abnehmen der Fettsäurekettenlänge, der Ersatz von geradkettigen durch methylverzweigte Fettsäuren, der Ersatz von *iso*-verzweigten durch *anteiso*-verzweigte Fettsäuren, die Isomerisierung von *trans*- in *cis*-Doppelbindungen und der Ersatz von geradzahigen durch ungeradzahige Fettsäuren. Diese Anpassungen können mit den verschiedenen Schmelzpunkten der jeweiligen Fettsäuren erklärt werden und somit kommt es zu einer gewünschten Schmelzpunkterniedrigung. In Tabelle 1 sind Schmelzpunkte verschiedener Fettsäuren aufgeführt.

Tabelle 1: Schmelzpunkte bestimmter Fettsäuren nach Guendouzi und Mekelleche (2012), Kaneda (1991), Muranushi et al. (1981) und United States Environmental Protection Agency, Washington, DC, USA (2012)

Fettsäure	Schmelzpunkt [°C]
C 13:0 <i>iso</i>	89,3
C 14:1 <i>trans</i> 2	99,5
C 14:0	53,9
C 15:0	52,5
C 16:0	63,1
C 17:0	61,3
C 18:0	69,6
C 16:1 <i>cis</i> 9	0,5
C 18:1 <i>trans</i> 9	51,0
C 18:1 <i>cis</i> 9	8-10
C 18:1 <i>trans</i> 11	44,0
C 18:2 <i>cis,cis</i> 9,12	-5,0
15:0 <i>iso</i>	51,7
17:0 <i>iso</i>	60,2
15:0 <i>anteiso</i>	23,0
17:0 <i>anteiso</i>	36,8

Trotz der allgemein anerkannten dominierenden Funktion der Fettsäureprofile in der Membrananpassung gibt es einige aktuelle Literaturquellen über mikrobielle Gemeinschaften in arktischen und antarktischen Lebensräumen, die - teilweise zusätzlich - andere Strategien verfolgen. Beispiele dafür sind das Verändern der polaren Kopfgruppe, die Konzentrationsänderung von integralen Membranproteinen und das Ändern der Carotinoidzusammensetzung und -gehaltes aus polaren und unpolaren Carotinoiden (Chintalapati et al. 2004; Margesin et al. 2007).

Im den folgenden Abschnitten wird nun detaillierter auf die Fettsäuren und andere lipophile Komponenten der Zellmembran, die eine Rolle bei der Kälteanpassung auf zellulärer Ebene spielen könnten, eingegangen.

1.3 Fettsäuren in der Zellmembran

1.3.1 Nomenklatur der Fettsäuren

Fettsäuren können nach der Länge der Acylkette, Anzahl, Position und Konfiguration der Doppelbindungen, sowie nach dem Vorkommen zusätzlicher funktioneller Gruppen klassifiziert werden.

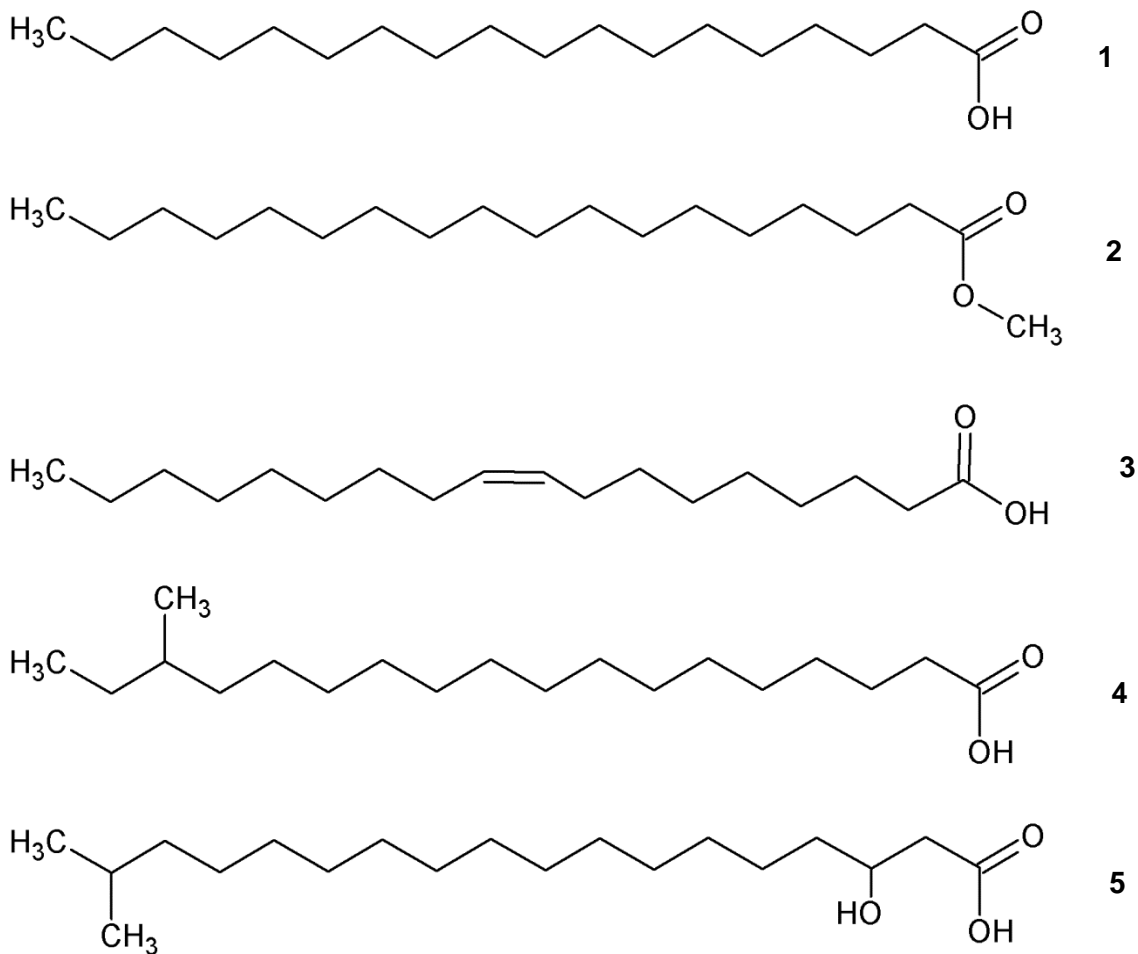


Abbildung 2: unterschiedliche Fettsäuretypen; 1: C18:0 Fettsäure; 2: C18:0 Fettsäure mit Methylester markiert; 3: C18:1 *cis*9 Fettsäure; 4: C19:0 *anteiso* Fettsäure; 5: C19:0 *iso* 3OH Fettsäure

In der Literatur werden die Fettsäuren mit einer Abkürzung bezeichnet, z.B. 18:1 *cis*9, für Ölsäure (Abb.2). Die Angabe der Positionen der Doppelbindungen erfolgt, indem vom Carboxylende aus gezählt wird. Weiter wird die Konfiguration der Doppelbindung mit *cis* oder *trans* angegeben. Methylverzweigungen werden mit dem Zusatz *methyl* angegeben. Eine Methylverzweigung am vorletzten C-Atom wird mit *iso*, eine Methylverzweigung am vorvorletzten C-Atom wird mit *anteiso* gekennzeichnet. Die Benennung von Cyclopropanstrukturen erfolgt mit dem Zusatz *cyclo*, sowie der

Positionsangabe des C-Atoms. Hydroxylgruppen werden mit OH, sowie der Positionsangabe gekennzeichnet. (Belitz et al. 2008; IUPAC-IUB-Commission on Biochemical Nomenclature 1978)

1.3.2 Fettsäurezusammensetzung in der Kälteanpassung

Durch Schwankungen der Umgebungstemperatur der Mikroorganismen, sind die Fettsäuren der Phospholipiddoppelschicht einer Anzahl von möglichen Änderungen ausgesetzt (Chintalapati et al. 2004). Die Anpassungen wurden bereits im Abschnitt 1.2 aufgelistet. Fettsäuren unterschiedlicher Kettlängen und Sättigungsgrad befinden sich in der Lipiddoppelschicht. Gesättigte Fettsäuren fördern die Aneinanderlagerung benachbarter Acylketten, was wiederum stabilere Strukturen verursacht und die Membran visköser macht. Diese Membranen haben wegen der optimalen, engen side by side Packung und der daraus resultierenden höheren van-der-Waals-Kräfte einen höheren Schmelzpunkt. (Freedman 1981; Hazel und Eugene Williams 1990)

Im Gegensatz dazu sind kürzere Fettsäuren, besonders die mit weniger als zwölf Kohlenstoff-Atomen, nicht in der Lage in so hohem Maße hydrophobe Wechselwirkungen mit anderen Lipiden oder Proteinen einzugehen, da sie zu kurz sind, um durch die Lipiddoppelschicht der Membran zu reichen. Somit wird der fluide Zustand der Membran gefördert. (Quinn 1981) Dieser Mechanismus der Acylkettenlängenmodifizierung bei abfallender Temperatur ist allerdings an das Wachstum der Zellen gekoppelt, das heißt die kürzeren Fettsäuren müssen *de novo* synthetisiert werden. (Denich et al. 2003; Russell 1984).

Außerdem besitzen einige Bakterien membrangebundene Desaturasen. Diese sind in der Lage in einem aeroben Prozess Doppelbindungen in Fettsäuren einzubauen, die bereits in der Membran existieren. Ihre Funktion wird durch mehrere verknüpfte Untereinheiten vermittelt, welche die Wasserstoffatome vom Substrat zu molekularem Sauerstoff kanalisieren, um eine Doppelbindung und Wasser zu bilden. Die Fluidität wird erhöht, indem die Doppelbindung in *cis*-Konfiguration in der Fettsäure mehr Platz einnimmt und so für mehr Fluktuation in der Membran sorgt. *Trans*-Fettsäuren dagegen reduzieren ähnlich wie gesättigte Fettsäuren die Fluidität der Membran. (Aguilar und Mendoza 2006; Heipieper et al. 1992; Russell 1984) Aerobe Bakterien erzeugen diese *trans*-Fettsäuren in ihrer Membran durch Umwandlung von bereits bestehenden *cis*-Fettsäuren. Dies geschieht mit Hilfe der *cis-trans*-Isomerase. Sie ist in der Lage eine einfach ungesättigte Doppelbindung in der *cis*-Konfiguration in einem energie- und wachstumsunabhängigen Prozess in die *trans*-Konfiguration zu

überführen. Die *trans*-Isomere der Fettsäuren haben daher Einfluss auf die Membranfluidität. Sie weisen allerdings aufgrund ihrer langgestreckten, sterischen Struktur, im Gegensatz zu den *cis*-Isomeren, eher die Eigenschaften von gesättigten Fettsäuren auf und haben somit einen eher reduzierenden Effekt auf die Membranfluidität. Die aufgelisteten Schmelzpunkte aus der Tabelle 1 können diesen Effekt erklären. Zusätzlich sind Bakterien mit anaerobem Stoffwechsel in der Lage *trans*-Fettsäuren *de novo* zu synthetisieren und in ihre Membran einzubauen. (Heipieper et al. 2003; Keweloh und Heipieper 1996)

Als Beispiel für diesen Effekt konnten in einigen psychophilen Bakterien der Gattung *Vibrio* und *Pseudomonas* mit steigender Wachstumstemperatur ein Anstieg des *trans*-Fettsäuregehaltes verzeichnet werden. Diese vermehrte Bildung der *trans*-Fettsäuren kann den Effekt des Temperaturanstieges ausgleichen und somit die Membranfluidität reduzieren. (Kiran et al. 2004; Okuyama et al. 1990)

Zusätzlich spielen in der Kälteanpassung die strukturellen Isomere der geradkettigen Fettsäuren eine wichtige Rolle. Die strukturellen Isomere *iso* und *anteiso* sind die häufigsten Formen der methylverzweigten Fettsäuren (Chintalapati et al. 2004). Diese endständig verzweigten Fettsäuren werden *de novo* synthetisiert, das heißt die Position der Methylverzweigung ist durch die jeweilige Aminosäure, aus der die Fettsäure in der Fettsäuresynthese hervorgeht, determiniert und kann nicht mehr verändert werden. Die zusätzliche Methylgruppe der verzweigten Fettsäuren benötigt mehr Raum in der Plasmamembran und kann somit die Ordnung einer Phospholipiddoppelschicht mehr beeinträchtigen als die *iso*-verzweigten Fettsäuren. (Kaneda 1991; Russell 1984; Suutari und Laakso 1994).

Zusammengefasst kann gesagt werden, dass bei der Kälteadaptation von Mikroorganismen das temperaturabhängige Fettsäuremuster der Membranen eine wesentliche Rolle spielt. Durch Verzweigungen, die Variation der Kettenlänge, der Anteils an Doppelbindungen und Cyclisierungen, können Fettsäuren verändert werden (Suutari und Laakso 1994). Die Verschiebung zu verzweigten Fettsäuren (Annous 1997), die Verringerung des Sättigungsgrades und die Kürzung der Kettenlänge erhöhen die Membranfluidität bei sinkenden Temperaturen (Quinn 1981).

1.4 sonstige Lipide in der Zellmembran

Neben den membranbildenden Lipiden (Phospholipide, Sphingolipide) sind Isoprenoide lipophile Strukturbestandteile der pro- und eukaryotischen Zellmembranen. Zu den Isoprenoiden zählen u.a. die große Gruppe der Steroide (Zoo- und Phytosterine), Carotinoide und Chinone.

Bezogen auf die Kälteanpassung übernimmt in eukaryotischen Zellen vor allem das Cholesterin (Steroid) die Funktion zur Regulierung der Membranstabilität bzw. Membranfluidität. In Eukaryoten ist Cholesterin daher ein wichtiger Bestandteil von Membranen. Cholesterin ist bekannt für die Wirkung auf die physikalischen Eigenschaften von Membranen. Das starre Steroidgerüst unterbricht die Wechselwirkungen zwischen den Fettsäureketten. Durch die zusätzliche Bildung spezifischer Komplexe mit den Phospholipiden wird die Membran weniger fluide und die Wahrscheinlichkeit für Phasenübergänge wird gleichzeitig gesenkt (Berg et al. 2003). Aus diesem Grund kann es die Auswirkungen der Temperatur auf die Membranstruktur und -funktion minimieren, d.h. die Phase des Übergangszustandes wird verbreitert. Eine Änderung der Umgebungstemperatur hat unmittelbare Folgen für die Membranen. Einige Eigenschaften der Membran sind aber besonders wichtig, um die Funktionalität aufrechtzuerhalten. Dabei spielt, wie zuvor in Abschnitt 1.2 beschrieben, die Ordnung der Membran, die entsprechende Phase der Lipiddoppelschicht sowie die Durchlässigkeit der Membran eine wichtige Rolle. Durch Temperaturschwankungen ist eine Umstrukturierung bzw. Unordnung der Membran erforderlich, um diese aufrecht zu erhalten. Wie bereits erwähnt, ist das Cholesterin eine ideale Wahl für diese Umgestaltung der Membran, da die planare Struktur die Ordnung der Akyllketten im höheren Wachstumsbereich stabilisiert und die Ordnung der Akyllketten im niedrigen Bereich stört. (Crockett 1998)

Jedoch wird Cholesterin von Prokaryonten nicht gebildet bzw. exogen aufgenommen. Eine Ausnahme sind dabei die Mykoplasmen. Mykoplasmen können das Steroid exogen aufnehmen und dieses kann somit in die Membran diffundieren, um so u.a. die Bildung einer Gelphase der Membran bei niedrigen Temperaturen zu verhindern. (Razin et al. 1980; Rottem et al. 1973; Rottem 1981).

Diese Studien unterstützen die Arbeitshypothese, dass das Prinzip der Unordnung der Acylketten der Phospholipide durch hydrophobe membranlösliche Moleküle in kälteangepassten Bakterien als alternativer Mechanismus zur Fettsäuremodifikation realisiert werden kann. Daher können auch andere Lipide an der Regulation der

Membranfluidität beteiligt sein. In dieser Arbeit wurde versucht, Indizien dafür zu finden, ob isoprenoide Strukturen wie Chinone und Carotinoide an der Regulation der Fluidität beteiligt sind.

1.4.1 Chinone

Chinone sind in der Natur weit verbreitet und kommen größtenteils als fettlösliche Komponenten membrangebunden vor. (Søballe und Poole 1999)

Der Begriff Chinon beschreibt eine chemische Verbindungsklasse, die häufig in Naturstoffen vorkommt und vielfältige Eigenschaften aufweist. Er leitet sich von dem Namen der Chinasäure ab, einer Zwischenstufe im Shikimatweg, welche wichtig für die Biogenese von Aromaten ist. Im Allgemeinen werden Chinone nach dem jeweiligen Aromaten benannt, von dem sie sich durch Oxidation ableiten. So erhält man aus chemischer Sicht para-Benzochinon und ortho-Benzochinon aus Benzol, para-Napthochinon und ortho-Napthochinon aus Naphthalin sowie Anthrachinon aus Anthracen. (Effenberger-Neidnicht 2011) Bakterielle Chinone können in zwei Gruppen aufgeteilt werden. Die erste Gruppe umfasst die Benzochinone, die auch als Ubichinone oder Coenzym Q bezeichnet werden. Beide Namen werden von der IUPAC-Kommission für die Nomenklatur anerkannt (Nič et al. 2009). Der Begriff Coenzym Q wird vermehrt im biochemischen und klinischen Bereich verwendet. Die Abkürzung für Ubichinon, welche auch in dieser Arbeit verwendet wird, ist entweder Q oder Q-n, wobei n für die Anzahl der Isopreneinheiten in der Seitenkette steht. Die zweite Gruppe sind die Napthochinone. Diese lassen sich in Phyllochinone (Vitamin K₁) und Menachinone (MK-n, Vitamin K₂) unterscheiden. Phyllochinone tragen am 3. Kohlenstoffatom des Napthochinonrings eine Phytylgruppe und werden in grünen Pflanzen gebildet. Dagegen sind Menachinone, die am C-3 eine ungesättigte Polyprenylgruppe tragen, in Bakterien vorhanden. (Søballe und Poole 1999; Stein 2003)

Die verschiedenen Chinontypen unterscheiden sich in der Länge der Isopreneseitenketten sowie dem Sättigungs- und Hydrierungsgrad der Isopreneinheiten. Beispielsweise haben Menschen Chinone mit 10 Isoprenoidseitenketten, wohingegen Nagetiere, das Bakterium *Pseudomonas* und Hefen überwiegend 6, 8 oder 9 Isoprenoideinheiten in der Seitenkette vorweisen. Die chemische Struktur von Chinonen ist am Beispiel von Q-8 und MK-8 in Abbildung 3 gezeigt. (Collins und Jones 1981; Søballe und Poole 1999)

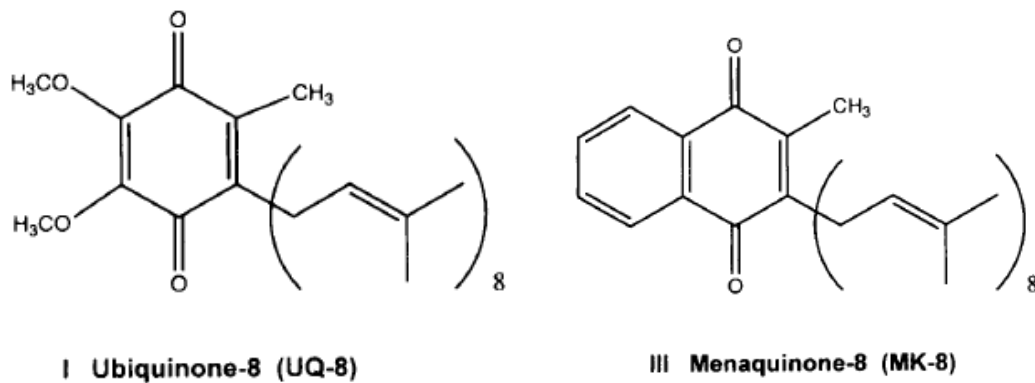


Abbildung 3: chemische Struktur von Ubichinon (links) und Menachinon (rechts) am Beispiel von Q-8 und MK-8 (Søballe und Poole 1999)

Die Klasse der Ubichinone ist in der Natur weit verbreitet und kommen in Zellen von Tieren, Pflanzen und Mikroorganismen (v.a. *Alpha*-, *Beta* und *Gammaproteobacteria*) vor. Gram-positive Bakterien und einige Gram-negative Bakterien wie Sulfatreduzierer oder die Gattung *Bacteroides* und Cyanobakterien besitzen dagegen (zum Teil zusätzlich) Menachinone. (Munk 2008)

Chinone sind Elektronenüberträger in der Atmungskette und spielen daher eine wichtige Rolle bei der oxidativen Phosphorylierung. Zu den verbreitetsten Atmungskettenchinonen zählen die Ubichinone, die Menachinone und die Dimethylmenachinone. Der bekannteste Elektronencarrier ist das Coenzym Q, ein Ubichinon. Das Chinon kann zwei Elektronen nacheinander aufnehmen, dabei entsteht im ersten Schritt ein Semichinon-Radikal und bei Aufnahme des zweiten Elektrons ein Hydrochinon. Chinone fungieren als Schalter zwischen Ein- und Zwei-Elektronen-Übergängen. Bei der Reduktion des Chinons mit zwei Elektronen werden auf der Membraninnenseite zwei Protonen aufgenommen, die bei der Oxidation auf der Membranaußenseite wieder abgegeben werden. Wird das Hydrochinon durch einen Elektronencarrier oxidiert, der nur eines der beiden Elektronen aufnimmt, wird das zweite Elektron in den Chinonpool zurückgeführt, wo es ein festgebundenes Chinon zum Semichinon-Radikal reduziert. Bei der Oxidation eines weiteren Hydrochinons wird erneut ein Elektron auf den nachfolgenden Elektronencarrier übertragen, das andere reduziert das gebundene Semichinon-Radikal zum Hydrochinon. Insgesamt werden so in einem kompletten Chinonzyklus zwei Hydrochinone zum Chinon oxidiert, ein gebundenes Chinon zu Hydrochinon reduziert und dabei zwei Elektronen und vier Protonen transportiert. An den Elektronentransportketten der verschiedenen Organismen sind wie oben beschrieben unterschiedliche Chinone beteiligt. (Madigan et al. 2008; Madigan et al. 2013; Munk 2008)

Bemerkenswert ist, dass das prokaryotische Atmungssystem ein flexibles Design aufweist, welches der Zelle ermöglicht, Veränderungen der Wachstumsbedingungen auszugleichen und sich an verschiedene verfügbare Elektronenakzeptoren wie z.B. Sauerstoff oder Nitrat anzupassen. Dies wird dadurch bestätigt, dass Chinone eine Rolle im Management von oxidativem Stress spielen. (Søballe und Poole 1999)

1.4.1.1 Chinone in der Taxonomie

Da sich die Art der Chinone und ihre Seitenkettenlänge je nach Bakteriengattung unterscheiden, können diese zur chemotaxonomischen Einordnung von Mikroorganismen herangezogen werden. Die Arbeiten von Jeffries et al. (1967), Collins et al. (1979) und Collins & Jones (1981) wurden als neue Grundlage zur Nutzung von Chinonstrukturen als taxonomische Kriterium genommen. Daraus geht hervor, dass Ubichinone nur in Eukaryoten und bestimmten gramnegativen Bakterien vorkommen, wogegen Menachinone in gramnegativen und grampositiven Bakterien sowie Archaea enthalten sind.

1.4.1.2 Chinone in der Kälteanpassung

In der Literatur ist ein Einfluss von Chinonen auf die Kälteanpassung von Zellmembranen bisher nicht beschrieben. Einer der Grundgedanken dieser Arbeit war es daher, dass die membranständigen Menachinone und Ubichinone einen Einfluss auf die Membranfluidität und damit gegebenenfalls auf die Kälteadaptation von psychophilen und psychrotoleranten Bakterien haben können. Dies ist in erster Linie auf ihre molekulare Struktur, den dreidimensionalen, raumfordernden Aufbau und die enthaltenen Doppelbindungen ungesättigter Isoprenoidseitenketten zurückzuführen. Durch die Lokalisation in bakteriellen Membranen kommt es zur der Hypothese, dass bei einer kälteinduzierten Restrukturierung der Membran ebenso das Chinonprofil betroffen ist, welches unter Umständen sowohl qualitativ als auch quantitativ aktiv angepasst werden kann, um die Adaption an die neuen Umweltbedingungen zu gewährleisten.

1.4.2 Carotinoide

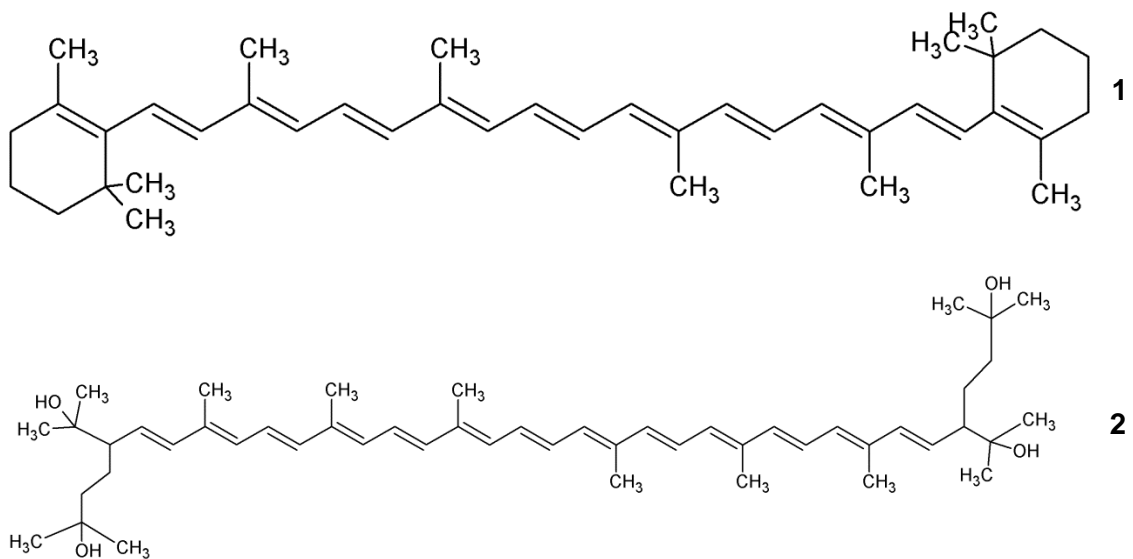


Abbildung 4: Strukturformel unterschiedlicher Carotinoide; 1 β -Carotin; 2: Bacterioruberin

Alle Carotinoide werden aus der gleichen Grundstruktur von 40 Kohlenstoffatomen gebildet. Die aus acht Isopreneinheiten aufgebaute Polyen-Kohlenwasserstoffkette bildet das Zentrum des Moleküls. Durch die Cyclisierung der Kettenenden, Hydrierungen der Doppelbindungen sowie durch Addition von sauerstoffhaltigen funktionellen Gruppen können Modifikationen entstehen (Abb. 4). Obwohl jede Doppelbindung als *cis* oder *trans* Konfiguration auftreten kann, sind in der Natur hauptsächlich die thermodynamisch stabileren *all-trans*-Carotinoide vertreten. Carotinoide werden in die zwei Hauptgruppen Carotine und Xanthophylle unterteilt. Die Carotine sind reine Polyene-Kohlenwasserstoffe, während Xanthophylle zusätzlich mindestens eine sauerstoffhaltige funktionelle Gruppe (z.B. Hydroxylgruppe) enthalten. (Belitz et al. 2008; Rodriguez-Amaya 2001).

Für die chemischen und physikalischen Eigenschaften der Carotinoide sind hauptsächlich zwei Aspekte in der molekularen Struktur verantwortlich. Der strukturelle Aufbau der Carotinoide (Größe, Gestalt, funktionellen Gruppen) ermöglicht die funktionelle Lokalisation und Orientierung innerhalb der zellulären Strukturen. Das System aus konjugierten Doppelbindungen ist entscheidend für die photochemischen Eigenschaften und chemische Reaktivität. Aufgrund der konjugierten Doppelbindungen können Carotinoide im sichtbaren Wellenlängenbereich von 400 bis 500 nm Lichtenergie absorbieren. (Britton 1995)

Bei Mikroorganismen wird die Wirkung von Carotinoiden oft zwischen phototroph und nicht-phototroph unterschieden. Phototrophe Bakterien benötigen Carotinoide für die

Aufnahme von Lichtenergie zur Photosynthese und zum Schutz der Chlorophyllmoleküle vor photooxidativen Schäden (Cogdell und Frank 1987). Bei den nicht-phototrophen Bakterien wirken Carotinoide unter anderem schützend gegenüber UV-Strahlung (Dieser et al. 2010).

1.4.2.1 Carotinoide in der Kälteanpassung

Carotinoide zeigen als lipophile Moleküle die Fähigkeit sich in biologische Membranen einzulagern und somit einen Einfluss auf die Membranfluidität und Membranrigidität zu nehmen. Bei Bakterien können daher die Carotinoide eine ähnliche regulierende Funktion wie das Cholesterin bei Eukaryonten übernehmen. Damit kann die Regulation der Membranfluidität in der Kälteadaptation bei Bakterien neben der unterschiedlichen Fettsäurezusammensetzung in der Lipiddoppelschicht (Annous 1997; Quinn 1981; Suutari und Laakso 1994) zusätzlich durch die Gruppe der Carotinoide übernommen werden (Chattopadhyay et al. 1997; Jagannadham et al. 2000; Pintea et al. 2005; Subczynski et al. 1991)

Die lipophilen Verbindungen sind meist in den Membranen lokalisiert, wobei die Orientierung innerhalb der Lipiddoppelschicht von der Struktur und den funktionellen Gruppen abhängt. Carotinoide mit polaren Substituenten (z.B. Zeaxanthin) können Interaktionen mit den polaren Kopfgruppen der Phospholipide eingehen und somit die Membran durchspannen. Hydrocarbone (β -Carotin) liegen dagegen innerhalb des lipophilen Kerns der Membran vor. (Britton 2008)

Vor allem polare Carotinoide können einen Einfluss auf die Membranstruktur haben. Oberhalb der Phasenübergangstemperatur erzielen sie über die Rigidisierung eine Senkung der Membranfluidität (Subczynski et al. 1991). Indem die polaren Carotinoide die Lipiddoppelschicht vollständig durchspannen, wird die Beweglichkeit der Lipide innerhalb der Membran eingeschränkt und die Membranstabilität im fluiden Stadium erhöht. Die apolaren Carotinoide wie β -Carotin ermöglichen dagegen eine verstärkte Beweglichkeit der Membranlipide und erhöhen dadurch die Membranfluidität. Carotinoide erfüllen somit ähnliche Funktionen wie das Cholesterin (Britton 2008).

In vitro Studien synthetischer Membranen mit Phosphatidylcholin haben gezeigt, dass die Carotinoide Zeaxanthin, Cryptoxanthin und β -Carotin in der Membran gebunden wurden und damit die Fluidität der Membran verringert wurde (Jagannadham et al. 2000). In einer *in vivo* Studie konnte an dem psychrotoleranten Bakterienstamm *Micrococcus roseus* 45R eine temperaturabhängige Synthese von Carotinoiden

gezeigt werden. Bei der Wachstumstemperatur von 5°C stiegen der Gesamtcarotinoidgehalt sowie der Anteil an den polaren Carotinoiden Bacterioruberindiglycosid und Bacterioruberinmonoglycosid im Vergleich zu einer Wachstumstemperatur von 25°C an (Chattopadhyay et al. 1997). Auch das psychrotolerante Bakterium *Sphingobacterium antarcticus* steigerte bei 5°C die Synthese an polaren Carotinoiden und ungesättigten Fettsäuren. Die ungesättigten Fettsäuren erhöhen die Fluidität der Membran, während dagegen die polaren Carotinoide die Stabilität erhalten können (Jagannadham et al. 2000).

In diesem beschriebenen Zusammenhang ist es sehr interessant, dass grampositive Bakterien aus der Antarktis kollektiv eine Dominanz an pigmentierten Isolaten vorweisen. Bei *Arthrobacter agilis*, ein Bakterium, welches aus dem antarktischen Eismeer isoliert wurde, wird die starke Pigmentierung bei niedriger Temperatur durch ein C-50 langes Carotinoidmolekül hervorgerufen, welches als Derivat von Bacterioruberin identifiziert wurde. Diese Aussagen, dass solche Carotinoide die Membran stabilisieren, werden auch von anderen extremophilen Bakterien und Archaeen berichtet, die starken Salzkonzentrationen oder UV-Strahlenbelastung ausgesetzt sind. (Fong et al. 2001)

Diese Aussagen passen auch zu der Beobachtung von Varkonyi et al. (2002), dass einige polare Carotinoide nur bei einer niedrigen Temperatur in den Thylakoidmembranen des Cyanobakteriums *Cylindrocapsa raciborskii* induziert wurden.

Jedoch scheint es auch so, dass die oben beschriebene Carotinoid-vermittelte Stabilisierung von Membranen und die dadurch auftretende Abnahme der Membranfluidität, durch Veränderungen im Fettsäuremuster wieder ausgeglichen werden müssen. Dadurch würde die Membranfluidität wieder erhöht.

Allgemein kann gesagt werden, dass in Abhängigkeit von der Struktur und Polarität Carotinoide unterschiedliche Effekte auf die Membran ausüben können und die Membranfluidität oder die Rigidität erhöhen können. In Kombination mit den Fettsäuren könnten Carotinoide eine regulierende Rolle bei der Anpassung an niedrige Temperaturen spielen.

Jedoch sind Studien, die den Einfluss der Wachstumstemperatur auf die Carotinoidsynthese bei Mikroorganismen und die damit verbundene Funktion der Carotinoide bei der Kälteadaptation liefern, insbesondere außerhalb der Psychrophilen sehr selten. Es ist wichtig, das Zusammenspiel von Carotinoiden und Fettsäuren bei

niedriger Temperatur verstehen zu können und damit aufzuklären. (Scherer und Neuhaus 2006)

Daher war ein weiterer Grundgedanke dieser Arbeit, dass Carotinoide nicht nur einen Einfluss auf die Membranstabilität haben, sondern auch auf die Membranfluidität, um damit gegebenenfalls die Kälteadaptation von psychophilen und psychrotoleranten Bakterien erklären zu können. Carotinoide könnten wie Chinone oder ungesättigte Fettsäuren durch ihre molekulare Struktur und die enthaltenen Doppelbindungen raumfordernd auf die Membran wirken. Durch die Lokalisation in bakteriellen Membranen kommt es zur erweiterten Arbeitshypothese, dass bei Kälteeinfluss die Membran durch den vermehrten Einbau von Carotinoiden aktiv angepasst werden kann, um die Funktionsfähigkeit der Membran zu gewährleisten.

1.4.3 Weitere Mechanismen in der Kälteanpassung von Bakterien

Neben den oben genannten Veränderungen können noch weitere membranständige Substanzen einen Einfluss auf die Fluidität der Membranen nehmen und somit eine Kälteadaptation erklären, wovon beispielhaft zwei Gruppen kurz beschrieben werden.

Membranproteine tragen durch ihre Fähigkeit mit Lipiden zu interagieren zur Gesamtstabilität der Phospholipiddoppelschicht bei (Erand 1998). Takeuchi et al. zeigten bereits 1978 bei *Escherichia coli*, dass dessen Membranphospholipide mit den Membranproteinen interagieren. In einer späteren Studie von Am Kropinski et al. (1987) konnten auch temperaturabhängige Schwankungen im Proteingehalt der Plasmamembran von *Pseudomonas aeruginosa* gezeigt werden. Diese Ergebnisse untermauerten die Bedeutung der Membranproteine in der Kälteadaptation, auch wenn sie im Vergleich zu den anderen Mechanismen eine untergeordnete Rolle spielen (Shivaji et al. 2007).

Hopanoide stellen einem dem Cholesterin strukturell ähnlichen Stoff dar, der von Bakterien gebildet werden kann. Somit können Hopanoide in Membranen von Bakterien eine ähnliche Funktion besitzen, wie Cholesterin in Membranen von Eukaryonten. Die Bildung von Hopanoiden scheint, wie auch die Bildung von Carotinoiden und langkettigen, gesättigten Fettsäuren, die Membran als hydrophobe Barriere zu stabilisieren und einer möglichen Erhöhung der Permeabilität entgegenzuwirken. (Bringer et al. 1985; Kannenberg und Poralla 1999)

1.5 Ziel der Arbeit

Am Ende dieser Arbeit soll die Erkenntnis stehen, ob und wie andere lipophile Komponenten der Zellmembran von Bakterien einen Einfluss auf die Kälteanpassung haben.

Mit dem Hintergrund der Bedeutsamkeit kälteangepasster Bakterien in der Mikrobiologie, aber auch für die Lebensmittelindustrie im Bereich Biotechnologie und Lebensmittelsicherheit, wurden für diese Arbeit lebensmittelassoziierte Kühlhabitats und gekühlte Lebensmittel untersucht, um psychrophile bzw. psychrotolerante Bakterien zu isolieren. Die erhaltenen Isolate werden morphologisch und chemotaxonomisch charakterisiert und per 16S rRNA-Gensequenzierung identifiziert.

Bezogen auf die Kälteanpassung werden alle Isolate hinsichtlich ihres Fettsäuremusters bei 10°C und 30°C analysiert und in Gruppen eingeordnet. Bei ausgewählten Isolaten werden zusätzlich bei 10°C und 30°C zum einen die Chinonanalytik und zum anderen die Carotinoidanalytik angewendet, um die unter Abschnitt 1.4 beschriebenen weiteren Kälteanpassungsstrategien auf Membranebene auszuarbeiten.

2. Material und Methoden

Die verwendeten Chemikalien und Lösungsmittel stammen, sofern nicht zusätzlich angegeben, von den Firmen Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland) und Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland).

2.1 Herkunft der Bakterienisolate

Als Isolationsquellen dienten zum einen Oberflächen von verschiedenen Kühlschranksinnenseiten, Kühlraumwänden sowie ein gekühlter Milchtank und zum anderen verschiedene, gekühlte Lebensmittelproben.

Die Isolate wurden entweder mit dem Rodac-Plattenverfahren oder dem Tupfverfahren von der jeweiligen Oberfläche isoliert oder mithilfe des Oberflächenverfahrens aus dem jeweiligen Lebensmittel isoliert (Bast 1999). Die Isolate wurden als kälteadaptiert bezeichnet, sobald ein sichtbares Wachstum bei 10°C nach 7 Tagen stattfand.

In Tabelle 2 werden die jeweiligen kälteadaptierten Bakterienisolate mit Herkunft aufgelistet.

Tabelle 2: untersuchte Bakterienisolate und deren Herkunft

Isolat	Isolationsquelle
J1	Oberfläche der Innenwand eines Kühlschranks
J2	
J3	
J5	
J6	
J7	
J8	
J9	
J10	
J11	
J12	
J16	
J17	

J20	frische Tortellini mit Schweinefleischfüllung (gekühlt)
J21	
J22	
J23	
J29	Vanillespeiseeis aus Eisdiele
J32	
J34	
J39	Oberfläche der Innenseite eines Kühlschranks
J40	
J44	
J45	
J48	
J50	
J52	Schlagsahne aus Sahneaufschlagmaschine einer Eisdiele
J53	
J54	Bananenspeiseeis von einer Eisdiele
J55	
J57	
J58	Schokoladenspeiseeis von einer Eisdiele
J59	
J60	
J61	
J62	Rohmilch aus Milchtank (Forschungsgut Frankenforst der Universität Bonn)
J63	
J64	
J65	
J66	
J67	
J68	
J69	
J70	
J71	
J72	Tupfer-Abstrich Milchtankablass (Forschungsgut Frankenforst der Universität Bonn)
J73	
J74	
J75	
J76	
J77	
J78	
J79	
J80	Rohmilch Milchtank (Forschungsgut Frankenforst der Universität Bonn)
J81	
J82	Emmentaler Biomarkt
J83	
J84	Eichenblattsalat Biomarkt

J85	frisches, gemischtes Hackfleisch (50% Rind, 50% Schwein)
J86	
J87	Salat (verzehrbarer Mischsalat)
J88	
J89	
J90	
J91	
FFL1	Räucherlachs
Iso1/1	Frisches Lammhackfleisch

Verwendete Referenz- und Vergleichsstämme sind in Tabelle 3 aufgelistet. Die Stämme wurden von der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) bzw. dem Laboratorium voor Microbiologie, Universität Gent (LMG) bezogen.

Tabelle 3: Referenz- und Vergleichsstämme zu bestimmten Isolaten

Referenz- bzw. Vergleichsbakterium	Stammbezeichnung
<i>Bacillus cereus</i>	DSM 345
<i>Pedobacter panaciterrae</i>	LMG23400 ^T
<i>Pedobacter africanus</i>	DSM 12126 ^T
<i>Pedobacter heparinus</i>	DSM 2366 ^T
<i>Listeria monocytogenes</i>	DSM 20600 ^T

2.2 Verwendete Medien und Kultivierung der Bakterien

Die Isolate wurden für die Untersuchungen und für die Stammhaltung in Trypton-Soja-Bouillon (TSB) (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland; Zusammensetzung: Pepton aus Casein 17,0 g/L, Pepton aus Sojamehl 3,0 g/L, D(+)-Glucose-Monohydrat 2,5 g/L, Natriumchlorid 5,0 g/L di-Kaliumhydrogenphosphat 2,5g/L) oder auf Trypton-Soja-Agar (TSA) (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland; Zusammensetzung: Pepton aus Casein 15,0g/L, Pepton aus Sojamehl 5,0 g/L, Natriumchlorid 5,0 g/L Agar-Agar 15,0 g/L) angezogen. Bei der Gattung *Listeria* wurde Hefeextrakt-Trypton-Soja-Bouillon (HTB) (Zusammensetzung TSB und 6g/L Hefeextrakt (Oxoid, Hampshire, UK) oder Hefeextrakt-Trypton-Soja-Agar (HTA) (Zusammensetzung: TSA und 6g/L Hefeextrakt) zur Kultivierung verwendet.

2.3 Makroskopische und mikroskopische Morphologiebeschreibung

Zur Differenzierung der gewonnenen Reinkulturen wurde neben der Koloniemorphologie auch die Zellmorphologie mit einem Lichtmikroskop (Modell BH-2, Olympus, Hamburg, Deutschland) untersucht. Die Zellgröße wurde mit einem Phasenkontrastmikroskop (Axio, Zeiss, Deutschland) bestimmt. Eine weitere Differenzierung der Isolate erfolgte mittels Gram-Färbung mit anschließender mikroskopischer Betrachtung (Gram & Friedländer 1884). Die Ergebnisse des Gram-Färbeverhaltens wurden mit dem KOH-Test (Buck 1982) und dem L-Alanin-Aminopeptidase-Nachweis mit Bactident® Aminopeptidase-Teststreifen (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) überprüft. Außerdem wurde die Katalasereaktion nach Gerhardt et al. (1981) getestet. Die Oxidasereaktion wurde mittels Oxidaseteststreifen (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) bestimmt.

2.4 Temperaturtoleranztest

Für einen Temperaturtoleranztest wurde bei 4°C, 8°C, 10°C, 17°C, 28°C, 30°C, 37°C und 42°C inkubiert und auf Wachstum untersucht. Als Nährmedium diente Trypton-Soja-Agar.

2.5 Salzkonzentrationstest

Um die Salztoleranz festzustellen, wurde bei verschiedenen Salzkonzentrationen bei 30°C inkubiert. Die Salzkonzentrationen lagen bei 0,5%, 1%, 1,5%, 2% 3% und 4%. Als Nährmedium diente R2A-Bouillon (LAB MLimited, Lancashire, UK).

2.6 Molekularbiologische Methoden

2.6.1 Molekularbiologische Identifizierungen anhand von 16S rRNA-Gen-Sequenzanalysen

Um die Isolate molekularbiologisch zu identifizieren, wurde das 16S rRNA-Gen sequenziert. Dafür erfolgte die DNA-Extraktion mit dem Qiagen DNeasy® Blood and Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach Herstellerangaben.

Die Bakterienbiomasse wurde als Zellpellet aus 1 mL Bakteriensuspension durch Zentrifugation bei 7.500 x rpm extrahiert, anschließend in 180 µL Lysepuffer (20 mg/mL Lysozym, 20 mM Tris, pH 8,0, 2 mM EDTA, 1,2% Triton X-100) resuspendiert und 30 Minuten bei 37°C inkubiert.

Durch Zugabe von 200 µL des Puffers AL sowie 25 µL Proteinase K und anschließender Inkubation für 30 Minuten bei 70°C setzte die Lyse der Zellen ein. Nach Zusatz von 200 µL Ethanol und gründlichen Vortexen wurde die Probe auf die Säule pipettiert. Durch einen 1-minütigen Zentrifugationsschritt bei 8.000 rpm wurde die Probe durch den Filter in ein Sammelgefäß gedrückt. Die Nukleinsäuren werden dabei durch Anwesenheit der chaotropen Salze an die Glasfasern des Filters gebunden. Um PCR-störende Komponenten, Salze, Proteine sowie zelluläre Verunreinigungen von der Säule zu waschen, wurde die Säule in ein neues Sammelgefäß überführt, mit 500 µL AW1-Puffer versetzt und erneut bei 8.000 rpm eine Minute zentrifugiert. Ein zweiter Waschschrift erfolgte auf gleicher Weise mit Waschpuffer AW2. Zum Schluss folgte noch ein letzter Zentrifugationsschritt bei voller Drehzahl (13.200 rpm), um die Säule zu trocknen. Die DNA wurde schließlich mit Hilfe von 200 µL AE Puffer und Zentrifugation von der Säule eluiert und anschließend in einem 1,5 mL-Reaktionsgefäß bei -20°C gelagert. Die Amplifikation der 16S rRNA-Gen-DNA wurde mit der Polymerase Kettenreaktion (PCR) durchgeführt. Für den Mastermix wurden 0,5 µL (1U/Ansatz) *Taq*-Polymerase BioTherm, Ares Bioscience GmbH, Köln, Deutschland), 1 µL 10mM dNTP's (Bioline GmbH, Luckenwalde, Deutschland), 1,5 µL 50 mM MgCl (BioTherm, Ares Bioscience GmbH, Köln), 1 µL (8pmol/µL) forward-Primer GM3 (VBC, Biotech, Wien, Österreich), 1 µL (8pmol/µL) reverse-Primer GM4 (VBC, Biotech, Wien, Österreich), 0,75 µL Bovine Serum Albumin (Promega Corporation, Madison, USA) gemischt und auf 50 µL Reaktionsvolumen mit hochreinem und autoklaviertem HPLC-Wasser aufgefüllt. Die PCR wurde mit dem Thermocycler (Mastercycler gradient, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) durchgeführt. Das Temperaturprogramm umfasste 10 Zyklen mit jeweils der Denaturierungsphase bei 95°C (1 Minute), der Annealingphase des Primers bei 49°C (1 Minute) und der Polymerisation bei 72°C (1,5 Minuten).

Anschließend folgten 20 Zyklen mit jeweils einer Minute bei 95°C, einer Minute bei 44°C sowie 1,5 Minuten bei 72 °C.

Zur Überprüfung der erfolgreichen DNA-Isolierung und der PCR-Amplifikation erfolgte eine Gelelektrophorese mit einem 1%igen Agarosegel (VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland) bei 70 V für 40 Minuten. 2 µL des DNA-Extrakts wurden dafür mit 1 µL DNA Loading Buffer (Bioline GmbH, Luckenwalde, Deutschland) vermischt und in die Geltaschen gegeben. Als Längenstandard wurden 3 µL einer DNA-Leiter (HyperLadder I, Bioline GmbH, Luckenwalde, Deutschland) mitgeführt. Das Gel wurde anschließend mit dem 3-fach konzentrierten DNA-Farbstoff GelRed (Biotium, Hayward, USA) 20 Minuten gefärbt und konnte unter UV-Licht betrachtet werden.

Bei erfolgreicher Amplifikation wurde das PCR-Produkt mit dem QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach Herstellerangaben aufgereinigt.

Nach Zugabe von 250 µL PB Puffer wurde das Gemisch auf eine Säule pipettiert. Durch Zentrifugation bei 8.000 rpm wurde die DNA an die Glasfasern der Säule gebunden. Die Säule wurde anschließend in ein neues Sammelgefäß überführt und mit PE-Puffer gewaschen, um störende Komponenten zu entfernen. Nach Zugabe von 30 µL EB Puffer und einminütiger Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurde durch Zentrifugation das aufgereinigte PCR-Produkt von der Säule gelöst. Dieses wurde dann in einem 1,5 mL-Reaktionsgefäß bei -20°C gelagert.

5 µL des aufgereinigten PCR-Produktes wurde mit jeweils 2 µL der Primer GM8Rneu (5'-GGACTACCAGGGTATCTAAT-3') und GM1F (Muyzer et al. 1993) (jeweils 20 pmol/µL) versetzt und zur Sequenzierung der Isolate an die Firma SeqLab (Sequence Laboratories GmbH, Göttingen, Deutschland) geschickt. Die erhaltenen Basensequenzen wurden zunächst mit dem Programm Chromas Lite (Technelysium Pty Ltd, Brisbane, Australien) geprüft und falls nötig manuell editiert. Die Zusammensetzung der Basensequenzen erfolgte mit dem Programm MEGA 5.0 (Tamura et al. 2007). Zum Schluss wurden die erhaltenen Basensequenzen mit bekannten Gensequenzen über die Datenbank EzTaxon-e server 2.1 (Kim et al. 2012) abgeglichen.

2.6.2 Molekulare Phylogenie-Analyse

Die Konstruktion eines phylogenetischen Stammbaumes wurde ebenfalls mit dem Programm MEGA 5.0 (Tamura et al. 2007) mittels „Neighbor-Joining“-Analyse (Saitou und Nei 1987) durchgeführt. Im „Bootstrap“-Verfahren konnten durch wiederholte Berechnung (1000x) der Baumtopologie mit dem „Neighbor-Joining“-Verfahren Werte für die statistische Signifikanz ermittelt werden. Um dieses Ergebnis zu bestätigen, wurde zusätzlich die „Maximum Likelihood“ Analyse und die „Maximum Parsimony“ Analyse durchgeführt.

2.6.3 DNA-DNA Hybridisierung

Durch die DNA-DNA-Hybridisierung kann man den Grad der Ähnlichkeit zwischen genetischen Pools von DNA-Sequenzen messen. Die Hybridisierung wurde mit genomischer DNA des zu testenden Isolates und mit DNA des nächstähnlichen Typstammes durchgeführt. Es wurde die von Ziemke et al. (1998) beschriebene Methode verwendet, mit der Ausnahme, dass für die Nick-Translation 2 mg DNA während einer 3-stündigen Inkubation bei 15°C markiert wurde.

Diese Analyseexperimente wurden von Prof. Peter Kämpfer im Institut für angewandte Mikrobiologie, Abteilung Mikrobiologie der Recyclingprozesse der Universität Giessen, durchgeführt.

2.7 Chemotaxonomische Methoden

2.7.1 Fettsäureanalysen

Die Fettsäureprofile der kälteangepassten Isolate wurden gaschromatographisch bestimmt. Dabei wurde nach der Methode der sauren Methanolyse von Sasser (1990) und Miller (1982) vorgegangen. Die eingesetzten Lösemittel besaßen HPLC-Reinheitsgrad. Zunächst wurden die Isolate auf TSA bzw. HT-Agar ausgestrichen und bei 30°C für 48 Stunden oder bei 10°C für 168 Stunden inkubiert. Anschließend wurden 40 mg Zellmasse in ein Pyrexröhrchen eingewogen und eine Fettsäuremethylester-Präparation durchgeführt. Dafür wurde als erstes die Verseifungsreagenz (15% NaOH in Methanol/bidest. Wasser 1:1 v/v) hinzugegeben und anschließend bei 100°C gekocht, um die Fettsäuren abzuspalten. Die anschließende Methylierung erfolgte durch das Methylierungsreagenz (6,0 N HCl/Methanol 13:11 v/v) und einen weiteren Erhitzungsprozess bei 80°C. Durch Zugabe von einer Extraktionsreagenz (1:1 Hexan:Methyl-tert-Butylether) wurde eine Phasentrennung hervorgerufen, durch die die Fettsäuremethylester gewonnen werden konnten. Nach einer Waschung mit 1,2% NaOH-bidest. H₂O-Lösung wurden die Fettsäuren in ein Glas-Vial überführt und mittels Gaschromatographie/Massenspektrometrie bestimmt (GC 7890A, GC Massenspektrometer 5975C, Agilent Technologies, Böblingen). Zur besseren Detektion hydroxiliertes Fettsäuren wurde der Gaschromatograph mit einem FID-Detektor (GC 6890A, Agilent Technologies, Böblingen, Deutschland) verwendet.

Das Injektionsvolumen betrug 1 µL, welches mit dem Trägergas Helium 5.0 auf die 5%-ige Phenylmethylsilicon-Kapillarsäule (0,25 mm x 30 m) überführt wurde. Der Injektorblock besaß eine Temperatur von 250°C und der Säulenofen wurde mit einer Heizrate von 5°C/min von 120°C auf 240°C erhitzt (Lipski & Altendorf, 1997). Für die Auswertung wurden die Software ChemStation GCMS Data-Analysis (Agilent Technologies, Böblingen) verwendet. Die Retentionszeiten der Fettsäuremethylester wurden mit denen eines Standards (Microbial ID, Newark, USA) abgeglichen und mit Hilfe des Equivalent-Chain-Length-Wertes (ECL-Wert) über eine hausinterne Datenbank identifiziert. Zur Überprüfung der Ergebnisse wurde das Massenspektrum der Peaks ausgewertet. Der prozentuale Gehalt einer Fettsäure wurde durch die ChemStation Software bestimmt. Die Lagerung der Proben erfolgte bei -20°C.

2.7.2 Chinonanaysen

Die Analyse des Chinongehaltes in Bakterienzellen wurde nach einer modifizierten Methode von Hiraishi et al. (1996) und Hu et al. (1999) durchgeführt. Die Gewinnung der Bakterienbiomasse erfolgte aus 100 mL Zellsuspension durch Zentrifugation für 20 Minuten bei 10.000 g. Es folgte eine zweifache Waschung mit 0,9%-iger NaCl-Lösung. Zum Teil wurden die Zellpellets in einer Gefriertrocknungsanlage (Christ, Alpha 1-2 LD, Osterode) plus Vakuumpumpe (vacuubrand, Wertheim) lyophilisiert, um den potentiellen Fehlerfaktor durch das Gewicht des Wassers zu eliminieren. Alle eingesetzten Lösemittel besaßen HPLC-Reinheitsgrad.

Die bakterielle Biomasse wurde mit 5 mL Phosphatpuffer (50 mM, pH 7,4), 10 mL Methanol und 5 mL Chloroform versetzt. Während des Mischens im Überkopf-Schüttler für 1,5 Stunden wurden die Chinone aus den Zellen extrahiert. Aufgrund der Lichtempfindlichkeit der Chinone sowie der Flüchtigkeit der eingesetzten Lösungsmittel erfolgte dieser Schritt in abgedeckten 50 mL-Pyrexröhrchen mit Teflon-Dichtung. Anschließend wurden 5 mL bidestilliertes Wasser und 5 mL Chloroform hinzugegeben und 5 Minuten bei 3.000 g zentrifugiert. Zum Wasserentzug und zur Trocknung des Lösungsmittels wurde die untere Phase (Chloroform-Methanol-Phase) über Filterflocken mit wasserfreiem Natriumsulfat filtriert und das Filtrat im Rotationsverdampfer (CVC 3000 vakuubrand, IKA RV 10 digital, IKA, HB 10 digital, VWR, Darmstadt) bei 45°C und 100 mbar bis zur Trockne eingengt.

Zur Extraktion der Chinone wurde anschließend 5 mL bidestilliertes Wasser und 10 mL Hexan zugesetzt und 5 Minuten geschüttelt. Die Hexanphase wurde in einen neuen Spitzkolben überführt und die Extraktion im ersten Kolben mit 10 mL Hexan wiederholt. Die Hexanphasen wurden vereinigt und wieder bis zur Trockne eingengt. Danach wurde das Extrakt in 1 mL Hexan wieder aufgenommen und auf eine vorkonditionierte Silicagelsäule (1 g Sorbent, 6 mL Reservoir, Biotage, Uppsala, Schweden) aufgetragen. Die Elution der Menachinone erfolgte mit 20 mL eines Hexan-Diethylether-Gemisches (98:2, v/v). Ubichinone wurden mit 20 mL Hexan-Diethylether (90:10, v/v) von der Säule gelöst. Die zusammengeführten Extrakte wurden bis zur Trockne im Rotationsverdampfer eingengt, in 300 µL Methanol aufgenommen und für die Analyse in Glas-Vials abgefüllt.

Die Analyse der Chinongehalte erfolgte mittels HPLC (HP Series 1050, Böblingen, Deutschland). 15 µL der Probe wurden auf die ODS Hypersil RP₁₈-Säule (HP, Böblingen/Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) injiziert, die durch den Ofen (Mistral, Spark Holland, Emmen, Niederlande) auf einer Temperatur von 30°C gehalten wurde. Als isokratisches Laufmittel wurde ein Gemisch aus Methanol und

Diisopropylether (9:2, v/v) mit einer Flussrate von 1 mL/min eingesetzt. Die Detektion erfolgte über einen Diodenarray-Detektor (HP Series 1050, Böblingen, Deutschland) bei 275 nm. Bis zu ihrer Verwendung wurden die Proben bei -20°C abgedunkelt gelagert.

Zur Auswertung wurde die Software ChemStation (HP, Böblingen, Deutschland) verwendet. Die auftretenden Peaks konnten über die Retentionszeiten und ihre charakteristischen UV-Spektren identifiziert werden. Nach der Identifizierung der Ubi- und Menachinone über das charakteristische UV-Spektrum konnte über das Verhältnis der Retentionszeiten von Probe zu mitgeführtem Standard und mit Hilfe einer internen Auswertungstabelle die genaue Chinonart mit der Anzahl an Isopreneinheiten ermittelt werden. Als Standard wurde Ubichinon Q₁₀ sowie das Phyllochinon Vitamin K₁ mit jeweils einer Konzentration von 100 nmol/mL in Hexan Methanol (1:2, v/v) eingesetzt.

Für die quantitative Bestimmung wurden die Peakflächen von Probe und mitgeführtem Standard zur Berechnung herangezogen. Die Fläche unter dem Peak gibt die Menge an absorbiertem Licht in milli-Absorbance-Units mal Sekunde (mAU*s) an. Über die bekannte Konzentration des Standards und die eingesetzten Biomassenmenge konnte der Chinongehalt pro Gramm Biomasse bzw. Lyophilisat mit Hilfe einer Formel berechnet werden.

$$\begin{aligned} \text{Chinongehalt in der Biomasse} \left[\frac{\text{nmol}}{\text{g}} \right] \\ = \frac{\text{Peakfläche der Probe} [\text{mAU} * \text{s}] \times 100 \frac{\text{nmol}}{\text{ml}} \times 0,3 \text{ ml}}{\text{Peakfläche Standard} [\text{mAU} * \text{s}] \times \text{Biomasse} [\text{g}]} \end{aligned}$$

Biomasse in g: Nassgewicht bzw. Trockengewicht

0,3 mL: aufgenommen in 300µl Methanol

2.7.3 Kombinierte polare Lipid- und Chinonanalyse

Dieses Verfahren ist eine kombinierte Methode und nach Minnikin et al. (1984) modifiziert. Alle Lösungsmittel hatten HPLC-Reinheitsgrad.

In einem ersten Schritt wurden aus lyophilisierter Biomasse mit einem wässrigem Methanol/Petroleumether (60-80°C)-Gemisch (1:1, v/v) die Chinone extrahiert. Der Rückstand wurde in Aceton aufgenommen und mittels Dünnschichtchromatographie auf einer Kieselgelplatte 60F₂₅₄ getrennt. Als Standard für Menachinone wurde Vitamin K₁, als Standard für Ubichinone wurde Coenzym Q₁₀ mit aufgetragen. Als Laufmittel diente Petroleumether/Diethylether (85:15, v/v). Das Ergebnis wurde unter einer UV-Lampe betrachtet. Die getrennten Mena- und Ubichinone wurden dann aus der Kieselgelplatte eluiert und in der HPLC nach Hu et al. (1999) analysiert. Als Elutionsmittel für Menachinone diente Diethylether und für Ubichinone Aceton.

In einem zweiten Schritt wurde das Lyophilisat nach der Chinonextraktion weiter mit Chloroform/Methanol/0,3% NaCl-Lösung (9:10:3, v/v) behandelt, um die polaren Lipide aus der Zellmembran zu extrahieren. Das gewonnene Extrakt wurde auf eine Silicagelplatte aufgetragen und zweidimensional entwickelt. Als erstes Laufmittel wurde Chloroform/Methanol/Wasser (65:25:4, v/v) und als zweites Laufmittel Chloroform/Essigsäure/Methanol/Wasser (80:15:12:4, v/v) verwendet. Die getrocknete Kieselgelplatte wurde zuerst mit Ninhydrinsprühreagenz besprüht und 5 Minuten bei 100°C inkubiert, um die Lipide mit freier Aminogruppe sichtbar zu machen. Nach einer kurzen Abkühlung wurden die Platten mit Molybdänblau-Reagenz besprüht und ebenfalls für 5 Minuten bei 100°C inkubiert. Entstandene blaue Flecken kennzeichneten Phospholipide.

Es wurde jeweils eine Dokumentationsplatte unter den gleichen Bedingungen angefertigt. Diese Platte wurde jedoch nicht mit den verschiedenen Färbereagenzien besprüht, sondern mit 30% Schwefelsäure behandelt und anschließend erhitzt. Die sich hier bildenden braunen Flecken kennzeichnen alle auf der Platte aufgetrennten polaren Lipide.

2.7.4 Carotinoideextraktion

Die Carotinoideextraktionsmethode modifiziert nach Kaiser et al. (2007) und Rezwan et al. (2007) stellte sich in der Abschlussarbeit von Jacobsen (2013) als effektivste Extraktionsmethode heraus und würde daher als Carotinoideanalysemethode angewendet.

Der Zellaufschluss wurde mit Lysozym und Ultraschall durchgeführt, um anschließend die Carotinoide mit den Lösungsmitteln Methanol und Chloroform zu extrahieren. Alle verwendeten Lösemittel besaßen HPLC-Reinheitsgrad.

Die Herstellung der Lysozym- (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland, Artikelnr: L6876) und Lipase- (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland, Artikelnr: L1754)-Lösung mit einer Konzentration von 2,4 mg/mL erfolgte mit einem Phosphatpuffer mit pH 7,0. Die zur Extraktion benötigten Lösungsmittel Chloroform und das Chloroform-Methanol-Gemisch wurden mit der Zugabe von 0,1% Butylhydroxytoluol (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) stabilisiert. Es wurden 20-50 mg Zellyophilisat in 50 mL-Pyrexröhrchen eingewogen und in 5 mL Lysozym- und Lipase-Lösung resuspendiert. Für den Zellaufschluss wurde die Suspension für zwei Stunden bei 37°C unter Schütteln inkubiert und anschließend für 60 Minuten im Ultraschallbad (Sonorex, Bandelin electronic, Berlin) behandelt. Nach dem Zellaufschluss wurde die Zellsuspension in Zentrifugenröhrchen überführt und das Zellpellet durch Zentrifugation für 10 Minuten bei 12.000 g und 4°C für die Carotinoideextraktion gewonnen.

Für die Extraktion der Carotinoide wurden 4 mL Methanol/Chloroform-Gemisch (7:3, v/v) zum Zellpellet gegeben und gevortext. Nach einer Zentrifugation für 10 Minuten bei 12.000 g und 4°C wurde der Überstand, bestehend aus dem Extrakt mit den Carotinoiden, über Filterflocken in ein 50 mL-Pyrexröhrchen überführt. Die Extraktion wurde je nach Isolat drei- bis viermal wiederholt, bis der Extrakt farblos erschien. Zur Gewinnung der Chloroformphase wurde den vereinigten Extrakten 10 mL 10%ige NaCl-Lösung und 3 mL Chloroform hinzugefügt und die Mischung gevortext. Über einen Zentrifugationsschritt für 5 Minuten bei 4000 rpm und 4°C konnte eine Phasentrennung erreicht werden. Die untere Chloroform-Phase wurde in einen 25 mL Spitzkolben überführt. Die Extraktion der Carotinoide aus der wässrigen Phase wurde wiederholt, bis beide Phasen farblos waren.

Aus den vereinigten Extrakten wurde mit dem Rotationsverdampfer bei 100 mbar und 20-35°C das Lösungsmittel entfernt und der Rückstand wurde für die photometrische und chromatographische Carotinoidebestimmung in Hexan aufgenommen.

2.7.4.1 Quantitative Carotinoidbestimmung

Die quantitative Carotinoidbestimmung erfolgte über eine photometrische und eine chromatographische Methode.

Für die photometrische Bestimmung der Carotinoidkonzentration in den Proben wurden die Lösungsmittel nach der Extraktion mit dem Rotationsverdampfer bei 100 mbar bei 30°C entfernt und die Rückstände in 1-5 mL Hexan aufgenommen. Das Hexanvolumen war von der Rückstandsmenge abhängig, um eine Absorption von <1,0 im Spektralphotometer zu erreichen. Nach Rodriguez-Amaya (2001) wurden die Lösungen bei einer Wellenlänge von 450 nm mit dem Spektralphotometer (Genesys 10uv Scanning, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) gemessen. Die Berechnung der Carotinoidmenge in der Probe in µg und der Carotinoidkonzentration als Carotinoidmenge pro Gramm Lyophilisat wurden nach Rodriguez-Amaya (2001) berechnet. Für ein Gemisch aus verschiedenen unbekanntem Carotinoiden wird nach Britton (1995) die Verwendung eines spezifischen Absorptionskoeffizienten von $2500 \times \frac{100\text{mL}}{\text{g}\cdot\text{cm}}$ vorgeschlagen.

$$x[\mu\text{g}] = \frac{A \cdot y[\text{mL}] \cdot 10^6}{A_{1\text{cm}}^{1\%} \cdot 100}$$

$$x\left[\frac{\mu\text{g}}{\text{g}}\right] = \frac{x[\mu\text{g}]}{\text{Einwaage} [\text{g}]}$$

x = Carotinoidmenge in µg bzw. -konzentration in µg/g Trockengewicht

y = Volumen an Lösungsmittel in mL

A = Absorption bei 450 nm

$A_{1\text{cm}}^{1\%}$ = spezifischer Absorptionskoeffizient ($2500 \frac{100\text{mL}}{\text{g}\cdot\text{cm}}$)

Für die chromatographische Bestimmung des Carotinoidgehaltes und zur Auftrennung des Carotinoidgemisches wurden die Extrakte aus der photometrischen Bestimmung erneut mit dem Rotationsverdampfer eingedampft. Nach der Entfernung des Lösungsmittels wurde der Rückstand in 200 µl Hexan aufgenommen, in Glas-Vials überführt und bis zur Messung bei -20°C gelagert.

Die chromatographische Analyse der Carotinoide wurde nach der modifizierten Methode von Rähler (2007) durchgeführt. Die Detektion erfolgte wieder über das HPLC-System mit einem Diodenarray-Detektor (HP Series 1050, Böblingen). 20 µL der Probe wurden in das HPLC-System injiziert. Die Auftrennung der Analyten erfolgte über eine auf 20°C temperierte ODS Hypersil RP₁₈-Säule (Thermo Fisher Scientific,

Massachusetts, USA). Als mobile Phase wurde ein Gemisch aus Acetonitril, Methanol und Isopropanol im Verhältnis 85:10:5 mit einer Flussrate von 0,8mL/min eingesetzt. Der Diodenarray-Detektor detektierte die aufgetrennten Analyten bei einer Wellenlänge von 440 nm. Zur Auswertung wurde die Software ChemStation 2.0 (HP, Böblingen) verwendet. Die erhaltenen Peaks wurden über ihre charakteristischen Absorptionsspektren als Carotinoide identifiziert und der Gesamtcarotinoidgehalt mithilfe des mitgeführten β -Carotin-Standards berechnet.

Über den Vergleich der gemessenen Peakfläche des Standards mit bekannter Konzentration und der Gesamtpeakfläche der Carotinoide in der Probe wurde die Carotinoidkonzentration des Extraktes in mg/L nach der nachstehenden Formel berechnet (Matissek et al. 2010).

$$X\left[\frac{mg}{L}\right] = \frac{Fläche_{Probe} \cdot m_{Std}}{Fläche_{Std} \cdot VD}$$

X	= Carotinoidkonzentration in mg/L
Fläche (Probe)	= Gesamtpeakfläche der Probe
Fläche (Std)	= Peakfläche Standard
VD	= Verdünnung des Standards für die chromatographische Analyse
m_{Std}	= Konzentration des Standards in mg/L

Über die Carotinoidkonzentration in mg/L in dem Probenextrakt konnte der Carotinoidgehalt in der Probe in μ g und der Carotinoidgehalt bezogen auf die Einwaage (Lyophilisat) berechnet werden.

$$x[\mu g] = \frac{X\left[\frac{mg}{L}\right]}{10^6 \cdot y[\mu l]} \cdot 10^3$$

$$x\left[\frac{\mu g}{g}\right] = \frac{x[\mu g]}{Einwaage [g]}$$

X	= Carotinoidkonzentration der Probe in mg/L
x	= Carotinoidmenge in der Probe in μ g bzw. -konzentration in μ g/g
y	= Volumen an Lösungsmittel in μ l

2.8 Messungen des Zellertrages

2.8.1 Messung des Wachstumsverhaltens mittels optischer Dichte

Zur Bestimmung des bakteriellen Zellertrages wurde von ausgewählten Isolaten eine Wachstumskurve erstellt. Somit konnte man den bakteriellen Wachstumsverlauf verfolgen. Hierfür wurde die indirekte Methode der Trübungsmessung gewählt. Dabei wird die optische Dichte (OD) einer Bakteriensuspension, die innerhalb bestimmter Grenzwerte proportional zur Zellzahl ist, photometrisch gemessen (Madigan et al. 2008). Als Nährmedium wurde TSB bzw. HT-Bouillon verwendet. Die optische Dichte wurde bei einer Wellenlänge von 625 nm im Spektralphotometer (Genesys 10uv Scanning, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) gemessen.

Im Verlauf dieser Messung wurde die optische Dichtung in regelmäßigen Abständen bestimmt. Damit konnten die unterschiedlichen Wachstumsphasen möglichst genau bestimmt werden. Besonders relevant waren die Zeitpunkte der spätexponentiellen Wachstumsphase und der stationären Wachstumsphase, weil in diesen Phasen die optische Dichte am höchsten war. Danach wurde die Messung beendet, da die Bakterien die stationäre Phase erreicht hatten und kein Anstieg mehr erfolgte.

Die Wachstumsgeschwindigkeit während der exponentiellen Vermehrung wurde über die Wachstumsrate μ berechnet (Schlegel et al. 2007)

$$\mu = \frac{\ln(x_t) - \ln(x_0)}{t - t_0}$$

μ : exponentielle Wachstumsrate einer statischen Kultur [h^{-1}]

x_t : Zelldichte zum Zeitpunkt t [hier: OD]

x_0 : Zelldichte zum Zeitpunkt t_0 [hier: OD]

t: Zeit am Ende der exponentiellen Wachstumsphase [h]

t_0 : Zeit zu Beginn der exponentiellen Wachstumsphase [h]

2.8.2 Messung des Proteingehaltes

Zur Messung des bakteriellen Zellertrages wurde zusätzlich neben der Ermittlung der optischen Dichte eine Proteinbestimmung nach Biuret (Bast 1999) durchgeführt.

Die ausgewählten Isolate wurden in Flüssigkultur (TSB bzw. HT-Bouillon) bis zu dem Zeitpunkt des Erreichens der spätexponentiellen Wachstumsphase bei der jeweiligen Temperatur inkubiert.

5 mL dieser Flüssigkultur wurden abgenommen, abzentrifugiert, mit 0,9%-iger NaCl-Lösung zweimal gewaschen und anschließend die Gesamtproteinmenge des entstandenen Zellpellets bestimmt. Dafür wurde das jeweilige Zellpellet mit 3 molarer Natronlauge versetzt und anschließend 5 Minuten bei 100°C gekocht. Danach wurde 2,5% Kupfersulfat-Lösung hinzupipettiert und der Ansatz bei Raumtemperatur für 30 Minuten stengelassen. Der Ansatz wurde zentrifugiert und der Überstand bei einer Wellenlänge von 555 nm im Spektralphotometer gemessen.

Zusätzlich zu den Proben wurde eine Eichgerade erstellt. Die gemessenen Extinktion der entsprechend eingestellten Proteinmengen (in mg pro 5 mL Probenansatz) wurden als Eichkurve graphisch dargestellt. Somit konnte die Proteinmenge pro Probenansatz ermittelt werden. Das eingesetzte Volumen wurde dividiert, um den Proteingehalt pro mL Ausgangssuspension zu erhalten.

2.9 Kälteresistenztest

Bei dem Kälteresistenztest wurde die Resistenz gegenüber Einfrier- und Auftaustress bestimmter Listerienstämme untersucht.

Dafür würde eine Bakterienkultur des jeweiligen Listerienstammes in HT-Bouillon bis zur spätexponentiellen Wachstumsphase bei 6 °C wachsen gelassen und die Zellzahl kulturell im Oberflächenverfahren bestimmt. Danach würde im Dreifachansatz jeweils 1 mL dieser kälteadaptierten Bakteriensuspension bei -20°C für 20 Stunden eingefroren, anschließend wieder aufgetaut und die Zellzahl erneut kulturell im Oberflächenverfahren bestimmt. Ein zweiter Dreifachansatz wurde zusätzlich bei -20°C für 20 Stunden eingefroren, aufgetaut, erneut wieder für 20 Stunden bei -20°C eingefroren und aufgetaut und dann die Zellzahl kulturell im Oberflächenverfahren bestimmt. Das Verhältnis der Lebendzellzahl pro mL vor und nach der Behandlung wurde als Maß für die Stressresistenz gegenüber kalten Bedingungen verwendet.

2.10 Überlebenstest - Zellertragsmessung bei 10°C und 30°C in einem Modelllebensmittel

Als Modelllebensmittel diente 3,5% ultrahocherhitzte Milch. Isolat Iso 1/11 wurde als Versuchskeim verwendet. Als Vergleichskeim wurde der Typstamm *Listeria monocytogenes* DSM 20600^T ausgewählt.

Für den Versuch wurden für jeden Keim jeweils 1 Liter Milch mit 10⁸ KbE/mL inokuliert (Endkonzentration 10⁵ KbE/mL Milch) und parallel bei 10°C und 30°C inkubiert. Als Negativkontrolle diente bei beiden Temperaturen 1L Milch, die nicht inokuliert wurde. Die Ausgangskeimzahl wurde kulturell im Oberflächenverfahren bestimmt. Danach wurden in bestimmten Abständen die Keimzahlen bestimmt, bis die Absterbephase der Wachstumskurve einsetzte.

2.11 Physiologisches Reaktionsprofil

Um das biochemische Reaktionsprofil zu bestimmen, wurden verschiedene biochemische Tests durchgeführt.

Als erster Test wurde der API 20 E®-Test durchgeführt. Es ist ein biochemischer Test, der zur Identifizierung von *Enterobacteriaceae* und gram-negativen Stäbchenbakterien (BioMérieux, Marcy l'Etoile, Frankreich) verwendet wird. Der Test wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

Zur Analyse der Kohlenhydratverwertung wurde der API50CH Test (BioMérieux, Marcy l'Etoile, Frankreich) durchgeführt. Der Test wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Jedoch wurde das CHB-Medium, welches laut Hersteller für die Gattung *Bacillus* verwendet werden soll auch für gramnegative Stäbchenbakterien benutzt. Ein positives Ergebnis wird durch einen Farbumschlag nach Gelb angezeigt; dann wurde in Folge der Verwertung des Kohlenhydrats Säure gebildet.

Der GN2 Microplate Test (Biolog, Hayward, USA) diente zur Identifikation und Charakterisierung von aeroben gramnegativen Bakterien. Er beruht auf der Reduktion von Tetrazolium, welches bei einem aktiven Metabolismus reduziert wird. Es wurden in einer 96-well Mikrotiterplatte 95 verschiedene Kohlenstoffquellen angeboten. Bei Verstoffwechslung einer Kohlenstoffquelle kommt es zu einem Farbumschlag, der im Mikrotiterplattenspektralphotometer (Epoch BioTek^R, Winooski, USA) bei 550 nm gemessen wird.

3. Ergebnisse

3.1 Makroskopische und mikroskopische Isolatbeschreibung

Nachfolgend werden die Ergebnisse des makroskopischen und mikroskopischen Bildes sowie das Gramverhalten, die Oxidasereaktion und die Katalasereaktion aufgeführt. Das makroskopische Bild wurde bei den Isolaten J1 bis J91 auf TS-Agar beschrieben. Bei Isolat FFL1 und Iso1/11 wurde HT-Agar verwendet.

Insgesamt zeigten 65% aller untersuchten Isolate ein positives Gram-Verhalten und 35% ein negatives Gram-Verhalten.

Tabelle 4: Makroskopische und mikroskopische Eigenschaften aller Isolate sowie deren Gramverhalten, Katalase- und Oxidasereaktion.

Isolat	Makroskopisches Bild	Mikroskopisches Bild	Gramverhalten	Katalase	Oxidase
J1	<ul style="list-style-type: none"> • beige, matt • sehr starkes Wachstum • in Agar gewachsen • wachsartige Konsistenz • fransiger Rand 	<ul style="list-style-type: none"> • Stäbchenbakterien • endterminale Sporenbildner • Bakterienketten geschwungen 	+	-	-
J2	<ul style="list-style-type: none"> • beige-glänzend, durchsichtig • moderates Wachstum • kleine, runde Kolonien mit glattem Rand 	<ul style="list-style-type: none"> • kleine, aber dicke Stäbchenbakterien 	-	+	-
J3	<ul style="list-style-type: none"> • gelb, matt • moderates Wachstum • kleine, runde Kolonien mit glattem Rand 	<ul style="list-style-type: none"> • Kokken • zusammenhängende Zellverbände 	+	+	-
J5	<ul style="list-style-type: none"> • weißlich, beige, matt • spröde, trockene Konsistenz • wurzelartiges Koloniewachstum • leicht fransiger Rand • moderates Wachstum 	<ul style="list-style-type: none"> • kleine, dünne Stäbchen-bakterien • Sporenbildner • beweglich 	+	+	-
J6	<ul style="list-style-type: none"> • beige, matt • sehr starkes Wachstum • in Agar gewachsen • wachsartige Konsistenz • fransiger Rand • Faserausbildung 	<ul style="list-style-type: none"> • Stäbchen-bakterien • oft in Ketten • zusammen-hängend • endterminale Sporenbildner • Bakterienketten geschwungen 	+	-	-

J7	<ul style="list-style-type: none"> • gelblich-orange, beige-glänzend • kleine Kolonien • glatter Rand • moderates Wachstum 	<ul style="list-style-type: none"> • Stäbchenbakterien 	+	+	-
J8	<ul style="list-style-type: none"> • weißlich-beige, matt, leicht glänzend • starkes Wachstum • große Kolonien • leicht, fransiger Rand • wachsartige Konsistenz 	<ul style="list-style-type: none"> • Stäbchenbakterien • endterminale Sporenbildner 	+	-	-
J9	<ul style="list-style-type: none"> • orange, matt, leicht glänzend • moderates Wachstum • runde, mittelgroße Kolonien • glatter Rand 	<ul style="list-style-type: none"> • Kokken • oft Sarcinenbildung 	+	+	+
J10	<ul style="list-style-type: none"> • weißlich-beige, matt • trockene, spröde Konsistenz • starkes Wachstum • fransiger Rand • wurzelartiges Kolonienwachstum 	<ul style="list-style-type: none"> • kleine Stäbchenbakterien 	+	+	-
J11	<ul style="list-style-type: none"> • beige-glänzend • schleimige, visköse Konsistenz • starkes Wachstum 	<ul style="list-style-type: none"> • sehr dünne Stäbchenbakterien 	-	+	+
J12	<ul style="list-style-type: none"> • beige-glänzend • starkes, schwirrendes Wachstum • viele kleine Kolonien • leicht fransiger 	<ul style="list-style-type: none"> • Stäbchenbakterien • endterminale Sporenbildner • beweglich 	+	+	+
J16	<ul style="list-style-type: none"> • gelblich-matt • kleine, runde Kolonien • glatter Rand • moderates Wachstum 	<ul style="list-style-type: none"> • Kokken • Sarcinenbildung 	+	+	-
J17	<ul style="list-style-type: none"> • gelblich-matt • geringes Wachstum • kleine Kolonie • runde Kolonien • glatter Rand 	<ul style="list-style-type: none"> • Kokken • meist in Zellverbänden 	+	+	-
J20	<ul style="list-style-type: none"> • pastell-orange, • starkes Wachstum • kleine, runde Kolonien • glatter Rand 	<ul style="list-style-type: none"> • kleine, dicke Stäbchenbakterien • wenige Sporenbildner 	+	+	-

J21	<ul style="list-style-type: none"> • beiglich-matt, • starkes Wachstum • runde Kolonien, glatter Rand • leicht erhabene Form 	<ul style="list-style-type: none"> • kleine Stäbchenbakterien 	-	+	+
J22	<ul style="list-style-type: none"> • beige, glänzend, leicht durchsichtig • kleine, runde Kolonien mit glattem Rand • flache Kolonien • moderates Wachstum 	<ul style="list-style-type: none"> • kleine, dünne Stäbchen 	-	+	-
J23	<ul style="list-style-type: none"> • gelblich-beige, glänzend, leicht matt • runde Form, glatter Rand • moderates Wachstum 	<ul style="list-style-type: none"> • kleine Stäbchenbakterien 	-	+	+
J29	<ul style="list-style-type: none"> • weißlich-matt • kleine Kolonien • moderates Wachstum 	<ul style="list-style-type: none"> • Hefe 	/	+	-
J32	<ul style="list-style-type: none"> • gelblich-matt • kleine Kolonien • moderates Wachstum 	<ul style="list-style-type: none"> • Kokken 	+	+	-
J34	<ul style="list-style-type: none"> • hellbeige, glänzend • kleine Kolonien • schwaches Wachstum 	<ul style="list-style-type: none"> • Kokken bzw. dicke Stäbchen 	+	-	-
J39	<ul style="list-style-type: none"> • hellgelb, matt • kleine Kolonien • moderates Wachstum 	<ul style="list-style-type: none"> • Kokken 	+	+	-
J40	<ul style="list-style-type: none"> • Gelblich-matt • kleine Kolonien • moderates Wachstum 	<ul style="list-style-type: none"> • Kokken 	+	+	-
J44	<ul style="list-style-type: none"> • hellbeige, matt • große Kolonien • unregelmäßiger Rand • starkes Wachstum 	<ul style="list-style-type: none"> • dünne Stäbchenbakterien • jedoch sehr große Stäbchen • teilweise Sporenbildung • teilweise zusammenhängend 	+	+	-
J45	<ul style="list-style-type: none"> • gelblich-matt • kleine Kolonien • moderates Wachstum 	<ul style="list-style-type: none"> • Kokken 	+	+	-

J48	<ul style="list-style-type: none"> • gelblich-matt • kleine Kolonien • moderates Wachstum 	<ul style="list-style-type: none"> • Kokken 	+	+	-
J50	<ul style="list-style-type: none"> • starke gelb pigmentiert, leicht neonfarbend, glänzend • hydrophiles Pigment • leicht durchsichtig • kleine Kolonien • starkes Wachstum 	<ul style="list-style-type: none"> • Kokken 	+	+	-
J52	<ul style="list-style-type: none"> • Weiß-opaque • Matte, glatte Oberfläche • runde Kolonien • Rand gekerbt • butterartige Konsistenz 	<ul style="list-style-type: none"> • lange Stäbchenbakterien 	+	+	-
J53	<ul style="list-style-type: none"> • weißlich-gelb • opaque • glänzende, glatte Oberfläche • rundes Kolonien • glatter Rand • schleimige Konsistenz • moderates Wachstum 	<ul style="list-style-type: none"> • sehr kleine, Stäbchenbakterien • beweglich 	-	+	+
J54	<ul style="list-style-type: none"> • weiß-milchig • opaque • rauhe Oberfläche • unregelmäßiges Koloniebild • Rand gekerbt • visköse Konsistenz • moderates Wachstum 	<ul style="list-style-type: none"> • Stäbchenbakterien • zum Teil in 2er oder 3er Ketten 	+	+	+
J55	<ul style="list-style-type: none"> • beige-glänzend • leicht durchsichtig • runde Kolonien • Rand leicht gekerbt • Butterartige Konsistenz • starkes Wachstum 	<ul style="list-style-type: none"> • kurze, dicke Stäbchenbakterien • beweglich 	-	+	-
J57	<ul style="list-style-type: none"> • weißlich-milchig • matte Oberfläche • konzentrische Linien • unregelmäßige Kolonien • wellenförmiger Rand • visköse Konsistenz • moderates Wachstum 	<ul style="list-style-type: none"> • kleine, dicke Stäbchenbakterien 	+	+	+

J60	<ul style="list-style-type: none"> • weißlich-beige • mittig matt • außen glänzend • rundes Kolonien • Rand leicht gekerbt • butterartige Konsistenz • moderates Wachstum 	<ul style="list-style-type: none"> • Stäbchenbakterien • beweglich 	+	+	-
J61	<ul style="list-style-type: none"> • beige-milchig, glänzend • glatte Oberfläche • rundes Kolonien • leicht erhaben • glatter Rand • visköse Konsistenz • moderates Wachstum 	<ul style="list-style-type: none"> • kleine Stäbchenbakterien 	-	-	+
J67	<ul style="list-style-type: none"> • beige-glänzend • große Kolonien • leichte Erhebung i.d. Mitte der Kolonie etwas dunkler • moderates Wachstum 	<ul style="list-style-type: none"> • Stäbchenbakterien 	-	+	+
J70	<ul style="list-style-type: none"> • hell-orange, matt • fransiger Rand • moderates Wachstum 	<ul style="list-style-type: none"> • Kokken 	+	+	-
J72	<ul style="list-style-type: none"> • beige-glänzend • muffiger Geruch • moderates Wachstum 	<ul style="list-style-type: none"> • kokkoide Stäbchenbakterien 	+	+	-
J73	<ul style="list-style-type: none"> • hell-orange, leicht glänzend, matt • leichte Turmbildung • moderates Wachstum 	<ul style="list-style-type: none"> • Kokken 	+	+	-
J74	<ul style="list-style-type: none"> • gelb-glänzend • kleine Kolonien • moderates Wachstum 	<ul style="list-style-type: none"> • Kokken 	+	+	-
J75	<ul style="list-style-type: none"> • gelb-glänzend • moderates Wachstum 	<ul style="list-style-type: none"> • Kokken, • oft in Zellverbänden 	+	+	-
J76	<ul style="list-style-type: none"> • beige-glänzend • unregelmäßiger Rand • moderates Wachstum 	<ul style="list-style-type: none"> • Kokken 	+	+	-
J77	<ul style="list-style-type: none"> • beige- glänzend • leichte Erhebung in der Mitte der Kolonie • moderates Wachstum 	<ul style="list-style-type: none"> • Kokken 	+	+	-

J78	<ul style="list-style-type: none"> • gelb-glänzend • starkes Wachstum 	<ul style="list-style-type: none"> • Kokken • oft in Zellverbänden 	+	+	-
J79	<ul style="list-style-type: none"> • okkafarben-glänzend • moderates Wachstum 	<ul style="list-style-type: none"> • dicke Stäbchenbakterien 	-	+	+
J82	<ul style="list-style-type: none"> • weiß-glänzend • glatter Rand • moderates Wachstum 	<ul style="list-style-type: none"> • Diplokokken 	+	+	-
J84	<ul style="list-style-type: none"> • weiß-glänzend • filamentös • moderates Wachstum 	<ul style="list-style-type: none"> • Kokkoide Stäbchenbakterien 	-	+	-
J85	<ul style="list-style-type: none"> • Weiß, durchsichtig, glänzend • glatter Rand • moderates Wachstum 	<ul style="list-style-type: none"> • kurze Stäbchenbakterien 	-	-	-
J86	<ul style="list-style-type: none"> • weiß • filamentös, matt • glatter Rand • moderates Wachstum 	<ul style="list-style-type: none"> • Hefe 	+	+	-
J87	<ul style="list-style-type: none"> • orange, stark pigmentiert • hydrophiles Pigment • glatter Rand • starkes Wachstum 	<ul style="list-style-type: none"> • kurze Stäbchenbakterien • beweglich 	-	+	+
J88	<ul style="list-style-type: none"> • hellgelb • glatter Rand • moderates Wachstum 	<ul style="list-style-type: none"> • Stäbchenbakterien • beweglich 	-	+	-
J89	<ul style="list-style-type: none"> • weiß-rosé, leicht glänzend • unregelmäßiger Rand • starkes Wachstum 	<ul style="list-style-type: none"> • Stäbchenbakterien 	-	+	-
J90	<ul style="list-style-type: none"> • Beige-orange, glänzend, durchsichtig • Rand weniger pigmentiert • glatter Rand • konvex • moderates Wachstum 	<ul style="list-style-type: none"> • Stäbchenbakterien 	-	-	-
J91	<ul style="list-style-type: none"> • Beiglich-weiß, durchsichtig • glatter Rand • moderates Wachstum 	<ul style="list-style-type: none"> • Stäbchenbakterien 	-	+	+

FFL1	<ul style="list-style-type: none">• beige• kleine Kolonien• glatter Rand• schwaches Wachstum	<ul style="list-style-type: none">• Stäbchenbakterien	+	+	-
ISO 1/11	<ul style="list-style-type: none">• beige• kleine Kolonien• glatter Rand• schwaches Wachstum	<ul style="list-style-type: none">• Stäbchenbakterien	+	+	-

3.2 Identifizierung mittels 16S rRNA-Gen Sequenzierung

Nachfolgend sind die Isolatidentifizierungen durch die 16S rRNA-Gen Sequenzierung aufgelistet. Insgesamt wurden die Spezies von 47 Isolaten mit $\geq 98,8\%$ Sequenzübereinstimmung bestimmt. Das Isolat J22 (bei 1454 bp) lag unter diesen Wert. Auch Isolat J45 lag unter diesen Wert, jedoch wurde hierbei nur ein Teil (719 bp) des 16S rRNA-Gens sequenziert.

Tabelle 5: Identifizierung mittels 16S rRNA-Gen Sequenzierung zum nächstähnlichen Typstamm

Isolat	Nächstähnlicher Typstamm	Accession-Nr:	Untersuchte Basenpaarlänge	Bp-übereinstimmung in %
J1	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579 ^T	AE016877	774	99.2
J2	<i>Acinetobacter lwoffii</i> DSM 2403 ^T	X81665	721	99.7
J3	<i>Micrococcus luteus</i> NCTC 2665 ^T	CP001628	732	99.2
J5	<i>Bacillus pumilus</i> ATCC 7061 ^T	ABRX01000007	763	99.2
J7	<i>Solibacillus silvestris</i> HR3-23 ^T	AJ006086	1470	99.6
J9	<i>Macrococcus hajekii</i> CMM 4809 ^T	AY119685	764	99.2
J10	<i>Bacillus altitudinis</i> 41KF2b ^T	AJ831842	753	99.1
J11	<i>Pseudomonas koreensis</i> Ps 9-14 ^T	AF468452	734	98.9
J12	<i>Paenibacillus glucanolyticus</i> DSM 5162 ^T	AB073189	1495	99.5
J16	<i>Micrococcus luteus</i> NCTC 2665 ^T	CP001628	743	99.3
J17	<i>Kocuria palustris</i> DSM 11925 ^T	Y16263	708	99.3
J20	<i>Rhodococcus qingshengii</i> djl-6 ^T	DQ090961	725	98.9
J21	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> ATCC 13637 ^T	AB008509	742	99.1
J22	<i>Pedobacter panaciterrae</i> Gsoil 042 ^T	AB245368	1454	98.7
J23	<i>Achromobacter marplatensis</i> B2 ^T	EU150134	500	98.8
J34	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> NCDO 604 ^T	AB100803	733	100.0
J39	<i>Micrococcus luteus</i> NCTC 2665 ^T	CP001628	741	99.5

J40	<i>Kocuria palustris</i> DSM 11925 ^T	Y16263	712	100.0
J44	<i>Bacillus mycoides</i> DSM 2048 ^T	ACMU01000002	762	99.3
J45	<i>Microbacterium foliorum</i> DSM 12966 ^T	AJ249780	719	98.6
J48	<i>Kocuria rhizophila</i> DSM 11926 ^T	Y16264	666	99.6
J50	<i>Micrococcus luteus</i> NCTC 2665 ^T	CP001628	738	98.9
J52	<i>Bacillus weihenstephanensis</i> WSBC 10204 ^T	Z84578	726	99.9
J53	<i>Pseudomonas lundensis</i> ATCC 49968 ^T	AB021395	729	99.5
J54	<i>Bacillus mycoides</i> DSM 2048 ^T	AE016877	755	99.6
J55	<i>Escherichia coli</i> KCTC 2441 ^T	EU014689	746	99.5
J57	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> ATCC 13637 ^T	AB008509	730	99.7
J60	<i>Bacillus safensis</i> FO-036b ^T	AF234854	706	99.9
J61	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> ATCC 13637 ^T	AB008509	746	99.7
J64	<i>Chryseobacterium aquaticum</i> 10-46 ^T	AM748690	726	99.7
J67	<i>Pseudomonas libanensis</i> CIP 105460 ^T	AF057645	743	99.2
J70	<i>Staphylococcus xylosus</i> ATCC 29971 ^T	D83374	748	99.1
J74	<i>Microbacterium maritopicum</i> DSM 12512 ^T	AJ853910	897	99.8
J75	<i>Microbacterium oxydans</i> DSM 20578 ^T	Y17227	1435	99.9
J78	<i>Microbacterium oxydans</i> DSM 20578 ^T	Y17227	1437	99.9
J79	<i>Paracoccus sulfuroxidans</i> LW36 ^T	DQ512861	657	98.9
J82	<i>Staphylococcus saprophyticus</i> ATCC 15305 ^T	AP008934	725	100.0
J84	<i>Acinetobacter lwoffii</i> DSM 2403 ^T	AIEL01000120	728	99.7

J85	<i>Carnobacterium divergens</i> DSM 20623 ^T	M58816	750	99.3
J86	<i>Brochothrix thermosphacta</i> DSM 20171 ^T	AY543023	759	99.6
J87	<i>Pseudomonas chlororaphis</i> DSM 21509 ^T	FJ168543	943	99.4
J88	<i>Serratia plymuthica</i> DSM 4540 ^T	AJ233433	743	100.0
J89	<i>Pantoea agglomerans</i> DSM 3493 ^T	AJ233423	736	99.7
J90	<i>Erwinia rhapontici</i> ATCC 29283 ^T	U80206	743	99.6
J91	<i>Pseudomonas baetica</i> a390 ^T	FM201274	741	99.0
FFL1	<i>Listeria monocytogenes</i> 4b H7858	AADR00000000	755	99.6
Iso 1/11	<i>Listeria monocytogenes</i> DSM 20600 ^T	HQ012006	754	99.3

3.2.1 Phylogenetische Beziehung der kälteangepassten Isolate

In Abbildung 5 und 6 ist die phylogenetische Beziehung der kälteangepassten Isolate einschließlich ihrer nächstähnlichen Typstämme dargestellt. Dabei gehören 18 durch 16S rRNA-Sequenzierung identifizierte Isolate zum Phylum *Firmicutes*, 13 Isolate lassen sich dem Phylum *Actinobacteria* zuordnen, 2 Isolate werden zum Phylum *Bacteroidetes* gezählt und 15 Isolate gehören zum Phylum *Proteobacteria*.

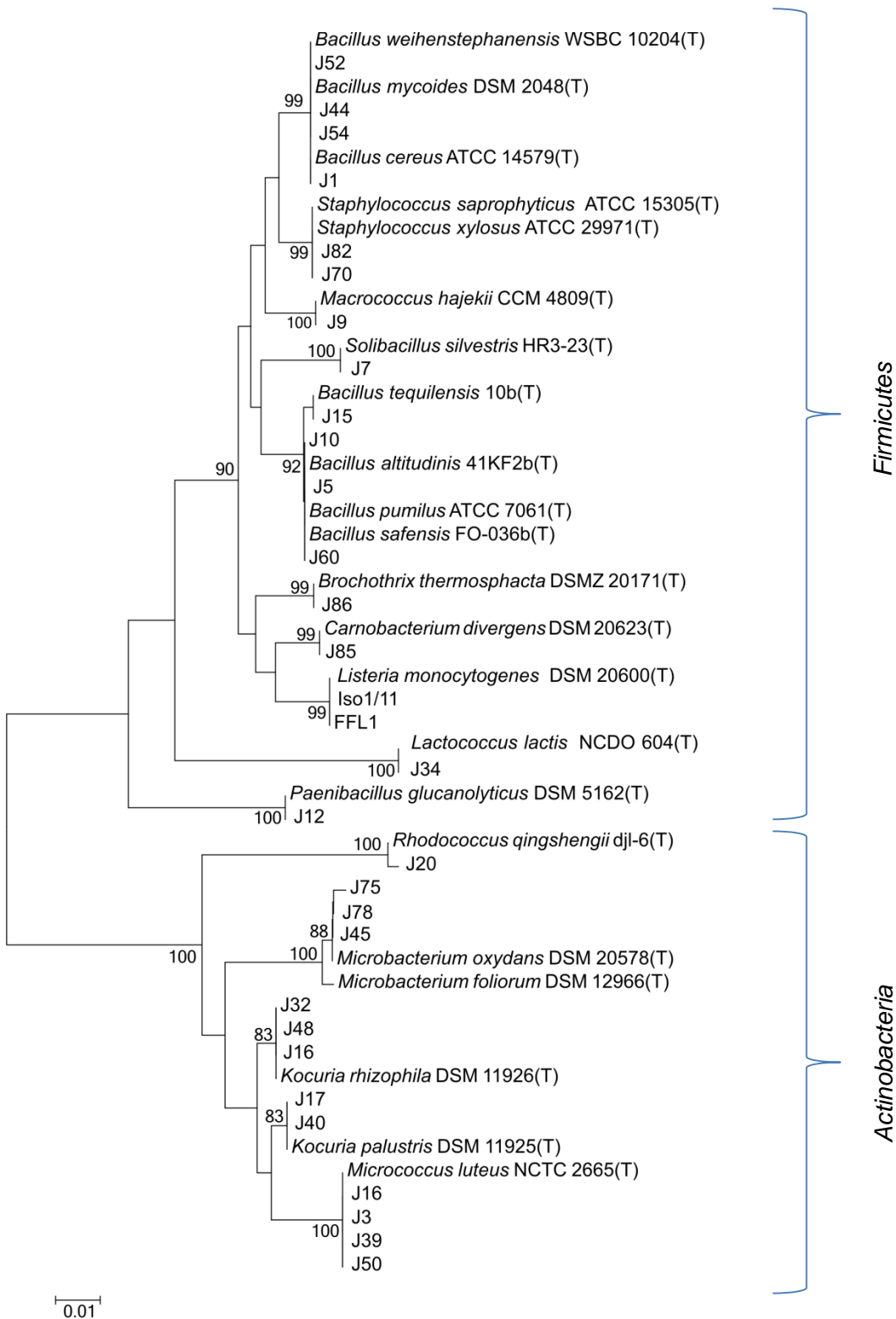


Abbildung 5: Phylogenetischer Stammbaum der über ihre 16S rRNA-Gensequenzen identifizierten Wildisolate einschließlich ihrer Typstamm-Referenzsequenzen der Abteilung *Firmicutes* und *Actinobacteria*. Der Stammbaum wurde mit dem Programm „MEGA 5.0“ (Tamura et al. 2007) unter Verwendung des „Neighbour-Joining-Algorithmus“ (Saitou und Nei 1987) erstellt. Die Korrektheit der Baumtopologie wurde mit dem Bootstrap-Verfahren (Felsenstein 1985) mit 1.000 Wiederholungen überprüft und Bootstrap-Wert $\geq 70\%$ als Zahl gekennzeichnet. Die dargestellte Skalierung entspricht einer phylogenetischen Distanz von 5 %.

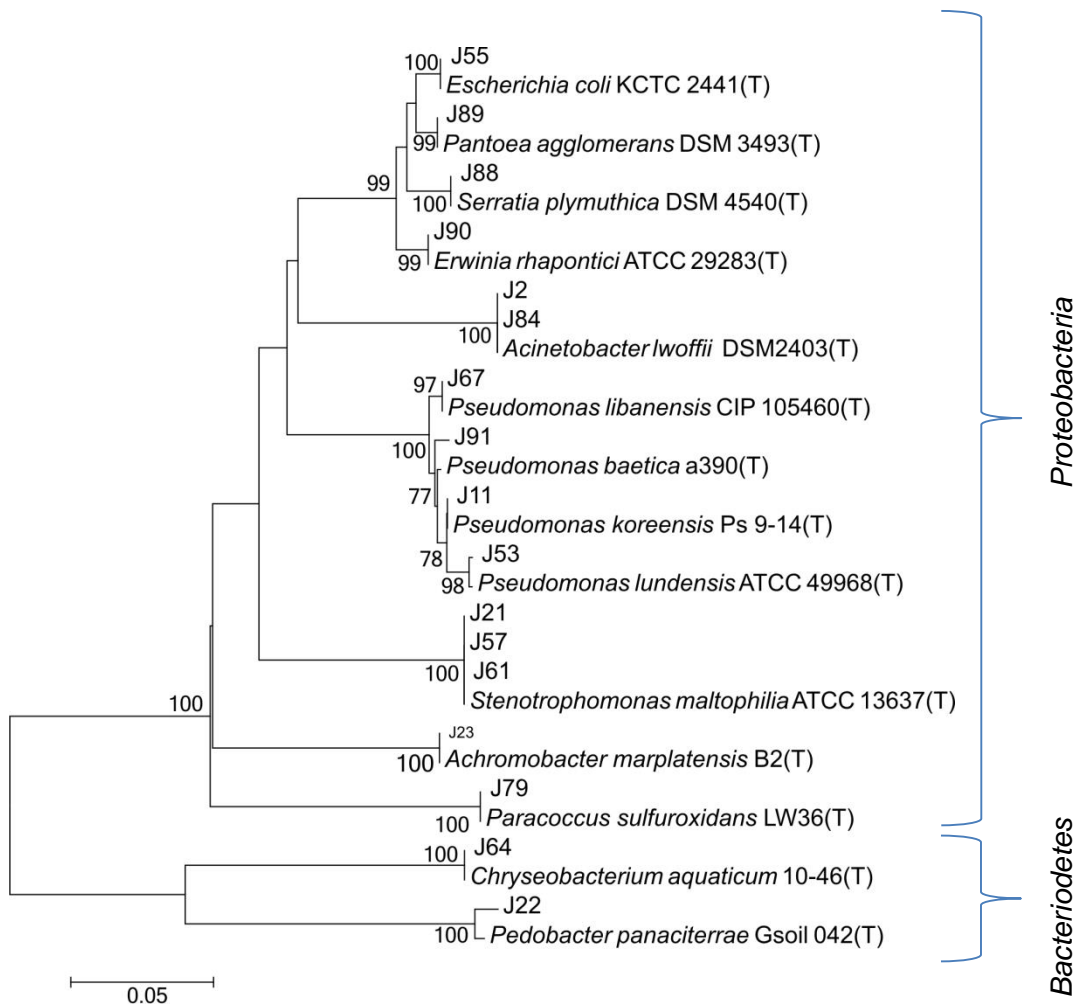


Abbildung 6: Phylogenetischer Stammbaum der über ihre 16S rRNA-Gensequenzen identifizierten Wildisolate einschließlich ihrer Typstamm-Referenzsequenzen der Abteilung *Bacterioidetes* und *Proteobacteria*. Der Stammbaum wurde mit dem Programm „MEGA 5.0“ (Tamura et al. 2007) unter Verwendung des „Neighbour-Joining-Algorithmus“ (Saitou und Nei 1987) erstellt. Die Korrektheit der Baumtopologie wurde mit dem Bootstrap-Verfahren (Felsenstein 1985) mit 1.000 Wiederholungen überprüft und ein Bootstrap-Wert in $\geq 70\%$ als Zahl gekennzeichnet. Die dargestellte Skalierung entspricht einer phylogenetischen Distanz von 5 %.

3.3 Neubeschreibung Isolat J22

Im Verlauf dieser Arbeit wurde das Isolat J22 aus frischen Fleischtortellini isoliert, welches bei der 16S rRNA-Gen Sequenzierung bei 1454 Basenpaaren nur eine 98,7% Übereinstimmung mit dem nächstähnlichen Typstamm *Pedobacter panaciterrae* LMG23400^T aufwies. Durch diese niedrige Sequenzübereinstimmung war eine Differenzierung auf Speziesebene nicht möglich und muss daher überprüft werden. Um diesen Verdacht zu bestätigen, wurde eine DNA-DNA Hybridisierung mit dem nächstähnlichen Typstamm auf 16S rRNA-Gensequenzebene, nämlich *Pedobacter panaciterrae* LMG23400^T durchgeführt. Hierbei ergab sich ein Wert von weniger als 36%. Der Schwellenwert für eine neu zu beschreibende Spezies wird mit einem Grenzwert von weniger als 70% angegeben (Wayne et al. 1987), d.h. Isolat J22 gehört nicht zur Spezies *Pedobacter panaciterrae* und kann als Vertreter einer neuen Spezies neu beschrieben werden.

3.3.1 Makroskopische und mikroskopische Zellmorphologie

Isolat J22 wächst unter aeroben Bedingungen und bildet keine Sporen. Das Gram-negative Stäbchenbakterium hat eine Länge von 2 µm und einem Durchmesser von 0,6 µm. Die Kolonien hatten auf TS-Agar einen Durchmesser von 2 mm nach zwei Tagen Inkubation bei 30°C. Außerdem war es Oxidase- und Katalase-positiv.

3.3.2 Temperatur- und Salztoleranztest

Die Ergebnisse zum Wachstumstemperaturprofil und der Salztoleranz von Isolat J22 und drei Referenzstämmen sind in Tabelle 6 dargestellt.

Tabelle 6: Wachstumstemperaturprofil und Salztoleranz von Isolat J22 (1) sowie den Referenzstämmen *Pedobacter panaciterrae* LMG 23400^T (2), *Pedobacter africanus* DSM12126^T (3) und *Pedobacter heparinus* DSM2366^T (4)

	1	2	3	4
Wachstumsbereich in °C	4-37	4-37	4-37	8-37
NaCl-Toleranz in R2A-Medium (in	0-2	0-3	0-2	0-2

Isolat J22 und alle drei Referenzstämmen zeigen Wachstum bis zur Maximaltemperatur von 37°C. Die Minimaltemperatur für Wachstum liegt, mit der Ausnahme von *Pedobacter heparinus* DSM2366^T, bei 4°C. Alle vier untersuchten Stämme tolerieren NaCl-Konzentrationen bis 2%, der Stamm *Pedobacter panaciterrae* LMG23400^T sogar bis 3%.

3.3.3 Chemotaxonomische Beschreibung

Als Hauptfettsäuren wurden bei Isolat J22 C15:0 *iso* und C16:1 *cis* 9 detektiert. Eine genaue Auflistung des kompletten Fettsäuremusters von Isolat J22 sowie der drei weiteren Referenzstämmen zum Vergleich befinden sich in Tabelle 7.

Als einziges respiratorisches Chinon wurde bei Isolat J22 und den Referenzstämmen *Pedobacter panaciterrae* LMG23400^T, *Pedobacter africanus* DSM12126^T und *Pedobacter heparinus* DSM2366^T das Menachinon MK-7 detektiert.

Tabelle 7: Fettsäuremuster mittels GC-FID Analyse des Isolates J22 sowie der Referenzstämmen *Pedobacter panaciterrae* LMG23400^T, *Pedobacter africanus* DSM12126^T und *Pedobacter heparinus* DSM2366^T bei der Wachstumstemperatur von 30°C; Angaben in %.

	J22	<i>P. panaciterrae</i>	<i>P. africanus</i>	<i>P. heparinus</i>
ECL ^a 12,880	2,4	0,8	0,7	1,0
ECL ^a 13,530	4,6	4,8	5,6	6,3
ECL ^a 13,600	-	-	-	1,3
C 14:0	4,8	3,0	1,5	1,0
C 15:0 <i>iso</i>	34,8	37,5	33,8	31,6
C 15:0 <i>anteiso</i>	-	0,7	0,8	1,2
C 15:1 <i>cis</i> 9	0,7	0,8	-	2,5
C 15:0	2,6	1,3	0,5	2,2
C 14:0 3-OH	1,8	-	-	-
C 16:0 <i>iso</i>	0,7	-	-	-
C 16:1 <i>cis</i> 9	24,9	35,5	28,6	25,6
C 16:1 <i>cis</i> 11	4,1	3,3	1,9	1,7
C 16:0	7,3	1,6	2,3	1,2
C 15:0 <i>iso</i> 3-OH	2,3	1,4	2,3	3,3
C 17:1 <i>iso cis</i> 9	0,6	3,5	6,5	3,3
C 17:1 <i>iso cis</i> 11	-	1,0	1,5	2,1
C 17:0 <i>cyclo</i>	0,5	-	0,9	0,6
ECL ^a 17,115	0,7	-	-	0,8
C 16:0 3-OH	3,0	0,9	1,5	1,3
ECL ^a 17,875	-	-	1,1	0,8
C 17:0 <i>iso</i> 3-OH	4,4	4,1	9,8	8,4
ECL ^a 18,225	-	-	-	1,5
Verhältnis S/U ^b	1,66	1,00	0,99	1,05

^a ECL: Equivalent Chain Length

^b S: gesättigte Fettsäuren C 14:0, C 15:0 *iso*, C 15:0 *anteiso*, C 15:0, C 16:0 und C16:0 *iso*

^b U: ungesättigte Fettsäuren C 15:1 *cis* 9, C 16:1 *cis* 9, C 16:1 *cis* 11, C 17:1 *iso cis* 9 und C 17:1 *iso cis* 11

Als polare Lipide wurden bei Isolat J22 Phosphatidylethanolamin, zwei Lipide ohne Aminogruppen, drei Aminolipide und drei Aminophospholipide identifiziert. Außerdem wurden die polaren Lipide der drei Referenzstämme mit untersucht. Abbildung 8 zeigt die Dünnschichtchromatographieplatten aller vier Stämme. Die Referenzstämme zeigten zwar ein ähnliches polares Lipidmuster, jedoch war die Anzahl der einzelnen Lipidgruppen teilweise unterschiedlich. So bildete der nächstähnliche Typstamm *P. panaciterrae* LMG23400^T im Gegensatz zu Isolat J22 nur ein Lipid und ein Aminophospholipid, jedoch insgesamt vier Aminolipide.

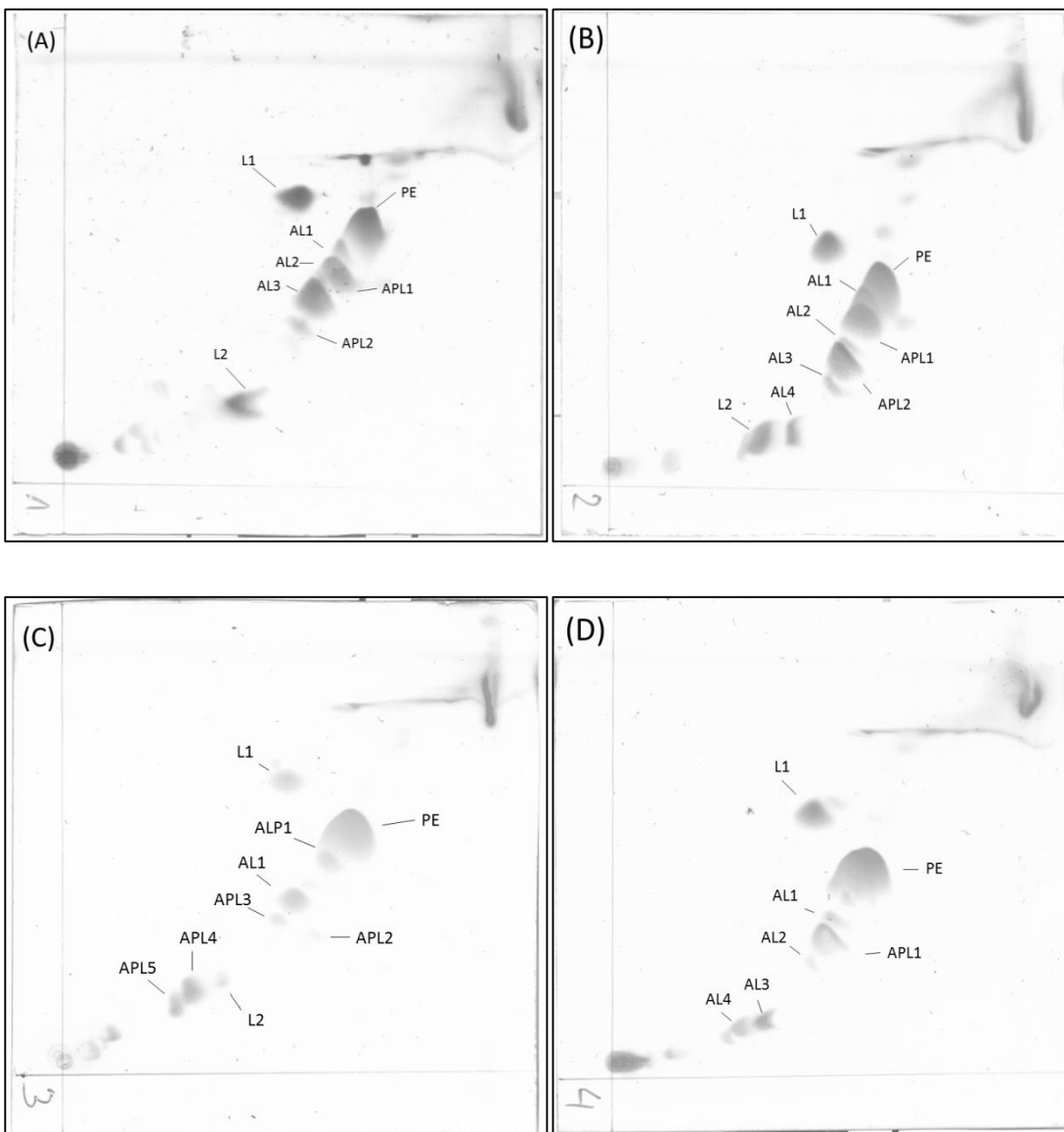


Abbildung 7: zweidimensionale Dünnschichtplatten mit polaren Lipidextrakten von Isolat J22 (A), *Pedobacter africanus* DSM12126^T (B), *Pedobacter heparinus* DSM 2366^T(C) und *Pedobacter panaciterrae* LMG23400^T (D). L1-L2: unbekannte Lipide, AL1-AL4: unbekannte Aminolipide, APL1-APL5: unbekannte Aminophospholipide; PE: Phosphatidylethanolamin

3.3.4 physiologisches Reaktionsprofil

Isolat J22 und alle drei Referenzstämme (*Pedobacter panaciterrae* LMG23400^T, *Pedobacter africanus* DSM12126^T und *Pedobacter heparinus* DSM2366^T) verstoffwechselten im API 50CH Test und im GN2-Test D-Cellobiose, D-Glukose, D-Laktose, D-Maltose und D-Mannose. Im API20E-Test zeigten alle vier Stämme negative Reaktionen in Bezug auf H₂S-Bildung, Indolbildung und Nitratreduktion. Im Vergleich zu den drei Referenzstämmen verwertete Isolat J22 als einziger Vertreter Tween 80, Itaconsäure, α -keto Butyrinsäure, d-Alanin, L-Asparaginsäure, Uraconsäure und Thymidin (Tab. 8). Die Ergebnisse aller Reaktionen befinden sich im Anhang in Tabelle 22 bis 24.

Tabelle 8: Unterschiedliche biochemische Eigenschaften von Isolat J22 (1), *Pedobacter panaciterrae* LMG23400^T (2), *Pedobacter africanus* DSM12126^T (3) und *Pedobacter heparinus* DSM2366^T (4). +: positive Reaktion; w: leicht positive Reaktion, -: negative Reaktion

Verwertung von (API 50CH und GN2-	1	2	3	4
Tween 80	+	-	-	-
L-Arabinose	-	+	w	+
D-Fruktose	+	+	-	+
D-Raffinose	-	+	-	w
D-Trehalose	+	+	-	+
D-Turanose	-	+	w	+
D-Mannitol	-	-	-	+
Essigsäure	+	-	w	+
<i>cis</i> -Aconitsäure	-	+	-	-
D-Glucosaminsäure	-	+	-	-
α -Hydroxybutyrinsäure	+	-	-	w
α -keto Butyrinsäure	+	-	-	-
Itaconsäure	+	-	-	-
D-Alaninamid	+	-	-	w
D-Alanin	+	-	-	-
L-Asparagin	+	-	-	w
L-Asparaginsäure	+	-	-	-
L-Leucin	+	-	w	-
L-Ornithin	+	-	-	w
L-Prolin	+	-	w	-
L-Serin	+	-	-	w
L-Threonin	+	w	w	-
Urocansäure	+	-	-	-
Thymidin	+	-	-	-

3.3.5 Molekulare Phylogenie-Analyse und DNA-DNA-Hybridisierung

Der mit der Neighbour-Joining-Analyse erstellte phylogenetische Stammbaum der 16S rRNA-Gen Sequenz (Abb. 9) zeigt, dass Isolat J22 zu der Gattung *Pedobacter* zugeordnet werden kann. Das gleiche Ergebnis wurde auch mit der Maximum-Likelihood-Methode und der Maximum-Parsimony-Methode erzielt. Diese phylogenetischen Stammbäume sind im Anhang in Abbildung 42 und 43 dargestellt. Vergleichende 16S rRNA-Gen-Sequenzanalysen von Isolat J22 (1553 bp) zeigten Sequenzübereinstimmung mit der Bakterienstämmen *Pedobacter panaciterrae* LMG23400^T (98,7%), gefolgt von *Pedobacter africanus* DSM 12126^T (98,5%) und *Pedobacter heparinus* DSM2366^T (98,3%).

Zusätzlich wurde eine DNA-DNA Hybridisierung mit dem nächstähnlichen Typstamm *Pedobacter panaciterrae* LMG23400^T durchgeführt. Hierbei ergab sich ein Wert von 35,2% und einem reziproken Wert von 7,4%.

3.3.6 Namensgebung

Isolat J22 wurde aus frischen Fleischortellini isoliert, welche bei 6°C gekühlt gelagert wurden. Dieses Lebensmittelprodukt wurde in Deutschland hergestellt und vertrieben.

Aus diesem Grund wurde für das Isolat J22 der Speziesname *Pedobacter nutrimenti* (nu.tri'men.ti L. gen. n. nutrimenti von nutriment (engl.); Nahrungsmittel) vorgeschlagen (Derichs et al. 2014).

Der Typstamm J22^T ist in der Stammsammlung der DSMZ unter der Nummer DSM 27373^T und in der Stammsammlung der CCUG mit der Nummer CCUG 64422^T hinterlegt.

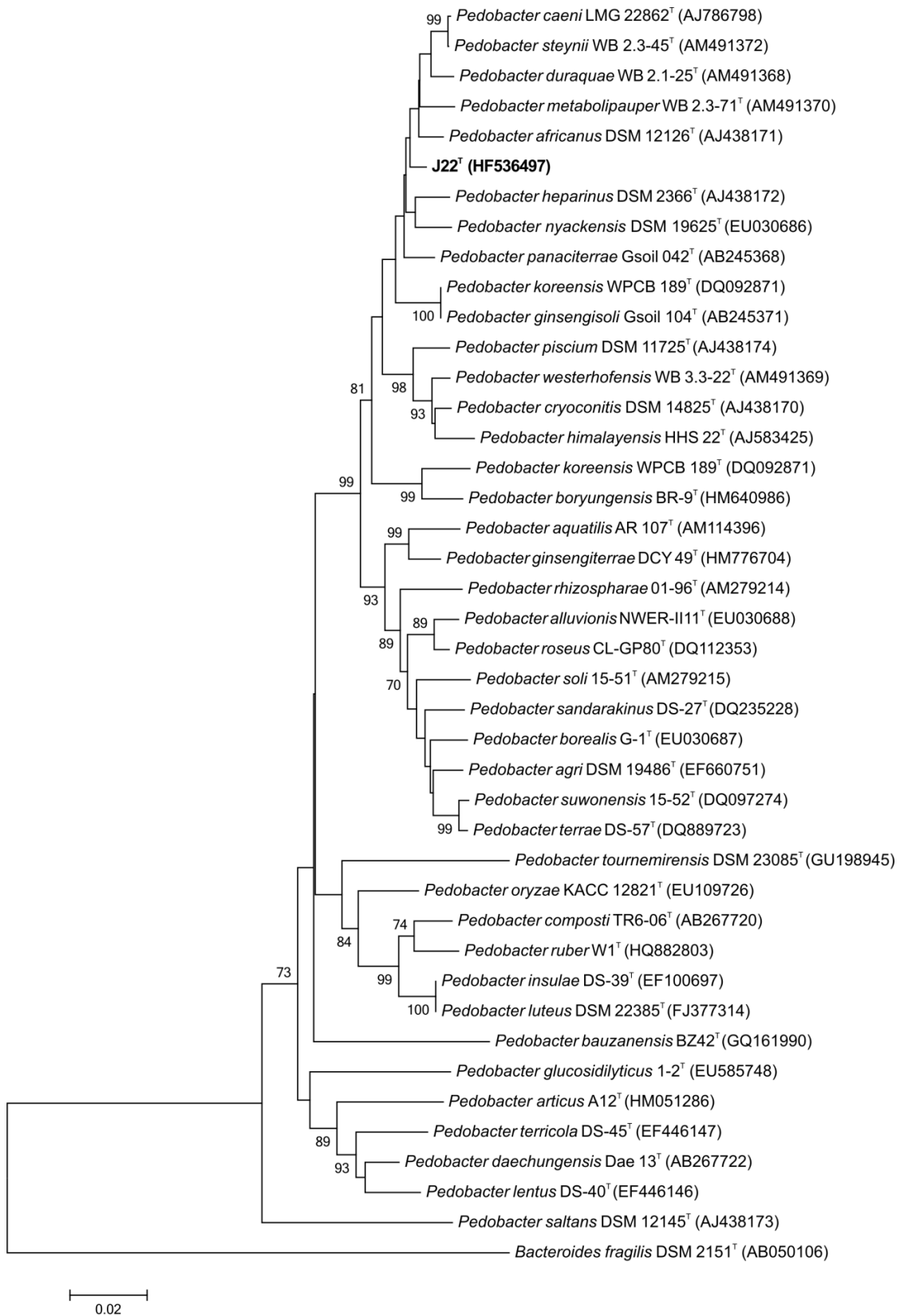


Abbildung 8: Phylogenetischer Stammbaum mit Neighbour-Joining Algorithmus der 16S rRNA Gensequenzen von Isolat J22 in Relation zu 40 beschriebenen *Pedobacter* Spezies. *Bacteroides fragilis* DSM2151^T dient als Außengruppe. „Bootstrap“-Werte ≥ 70 % sind als Zahl gekennzeichnet. Der Skalierungsbalken entspricht einem Sequenzunterschied von 0,02%

3.4 Fettsäuremuster bei 10°C- und 30°C-Inkubation

In Tabelle 9 sind die Hauptveränderungen des Fettsäuremusters der Isolate nach Wachstum bei verschiedenen Temperaturen dargestellt.

Tabelle 9: Gesamtübersicht – Veränderung des Fettsäuremusters durch Temperaturunterschied

Isolat	Hauptfettsäuren	Bei 10°C in %	Bei 30°C in %	Fettsäuremuster bei 10°C im Vergleich zu 30°C
J1	C 13:0 C 15:0 C 16:0	76,1 7,8 4,8	9,3 39,7 9,4	KFS ^a ↑
J2	C 16:1 <i>cis</i> 9 C 16:0 C 18:1 <i>cis</i> 9	54,9 14,3 19,9	42,9 32,4 13,7	UFS ^b ↑
J3	C 15:0 <i>iso</i> C 15:0 <i>anteiso</i>	5,7 93,9	19,4 75,5	AFS ^c ↑
J5	C 15:0 <i>iso</i> C 15:0 <i>anteiso</i> C 17:0 <i>iso</i> C 17:0 <i>anteiso</i>	35,9 46,6 6,9 6,0	45,7 4,3 0,0 0,0	LFS ^d ↑
J6	C 13:0 <i>iso</i> C 15:0 <i>iso</i>	63,0 10,40	27,9 37,0	KFS ↑
J7	C 15:0 <i>iso</i> C 15:0 <i>anteiso</i> C 16:1 <i>iso</i> 5 C 16:0 <i>iso</i>	33,6 4,8 34,7 10,4	53,7 10,7 15,3 3,1	AFS ↑
J8	C 13:0 <i>iso</i> C 15:0 <i>iso</i>	68,4 12,7	25,2 45,7	KFS ↑
J9	C 15:0 <i>anteiso</i> C 17:1 <i>iso cis</i> 5	76,5 7,4	52,7 22,7	AFS ↑
J10	C 15:0 <i>iso</i> C 15:0 <i>anteiso</i>	55,2 44,9	67,4 29,4	AFS ↑
J11	C 16:1 <i>cis</i> 9 C 16:0 C 17:0 <i>cyclo</i> C 18:1 <i>cis</i> 11	40,7 35,8 2,9 16,8	27,2 34,3 18,2 14,7	UFS ↑
J12	C 15:0 <i>iso</i> C 15:0 <i>anteiso</i> C 16:0 <i>iso</i>	3,0 71,2 4,3	3,8 73,0 9,8	Keine eindeutige Veränderung im FS-Muster
J16	C 15:0 <i>iso</i> C 15:0 <i>anteiso</i>	5,0 93,4	7,2 91,6	Keine eindeutige Veränderung im FS-Muster
J17	C 15:0 <i>anteiso</i>	100,0	100,0	Keine eindeutige Veränderung im FS-Muster
J20	C 16:1 <i>cis</i> 10/ <i>trans</i> 9 C 16:0 C 18:1 <i>cis</i> 9	31,3 31,8 27,0	12,8 60,8 13,1	UFS ↑
J21	C 15:0 <i>iso</i> C 15:0 <i>anteiso</i> C 16:1 <i>cis</i> 9 C 16:0	20,0 11,0 32,4 10,7	42,4 12,5 12,4 16,0	UFS ↑

J22	C 15:0 <i>iso</i> C 16:1 <i>cis</i> 9 C 16:0	43,0 31,8 6,8	38,0 17,3 29,3	UFS ↑
J23	C 16:1 <i>cis</i> 9 C 16:0 C 17:0 <i>cyclo</i> C 18:1 <i>cis</i> 11	53,7 28,7 1,4 12,1	19,3 49,1 22,3 4,2	UFS ↑
J32	C 15:0 <i>anteiso</i>	89,1	87,8	Keine eindeutige Veränderung im FS-Muster
J34	C 16:0 C 19:0 <i>cyclo</i> 11-12	52,3 33,4	81,6 10,3	LFS ↑
J39	C 15:0 <i>iso</i> C 15:0 <i>anteiso</i>	9,6 89,6	14,9 84,7	Keine eindeutige Veränderung im FS-Muster
J40	C 15:0 <i>anteiso</i>	94,5	98,1	Keine eindeutige Veränderung im FS-Muster
J44	C 13:0 <i>iso</i> C 13:0 <i>anteiso</i> C 15:0 <i>iso</i> C 16:1 <i>c/t</i> 5	37,1 10,9 8,3 26,9	27,9 2,4 45,3 0,0	KFS ↑ UFS ↑
J45	C 15:0 <i>iso</i> C 15:0 <i>anteiso</i>	13,3 81,0	13,5 85,0	Keine eindeutige Veränderung im FS-Muster
J48	C 15:0 <i>iso</i> C 15:0 <i>anteiso</i> C 17:0 <i>anteiso</i>	7,7 76,6 11,1	9,3 69,4 18,1	Keine eindeutige Veränderung im FS-Muster
J50	C 15:0 <i>anteiso</i> C 16:0 <i>iso</i> C 17:0 <i>anteiso</i>	49,8 18,2 12,9	56,7 12,3 28,6	Keine eindeutige Veränderung im FS-Muster
J52	C 13:0 <i>iso</i> C 15:0 <i>iso</i>	51,1 7,7	9,0 61,9	KFS ↑
J53	C 16:1 <i>cis</i> 9 C 16:0 C 17:0 <i>cyclo</i> C 18:1 <i>cis</i> 11	33,0 34,5 12,4 10,7	2,9 45 44,7 0,8	UFS ↑
J55	C 16:0 C 17:0 <i>cyclo</i> C 18:1 <i>cis</i> 11	40,3 4,7 39,5	60,5 16,4 8,3	UFS ↑
J57	C 15:0 <i>iso</i> C 15:0 <i>anteiso</i> C 16:1 <i>cis</i> 9	28 17,9 38,7	55,9 22,0 8,4	UFS ↑
J60	C 15:0 <i>iso</i> C 15:0 <i>anteiso</i>	54,3 45,7	58,1 40,5	AFS ↑
J63	C 16:1 <i>cis</i> 9 C 16:0 C 17:0 <i>cyclo</i> C 18:1 <i>cis</i> 11	48,8 16,0 1,1 16,3	34,1 32,7 10,9 10,1	UFS ↑
J61	C 15:0 <i>iso</i> C 15:0 <i>anteiso</i> C 16:1 <i>cis</i> 9	30 18 35,4	48,8 18,1 10,0	UFS ↑
J67	C 16:1 <i>cis</i> 9 C 16:0 C 18:1 <i>cis</i> 11	44,6 18,0 23,4	31,7 31,3 9,7	UFS ↑
J70	C 13:0 <i>iso</i> C 13:0 <i>anteiso</i> C 15:0 <i>iso</i> C 15:0 <i>anteiso</i>	10,0 15,2 16,4 50,5	6,8 11,6 17,6 54,3	Keine eindeutige Veränderung im FS-Muster

J72	C 16:1 <i>cis</i> 9 C 16:0 C 18:1 <i>cis</i> 9	30,2 6,0 44,3	16,3 26,5 36,0	UFS ↑
J74	C 15:0 <i>anteiso</i> C 16:0 <i>iso</i> C 17:0 <i>anteiso</i>	60,8 18,5 12,1	59,0 21,8 16,6	Keine eindeutige Veränderung im FS-Muster
J75	C 15:0 <i>anteiso</i> C 16:0 <i>iso</i> C 17:0 <i>anteiso</i>	59,7 10,0 11,2	53,7 14,3 21,0	Keine eindeutige Veränderung im FS-Muster
J76	C 16:1 <i>cis</i> 9 C 16:0 C 18:1 <i>cis</i> 9	29,3 6,6 44,3	13,9 28,3 38,3	UFS ↑
J78	C 15:0 <i>iso</i> C 15:0 <i>anteiso</i> C 16:0 <i>iso</i> C 17:0 <i>anteiso</i>	17,7 50,0 15,3 6,6	12,8 52,9 15,0 18,2	Keine eindeutige Veränderung im FS-Muster
J82	C 15:0 <i>anteiso</i> C 17:0 <i>anteiso</i>	85,7 13,3	79,0 9,6	AFS ↑
J84	C 16:1 <i>cis</i> 9 C 16:0 C 18:1 <i>cis</i> 7 C 18:1 <i>cis</i> 11	62,2 7,5 13,2 11,4	43,5 26,2 15,8 6,7	UFS ↑
J86	C 15:0 <i>anteiso</i>	98,2	81,5	IFS ^e ↑
J87	C 16:1 <i>cis</i> 9 C 16:0 C 18:1 <i>cis</i> 11	26,2 18,8 13,4	11,1 41,8 3,0	UFS ↑
J88	C 16:1 <i>cis</i> 9 C 16:0	53,8 32,2	27,2 52,4	UFS ↑
J89	C 16:1 <i>cis</i> 9 C 16:0	47,1 39,7	28,5 50,5	UFS ↑
J90	C 16:1 <i>cis</i> 9 C 16:0 C 18:1 <i>cis</i> 11	48,5 27,4 16,6	30,6 45,3 5,9	UFS ↑
J91	C 16:1 <i>cis</i> 9 C 16:0 C 18:1 <i>cis</i> 11	48,3 26,2 19,8	28,0 61,1 1,4	UFS ↑
FFL 1	C 15:0 <i>anteiso</i> C 17:0 <i>anteiso</i>	84,9 6,8	67,8 25,0	KFS ↑
Iso 1/11	C 15:0 <i>anteiso</i> C 17:0 <i>anteiso</i>	85,7 8,7	67,7 27,9	KFS ↑

^a KFS: kurzkettige Fettsäuren

^b UFS: ungesättigte Fettsäuren

^c AFS: *anteiso*-verzweigte Fettsäuren

^d LFS: langkettige Fettsäuren

^e IFS: *iso*-verzweigte Fettsäuren

Die komplett ermittelten Fettsäuremuster werden im Anhang in Tabelle 15 aufgelistet. Aus der Tabelle 9 wird ersichtlich, dass es einige Isolate gab, die ihre Hauptfettsäuren bei einem Temperaturunterschied von 20°C nicht eindeutig änderten. Zu diesen zählen die Isolate J12, J16, J17, J32, J39, J40, J45, J50, J70, J74, J75, J78. In den Abbildungen 10 bis 16 sind die Fettsäuremuster mit prozentualem Anteil als

Säulendiagramm von diesen Isolaten dargestellt. Alle anderen Isolate zeigten eine teils eindeutige Veränderung im Fettsäureprofil bei einem Temperaturunterschied. In den Abbildungen 16 und 17 sind als Beispiel die Fettsäuremuster von Isolaten dargestellt, die eine Anpassung im Fettsäuremuster in Bezug auf Kälteeinfluss zeigten.

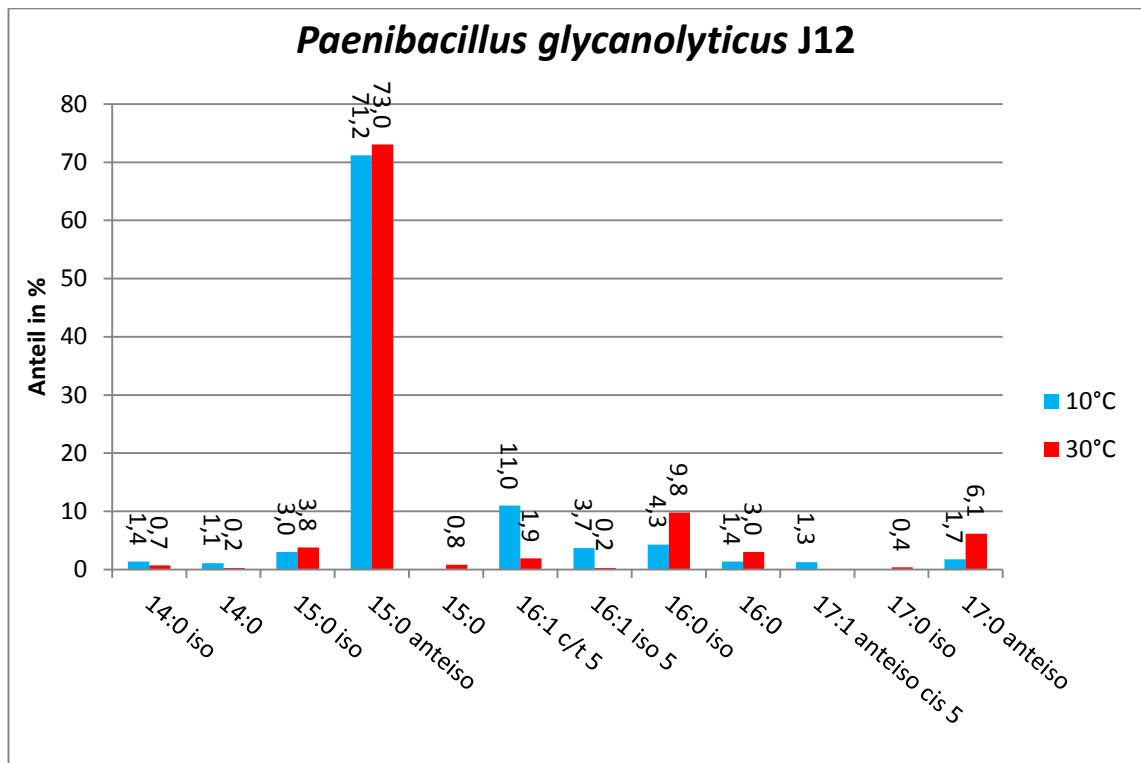


Abbildung 9: Fettsäuremuster von *Paenibacillus glycanolyticus* J12 bei den Wachstumstemperaturen 10°C und 30°C

In Abbildung 9 erkennt man, dass *Paenibacillus glycanolyticus* J12 keine eindeutigen Veränderungen im Fettsäuremuster in Bezug auf einen Temperaturunterschied zeigte. Sowohl bei 10°C als auch bei 30°C wurde mit über 70% die Hauptfettsäure C15:0 *anteiso* gebildet. Die ungesättigte Fettsäure C16:1 *c/t* 5 wurde ca. 9% vermehrt bei 10°C gebildet, jedoch ist fraglich, ob dieser Effekt die Kälteadaptation erklären kann.

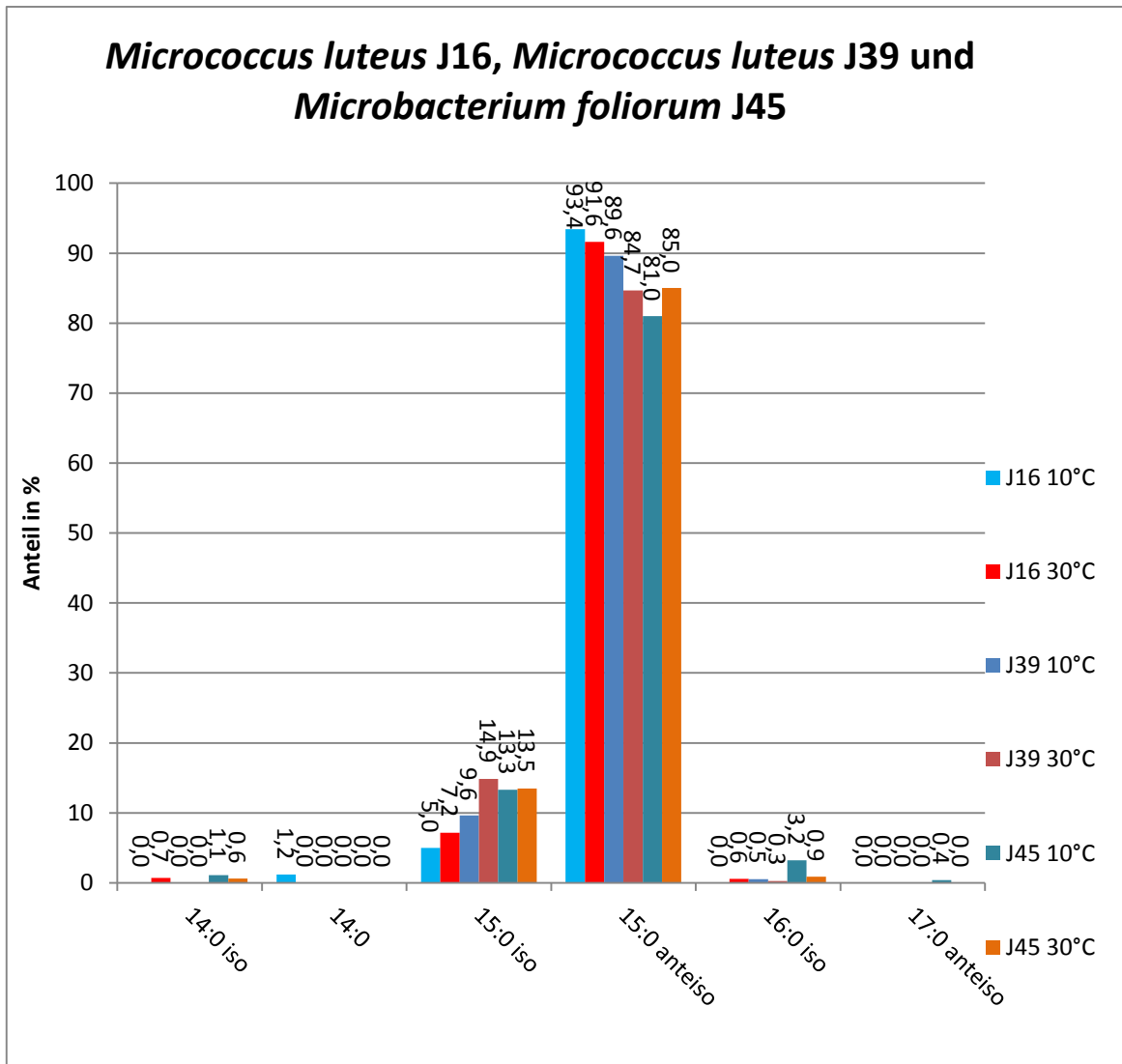


Abbildung 10: Fettsäuremuster von *Micrococcus luteus* J16, *Micrococcus luteus* J39, *Microbacterium foliorum* J45 und bei den Wachstumstemperaturen 10°C und 30°C

Alle Isolate in Abbildung 10 weisen mit über 80% C15:0 *anteiso* als Hauptfettsäure auf. Ähnlich wie bei *Paenibacillus glucanolyticus* J12 gibt es keine eindeutige Verschiebung im Fettsäuremuster in Bezug auf einen Temperaturwechsel.

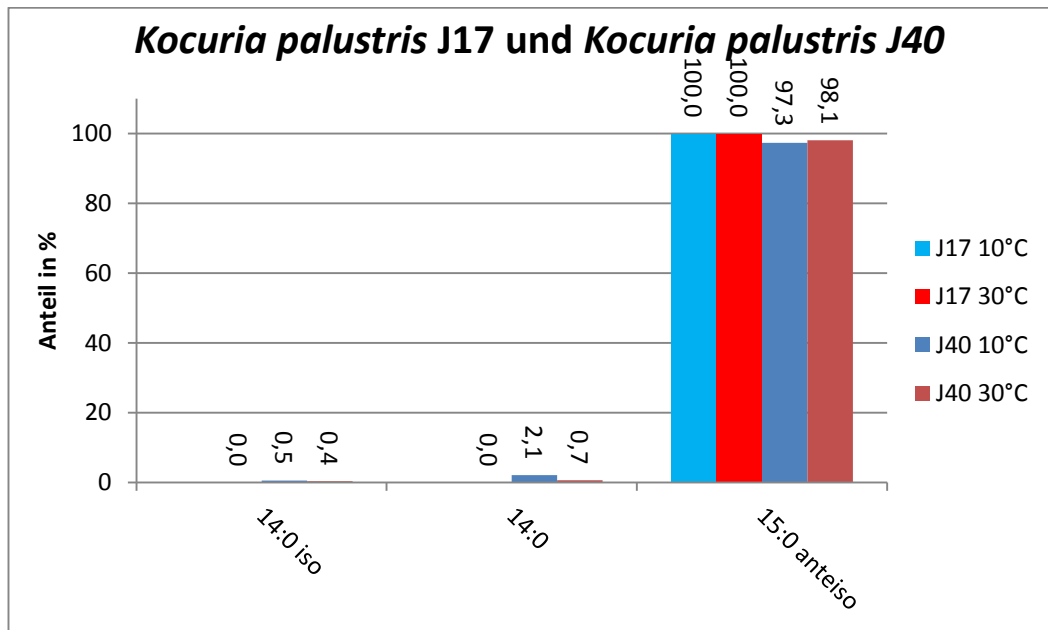


Abbildung 11: Fettsäuremuster von den Isolaten *Kocuria palustris* J17 und *Kocuria palustris* J40 bei den Wachstumstemperaturen 10°C und 30°C

In Abbildung 11 ist erkennbar, dass es keine deutliche Veränderung im Fettsäuremuster in Bezug auf einen Temperaturunterschied gibt. Diese Isolate gehören der Spezies *Kocuria palustris* an.

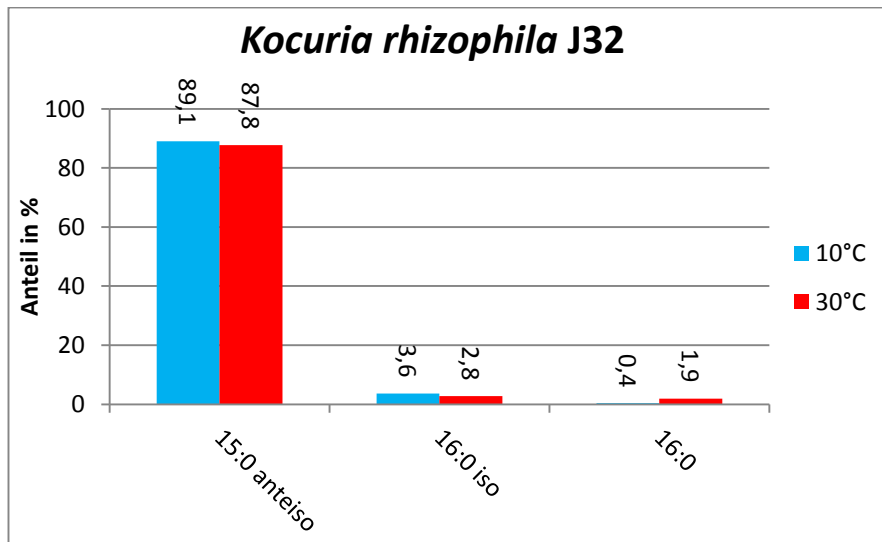


Abbildung 12 Fettsäuremuster von Isolat *Kocuria rhizophila* J32 bei den Wachstumstemperaturen 10°C und 30°C

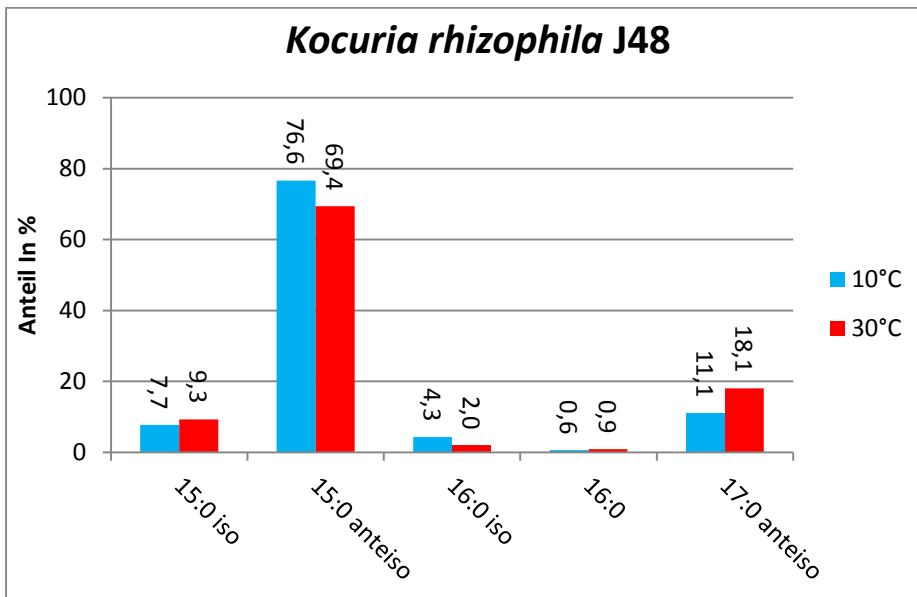


Abbildung 13: Fettsäuremuster von Isolat *Kocuria rhizophila* J32 bei den Wachstumstemperaturen 10°C und 30°C

Auch Abbildungen 12 und 13 zeigen, dass es keine eindeutigen Veränderungen im Fettsäureprofil von den Isolaten J32 und J48 gibt. Die Isolate gehören der Spezies *Kocuria rhizophila* an.

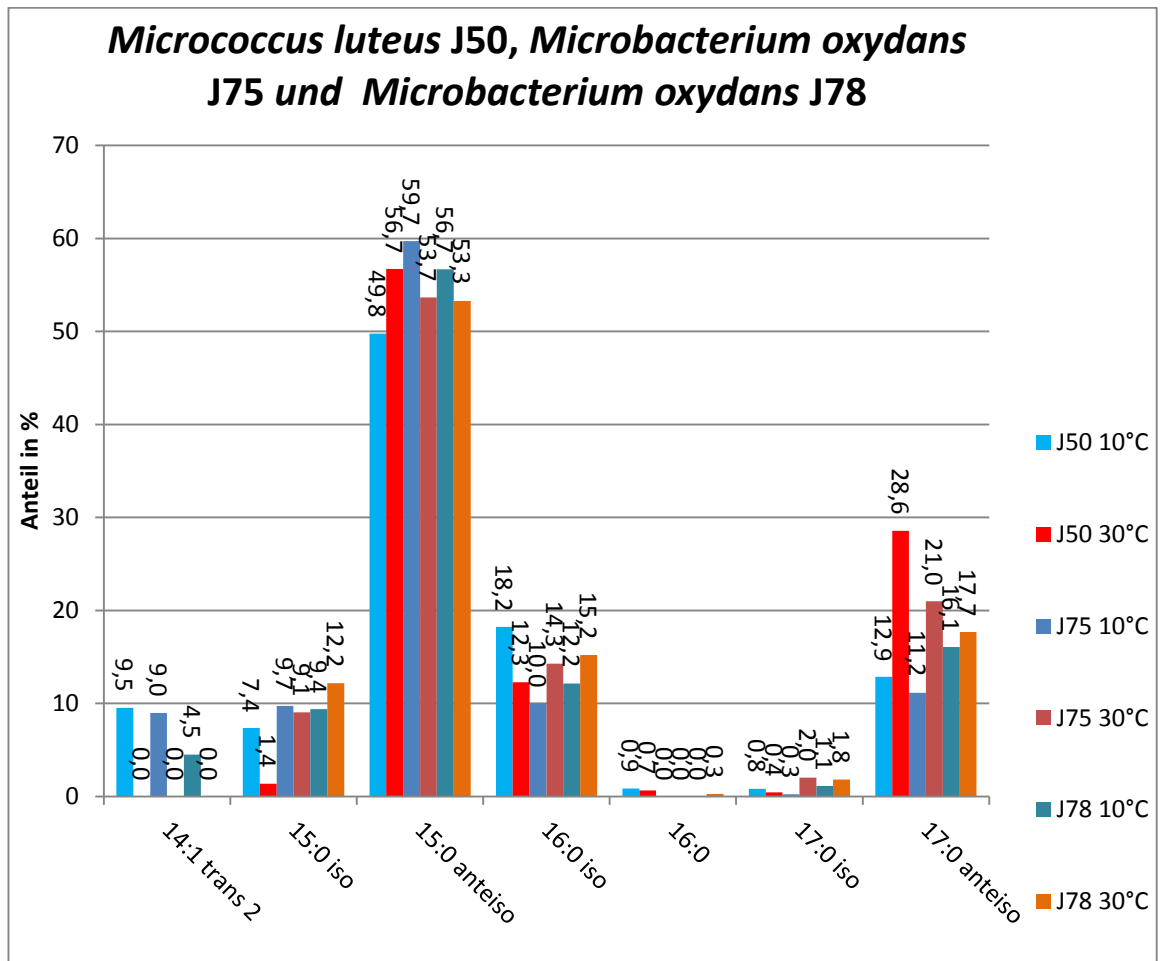


Abbildung 14: Fettsäuremuster von den Isolaten *Micrococcus luteus* J50, *Microbacterium oxydans* J75 und *Microbacterium oxydans* J78 bei den Wachstumstemperaturen 10°C und 30°C

Das Fettsäuremuster von den Isolaten aus der Abbildung 14 unterschied sich teilweise von den Fettsäuremustern der anderen Isolate. So zählten zu den Hauptfettsäuren C15:0 *anteiso* und C17:0 *anteiso*. Außerdem wurde die Fettsäure C16:0 *iso* mit über 10% am Gesamtanteil gebildet. Zusätzlich wurde bei Kälteeinwirkung die ungesättigte Fettsäure C14:1 *trans* 2 gebildet.

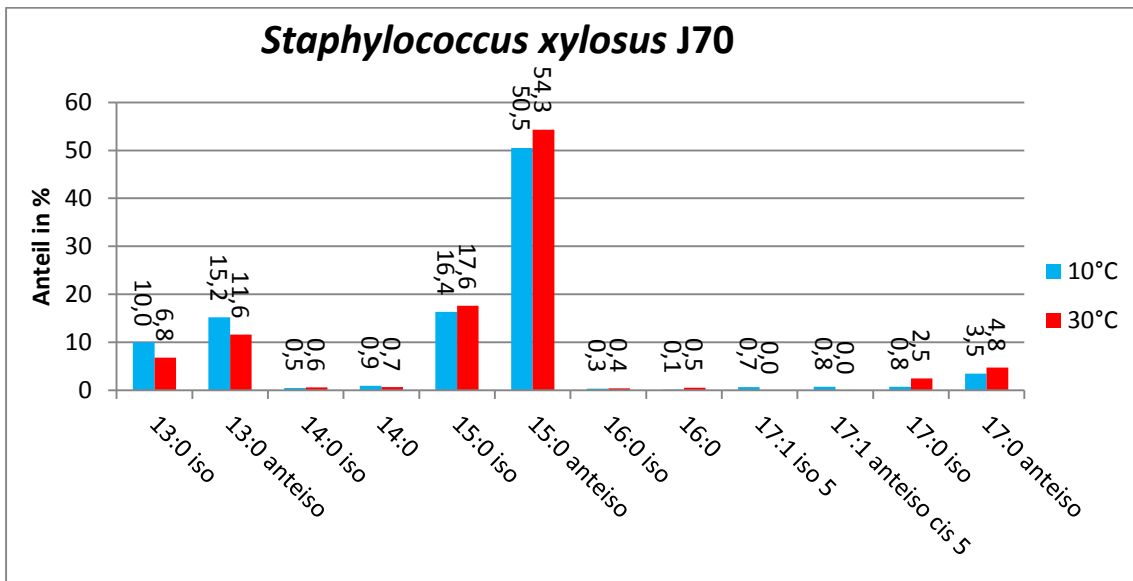


Abbildung 15: Fettsäuremuster von den Isolaten *Staphylococcus xylosus* J70 bei den Wachstumstemperaturen 10°C und 30°C

In Abbildung 15 ist zu erkennen, dass bei dem Isolat *Staphylococcus xylosus* J70 bei 10°C und 30°C die Hauptfettsäure C15:0 anteiso.

Alle anderen Isolate zeigten eine Verschiebung im Fettsäuremuster unter Kälteeinfluss. Als Beispiel hierfür sind die Isolate J7, FFL1 und Iso 1/11 in den Abbildungen 17 und 18 dargestellt. In Abbildung 17 ist zu erkennen, dass eine Verkürzung der Kettenlänge bei Kälteeinfluss zu ca. 20% stattfindet. In Abbildung 18 ist ersichtlich, dass sich die ungesättigte Fettsäure C16:1 c/t 5 von 15% auf 35 % durch Kälteeinfluss erhöht.

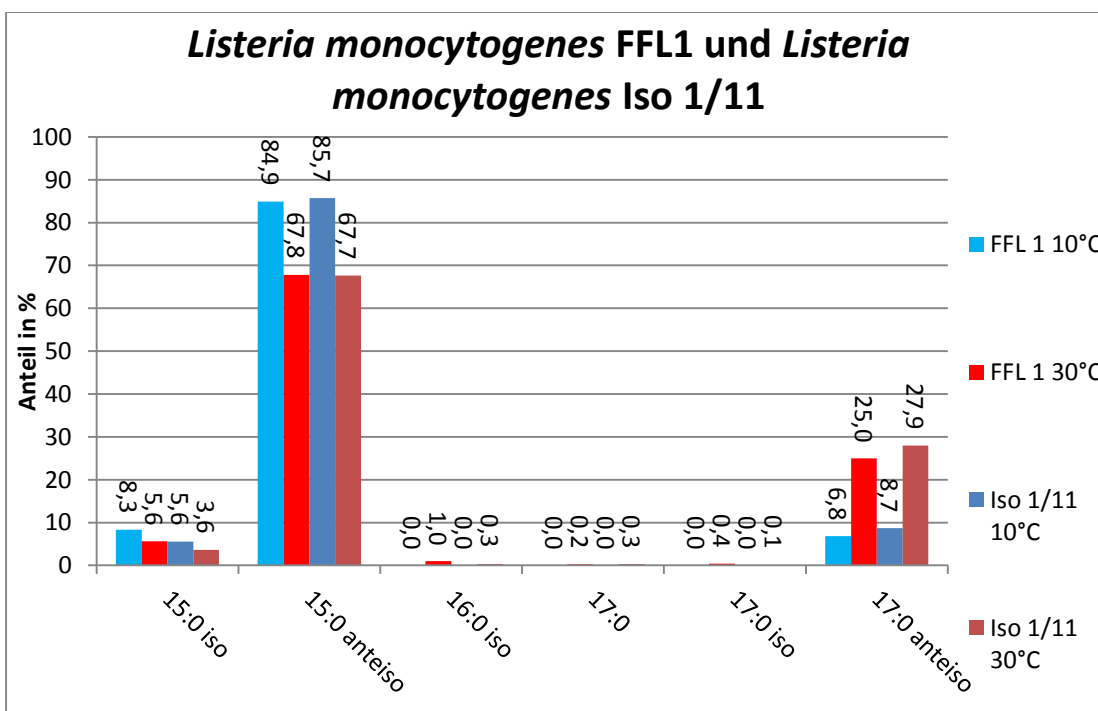


Abbildung 16: Fettsäuremuster von den Isolaten *Listeria monocytogenes* FFL1 und *Listeria monocytogenes* Iso 1/11 bei den Wachstumstemperaturen 10°C und 30°C

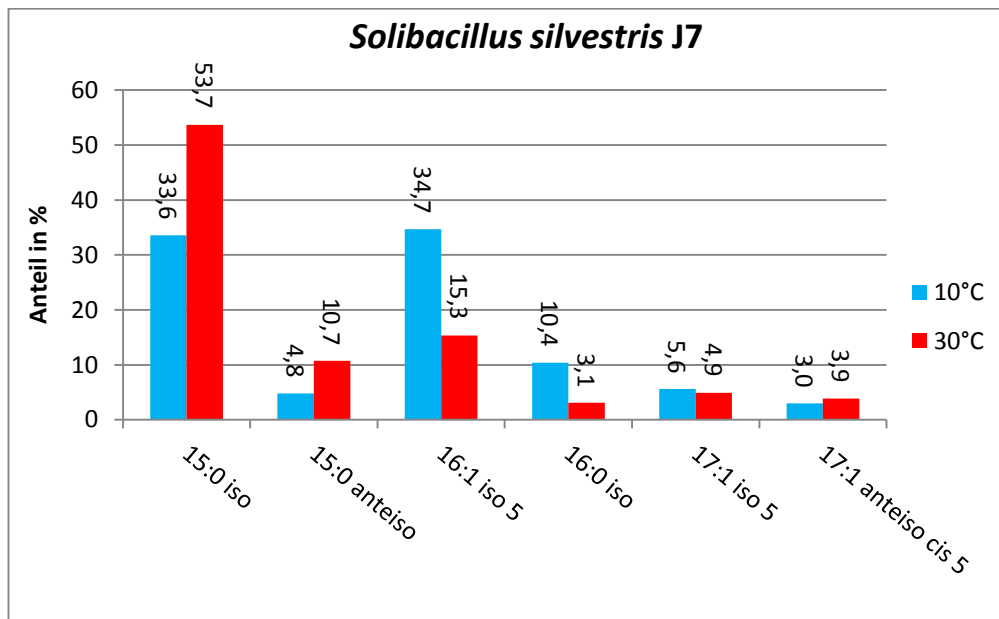


Abbildung 17 Fettsäuremuster von Isolat *Solibacillus silvestris* J7 bei den Wachstumstemperaturen 10°C und 30°C

3.5 Chinonmuster und -gehalt bei 10°C- und 30°C-Inkubation

3.5.1 Qualitative Chinonanalyse

Die Isolate, die keine Veränderung im Fettsäuremuster aufwiesen, wurden im 2. Schritt auf den Chinongehalt untersucht. Zusätzlich wurden auch Isolate auf Chinongehalte untersucht, die ein verändertes Fettsäuremuster bei einem Temperaturunterschied von 20°C aufwiesen, um einen zusätzlich möglichen Kälteanpassungsmechanismus aufzuzeigen.

Hierbei wurde zuerst eine qualitative Beurteilung durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 10 dargestellt. Hierbei handelte es sich um ein Art Screening, inwieweit sich der prozentuale Anteil von Chinonen bei den unterschiedlichen Temperaturen verändert und/oder neue Chinone gebildet werden. Zusätzlich wurde mit der gleichen Methode und mit Hilfe eines mitgeführten Standards quantitativ von ausgewählten Isolate (Tab. 11) der jeweilige Chinongehalt bestimmt. Die quantitative Chinonanalyse wurde anfangs mit feuchter Biomasse durchgeführt, im Laufe der Untersuchungen stellte sich jedoch durch hohe Standardabweichungen heraus, dass der Wasseranteil der Biomasse zu starken Varianzen führen kann und daher wurde die Analyse auf gefriergetrocknetes Material umgestellt.

Tabelle 10: Chinongehalt in % der untersuchten Isolate

Isolat	Chinon	Relative Retentionszeit	Anteil in % bei 10°C	Anteil in % bei 30°C
<i>B. cereus</i> J1	MK-7	1,34	100	100
<i>M. luteus</i> J3	MK-7	1,34	0	4
	MK-7 (H ₂)	1,46	13	15
	MK-8	1,65	0	18
	MK-8 (H ₂)	1,84	87	59
	MK-9 (H ₂)	2,30	0	3
<i>B. pumilus</i> J5	MK unbekannt	0,70	27	8
	MK-7	1,34	73	82
<i>S. silvestris</i> J7	MK-6	1,10	4	16
	MK-7	1,34	96	84
<i>M. carouelicus</i> J9	MK unbekannt	0,70	3	20
	MK-6	1,10	97	80
<i>P. gluconolyticus</i> J 12	MK-7	1,34	100	100
<i>M. luteus</i> J16	MK unbekannt	0,90	0	1
	MK unbekannt	1,21	3	0
	MK-7	1,34	2	0
	MK-7 (H ₂)	1,46	92	10
	MK-8 (H ₂)	1,80	3	77
	MK-8 (H ₄)	2,02	0	7
	MK-9 (H ₂)	2,25	0	5

<i>K. palustris</i> J17	MK unbekannt	1,20	0	3
	MK-7	1,34	0	2
	MK-7 (H ₂)	1,46	7	90
	MK-8	1,65	15	0
	MK-8 (H ₂)	1,80	72	5
	MK-8 (H ₄)	2,02	3	0
	MK-9 (H ₂)	2,25	3	0
<i>R. qingshengii</i> J20	MK unbekannt	0,70	6	3
	MK unbekannt	1,00	0	1
	MK-6	1,10	0	2
	MK-8 (H ₂)	1,85	94	90
	MK unbekannt	2,35	0	3
<i>S. maltophilia</i> J21	MK-8 (H ₂)	1,85	100	100
	Q unbekannt	0,55	0	2
	Q-8	0,68	100	98
<i>Pedobacter nutrimenti</i> J22	MK-7	1,34	100	100
<i>A. marplatensis</i> J23	Q-8	0,68	100	100
<i>L. lactis</i> J34	MK unbekannt	0,70	86	37
	MK-7	1,34	14	12
	MK-8	1,65	0	14
	MK-8 (H ₄)	2,02	0	37
<i>K. rhizophila</i> J32	MK unbekannt	1,21	0	6
	MK-7	1,34	0	2
	MK-7 (H ₂)	1,46	100	89
	MK-8 (H ₂)	1,84	0	3
<i>M. luteus</i> J39	MK-7	1,34	0	3
	MK-7 (H ₂)	1,46	12	10
	MK-8	1,65	0	14
	MK-8 (H ₂)	1,80	88	70
	MK-9 (H ₂)	2,29	0	3
<i>K. palustris</i> J40	MK unbekannt	1,00	5	10
	MK unbekannt	1,20	7	11
	MK-7 (H ₂)	1,46	83	78
	MK-8 (H ₂)	1,80	5	0
<i>M. luteus</i> J45	MK unbekannt	0,90	4	17
	MK unbekannt	1,00	1	0
	MK-7 (H ₂)	1,46	12	42
	MK-8 (H ₂)	1,80	83	41
<i>K. rhizophila</i> J48	MK unbekannt	0,74	0	2
	MK unbekannt	0,78	0	2
	MK unbekannt	0,90	0	4
	MK unbekannt	1,20	4	5
	MK unbekannt	1,28	4	0
	MK-7	1,34	4	3
	MK-7 (H ₂)	1,46	80	62
	MK-8 (H ₂)	1,80	8	22
<i>M. luteus</i> J50	MK unbekannt	0,70	5	0
	MK unbekannt	0,80	17	50
	MK-9 (H ₄)	2,55	0	1
	MK unbekannt	3,27	12	11
	MK-12	4,20	65	38
<i>B. weihenstephanensis</i> J52	MK-7	1,34	100	100
<i>E. coli</i> J55	MK-7	1,34	0	8
	MK-8	1,65	100	92
	Q unbekannt	0,55	1	4
	Q-8	0,68	99	96

<i>S. maltophilia</i> J57	Q unbekannt	0,55	0	2
	Q-8	0,68	100	98
<i>B. safensis</i> J60	MK-6	1,10	0	1
	MK-7	1,34	100	99
<i>M. oxydans</i> J75	MK unbekannt	0,70	10	7
	MK unbekannt	0,80	11	25
	MK-11	3,27	9	23
	MK-12	4,20	70	45
<i>M. oxydans</i> J78	MK unbekannt	0,70	4	0
	MK unbekannt	0,80	15	9
	MK-11	3,27	11	30
	MK-12	4,20	70	61
<i>A. lwoffii</i> J 84	Q unbekannt	0,56	1	1
	Q-8	0,65	31	30
	Q-9	0,80	65	68
	Q-10	1,00	1	1
<i>B. thermosphacta</i> J86	MK-7	1,34	100	100
<i>P. agglomerans</i> J89	MK-7	1,34	4	6
	MK-8	1,65	96	94
	Q unbekannt	0,48	0	1
	Q-8	0,65	98	93
<i>P. baetica</i> J91	Q-8	0,65	3	5
	Q-9	0,80	97	94
	Q-10	1,00	0	1

3.5.2 Quantitative Chinonanalyse

3.4.2.1 Gesamtchinongehalt

In Abbildung 18 und 19 ist der Gesamtchinongehalt in nmol/g Nassgewicht bzw. in nmol/g Lyophilisat der verschiedenen Isolate dargestellt.

Die meisten Isolate wurden im Zweifachansatz untersucht. Bei den Isolaten J7 und J12 wurde bei 10°C bei Messung in nmol/g Nassgewicht ein 6-fach bzw. 5-fach-Ansatz durchgeführt.

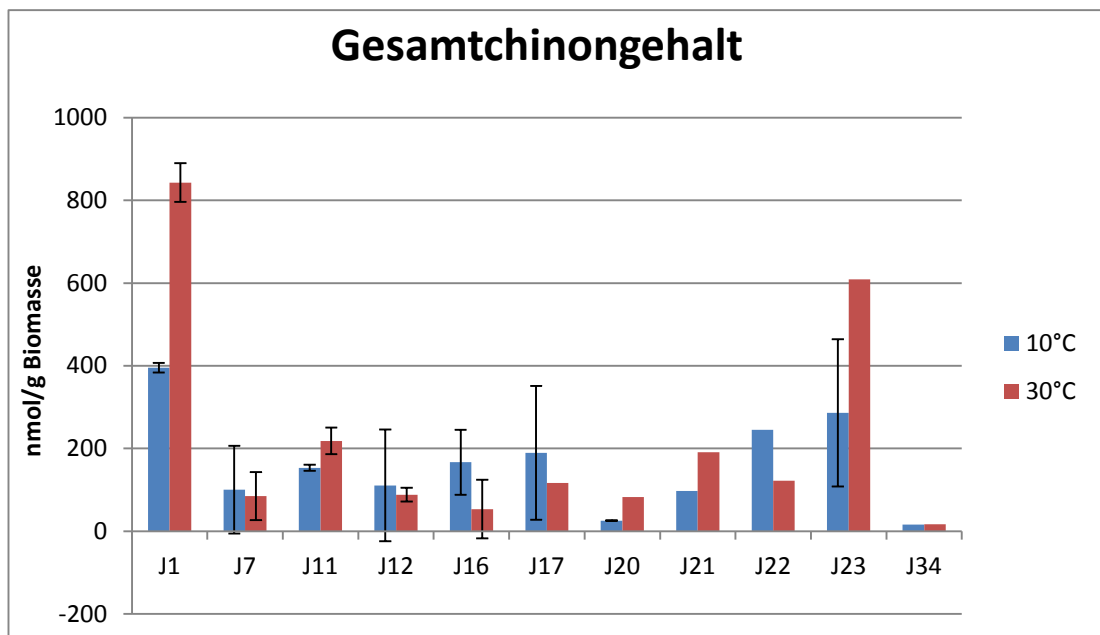


Abbildung 18: Gesamtchinongehalt in nmol/g Biomasse

Im Laufe der Arbeit stellte sich vor allem durch Untersuchungen der Isolate J7 und 12 heraus, dass es effizienter ist, mit lyophilisiertem Zellmaterial zu arbeiten, da die Ausbeuten besser ausfielen. Gerade Isolat J7 und J12 schienen interessant, da hier bei 10°C laut Untersuchung mehr Chinon bei 10°C gebildet wurde. In Abbildung 19 ist der Gesamtchinongehalt in nmol/g Lyophilisat dargestellt.

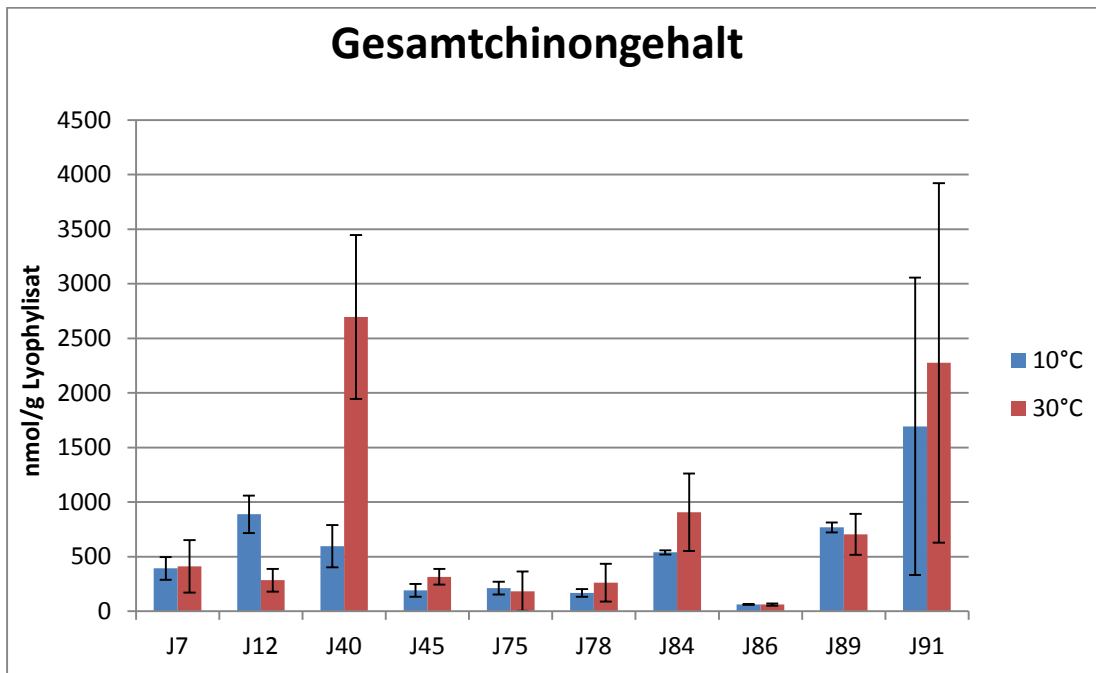


Abbildung 19: Gesamtchinongehalt in nmol/g Lyophilisat

3.4.2.2 Quantitativer Gehalt der einzelnen Chinone

Wie man in Tabelle 11 erkennen kann, bildeten die Isolate *Bacillus cereus* J1, *Rhodococcus qingshengii* J20, *Stenotrophomonas maltophilia* J21, *Achromobacter marplatensis* J23, *Kocuria palustris* J40; *Acinetobacter lwoffii* J84 und *Pseudomonas baetica* J91 vermehrt Chinone bei einer Inkubationstemperatur von 30°C.

Im Gegensatz dazu, veränderte sich der Chinongehalt der Isolate *Solibacillus silvestris* J7, *Brochothrix thermosphacta* J86 und *Pantoea agglomerans* J89 bei einer Inkubationstemperatur von 10°C und 30°C kaum.

Bei den Isolaten *Microbacterium oxydans* J75 und J78 wurde zwar der Gesamtchinongehalt bei einer Inkubationstemperatur von 30°C erhöht, jedoch wurde bei einer Inkubationstemperatur von 10°C zusätzlich das unbekannte Menachinon mit der relativen Retentionszeit von 0,70 gebildet.

Bei den Isolaten *Paenibacillus glucanolyticus* J12 und *Pedobacter nutrimenti* J22 wurde zwei- bis dreifach vermehrt das Menachinon MK-7 bei einer Inkubationstemperatur von 10°C gebildet. Bei dem Ergebnis bei 30°C von Isolat J22 handelt es sich jedoch nur um eine Einfachbestimmung.

Tabelle 11: Chinongehalt in nmol/g Biomasse

Isolat	Inkubations-temperatur	Chinon	Rel. RT ^{a)}	Gehalt in nmol/g
<i>Bacillus cereus</i> J1 ¹⁾	10°C	MK-7	1,34	408,3 ± 34,7
	30°C	MK-7	1,34	825,3 ± 20,9
<i>Solibacillus silvestris</i> J7 ²⁾	10°C	MK-6	1,10	15,9 ± 3,2
		MK-7	1,34	376,1 ± 114,8
	30°C	MK-6	1,10	28,5 ± 10,5
		MK-7	1,34	357,0 ± 249,4
<i>Paenibacillus glucanolyticus</i> J12 ²⁾	10°C	MK-7	1,34	887,6 ± 172,2
	30°C	MK-7	1,34	283,4 ± 104,2
<i>Rhodococcus qingshengii</i> J20 ¹⁾	10°C	MK-unbekannt	0,70	1,6
		MK-8 H ₂	1,85	24,4
		MK-unbekannt	2,35	0,0
	30°C	MK-unbekannt	0,70	1,9
		MK-8 H ₂	1,85	77,6
		MK-unbekannt	2,35	2,1
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> J21 ¹⁾	10°C	MK-unbekannt	0,70	0,6
		MK-8 H ₂	1,85	15,1
		Q-unbekannt	0,55	0,0
		Q-8	0,68	81,0
	30°C	MK-unbekannt	0,70	2,1
		MK-8 H ₂	1,85	6,7
		Q-unbekannt	0,55	4,3
		Q-8	0,68	178,2
<i>Pedobacter nutrimenti</i> J22 ¹⁾	10°C	MK-7	1,34	241
	30°C	MK-7	1,34	118,8
<i>Achromobacter marplatensis</i> J23 ¹⁾	10°C	Q-8	0,68	407,9
	30°C	Q-8	0,68	608,7

<i>Kocuria palustris</i> J40 ²⁾	10°C	MK-unbekannt	1,00	9,7 ± 4,1
		MK-unbekannt	1,20	27,0 ± 3,7
		MK-7 H ₂	1,46	542,9 ± 188,1
		MK-8 H ₂	1,84	14,9 ± 5,1
	30°C	MK-unbekannt	1,00	36,4 ± 5,7
		MK-unbekannt	1,20	214,3 ± 50,1
		MK-7 H ₂	1,46	2446,1 ± 695,0
		MK-8 H ₂	1,84	0,0
<i>Microbacterium oxydans</i> J75 ²⁾	10°C	MK-unbekannt	0,70	15,7 ± 0,9
		MK-unbekannt	0,80	19,1 ± 1,0
		MK-11	3,27	21,6 ± 10,0
		MK-12	4,20	154,7 ± 49,0
	30°C	MK-unbekannt	0,70	0,00
		MK-unbekannt	0,80	85,4
		MK-11	3,27	75,0
		MK-12	4,20	150,6
<i>Microbacterium oxydans</i> J78 ²⁾	10°C	MK-unbekannt	0,70	8,3 ± 0,8
		MK-unbekannt	0,80	26,7 ± 3,0
		MK-11	3,27	17,4 ± 5,6
		MK-12	4,20	114,8 ± 26,7
	30°C	MK-unbekannt	0,70	0
		MK-unbekannt	0,80	34,2
		MK-11	3,27	114,4
		MK-12	4,20	235,8
<i>Acinetobacter Iwoffii</i> J84 ²⁾	10°C	Q-unbekannt	0,55	3,8 ± 0,8
		Q-8	0,68	166,7 ± 0,5
		Q-9	0,80	362,9 ± 20,6
		Q-10	1,00	5,80 ± 0,23
	30°C	Q unbekannt	0,55	10,5 ± 2,1
		Q-8	0,68	264,2 ± 82,4
		Q-9	0,80	623,0 ± 265,1
		Q-10	1,00	9,8 ± 5,6
<i>Brochothrix thermosphacta</i> J86 ²⁾	10°C	MK-7	1,34	61,4 ± 3,0
	30°C	MK-7	1,34	60,7 ± 10,6
<i>Pantoea agglomerans</i> J89 ²⁾	10°C	MK-7	1,34	3,5 ± 0,6
		MK-8	1,85	88,4 ± 8,6
		Q unbekannt	0,50	1,5 ± 0,2
		Q unbekannt	0,56	15,1 ± 5,5
		Q-8	0,68	659,2 ± 49,7

	30°C	MK-7	1,34	10,8 ± 3,4
		MK-8	1,85	166,4 ± 60,1
		Q-unbekannt	0,50	4,4 ± 0,6
		Q-unbekannt	0,56	36,3 ± 3,2
		Q-8	0,68	486,0 ± 122,8
<i>Pseudomonas baetica</i> J91 ²⁾	10°C	Q-unbekannt	0,55	1,4 ± 0,0
		Q-8	0,65	24,5 ± 3,8
		Q-9	0,80	1668,1 ± 1357,2
		Q-10	1,00	0 ± 0,0
	30°C	Q-unbekannt	0,55	7,5 ± 6,5
		Q-8	0,65	84,7 ± 39,5
		Q-9	0,80	2164,0 ± 1586,5
		Q-10	1,00	19,1 ± 14,9

a) relative Retentionszeit

1) nasse Zellen als Biomasse

2) Lyophilisat als Biomasse

3.6 Carotinoidgehalt bei 10°C- und 30°C-Inkubation

Im Laufe der Arbeit stellte sich heraus, dass einige Bakterienisolate eine stärkere Pigmentbildung bei 10°C Inkubationstemperatur zeigten als bei 30°C Inkubationstemperatur. Aus den Abbildungen 20 bis 24 ist beispielhaft ersichtlich, dass sich die Intensität der Pigmentbildung der Isolate J7, J48, J50 und J70 bei 10°C im Vergleich zu 30°C unterscheidet.



Abbildung 20: Isolat *Solibacillus silvestris* J7 bei 10°C (links) und 30°C (rechts) Inkubationstemperatur



Abbildung 21: Isolat *Kocuria rhizophila* J48 bei 10°C (links) und 30°C (rechts) Inkubationstemperatur



Abbildung 22: Isolat *Micrococcus luteus* J50 bei 10°C (links) und 30°C (rechts) Inkubationstemperatur



Abbildung 23: Isolat *Staphylococcus xylosus* J70 bei 10°C (links) und 30°C (rechts) Inkubationstemperatur

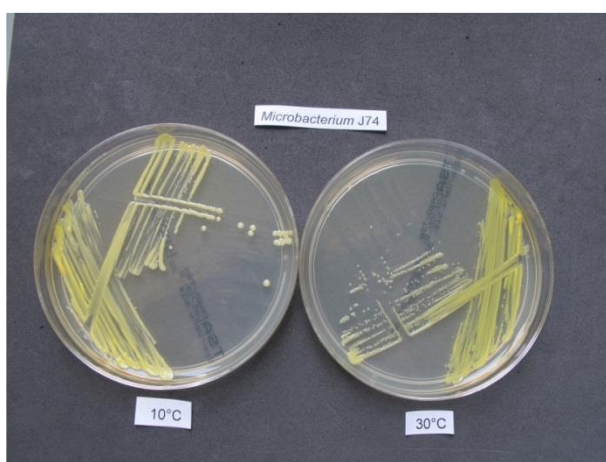


Abbildung 24: Isolat *Microbacterium maritopicum* J74 bei 10°C (links) und 30°C (rechts) Inkubationstemperatur

Um den Carotinoidgehalt zu bestimmen, wurde in den Abschlussarbeiten von Murr (2013) und Jacobsen (2013) nach einer effizienten Extraktionsmethode gesucht. In Abbildung 25 und 26 sind die Ergebnisse von Jacobsen (2013) dargestellt. Zusätzlich wurden in dieser Abschlussarbeit von den Isolaten *Kocuria rhizophila* J48, *Micrococcus luteus* J50 und *Staphylococcus xylosum* J70 die nächstähnlichen Typstämme auf ihren Carotinoidgehalt bei 10°C und 30°C untersucht und miteinander verglichen. Diese Ergebnisse sind in Abbildung 27 dargestellt.

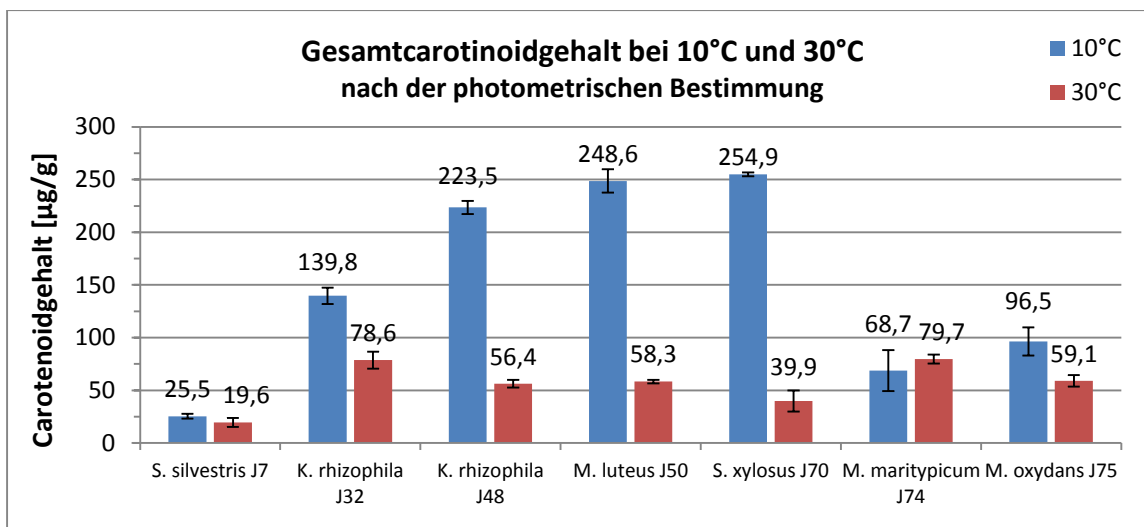


Abbildung 25: Gesamtcarotinoidgehalt in µg/g Lyophilisat nach photometrischer Messung bei 10°C und 30°C Inkubationstemperatur der Isolate *S. silvestris* J7, *K. rhizophila* J32, *K. rhizophila* J48, *M. luteus* J50, *S. xylosum* J70, *M. maritypicum* J74 und *M. oxydans* J75

Die Ergebnisse aus der photometrischen Methode zeigen, dass bei den Isolaten *K. rhizophila* J48, *M. luteus* J50 und *S. xylosum* J70 eine vier- bis sechsfache Zunahme der Carotinoidgehaltes in der kälteren Umgebung stattfand. Geringere Unterschiede zwischen den Wachstumstemperaturen wiesen dagegen die Isolate *K. rhizophila* J32 und *M. oxydans* J75 auf. Bei *S. silvestris* J7 und *M. maritypicum* J74 konnte kein signifikanter Unterschied im Carotinoidgehalt ermittelt werden. Dies ist jedoch verwunderlich, da man in Abbildung 20 und 24 eine deutliche Veränderung der Pigmentierung bei 10°C erkennen kann.

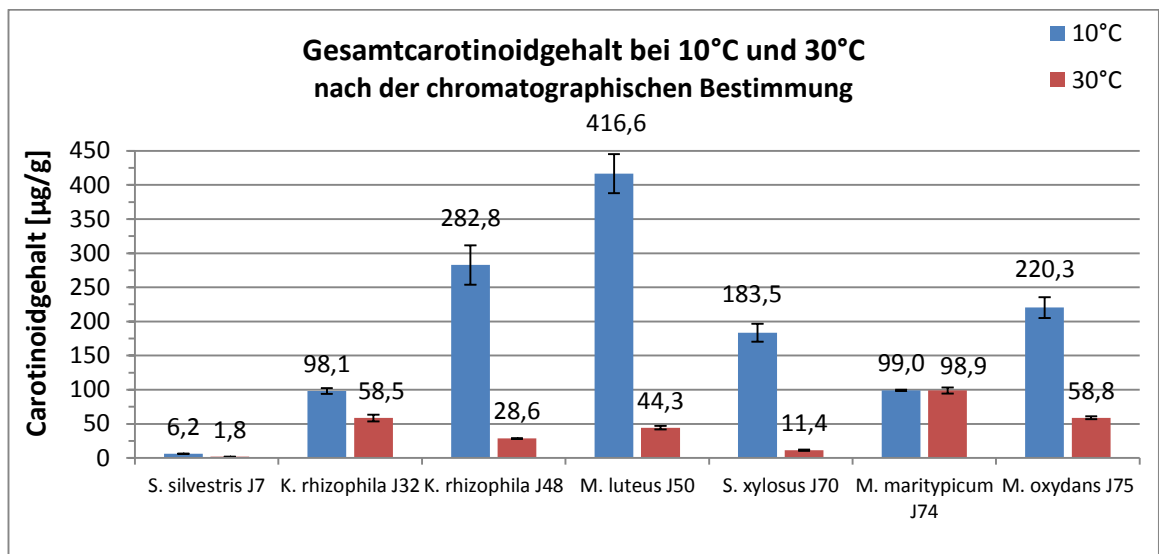


Abbildung 26: Gesamtcarotinoidgehalt in µg/g Lyophilisat nach chromatographischer Bestimmung mittels HPLC bei 10°C und 30°C Inkubationstemperatur der Isolate *S. silvestris* J7, *K. rhizophila* J32, *K. rhizophila* J48, *M. luteus* J50, *S. xylosus* J70, *M. maritypicum* J74 und *M. oxydans* J75

Auch nach der chromatographischen Bestimmung wurde bei den Isolaten *K. rhizophila* J48, *M. luteus* J50 und *S. xylosus* J70 der größte Anstieg des Carotinoidgehaltes bei 10°C festgestellt. In Abhängigkeit von der verwendeten Methode unterschieden sich die absoluten Carotinoidgehaltswerte. Bei *M. luteus* J50 übersteigt der chromatographisch ermittelte Wert von über 400 µg/g die photometrisch bestimmte Konzentration von ca. 250 µg/g, während der Gesamtcarotinoidgehalt bei *S. xylosus* J70 mit ca. 180 µg/g (chromatographisch) wesentlich geringer ausfällt. Im Gegensatz zu der photometrischen Bestimmung zeigte das Isolat *M. oxydans* J75 über die chromatographische Berechnung einen Anstieg der Carotinoidgehaltswerte von 59 µg/g auf 220 µg/g bei einer Inkubationstemperatur von 10°C. In Abhängigkeit von den Methoden wurden die Messungen bei 450 nm (photometrisch) bzw. 440 nm (chromatographisch) durchgeführt, daher war die Quantifizierung unterschiedlich. Die photometrische Methode wurde per Absorptionskoeffizient aus der Literatur durchgeführt und die chromatographische Methode mit eigenem Standard. Die genannten Differenzen im Gesamtcarotinoidgehalt der Isolate zwischen der photometrischen und der chromatographischen Methode können daher darauf zurückgeführt werden.

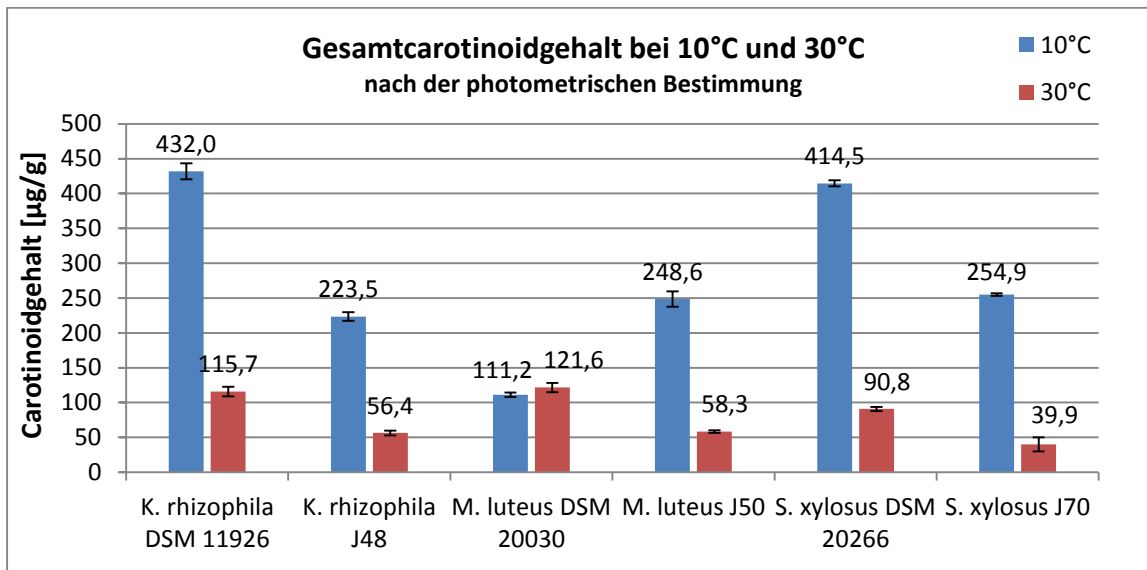


Abbildung 27: Vergleich der photometrisch ermittelten Gesamtcarotinoidgehalte der Isolate und Typstämme, inkubiert bei 10°C und 30°C

Der Vergleich der Isolate mit den Typstämmen der jeweiligen Spezies zeigt, dass bei den Isolaten von *K. rhizophila* und *S. xylosus* in der kälteren Umgebung von 10°C jeweils ein Anstieg des Carotinoidgehaltes nachgewiesen werden konnte. Die Typstämme *K. rhizophila* DSM 11926^T und *S. xylosus* DSM 20266^T erreichten jedoch noch größere Carotinoidekonzentrationen als die Wildisolate. Der Typstamm von *M. luteus* bildete jedoch bei 30°C mit 122 µg/g mehr Carotinoide als das Wildisolat J50 mit 58 µg/g. Im Gegensatz zu *Micrococcus luteus* J50 wurde bei dem Typstamm kein Anstieg des Carotinoidgehaltes bei 10°C beobachtet.

3.7 Wachstumsverhalten

Bei einigen Isolaten zeigte sich, dass der Zellertrag in der stationären Phase bei einer Inkubationstemperatur von 10°C deutlich höher lag als bei der Inkubationstemperatur von 30°C. Um diesen Effekt näher untersuchen zu können, wurden Wachstumskurven erstellt und der maximale Zellertrag mittels Trübungsmessung und Proteingehalt bestimmt. Im folgenden Abschnitt sind einige Isolate als Beispiel für einen erhöhten Zellertrag dargestellt. Zum Teil werden die Wachstumsverläufe bzw. Zellgehalte der Isolate mit Wachstumsverläufen bzw. Zellgehalten von Typ- bzw. Referenzstämmen verglichen.

3.7.1 Wachstumsverlauf einzelner Isolate bei 10°C- und 30°C-Inkubationstemperatur

Die Abbildungen 28 bis 34 zeigen die Wachstumsverläufe der untersuchten Isolate. Auf der X-Achse ist jeweils die Dauer der Messung in Stunden dargestellt und auf der Ordinate die Werte der Optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 625 nm.

Die Zellkulturen aller untersuchten Isolate hatte bei 10°C Inkubationstemperatur eine deutlich längere lag-Phase als bei 30°C. Auch die stationäre Phase wurde wesentlich später erreicht als bei 30°C Inkubationstemperatur, nämlich nach mindestens 100 h, bei den Isolaten FFL1 und Iso1/11 nach 80 h. Die stationäre Phase bei 30°C wurde bereits nach ca. 24 h erreicht.

Der maximale Zellertrag fällt bei allen Isolaten gemessen anhand der OD_{\max} bei 10°C deutlich höher aus als bei 30°C Inkubationstemperatur. Bei Isolat J70 wird sogar eine OD_{\max} von 25 bei 10°C gemessen. Bei 30°C Inkubationstemperatur liegt der Maximalwert 5-fach niedriger. Alle anderen Isolate zeigten eine 0,5 bis 3-fache Erniedrigung des Zellertrages bei 30°C.

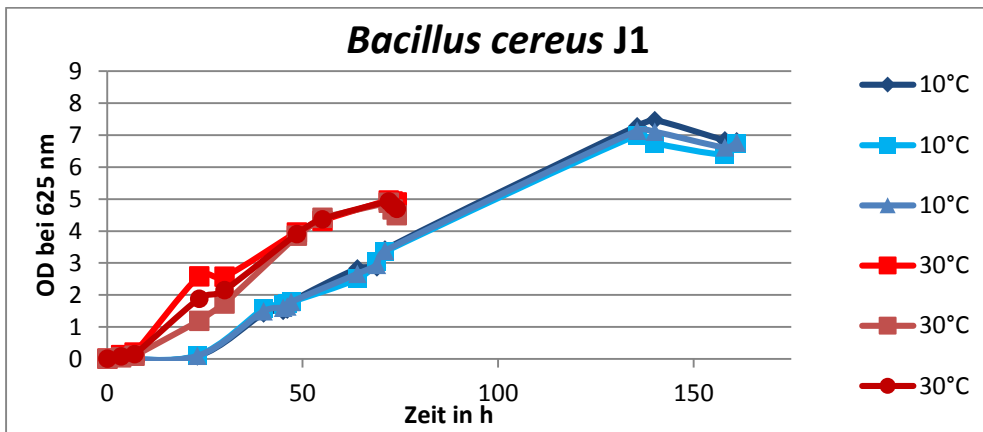


Abbildung 28: Wachstumskurven von Isolat *Bacillus cereus* J1 bei 10°C und 30°C Inkubation

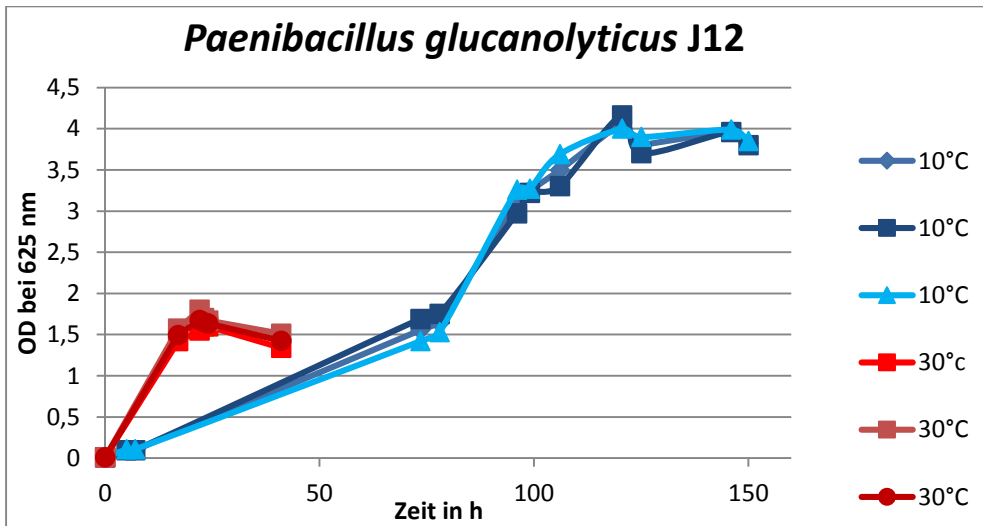


Abbildung 29: Wachstumskurven von Isolat *Paenibacillus gluconolyticus* J12 bei 10°C und 30°C Inkubation

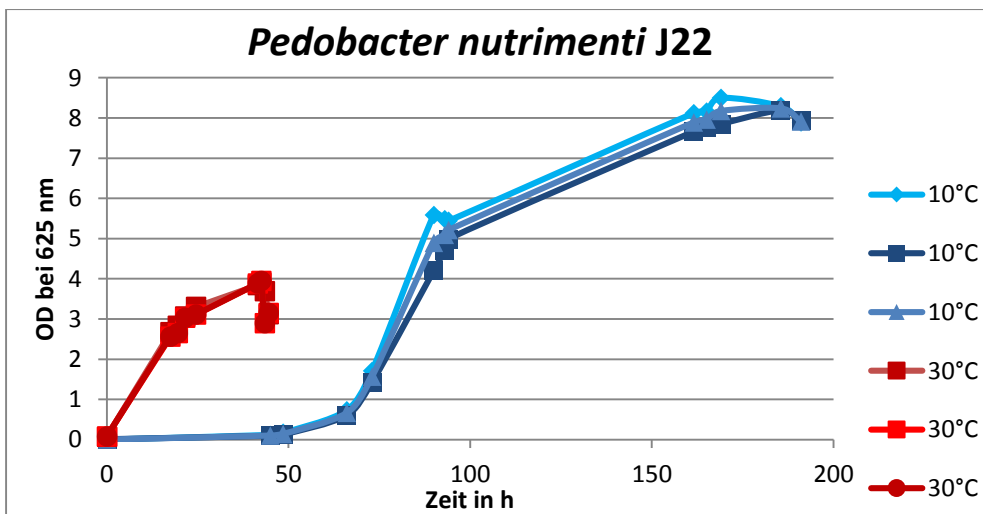


Abbildung 30: Wachstumskurven von Isolat *Pedobacter nutrimenti* J22 bei 10°C und 30°C Inkubation

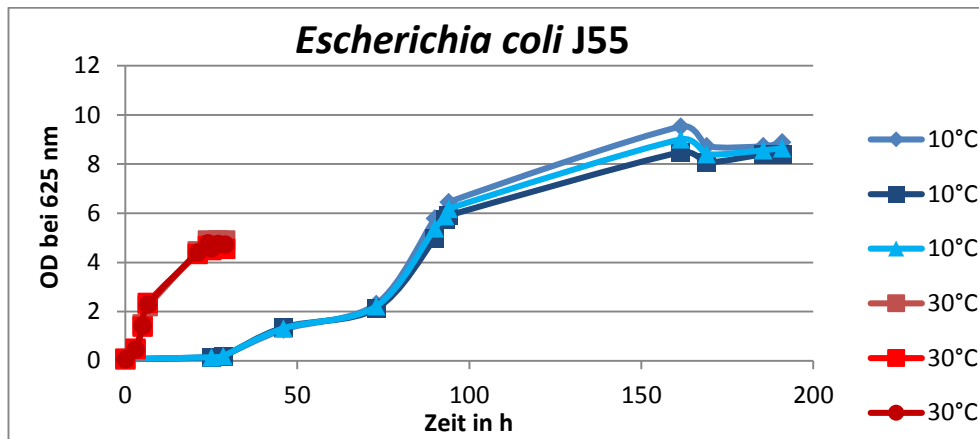


Abbildung 31: Wachstumskurven von Isolat *Escherichia coli* J55 bei 10°C und 30°C Inkubation

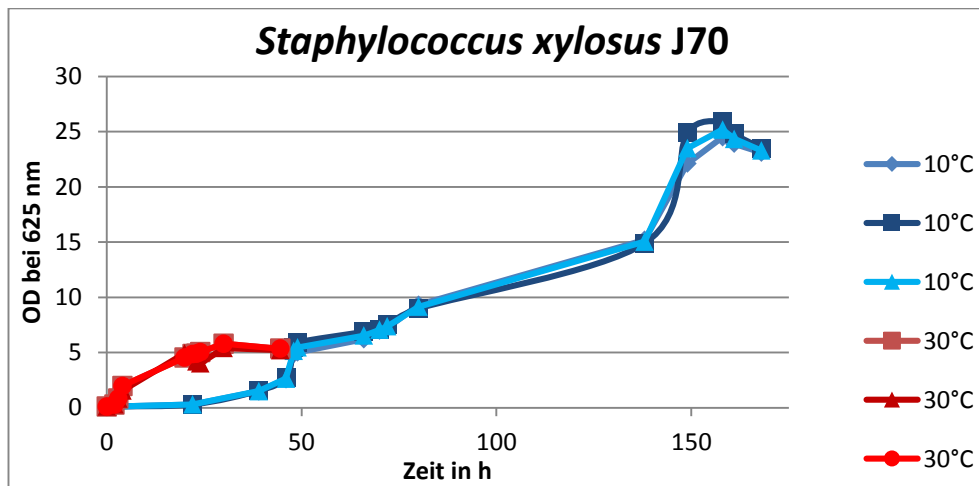


Abbildung 32: Wachstumskurven von Isolat *Staphylococcus xylosus* J70 bei 10°C und 30°C Inkubation

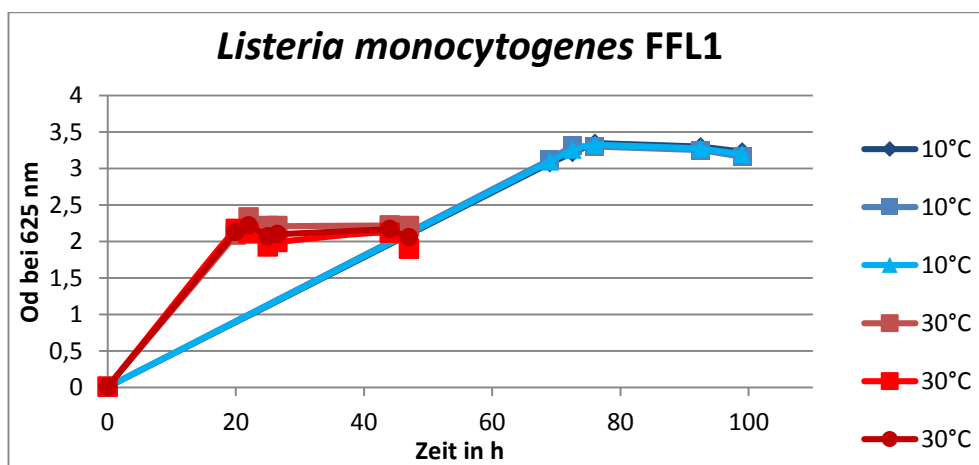


Abbildung 33: Wachstumskurven von Isolat *Listeria monocytogenes* FFL1 bei 10°C und 30°C Inkubation

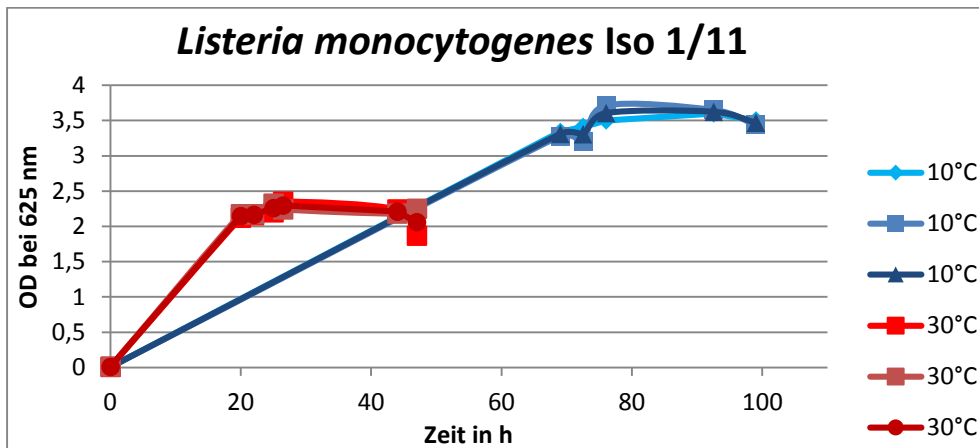


Abbildung 34: Wachstumskurven von Isolat *Listeria monocytogenes* Iso 1/11 bei 10°C und 30°C Inkubation

3.7.2 Wachstumsverhalten einzelner Isolate bei 10°C und 30°C im Vergleich zu Typ- bzw. Referenzstämmen

Zusätzlich zu dem Wachstumsverhalten der Isolate aus Abschnitt 3.7.1 wurde dieses Wachstumsverhalten mit dem Wachstumsverhalten von Referenzstämmen bei 10°C und 30°C verglichen.

In Abbildungen 35 bis 38 kann man erkennen, dass sich der Wachstumsverlauf bei einer Inkubationstemperatur von 30°C von Wildisolat und Referenzstamm nicht ändert. Jedoch zeigt sich auch, dass bei einer Inkubationstemperatur von 10°C der Wachstumsverlauf von Wildisolat im Vergleich zum Referenzstamm variierte. So zeigten alle Wildisolate, wie zuvor auch in Abschnitt 3.7.1 beschrieben, auch bei 10°C eine deutlich höhere optische Dichte als der Referenzstamm bei 10°C Inkubation. Bei 10°C-Inkubation änderte sich auch die Wachstumsrate von Wildisolat im Vergleich zu Referenzstamm. Auf diesen Aspekt wird im nächsten Abschnitt eingegangen.

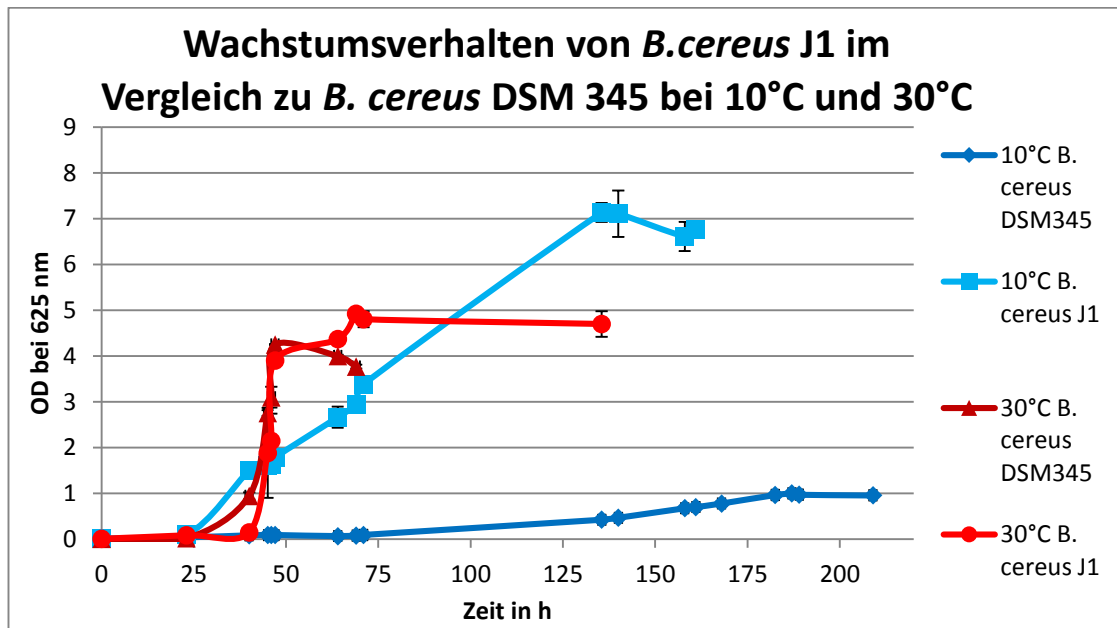


Abbildung 35: Wachstumskurven von Isolat *Bacillus cereus* J1 im Vergleich zum Referenzstamm *Bacillus cereus* DSM 345 bei 10°C und 30°C Inkubation

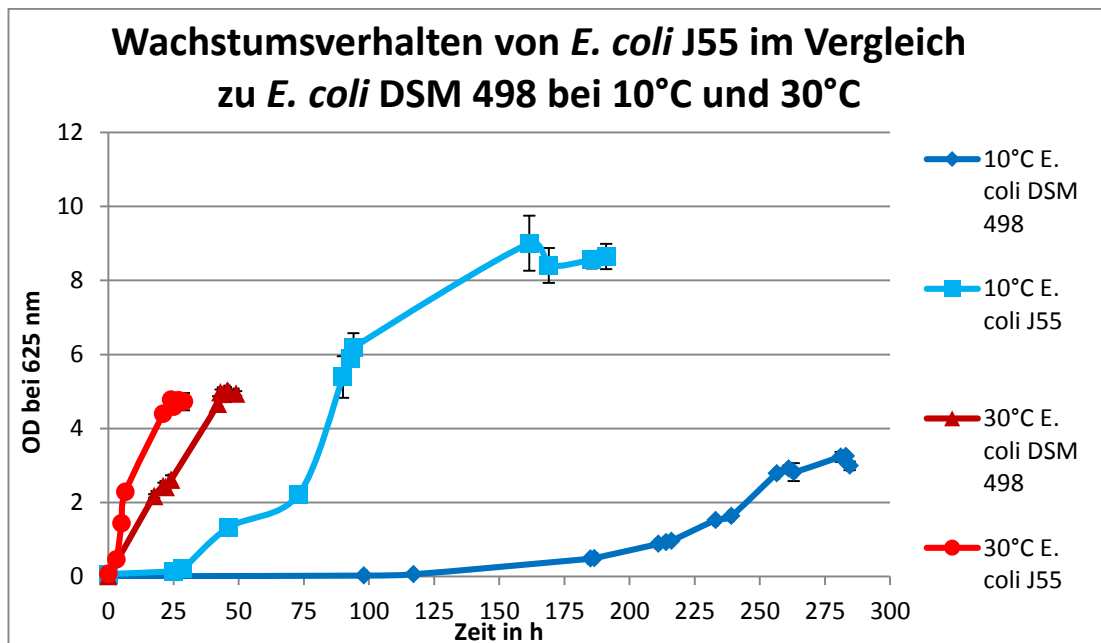


Abbildung 36: Wachstumskurven von Isolat *Escherichia coli* J55 im Vergleich zum Referenzstamm *Escherichia coli* DSM 498 bei 10°C und 30°C Inkubation

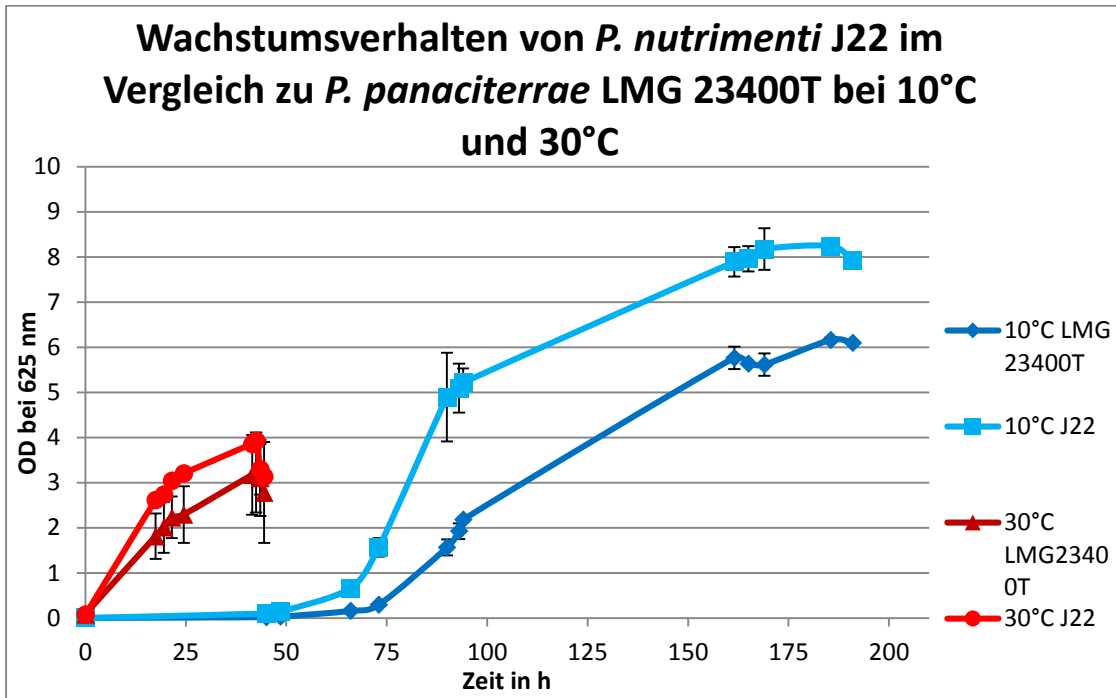


Abbildung 37: Wachstumskurven von Isolat *Pedobacter nutrimenti* J22 im Vergleich zum nächstähnlichen Typstamm *Pedobacter panaciterrae* LMG 23400T bei 10°C und 30°C Inkubation

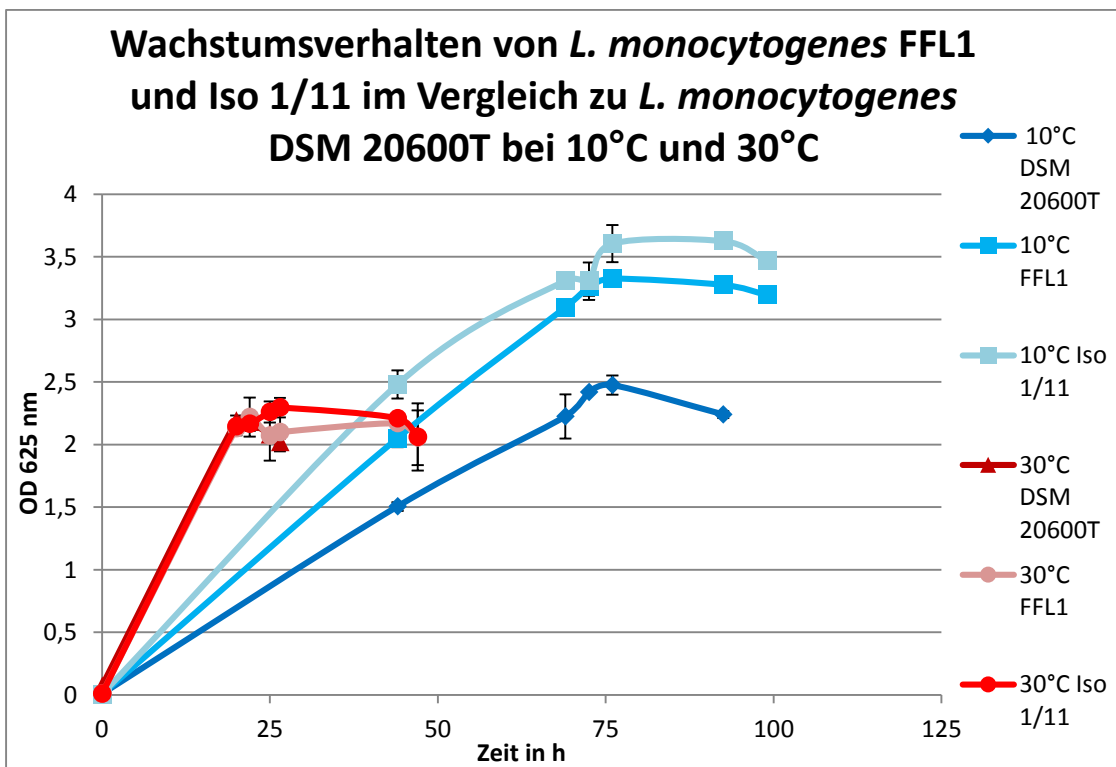


Abbildung 38: Wachstumskurven von den Isolaten *Listeria monocytogenes* FFL1 und Iso 1/11 im Vergleich zum nächstähnlichen Typstamm *Listeria monocytogenes* DSM 20600T bei 10°C und 30°C Inkubation

3.7.3. Exponentielle Wachstumsraten und maximale OD-Werte

Nachfolgend sind die exponentiellen Wachstumsraten und die maximalen OD-Werte der Wildisolate und deren Referenzstämme dargestellt.

Tabelle 12: Exponentielle Wachstumsraten und maximaler OD-Werte der Wildisolate

Isolate	10 °C		30 °C	
	μ	OD ₆₂₅	μ	OD ₆₂₅
<i>Bacillus cereus</i> J1	0,022 h ⁻¹	7,47 ± 0,51	0,028 h ⁻¹	4,93 ± 0,05
<i>Paenibacillus glucanolyticus</i> J12	0,022 h ⁻¹	4,08 ± 0,11	0,082 h ⁻¹	1,65 ± 0,07
<i>Pedobacter nutrimenti</i> J22	0,024 h ⁻¹	8,24 ± 0,07	0,041 h ⁻¹	3,93 ± 0,04
<i>Escherichia coli</i> J55	0,021 h ⁻¹	9,01 ± 0,74	0,044 h ⁻¹	4,78 ± 0,16
<i>Staphylococcus xylosus</i> J70	0,019 h ⁻¹	25,5 ± 0,99	0,035 h ⁻¹	5,60 ± 0,28
<i>Listeria monocytogenes</i> FFL1	0,026 h ⁻¹	3,26 ± 0,04	0,042 h ⁻¹	2,22 ± 0,16
<i>Listeria monocytogenes</i> Iso1/11	0,020 h ⁻¹	3,63 ± 0,04	0,056 h ⁻¹	2,29 ± 0,08

Tabelle 13: Exponentielle Wachstumsraten und maximaler OD-Werte der Referenz- bzw. Vergleichsstämme

Referenz- bzw. Typstämme	10 °C		30 °C	
	μ	OD ₆₂₅	μ	OD ₆₂₅
<i>Bacillus cereus</i> DSM 345	0,013 h ⁻¹	0,98 ± 0,03	0,116 h ⁻¹	4,26 ± 0,01
<i>Pedobacter panaciterrae</i> LMG23400 ^T	0,024 h ⁻¹	6,16 ± 0,06	0,037 h ⁻¹	3,23 ± 0,88
<i>Escherichia coli</i> DSM 498	0,010 h ⁻¹	3,26 ± 0,01	0,031 h ⁻¹	5,02 ± 0,03
<i>Listeria monocytogenes</i> DSM 20600 ^T	0,028 h ⁻¹	2,48 ± 0,08	0,099 h ⁻¹	2,19 ± 0,04

Wenn man die Werte der Wildstämme mit den Werten der Referenzstämme (Tab. 12 und 13) vergleicht, lässt sich erkennen, dass die optischen Dichten in der stationären Phase aller Wildisolate bei einer 10°C- Inkubationstemperatur höher liegen als bei den Referenzstämmen. Darüber hinaus kann man erkennen, dass alle untersuchten Wildisolate bei 10°C eine höhere optische Dichte erreichen als bei 30°C Inkubationstemperatur. Die exponentiellen Wachstumsraten hingegen sind bei einer 10°C-Inkubation niedriger als bei einer 30°C-Inkubation.

Die Referenzstämme verhielten sich wiederum entgegengesetzt. So war die höchste optische Dichte, mit Ausnahme von *Pedobacter panaciterrae* LMG23400^T, bei den Zellkulturen zu verzeichnen, die bei 30°C inkubiert wurden. Die exponentiellen Wachstumsraten verhielten sich aber wie die Wildisolate mit einem kleineren Wert bei einer 10°C-Inkubation.

3.8 Zelldichte

Um die Ergebnisse des Wachstumsverhaltens und der höherer Zelldichte gemessen mit der optischen Dichte zu validieren, wurde von den zuvor beschriebenen Isolaten und deren Referenz- bzw. Typstämmen zusätzlich eine Proteinbestimmung durchgeführt (Tab. 14).

Tabelle 14: Proteingehalt in mg/mL Zellsuspension und maximaler OD-Wert in der spätexponentiellen Wachstumsphase bei 625 nm der Isolate und deren Referenz- und Vergleichsstämme

Inkubations-temperatur	Isolat bzw. Referenzbakterium	Proteingehalt in g/mL Bakterien-suspension	Endpunkt-messung der OD bei 625 nm
10°C	<i>B. cereus</i> J1	0,60 ± 0,02	7,47 ± 0,51
	<i>B. cereus</i> DSM 345	0,29 ± 0,01	0,98 ± 0,03
30°C	<i>B. cereus</i> J1	0,53 ± 0,02	4,93 ± 0,05
	<i>B. cereus</i> DSM 345	0,54 ± 0,06	4,26 ± 0,01
10°C	<i>Pedobacter nutrimenti</i> J22	0,81 ± 0,05	8,24 ± 0,07
	<i>Pedobacter panaciterrae</i> LMG23400 ^T	0,62 ± 0,09	6,16 ± 0,06
30°C	<i>Pedobacter nutrimenti</i> J22	0,49 ± 0,01	3,93 ± 0,04
	<i>Pedobacter panaciterrae</i> LMG23400 ^T	0,66 ± 0,12	3,23 ± 0,88
10°C	<i>E. coli</i> J55	1,41 ± 0,04	9,01 ± 0,74
	<i>E. coli</i> DSM 498	0,32 ± 0,10	3,26 ± 0,01
30°C	<i>E. coli</i> J55	0,52 ± 0,06	4,78 ± 0,16
	<i>E. coli</i> DSM 498	1,06 ± 0,29	5,02 ± 0,03
10°C	<i>L. monocytogenes</i> FFL 1	0,51 ± 0,01	3,26 ± 0,04
	<i>L. monocytogenes</i> Iso 1/11	0,56 ± 0,01	3,63 ± 0,04
	<i>L. monocytogenes</i> DSM 20600 ^T	0,48 ± 0,00	2,48 ± 0,08
30°C	<i>L. monocytogenes</i> FFL 1	0,36 ± 0,01	2,22 ± 0,16
	<i>L. monocytogenes</i> Iso 1/11	0,37 ± 0,02	2,29 ± 0,08
	<i>L. monocytogenes</i> DSM 20600 ^T	0,46 ± 0,02	2,19 ± 0,04

Wie man in Tabelle 14 erkennen kann, korrelieren die Ergebnisse, mit Ausnahme von *P. panaciterrae* LMG23400^T, mit den Ergebnissen der OD-Wert Bestimmung.

Man kann jedoch nicht von einer 100% Übereinstimmung ausgehen, da es sich bei der Proteinbestimmung nach Biuret um eine direkte Methode der Zellmassenbestimmung

handelt und die Trübungsmessung mittels optischer Dichte eine indirekte Bestimmungsmethode der Biomasse ist. Chemische Zellbestandteile wie zum Beispiel Gesamtstickstoff, Protein oder DNA lassen sich zur direkten Bestimmung der Biomasse heranziehen, da der Bestandteil einen genügend großen Anteil der Zellmasse ausmacht und zum größten Teil in einem gleichbleibenden Verhältnis zur Gesamtbiomasse steht. (Bast 1999)

3.9 Kälteresistenztest *Listeria monocytogenes*

Für diese Untersuchung wurde der Wildstamm *Listeria monocytogenes* Iso 1/11 der Gefrierschranktemperatur von -20°C über einen definierten Zeitraum ausgesetzt. Dieser Versuch wurde mit dem nächstähnlichen Typstamm *Listeria monocytogenes* DSM 20600^T als Vergleich parallel wiederholt.

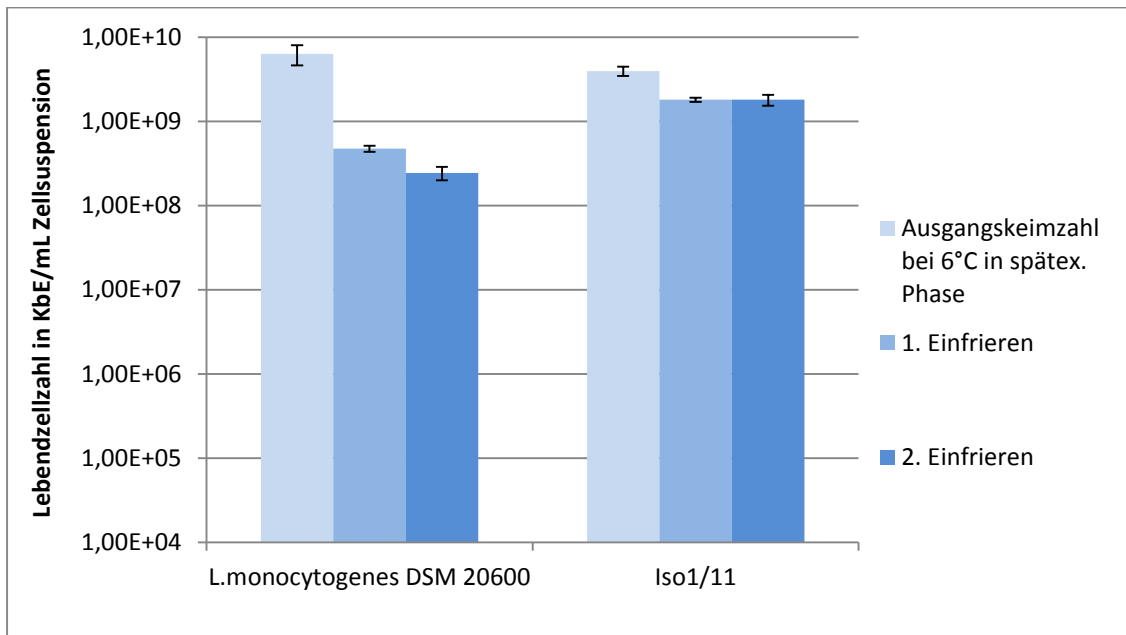


Abbildung 39: Lebendzellausbeute in KbE/mL nach Kältestresstest bei -20°C von Isolat *Listeria monocytogenes* Iso 1/11 im Vergleich zum nächstähnlichen Typstamm *Listeria monocytogenes* DSM 20600^T

Die Abbildung 39 zeigt die Lebenszellzahl von Wildisolat und Typstamm vor Beginn des Einfrierprozesses, nach einem bzw. zwei Einfrier- und Auftauzyklen. Man kann erkennen, dass das gewachsene Wildisolat *Listeria monocytogenes* Iso 1/11 im Vergleich zu dem Typstamm *Listeria monocytogenes* DSM 20600^T resistenter gegenüber Einfrier- und Auftaustress ist.

3.10 Überlebenstest bei 10°C und 30°C in einem Modelllebensmittel

Um die Ergebnisse aus 3.7 und 3.8 am Beispiel von *Listeria monocytogenes* in einem Lebensmittel nachzustellen, wurde das Modelllebensmittel Milch (ultrahocherhitzt, 3,5% Fettanteil) zum einen mit dem Wildisolat *Listeria monocytogenes* Iso 1/11 und zum anderen mit dem Typstamm *Listeria monocytogenes* DSM 20600^T inokuliert und anschließend bei 10°C und 30°C inkubiert.

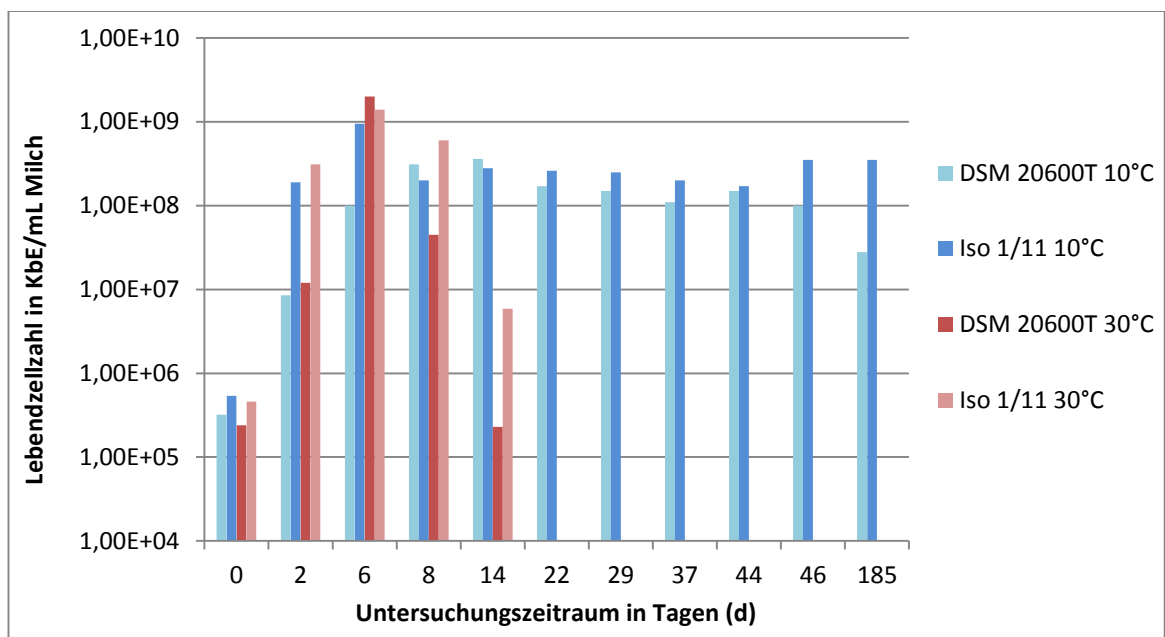


Abbildung 40: Kälteresistenztest von Isolat *Listeria monocytogenes* Iso 1/11 im Vergleich zum nächstähnlichen Typstamm *Listeria monocytogenes* DSM 20600^T in dem Modelllebensmittel Milch bei 10°C und 30°C

In Abbildung 41 kann man erkennen, dass die Lebendzellzahl sowohl von Wildisolat Iso 1/11 als auch von Typstamm DSM 20600^T bei 30°C Inkubationstemperatur nach sechs Tagen Inkubation langsam abnimmt. Im Gegensatz dazu bleibt die Lebendzellzahl von Wildisolat Iso 1/11 bei einer Inkubationstemperatur von 10°C über einen Zeitraum von über 180 Tagen fast konstant. Die Lebendzellzahl von Typstamm DSM 20600^T bei einer Inkubationstemperatur von 10°C nimmt dagegen ab 45 Tagen kontinuierlich ab. Die Lebenszellzahl nahm zwischen Tag 46 und Tag 185 um ca. 90% ab.

Allgemein hat dieser Versuch gezeigt, dass ein Wildstamm im Vergleich zu einem Referenzstamm nach einem längeren Zeitraum eine erhöhte Zellausbeute bei 10°C Inkubationstemperatur auch in einem Modelllebensmittel wie Milch aufweisen kann.

Außerdem konnte eine unterschiedliche Überlebensdauer und einen unterschiedlichen Wachstumsverlauf bei niedrigen Temperaturen detektiert werden. kann.

4 Diskussion

4.1 Isolierung kälteangepasster Bakterien

Insgesamt wurden 54 Bakterienstämme aus gekühlten Lebensmitteln und lebensmittelassoziierten Kalthabitaten isoliert. Bei 48 Isolaten wurden das 16S rRNA-Gen sequenziert, um sie zu identifizieren. Diese Methode hat sich zur Beschreibung neuer Prokaryoten-Spezies sowie zur Identifikation von Bakterienisolaten bewährt (Janda und Abbott 2007; Stackebrandt und Goebel 1994).

Die Phyla *Proteobacteria*, *Actinobacteria* und *Firmicutes* waren unter den für die Identifizierung ausgewählten Isolaten zu etwa gleichen Anteilen vertreten, während das Phylum *Bacteroidetes* den geringsten Anteil an identifizierten Isolaten ausmachte. Dies stellt ein phylogenetisches Muster für kälteliebende Bakterien dar, wie Simon et al. (2009) bei Proben von Gletschereis feststellten.

4.2 Neubeschreibung *Pedobacter nutrimenti* J22^T

Isolat J22 konnte der durch 16S rRNA-Gensequenz, Fettsäuremuster, Chinonmuster und polaren Lipidmuster der Gattung *Pedobacter* zugeordnet werden, die zuerst von Steyn et al. (1998) beschrieben wurde. Die Gattung umfasste zum Zeitpunkt der Beschreibung *Pedobacter heparinus* (vorher: *Flavobacterium heparinum* (Takeuchi und Yokota 1992); *Sphingobacterium heparinum* (Payza und Korn 1956) und die zwei neuen Spezies *Pedobacter africanus* und *Pedobacter saltans*. Seitdem wurden mehrere *Pedobacter*-Spezies neu beschrieben und zurzeit umfasst die Gattung *Pedobacter* 40 Spezies. Hauptsächlich wurde die Gattung aus Bodenproben isoliert ((Yoon et al. 2007), (Zhou et al. 2012), (Luo et al. 2010), (Oh et al. 2013)) aber auch aus Wasserproben (Baik et al. 2007), Gletscher Kyroconit (Margesin 2003), Kompost (Lee et al. 2009) oder der Pflanzenrhizosphäre (Kwon et al. 2007).

Obwohl vermehrt die verschiedenen Spezies der Gattung *Pedobacter* aus Sediment- und Umweltproben isoliert wurden, gibt es Beschreibungen, in denen vereinzelt *Pedobacter*-Stämme aus Lebensmitteln isoliert wurden. So isolierte Herranen et al. (2010) einen *Pedobacter*-Stamm aus Cornflakes und Tsukamoto et al. (2002) aus dem Speisepilz *Clitocybe* sp. Die 16S rRNA-Gen Analysen in diesen Arbeiten könnten aufgrund von Sequenzübereinstimmungen unter 98% auf eine neue Spezies hinweisen, jedoch wurde dieser Verdacht nicht weiter untersucht. Daher ist es sehr wichtig die potentielle Rolle der Gattung *Pedobacter* im Lebensmittelbereich weiterhin zu untersuchen.

Die Gattung *Pedobacter* besitzt eine gewisse Affinität zu kalten Habitaten. Es gibt mehrere *Pedobacter*-Spezies, die auch wie Isolat J22 aus kalten Habitaten isoliert wurden, wie beispielsweise *Pedobacter articus* aus dem Erdboden der Kältesteppe (Zhou et al. 2012) und *Pedobacter himalayensis* aus einem Gletscher des Himalaya-Gebirges (Shivaji 2005). Dadurch, dass auch Isolat J22 aus einem kalten Habitat isoliert wurde, spielt dessen Temperaturwachstumsbereich eine wichtige Rolle. Es wurde ein Temperaturbereich von 4°C bis 37°C ermittelt, mit einem Optimum bei 30°C.

Beim Test der biochemischen Reaktionsprofile mit den Testsystemen API 20E und API 50CH zeigte sich, dass im Vergleich zu den drei Referenzstämmen nur das *Pedobacter*-Isolat J22 die Substrate Tween 80, Itaconsäure, α -Keto-Butylsäure, D-Alanin, L-Asparaginsäure, Urocansäure und Thymidin verstoffwechselte. Damit konnte dieses Isolat von den anderen nächstähnlichen Typstämmen abgegrenzt werden.

Bei der phylogenetischen Analyse mit den drei verschiedenen Algorithmen Neighbour-Joining, Maximum-Likelihood und Maximum-Parsimony zeigte sich, dass Isolat J22 in die Gattung *Pedobacter* eingeordnet werden konnte. Bei der DNA-DNA Hybridisierung wurde ein Wert von 35,2% (reziprok 7,4%) zwischen dem Isolat J22 und dem nächstähnlichen Typstamm *Pedobacter panaciterrae* LMG23400^T gezeigt. Wayne et al. (1987) definierten den Wert von weniger als 70% als Kriterium zur Abgrenzung und Beschreibung einer neuen Spezies in der bakteriellen Taxonomie.

Die Fettsäureanalyse ermittelte die Hauptfettsäuren C14:0, C15:0 *iso*, C16:1 *cis* 9, C16:0 und C17:0 *iso* 3-OH, welche im Vergleich zu anderen *Pedobacter*-Spezies typisch für diese Gattung sind. (Kim et al. (2013); Luo et al. (2010); Steyn et al. (1998); Yoon et al. (2007); Zhou et al. (2012)). Jedoch gab es teilweise Unterschiede zu den Referenzstämmen. So konnte Isolat J22 durch den höheren Gehalt an der Fettsäure C16:0 und dem niedrigeren Gehalt an C17:1 *iso cis* 9 von den anderen drei Referenz-*Pedobacter*-Stämmen abgegrenzt werden. Außerdem wurde die für die Gattung *Pedobacter* typische Fettsäure C17:1 *iso cis* 11 nicht detektiert. Bei den polaren Lipiden ergab sich das typische *Pedobacter*-Muster aus Phosphatidylethanolamin, zwei Lipiden, zwei Aminophospholipiden und drei Aminolipide. Dieses Muster ist im Vergleich zu den drei Referenzstämmen teilweise übereinstimmend. Menachinon MK-7 wurde als einziges Chinon sowohl bei Isolat J22 als auch bei den drei Referenzstämmen detektiert. Dieses Ergebnis ist aber übereinstimmend mit allen Vertretern der Familie *Sphingobacteriaceae* (Margesin und Shivaji 2011).

Die oben aufgeführten chemotaxischen Daten und die phylogenetische Inferenz lässt die Schlussfolgerung zu, dass Isolat J22 zu der Gattung *Pedobacter* gehört. Es kann aber durch die unterschiedlich phänotypische Charakteristik und durch die DNA-DNA Hybridisierung mit dem nächstähnlichen Typstamm *Pedobacter panaciterrae* LMG23400^T mit einem Wert von weniger als 40% abgegrenzt werden.

Bezogen auf die hier beschriebenen Daten, konnte Isolat J22 als Repräsentant einer neuen Spezies in der Gattung *Pedobacter* eingeordnet werden, für welche der Name *Pedobacter nutrimenti* sp. nov. vorgeschlagen wurde (Derichs et al. 2014).

4.3 Fettsäurebewertung

4.3.1 Taxonomische Bedeutung

Die Fettsäureanalytik spielt in der Chemotaxonomie und damit auch in der Neubeschreibung von Bakterienarten eine wichtige Rolle. Viele Bakteriengattungen weisen ein unterschiedliches Fettsäuremuster auf und können damit von anderen Bakteriengattungen abgegrenzt werden. Die hier aus kalten Habitaten stammenden beschriebenen Isolate weisen alle ihr gattungstypisches Fettsäuremuster auf. Die am häufigsten vertretenden Gattungen sind *Bacillus*, *Micrococcus* und *Pseudomonas*. So sind die Fettsäuren C13:0 *iso*, C15:0 *iso*, C16:0, C17:0 *iso*, C15:0 *anteiso*, C16:0 *iso* typisch für die Gattung *Bacillus* (Guinebretiere et al. 2013). Die Gattung *Micrococcus* hat mit 15:0 *iso* und 15:0 *anteiso* zwei Hauptfettsäuren (Wieser et al. 2002) und die Gattung *Pseudomonas* besitzt neben den für gramnegative Bakterien typische hydroxylierten Fettsäuren noch die Fettsäuren C16:0 und C18:1 *cis* 11 (Yu et al. 2013).

Durch die Inkubation bei 10°C veränderten sich das Fettsäuremuster und die Fettsäurezusammensetzung von vielen Isolaten; zum Teil kam es sogar zu starken Veränderungen. Somit erkennt man, dass die Veränderung im Fettsäuremuster eine wichtige Rolle in der bakteriellen Kälteanpassung spielt. Dies ist eine bereits bekannte und in der Literatur oft beschriebene Strategie zur Änderung der Membranfluidität und -beweglichkeit in der Zellmembran (Russell 1984).

4.3.2 Bewertung der Fettsäuremuster in der Kälteanpassung

Die Grundstruktur jeder Zellmembran ist die Lipiddoppelschicht. Diese Membrandoppelschicht muss die richtige Fluidität aufweisen, um die Permeabilität und somit die Beweglichkeit der Membran zu gewährleisten. Der funktionelle Zustand ist immer die flüssig-kristalline Phase, jedoch kann es beim Absenken der Temperatur zu einem Übergang in die Gelphase kommen, wodurch essentielle Membraneigenschaften verloren gehen können. Die Temperatur, bei der dieser Phasenübergang stattfindet, ist abhängig von der Lipidzusammensetzung der Membran, aber zum größten Teil von den Fettsäureketten, die in der Lipiddoppelschicht verankert sind. Daher ist eine der wichtigsten Aufgaben von psychrophilen und psychrotoleranten Bakterien, diese Fettsäurezusammensetzung an die Umgebungstemperatur anzupassen. (Feller und Gerday 2003)

Anhand der Fettsäureanalyse nach Sasser (1990) ist dieser aus der Literatur bekannte Kälteanpassungsmechanismus bei verschiedenen Isolaten nachgewiesen worden. Zu den häufigsten Modifizierungen im Fettsäuremuster zählen die Erhöhung des Anteils von ungesättigten Fettsäuren, der Ersatz von langkettigen durch kurzkettige Fettsäuren, die Substitution von geradkettigen durch methyl-verzweigte Fettsäuren, die Substitution von *iso*-verzweigten durch *anteiso*-verzweigte Fettsäuren und die Isomerisierung von *trans* in *cis*-Doppelbindungen (Scherer und Neuhaus 2006). Alle diese Modifizierungen bzw. Veränderungen, mit der Ausnahme von der Isomerisierung von *trans* in *cis*-Doppelbindungen und die Substitution von geradkettigen durch methyl-verzweigte Fettsäuren, wurden in dieser Arbeit nachgewiesen.

Viele Isolate erhöhten bei Kälteeinfluss ihren Anteil an ungesättigten Fettsäuren. Dieser Effekt wurde vermehrt von gramnegativen Bakterienisolaten angewendet, wie Isolat J2, J11, J21, J22, J23, J52, J55, J57, J61, J63, J67, J84, J88, J86, J90 und J91. Diese Isolate zählten alle zu der Familie der *Pseudomonadaceae*, *Moraxellaceae* oder *Enterobacteriaceae*. Dies kann man jedoch auch darauf zurückzuführen, dass ungesättigte Fettsäuren die Hauptfettsäuren dieser Bakterienfamilien darstellen (Zelles 1999).

Die Substitution von *iso*-verzweigten Fettsäuren durch *anteiso*-verzweigte Fettsäuren wurde vermehrt durch Bakterienisolate der Familien *Bacillaceae*, *Listeriaceae* und *Staphylococcaceae* aus der Ordnung Bacillales gezeigt. Eine Erhöhung des Gehaltes an der verzweigten, kurzkettigen Fettsäuren C13:0 *iso* wurde bei Isolaten der Spezies *Bacillus cereus* nachgewiesen. Der Anteil an langkettigeren Fettsäuren nahm dabei ab.

Die Veränderungen im Fettsäuremuster führen zu einer Herabsetzung des Schmelzpunktes (Tab.1), wodurch die Membranfluidität auch bei niedrigen Temperaturen aufrechterhalten werden kann (Russell 1984). Laut Tabelle 1 müsste die Membran jedoch durch den Ersatz mit ungesättigten Fettsäuren wie beispielsweise C16:1 *cis* 9 oder C18:1 *cis* 9 stärker fluid gehalten werden als durch den Ersatz von *anteiso*-verzweigten Fettsäuren. Damit kann man auch erklären werden, dass das Ausmaß der Veränderung je nachdem welche Fettsäure eingebaut wird, stärker oder schwächer ausfällt.

Auch die Übersicht aus Tabelle 9 verdeutlicht, dass die Erhöhung der ungesättigten Fettsäuren zu Lasten der gesättigten Fettsäuren eine bevorzugte Strategie zur Kälteadaptation darstellt. Somit ist ableitbar, dass dieser Mechanismus gegenüber anderen eine effektivere Methode darstellen könnte, um sich an kältere Umgebungstemperaturen anzupassen. Die Einführung von Doppelbindungen wird daher bevorzugt angewendet.

Doppelbindungen können mit zwei verschiedenen Mechanismen in die Fettsäuren eingebaut werden (Russell 1984). Der Einbau und die dadurch entstehende Veränderungen im Fettsäuremuster werden gattungsspezifisch entweder durch die Sauerstoff-unabhängige Synthese ungesättigter Fettsäuren erreicht oder durch die sauerstoffabhängige Desaturierung von gesättigten Fettsäuren. Der sauerstoffunabhängige Mechanismus wurde nicht nur in anaeroben Bakterien gefunden (*Clostridium*, *Lactobacillus*), sondern auch im aeroben Bakterien, wie *Escherichia* oder *Pseudomonas*. Der sauerstoffabhängige Mechanismus wurde bei Spezies von *Bacillus*, *Mycobacterium* und *Micrococcus* entdeckt. (Erwin und Bloch 1964; Härtig et al. 1999; Magnuson et al. 1993)

Der Einbau über den anaeroben Weg geschieht während des Kettenverlängerungsprozess während der *de-novo* Fettsäurebiosynthese. Hierbei wird die Doppelbindung in der Regel bei Position ω 7 eingeführt (Magnuson et al.1993). Der Einbau der Doppelbindung über den sogenannten aeroben Weg der Fettsäurebiosynthese kann mittels Desaturase eingefügt werden. Dieser Mechanismus ist dadurch charakterisiert, dass die Doppelbindung bei Position C9 der entsprechenden Fettsäure spezifisch eingeführt wird (Fulco 1974). Da C18:1 *cis* 9 die Hauptfettsäure bei *Acinetobacter* darstellt, ist dies beispielsweise ein Indikator für die Gegenwart dieses Desaturase-Systems und daher auch für den aeroben Stoffwechselweg der Fettsäurebiosynthese in der Gattung *Acinetobacter*. (Härtig et al.

1999) Bei der Gattung *Pseudomonas* (Wada et al. 1989) und *Vibrio* (Morita et al. 1993) scheinen beide Biosynthesewege zu existieren.

Allgemein lässt sich aus den Ergebnissen erkennen, dass drei auf Fettsäureebene bekannte Adaptationsvorgänge an niedrige Umgebungstemperaturen vorliegen. Es gibt jedoch auch Isolate, die keinen eindeutigen Unterschied bezüglich dieser Anpassungsstrategien zeigen. Dies gibt Hinweise darauf, dass diese kälteangepassten Stämme andere Anpassungsmechanismen besitzen müssen. Bei diesen Stämmen ist es sehr interessant, die zuvor aufgestellten Hypothesen der fettsäureunabhängigen Kälteanpassung auf andere lipophile Komponenten der Zellmembran zu untersuchen. Somit könnten andere und unbekanntere Strategien aufgeklärt werden. Diese Hypothesen werden in den folgenden Abschnitten untersucht und diskutiert.

4.4 Chinone

4.4.1 Taxonomische Bedeutung der Chinone

Die chemisch-analytische Erfassung der Membranzusammensetzung (Fettsäuremuster, polare Lipide, Mycolsäuren, Chinone) dient unter anderem der Gattungs- und Speziesbestimmung von Bakterien (Kämpfer 1996). Chinone sind in allen Arten von aeroben und photosynthetischen Mikroorganismen vorhanden und zeigen deutliche Strukturvariationen in Abhängigkeit von der mikrobiellen Taxonomie. Daher werden Chinone nicht nur als Marker in der chemotaxonomischen mikrobiellen Systematik, sondern auch als Maßstab von mikrobiellen Populationen in Bezug auf Quantität, Qualität und Aktivität verwendet. Insbesondere die Analyse von Chinonprofilen ist nützlich für die Überwachung von mikrobiellen Populationsverschiebungen z.B. in einem Ökosystem, soweit die Verschiebungen nicht durch konventionelle Kulturverfahren und molekulare Techniken detektiert werden können. (Hiraishi 1999)

Chinone stellen Coenzyme dar und werden für den Elektronentransfer in der mikrobiellen Zelle verwendet. Ein bakterielles Phylum hat in der Regel eine dominante Art von respiratorischen Chinonen. So stellen Ubichinone gute Marker für Alpha-, Beta- und Gammaproteobacteria dar. (Kunihiro et al. 2014)

Das fakultativ anaerobe, gram-positive Isolat *Bacillus cereus* J1 bildete die beiden Menachinone MK-6 und MK-7, wobei MK-7 den Hauptanteil der Chinonkonzentration in den Zellen ausmachte. Dies entspricht dem Chinonmuster des nächstähnlichen Typstamms IAM 1074^T (Watanuki und Aida 1972).

Die Isolate *Acinetobacter lowffii* J2 und J84 bildeten als Hauptubichinon Q-9 und zu geringen Anteilen Q-8 und Q-10. Laut Malhotra et al. (2012) bildet die Gattung *Acinetobacter* das Hauptubichinon Q-9.

Bei Isolat *Solibacillus silvestris* J7 wurden die Menachinone MK-6 und MK-7 nachgewiesen. In der Umbenennung von Krishnamurthi et al. (2009) des Bakteriums *Bacillus silvestris* (Rheims et al. 1999) in *Solibacillus silvestris* wurden ebenfalls MK-7 als Hauptchinon nachgewiesen.

In der Zellmembran von Isolat *Paenibacillus glucanolyticus* J12 wurde als einziges Menachinon MK-7 detektiert. Dieses Ergebnis deckt sich mit der Erstbeschreibung von Shida et al. (1997).

Mehrere Menachinonarten wurden bei Isolat *Micrococcus luteus* J16 detektiert. Als Hauptmenachinon wurde bei 30°C das hydrierte Menachinon MK-8 H₂ analysiert. Zusätzlich wurden auch die Menachinone MK-7, MK-8 und die hydrierten Isoprene MK-7 H₂ und MK-9 H₂ nachgewiesen. Laut Wieser et al. (2002) werden vorwiegend die Menachinone MK-8 H₂ und MK-8 von der Spezies *Micrococcus luteus* gebildet. Die phylogenetisch-verwandte Spezies *Micrococcus yunnanensis* und *Micrococcus flavus* bilden MK-7 H₂ und MK-8 H₂ (Rieser et al. 2013). Zusätzlich wurden aber auch noch andere hydrierte Menachinone in der Zellmembran detektiert. Auf diesen Aspekt wird jedoch in der angegebenen Literatur nicht eingegangen. .

Bei *Kocuria palustris* J17 wurden wie bei Isolat *Micrococcus luteus* J16 wieder mehrere Menachinone, teils auch hydrierte Menachinone analysiert. Dieses Ergebnis stimmt mit dem Ergebnis von Kovacs et al. (1999) überein.

Im Isolat *Rhodococcus qingshengii* J20 wurde genauso wie bei der Erstbeschreibung von Xu et al. (2007) als dominierendes Chinon das hydrierte Menachinon MK-8 H₂ nachgewiesen.

Die Menachinone MK-8 und MK-9 wurden im aerotoleranten Isolat *Lactococcus lactis* J34 analysiert. Andere Isolate dieser Spezies wiesen zusätzlich zu kleinen Anteilen die Chinone MK-7 oder MK-10 auf (Morishita et al. 1999). Auch die taxonomisch benachbarte Gattung *Streptococcus* weist als Hauptchinon MK-9, gefolgt von MK-8 und zu kleinen Anteilen MK-7 und MK 10 auf. (Collins et al. 1983)

Wie auch in der Literatur für die Gattung *Stenotrophomonas* beschrieben, bildet Isolat *Stenotrophomonas maltophilia* J21, als aerobes und gramnegatives Bakterium als Hauptchinon das Ubichinon Q-8 (Palleroni und Bradbury 1993).

Bei Isolat *Pedobacter nutrimenti* J22 wird als einziges Menachinon MK-7 bestimmt. Diese Aussage deckt sich mit der Speziesbeschreibung des nächstähnlichen Typstammes *Pedobacter panaciterrae* (Yoon et al. 2007) und kann auf die komplette Gattung *Pedobacter* bezogen werden (Steyn et al. 1998).

In der Zellmembran von den Isolaten *Microbacterium oxydans* J75 und J78 wurden neben zwei unbekanntem Chinonen vorwiegend die Menachinone MK-11 und MK-12 identifiziert. Die Bakteriengattung *Microbacterium* bildet als Hauptchinone MK-11 und MK-12. (Takeuchi und Hatano 1998). Auch Yu et al. (2013) detektierte unbekanntem Chinone zu geringen Anteilen. Auf die Identifikation wurde jedoch in dieser Arbeit nicht eingegangen. Interessant ist jedoch, dass es sich bei dem von Yu et al (2013) untersuchten Bakterium um ein psychrotolerantes *Microbacterium* handelte.

Wie bei den meisten hier beschriebenen gram-negativen und aeroben Bakterien bilden *Achromobacter marplatensis* J23 (Yabuuchi und Yano 1981) und *Pantoea agglomerans* J89 (Kageyama et al. 1992) als Hauptchinon Ubichinon Q-8.

In Isolat *Brochothrix thermosphacta* J86 wird das Menachinon MK-7 als Hauptmenachinon detektiert (Collins et al. 1979).

Das für die Gattung *Pseudomonas* typische Ubichinon Q-9 (Lin et al. 2013) wurde auch als Hauptchinon in Isolat *Pseudomonas baetica* J91 nachgewiesen. Zusätzlich wurden zu kleinen Anteilen Q-8 und Q-10 detektiert. Das Ubichinon Q-8 wurde auch zu 4% von (Ramos et al. 2013) in der Neuschreibung von der phylogenetisch-benachbarten Spezies *Pseudomonas punonensis* detektiert.

4.4.2 Chinone in der Kälteanpassung

Arbeiten über das Thema Temperaturabhängigkeit bei Chinonprofilen und Chinongehalten in Bakterien sind nicht vorhanden. 1975 wurde von Ashcroft und Haddock jedoch eine veränderte Chinonsynthese in Abhängigkeit von der Sauerstoffverfügbarkeit ermittelt. So wurde bei der Spezies *Escherichia coli* mehr Ubichinon Q-8 unter aeroben Wachstum und mehr Menachinon MK-8 unter anaerobem Wachstum detektiert. Dieser Effekt kann jedoch auf die unterschiedlichen Redoxpotentiale zurückgeführt werden.

Durch Absenken der Umgebungstemperatur wurden in der vorliegenden Arbeit bei bestimmten Bakterienisolaten Veränderungen im Chinongehalt und Chinonmuster der Bakterienzellen festgestellt. Bei einigen Isolaten stieg die Chinonkonzentration an oder es wurden zusätzliche Chinone gebildet. Dadurch wird die Hypothese bestärkt, dass Chinone eine Rolle bei der Kälteanpassung spielen können.

Auch Hiraishi et al. (1999) detektierten bei einer Temperaturänderung eine Veränderung im Chinongehalt von Bakterien. Jedoch bezog sich dieses Ergebnis auf Bakterien, die aus heißen Quellen isoliert wurden und daher starker Hitze ausgesetzt waren. Die interessante Beobachtung war, dass die Chinonprofile der untersuchten Bakteriengemeinschaften unterschiedlich in Abhängigkeit von der Temperatur waren und dass diese auftretenden Unterschiede unabhängig von der untersuchten geographischen Lage waren. Es wurden vorwiegend folgende Strukturtypen von Chinonen in Abhängigkeit der jeweiligen Umgebungstemperatur erkannt. Bei 68°C war das Hauptchinon Methionachinon MTK-7 vertreten, bei 61 bis 65°C wurde hauptsächlich Menachinon MK-10 detektiert, bei 45 bis 56°C Quellentemperatur das Plastochinon PQ-9 und das Vitamin K₁ und bei unter 40°C Umgebungstemperatur das Ubichinon Q-8.

Bei vielen hier untersuchten Bakterienisolaten führte das Wachstum in kalter Umgebung zu einem reduzierten Gehalt an bakterieneigenen Chinonen. Zu erklären ist dies mit einer geringeren Biosyntheserate bei niedrigen Temperaturen. In Bakterien sind an der Biosynthese von Ubi- und Menachinonen verschiedene Enzyme beteiligt (Bentley und Meganathan 1982; Meganathan 2001). Da normalerweise die Aktivität von Enzymen temperaturabhängig ist und innerhalb bestimmter Grenzen mit der Temperatur ansteigt (Feller et al. 1994), liegt bei tiefen Temperaturen folglich eine niedrigere Enzymaktivität vor. Der verringerte Chinongehalt kann daher auf eine Verminderung der Biosyntheserate zurückgeführt werden. Zusätzlich werden dadurch

vermutlich auch weniger Chinone in der Atmungskette benötigt, da bei weniger Substratumsatz auch weniger Elektronen eingespeist werden müssen.

Im Gegensatz zu dieser allgemeinen Aussage wurde in Bezug auf den Gesamtchinongehalt im Zellmaterial der Isolate *Paenibacillus glucanolyticus* J12, *Pedobacter nutrimenti* J22 und *Pantoea agglomerans* J89 bei 10°C ein erhöhter Chinongehalt gemessen. Zusätzlich dazu wurde in den Isolaten *Kocuria palustris* J40, *Microbacterium oxydans* J75 und J78 ein neues Chinon unter Kälteeinfluss gebildet. Es kam demzufolge zu einer Veränderung im Chinonprofil und Chinongehalt. Dadurch kann die aufgestellte Hypothese unterstützt werden, dass diese Bakterienisolate u.a. durch diese erhöhte bzw. geänderte Chinonkonzentrationen in der Lage waren, in dieser kalten Umgebung sich zu vermehren. Diese Hypothese wird durch die Arbeit von Hiraishi et al. (1999) unterstützt, bei der es auch zu einer Änderung im Chinonprofil bei einem Temperaturunterschied kommt.

Da die Sauerstofflöslichkeit bei niedrigen Temperaturen besser ist, könnten aerobe Bakterien aber auch eine verlängerte bzw. verstärkt ablaufende Atmungskette und anschließende oxidative Phosphorylierung betreiben. Durch einen größeren Chinonvorrat in der Zellmembran wären die Bakterien in der Lage, schneller Energie in Form von ATP zu synthetisieren und für biosynthetische Reaktionen zu nutzen (Madigan et al. 2013).

In der Einleitung wurden die grundsätzlichen Mechanismen der Erhaltung der mikrobiellen Membranfluidität, z.B. durch Modifikation des Fettsäuremusters bzw. Erhöhung des Cholesteringehaltes bei Eukaryonten als Reaktion auf niedrige Umgebungstemperaturen geschildert. Da auch Chinone in das Membransystem integriert sind, wird die Vermutung aufgestellt, dass für Chinone ähnliche Annahmen bezüglich der Anpassung an Kälte gelten und somit die Unordnung der Membran beibehalten wird. Damit könnte die Aufrechterhaltung der Membranfluidität durch vermehrten Einbau von Chinonen in die Zellmembran erklärt werden. Die Ergebnisse von Asai und Watanabe (1999), in denen ein Anstieg von Chinonen eine fluidere Modellmembran ergibt, würden diese Theorie bekräftigen. Dabei wurden Chinone in eine Modellmembran eingebaut, dadurch die Temperatur der Phasenumwandlung gesenkt und folglich die Membranfluidität erhöht. Damit konnte ein fluidisierender Effekt von Chinonen an der Modellmembran beobachtet werden.

Um diese Hypothese zusätzlich zu überprüfen, wurde in der Abschlussarbeit von Fritsch (2012) Bakterienzellen Vitamin K₁ beim Wachstum zugesetzt, diese dann detektiert und in die Bakterienzelle aufgenommene Vitamin K₁-Menge berechnet. Die

Hypothese dieser Arbeit lag in der Annahme, dass Chinone als eine Art Schutzstoff in die Membran aufgenommen werden und somit die Stresstoleranz von Bakterien bei niedrigen Temperaturen erhöhen. Ein Zusammenhang zwischen der Synthese bzw. Aufnahme von kompatiblen Soluten und der Kälteadaption konnte in verschiedenen Studien bereits nachgewiesen werden. In Untersuchungen von Ko et al. (1994) mit *Listeria monocytogenes* wurde beispielsweise ein erhöhter Gehalt an Glycinbetain bei Wachstum in kalter Umgebung (4°C) entdeckt. Anhand weiterer Versuche konnte bestätigt werden, dass die Anreicherung des osmotisch aktiven Soluts dem Bakterium auch die Kältetoleranz verleiht. Ebenfalls wurde durch kompatible Solute eine induzierte Kältetoleranz in überwinternden Insekten bewiesen (Storey und Storey 1986).

Der genaue Mechanismus, wie Glycinbetain als Gefrierschutzmittel wirkt, ist unbekannt. Allerdings ist zu berücksichtigen, dass Betain ein Stabilisierungsmittel darstellt und daher eine nicht gewünschte Ordnung der Lipiddoppelschicht verhindern kann. Außerdem kann Betain die Löslichkeit von Zellproteinen oder die physikalischen Eigenschaften der Zellmembran positiv verändern (Rudolph et al. 1986). Osmotischer Stress scheint das Phasenverhalten der Zellmembran zu verändern (Sanderson et al. 1991) und Glycinbetain kann sowohl osmotischen Stress als auch Kältestress durch einen ähnlichen Mechanismus entgegenwirken.

Fast alle untersuchten Bakterienisolate nahmen Vitamin K₁ aus einer mit Vitamin K₁ versetzten Flüssigbouillon während des Wachstums auf und bauten es zu unterschiedlichen Anteilen vermutlich in ihre Plasmamembran ein, da es im analysierten Zellpellet nachgewiesen wurde. Dabei wurden jedoch größere Mengen in nmol/g Biomasse detektiert, wenn die Bakterienisolate bei 30°C inkubiert wurden. Allerdings zeigte sich eine Ausnahme: Bei Isolat *Lactococcus lactis* J34 war der Vitamin K₁-Gehalt in den Zellen nach 10°C-Anzucht um etwa 60% höher als nach Anzucht bei 30°C. Die Ergebnisse von Fritsch (2012) deuten auf eine erhöhte Chinonproduktion und eine erhöhte Chinonaufnahme bei steigender Temperatur hin, obwohl ein untersuchtes Isolat ein umgekehrtes Verhalten zeigt.

Dieses Isolat J34 aus der Masterarbeit von Fritsch (2012) und die untersuchten Isolate J12, J22, J75 und J78 aus dieser Arbeit, die eine erhöhte Chinonkonzentration bzw. eine Veränderung im Chinonmuster bei Kälteeinfluss zeigen, geben Anlass dazu, einen weiteren Kälteanpassungsmechanismus mit lipophilen Substanzen der Zellmembran zu untersuchen. Wie es scheint, können Chinone bei Kälteeinfluss zwar nicht allgemein aber teilweise eine Rolle spielen. Um dieses Ergebnis abzusichern, wäre es sinnvoll,

die temperaturabhängigen Chinonversuche auf eine komplette Gattung zu beziehen und mit Referenzstämmen zu vergleichen.

4.5 Carotinoide

4.5.1 Carotinoide in Bakterien

22 der in Tabelle 4 aufgelisteten Isolate zeigten eine typisch durch Carotinoide hervorgerufene Pigmentierung der Kolonie.

Carotinoide spielen innerhalb der Bakterienzellmembran eine wichtige Rolle. Sie dienen zum Beispiel als Schutz gegen durch Singulett-Sauerstoff verursachte Schäden. Bakterien und Pilze bedienen sich des Schutzes von Carotinoiden, wenn sie unter Licht und Sauerstoffanwesenheit wachsen. So können Bakterien diese membrangebundenen Carotinoide als Antioxidans gegen oxidativen Stress nutzen. Schon 1957 konnte Swart-Füchtbauer beobachten, dass der Prozentsatz der pigmentierten Bakterien in der Luft etwa dreimal so hoch war wie in der Erde. Daraus wurde geschlossen, dass pigmentierte Bakterien gegenüber Sonnenstrahlen widerstandsfähiger sind als farblose Bakterien. Carotinoide sind außerdem beteiligt am Lichtsammelkomplex, eine Ansammlung von Membranproteinen in den photosynthetischen Membranen von Mikroorganismen, die Photosynthese betreiben, wie beispielsweise Purpurbakterien (Guedes et al. 2011). Damit besitzen mikrobielle Carotinoide biochemisch wie auch pflanzliche Carotinoide als sekundärer Pflanzenstoff zwei charakteristische Eigenschaften: 1. Radikalfänger (Antioxidans) und 2. bei der UV-VIS-Absorption (Lichtsammelpigmente).

Eine vergleichsweise wenig geprüfte Hypothese zur Funktionalität bakterieller Carotinoide ist die Funktion eines Membranstabilisierers, welche in Eukaryoten von Cholesterin übernommen wird (Mitchell et al. 1986; Ourisson und Nakatani 1994). Durch ihre Lipophilie und Molekülstruktur können sich Carotinoide in biologische Membranen einlagern und in der Folge die Fluidität verändern (Pintea et al. 2005). Bei thermophilen Bakterien wird beispielsweise eine funktionelle Membranverstärkung durch Carotinoide als Überlebensstrategie bei extrem hohen Temperaturen postuliert (Havaux 1998; Subczynski et al. 1992).

Diese Aussage der Hitzeresistenz könnte jedoch auch auf andere Umwelteinflüsse wie osmotischer Stress oder Kälteeinfluss übertragen werden. So bildet beispielsweise das pathogene Bakterium *Staphylococcus aureus* ein goldschimmerndes Pigment aus, welches laut Liu (2005) dazu benutzt wird, sich gegen äußere Umwelteinflüsse zu

schützen. Bei dem Pigment könnte es sich das Staphylokokken-typische Carotinoid Staphyloxanthin (Marshall und Wilmoth 1981) handeln. Auf diesen Aspekt wird jedoch bei Liu (2005) nicht eingegangen.

4.5.2 Carotinoide in der Kälteanpassung

Jacobsen (2013) zeigte bei einer 10°C-Inkubation vier- bis sechsfache Zunahmen der Carotinoidkonzentration bei den Isolaten *Kocuria rhizophila* J48, *Micrococcus luteus* J50 und *Staphylococcus xylosus* J70. Die stärkste Zunahme wurde bei *S. xylosus* J70 ermittelt, die Carotinoidkonzentration stieg von 40 µg/g bei 30°C auf 255 µg/g in der kälteren Umgebung an. Die ermittelten Carotinoidmengen bezogen sich auf das Lyophilisat und können nicht mit Literaturangaben verglichen werden, da entsprechende Daten für die analysierten Bakterienstämme fehlen. Jagannadham et al. (2000) und Chattopadhyay et al. (1997) bezogen sich lediglich auf die prozentualen Carotinoidanteile in der Biomasse in Abhängigkeit von der Wachstumstemperatur und nicht auf absolute Carotinidgehalte. So stieg beispielsweise der Gehalt in der Biomasse von Zeaxanthin bei *Sphingobacterium antarcticus* von ca. 50 % bei 25°C auf ca. 80 % bei 5°C an.

Bei dem psychrotrophen Bakterium *Arthrobacter agilis* konnten Carotinoidkonzentrationen zwischen 250 µg/g bei 30°C Inkubation bis zu über 1000 µg/g bei 5°C Inkubation bezogen auf das Trockengewicht detektiert werden (Fong et al. 2001). Die Mikroalge *Chlorella protothecoides* zeigte unter Stressbedingungen, wie hoher Belichtung, Salzstress oder Nährstoffmangel höhere Carotinidgehalte pro Gramm Lyophilisat (Campenni' et al. 2013). Ebenfalls zeigte der Schimmelpilz *Mucor strictus* bei einer Inkubationstemperatur von 0°C eine erhöhte β-Carotin Produktion in seiner Biomasse im Gegensatz zu 25°C Inkubationstemperatur (Dexter und Cooke 1984).

Die temperaturabhängigen Veränderungen der Carotinoidmengen deuten auf einen Zusammenhang zwischen der Carotinoidsynthese und der Kälteanpassung hin. Die Erhöhung der Carotinoidkonzentration unter kälteren Wachstumsbedingungen bei den Isolaten *K. rhizophila* J48, *M. luteus* J50 und *S. xylosus* J70 werden durch die Ergebnisse von Chattopadhyay et al. (1997) bei *Micrococcus roseus* und Jagannadham et al. (2000) bei *Sphingobacterium anarticus* bestätigt.

Die mangelhafte Auftrennung der Peaks über die HPLC-Messung nach der Methode von Rähler (2007) und die fehlende Bestimmung der Absorptionsmaxima verhinderte

leider die zusätzliche Ermittlung der prozentualen Carotinoidprofile. Die Angabe von Chattopadhyay et al. (1997) und Jagannadham et al. (2000), dass bei niedrigeren Wachstumstemperaturen ein höherer Anteil an polaren Carotinoiden gebildet wird, kann ohne die prozentualen und die Identifizierung der Carotinoide nicht bestätigt werden. Bei der chromatographischen Analyse des Isolates *M. maritimum* J74 wurden die isolierten Carotinoide nach 10°C-Inkubation bei kürzeren Retentionszeiten detektiert als nach 30°C-Inkubation. Da für die Auftrennung eine C18-Säule und ein polares Lösungsmittel verwendet wurden, kann dies ein Indiz auf eine vermehrte Synthese von polaren Carotinoiden sein. Doch auch die Molekülgröße hat einen Einfluss auf die Retentionszeit, z.B. durchlaufen kleinere Verbindungen die stationäre Phase schneller.

Neben den beschriebenen Wildisolaten wurden zusätzlich in der Abschlussarbeit von Jacobsen (2013) die Referenzstämme *K. rhizophila* DSM 11926^T, *M. luteus* DSM 20030^T und *S. xylosus* DSM 20266^T auf den Carotinoidgehalt analysiert. Bereits in der Literatur wird auf die Pigmentierung der Typstämme hingewiesen. Nach Kovacs et al. (1999) wächst *Kocuria rhizophila* DSM 11926^T bei 28°C in gelb gefärbten Kolonien und auch *Micrococcus luteus* DSM 20030^T bildet Kolonien mit cremig gelben Pigmenten bei 37°C (Wieser et al. 2002). Einige Stämme von *Staphylococcus xylosus* zeigen nur bei Wachstumstemperaturen unter 20°C eine orange-gelbe Pigmentierung und sind bei 30-37°C farblos (Schleifer und Kloos 1975). Dieser Aspekt unterstützt die zweite Hypothese dieser Arbeit, dass Carotinoide einen Einfluss auf die Kälteanpassung haben. Nach der Anzucht bei 10°C und 30°C konnten bei diesen drei Typstämmen Carotinoide isoliert werden. Die Typstämme von *K. rhizophila* DSM 11926^T und *S. xylosus* DSM 20266^T wiesen entsprechend der Wildisolate bei 10°C einen höheren Carotinoidgehalt auf. Der Typstamm von *M. luteus* zeigte jedoch keine Veränderung im Gesamtcarotinoidgehalt (Abb. 28).

Dieser zuvor beschriebene Effekt der Erhöhung der Carotinoidkonzentration bei Kälteeinfluss wurde auch bereits in einer angewandten Studie der Lebensmittelindustrie postuliert. Dort wurde beschrieben, dass es Bakterien gibt, die Pigmente ausbilden und zu einem Verderb bei Lebensmitteln führen können. So konnte Kröckel (2007) beobachten, dass es in einer vorgepackten, kühl gelagerten Weißwurst zu einer Gelbfärbung kam. Es stellte sich heraus, dass es sich um das gelbpigmentierte Milchsäurebakterium *Leuconostoc gelidum* handelte, welches diese Gelbfärbung verursachte. Kröckel (2007) stellte in weiteren Versuchen fest, dass diese Gelbfärbung jedoch nur bei kalten Temperaturen vorkam, wie beispielsweise der

gekühlten Lagertemperatur. Die Identifizierung des Carotinoids erfolgte mittels UV-VIS Spektroskopie und Größenausschlusschromatographie. Während ein gelbes Pigment von *Leuconostoc citreum* spektrophotometrisch eindeutig als 4,4'-Diaponeurosporin identifiziert werden konnte, welches temperaturunabhängig produziert wird, handelte es sich bei dem nur in der Kälte produzierten gelben Pigment von *Leuconostoc gelidum* um eine Vorstufe dieses Triterpenoids. *Leuconostoc gelidum* ist zwar für den Menschen nicht pathogen, jedoch wird es als Lebensmittelverderber angesehen, da durch die Verfärbung des Lebensmittelproduktes es zu einer Ablehnung des Konsumenten gegenüber dem Produkt kommt.

Wie die Ergebnisse der Carotinoidbestimmung zeigen, liegt die Vermutung nahe, dass es durch Kälteeinfluss zu einer erhöhten Carotinoidproduktion in der Zellmembran kommen kann. Dieser Effekt wird jedoch, wie bei Kröckel (2007) bevorzugt bei Wildisolaten beobachtet. Somit kann davon ausgegangen werden, dass dieser erhöhte Gehalt an Carotinoiden einen Schutzmechanismus gegenüber Kältestress darstellen kann.

Der verstärkte Einbau von Carotinoiden in die Zellmembran bei Kälteeinfluss kann im Gegensatz zu Fettsäuren nicht mit der physikalischen Eigenschaft des Schmelzpunktes erklärt werden. Die Schmelzpunkte verschiedener Carotinoide liegen bei über 150°C (Rothblat et al. 1964; Zscheile und White 1940), somit kann der Mechanismus nicht mit einer Verschiebung des Schmelzpunktes begründet werden. Vielmehr kann hier die molekulare Struktur der Carotinoide eine Rolle spielen. Die genaue Funktion von unterschiedlichen Carotinoiden in Membranen ist immer noch unbekannt. Es gibt jedoch Hinweise, dass das bakterielle Carotinoid Bacterioruberin sich an Membranvesikel bindet und somit die Rigidität der Membran ansteigt (Strand et al. 1997). Die Daten von Dieser et al. (2010) tragen zum Verständnis der Funktionsweise von Carotinoiden bei. Carotinoid-pigmentierte heterotrophe Bakterien tolerieren niedrige Temperaturen und episodisches Einfrieren erfolgreicher als nicht-pigmentierte Bakterien. Diese Ergebnisse deuten stark darauf hin, dass Carotinoide bei der Modulation der Membranfluidität mitwirken müssen und zusätzlich auf die Membranstabilität einen Einfluss haben. Daher ist dies eine notwendige Anpassung an physikalischen Stress, der unter niedrigen oder Gefriertemperaturen entsteht. Laut Donato et al. (1997) kann die Anwesenheit von Carotinoiden, eine höhere Packungsdichte der Phospholipide in der Membran verursachen, womit diese stabilisiert wird.

Somit kann festgestellt werden, dass Carotinoide eine wichtige Rolle bei Kältestress von Bakterien auf Zellmembranebene spielen können. Sowohl für die Medizin als auch für die Industrie ist es daher von großer Bedeutung genauer herauszufinden, warum und zu welchem Zweck Carotinoide in Bakterien synthetisiert werden.

4.6 Zelldichte und Wachstumsverhalten

Um die Auswirkung von unterschiedlichen Temperaturen auf das jeweilige Wachstumsverhalten von Bakterien zu untersuchen, wurde von ausgewählten Isolaten der Wachstumsverlauf bei 10°C und 30°C bestimmt. An den beispielhaft in Abschnitt 3.7 beschriebenen Isolaten wurden temperaturabhängige Veränderungen bei den maximalen Zellerträgen ermittelt. Es wurde jeweils eine höhere Zellausbeute bei 10°C im Vergleich zu 30°C festgestellt. Dieses Verhalten wurde zuvor auch in den Abschlussarbeiten von Fritsch (2012), Jacobsen (2013) und Murr (2013) beobachtet.

Bereits Margesin (2009) und Muranushi (2009) konnten diesen Effekt ebenfalls bei ausgewählten Isolaten, die aus kalten Habitaten stammen, nachweisen.

Es fällt auf, dass dieser Effekt fast ausschließlich bei den Wildisolaten auftrat, nicht aber bei verwandten Typ- oder Referenzstämmen. Dieses Verhalten konnte in der Proteinbestimmung bestätigt werden.

Nach den Angaben aus der Literatur wachsen diese Isolate vorwiegend im mesophilen Bereich. Das Wachstumsoptimum von *Bacillus cereus* liegt bei 37°C (Warth 1978) und von *Paenibacillus glucanolyticus* liegt der Wachstumsbereich zwischen 17-37°C (Alexander und Priest 1989). *Pedobacter panaciterrae* hat ein Wachstumsoptimum bei 25°C (Yoon et al. 2007) und *Escherichia coli* bei 37°C bis 42°C (Buchanan und La Klawitter 1992). *Staphylococcus xylosus* wächst im Temperaturbereich zwischen 15°C und 45°C (Schleifer und Kloos 1975). *Listeria monocytogenes* hat ein Wachstumsoptimum zwischen 30°C und 37°C (Krämer 2007).

Bei mesophilen Bakterien liegt der maximale Wachstumsertrag meist in der Nähe des Temperaturoptimums und bleibt zusammen mit der Wachstumsrate über einen großen Temperaturbereich konstant. Manche psychrophile Bakterien (z.B. *Psychrobacter*) versuchen dagegen sinkende Wachstumsraten bei Temperaturen unterhalb des Wachstumsoptimums mit einer Erhöhung des Wachstumsertrages auszugleichen. (Bakermans und Nealson 2004)

Jedoch zeigte sich bei diesen Isolaten, die laut Speziesbeschreibung ein Wachstumsoptimum im mesophilen Bereich haben, eine deutlich höhere Zellausbeute

bei einer niedrigeren, im Kältebereich liegenden Temperatur. Da es sich bei allen Isolaten laut Speziesbeschreibung eigentlich um mesophile Bakterien handelte, sind diese Beobachtungen erstaunlich, da es eigentlich zu einer Reduzierung der Zellausbeute hätte kommen müssen. Die erhöhte Zellausbeute wurde in dieser Arbeit zusätzlich mit einer Proteinbestimmung bestätigt. Der potentielle Mechanismus dieses Effektes sollte durch weiterführende Arbeiten ausführlicher untersucht werden, da bislang wenige Literaturquellen zu diesem Thema existieren. Außerdem muss genauer abgegrenzt werden, zu welchen Bakterientypen in Bezug auf das Temperaturverhalten diese Wildisolate zählen. Außerdem sind sie nicht immer mit dem Verhalten der Referenzstämme gleichzusetzen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die Wachstumsausbeute ein sehr wichtiger, jedoch auch oft übersehener, Faktor in der Temperaturanpassung von Bakterien ist. Zu diesem Resultat kommen auch Knoblauch und Jørgensen (1999). Die Korrelation zwischen einer hohen Zellausbeute und Wachstum bei niedrigen Temperaturen kann ein Merkmal von kälteangepassten Bakterien sein und kann daher den psychrophilen Bakterien einen Vorteil beim mikrobiellen Wettbewerb bieten. Mikroorganismen, die über einen weiten Temperaturbereich leben, benötigen einen Ausgleich für langsame Reaktionsgeschwindigkeiten bei niedrigen Temperaturen, um wettbewerbsfähig zu bleiben zu können. So würde die langsamere Wachstumsrate und die dadurch langsameren biochemischen Prozesse kompensiert werden. Einige Psychrophile maximieren oder versuchen ihr Wachstum bei niedrigen Temperaturen zu erhalten, um niedrige Wachstumsraten auszugleichen. Damit wären sie konkurrenzfähig. Die Daten der vorliegenden Arbeit werden auch Harder & Veldkamp (1968), Harder und Veldkamp (1971) Isaksen & Jørgensen (1996) und Knoblauch & Jørgensen (1999) bestätigt, die u.a. Zellausbeute und spezifische Wachstumsrate von unterschiedlichen psychrophilen Bakterienstämmen untersucht haben. So zeigte sich beispielweise bei Knoblauch und Jørgensen (1999), dass der psychrophile Sulfat-reduzierende Bakterienstamm LSV514 zwar die höchste spezifische Wachstumsrate und die Sulfatreduktion im mesophilen Temperaturbereich aufwies, die höchste Zellausbeute jedoch zwischen 0 und 4°C gemessen wurde. Außerdem kann damit die längere Anpassungsphase erklärt werden. Der eigentlichen Vermehrung geht bei kühlen Inkubationstemperaturen ebenso wie bei wärmeren Inkubationstemperaturen zunächst immer diese Anpassungsphase voraus. Diese lag-Phase ist extrem temperaturabhängig, wie Mossel et al. (1995) bereits festgestellt hatten. Die Anpassungsphase von *L. monocytogenes* lag bei einem Temperaturbereich von 0 bis

1°C zwischen 3 und 33 Tagen, bereits eine geringfügige Erhöhung auf 3°C verkürzte sie auf 2 bis 8 Stunden.

Insgesamt kann festgestellt werden, dass durch die Kälteanpassung das Wachstum von Bakterien sich deutlich verändert. Es scheint, dass das Wachstum in der Kälte einen interessanten jedoch auch bislang wenig untersuchten Effekt zur Folge hat. Es zeigt sich ein teilweise stark erhöhter Zellertrag bei kälteangepassten Bakterien im Vergleich mit mesophilen Bakterien bei ihrer optimalen Temperatur. Dies könnte darauf hindeuten, dass kälteadaptierte Bakterien möglicherweise ihre Kohlenstoffquelle effizienter nutzen, um somit die mehr verlangte Biomasse aufzubauen. Außerdem muss der niedrige bzw. nicht auftretende Effekt des gesteigerten Zellertrages bei Referenzstämmen, die meist aus Stammsammlungen bezogen werden, geklärt werden.

4.7 Kälteresistenztest und Überlebenstest *Listeria monocytogenes*

Der Kälteresistenztest zeigt, dass ein *Listeria monocytogenes*-Wildstamm eine stärkere Kälteresistenz aufweist als der vergleichende Referenzstamm. So konnte der Wildstamm *Listeria monocytogenes* Iso 1/11 zum einen trotz Stress in Form von Gefrieren seine Zelldichte aufrechterhalten und zum anderen über einen sehr langen Zeitraum in dem Lebensmittel Milch bei niedriger Temperatur überleben und die Zelldichte halten. Diese Effekte konnten bei dem Referenzstamm DSM 20600^T nicht gezeigt werden. Die Zelldichte des Referenzstammes nahm sowohl im Kälteresistenztest als auch im Überlebenstest ab Tag 44 ab.

Diese Ergebnisse zeigen, dass man das Verhalten gegenüber einem Stressfaktor wie in diesem Fall niedrige Temperaturen nicht immer auf eine komplette Spezies beziehen kann, wie es bei der Spezies *Listeria monocytogenes* oft der Fall ist (Tasara und Stephan 2006). Unser Fall zeigt, dass nur das Wildisolat eine stärker ausgeprägte Kälteresistenz, nicht jedoch der Referenzstamm DSM 20600^T, aufweist.

In der Literatur ist der Bezug von der Spezies *Listeria monocytogenes* zu kalten Umgebungstemperaturen ausführlich beschrieben. Bezogen auf die Wachstumstemperatur ist der durchschnittliche minimale Wert bei 1,7°C anzusiedeln, wie entsprechende Untersuchungen von Junttila et al. (1988) zeigen. Laut Guillier et al. (2005) weist die Spezies *Listeria monocytogenes* eine innerhalb für Bakterien recht weiten Spannweite von 0°C bis 45°C auf.

Auch bezogen auf das Wachstumsverhalten von *L. monocytogenes* konnte Jiang et al. (2004) ein anderes Wachstumsverhalten bei unterschiedlichen Temperaturen zeigen. So waren in Erdboden eingebrachte *L. monocytogenes*-Stämme bei 21°C bis zu 3 Wochen lebensfähig und bei 5°C sogar bis zu 43 Tage. Aber auch bezogen auf den Lebensmittelbereich werden in der Literatur besonders häufig die Spezies *Listeria monocytogenes* in geräucherter und gekühlter Fischware beschrieben. Als Beispiel sei hier Hudson und Mott (1993) genannt, wo sich in geräucherten, abgepackten Lachs *L. monocytogenes* bei einer Lagertemperatur von 10°C innerhalb von 4 Tagen um ca. 3 Zehnerpotenzen vermehren konnte. Zusätzlich stellten Guyer und Jemmi (1991) bei mit *L. monocytogenes* kontaminiertem Lachs fest, was die anschließende Lagertemperatur bis zu 30 Tage bei 4°C und 10°C für eine wichtige Rolle spielen kann. Die Anfangskontamination von $6,5 \times 10^2$ Zellen/g wurde bei 4°C nach 30 Tagen circa ver Hundertfacht und zwar auf einen Wert von ca. 10^4 Zellen/g. Bei 10°C Lagertemperatur lag dieser Wert nach 10 Tagen sogar schon bei knapp 10^7 Zellen/g. Bradshaw et al. (1985) zeigte, dass bei einer Aufbewahrungstemperatur von Milch bei 8°C sich eine anfängliche Listerien-Population von ca. 10 Zellen innerhalb von 7 Tagen auf ca. 10^4 KbE/mL und nach 10 Tagen auf 10^6 KbE/mL anstieg.

Wie man erkennen kann, spielen die extrinsischen Faktoren eines Lebensmittels (Lagertemperatur, aber auch Gasatmosphäre) eine wichtige Rolle bezogen auf Wachstumsverhalten und Vermehrungsfähigkeit von *Listeria monocytogenes*. Wahrscheinlich mehr als die intrinsischen Faktoren (a_w -Wert, pH-Wert, Zusammensetzung) und die Struktur des Lebensmittels, da insbesondere der extrinsische Faktor Kühlung in aller Regel nicht ausreicht, einmal ins Produkt gelangte *L. monocytogenes*-Stämme im Wachstum einzuschränken oder gar zu reduzieren. Man erkennt, dass *L. monocytogenes* somit in der Lage ist, in kühlpflichtigen Lebensmitteln nicht nur zu überdauern, sondern auch zu wachsen. Die mögliche Gefährdung für den Menschen steigt mit längerer Lagerungsdauer grundsätzlich an, wenn das Lebensmittel erst einmal mit dem Erreger kontaminiert ist. Die Zellen benötigen zwar nach der Besiedlung eine temperaturabhängige Anpassungszeit, jedoch gehen die Zellen dann schnell in die exponentielle Vermehrung mit einer kurzen Generationszeit über. (Bülte 2008b)

Für eine Risikobewertung sind die Temperatur und die Temperaturführung daher von wesentlicher Bedeutung. Selbst bei geringer Belastung von Lebensmitteln mit *Listeria monocytogenes* mit einigen wenigen Zellen, kann bei haushaltsüblichen

Kühlschranktemperaturen der Grenzwert von 100 KbE/mg bzw. mL schnell erreicht und überschritten werden. (Bülte 2008a)

Wie in den zuvor erwähnten Beispielen beschrieben, wird in der Literatur von den untersuchten Isolaten oder Bakterienstämmen auf die komplette Spezies geschlossen. Gerade bei der Spezies *Listeria monocytogenes* ist dies der Fall, da sie ein gut untersuchter Vertreter für kälteadaptierte Lebensmittelpathogene ist. Die vorliegenden Versuche zeigen aber, dass es zu einem stammspezifisch starken Unterschied in der Vermehrungsfähigkeit und im Wachstumsverhalten bei niedrigen Temperaturen kommen kann. Insbesondere für die Qualitätssicherung der Lebensmittelindustrie ist diese Erkenntnis von Bedeutung. So ist es interessant, wie sich in den Rückstellproben bestimmte Bakterien während einer gewährleisteten kühlen Lagerung im Laufe des Mindesthaltbarkeitsdatums verhalten und dabei ihren Zellgehalt verändern bzw. sich im Gegensatz zu höheren Temperaturen erhöhen.

Zusätzlich ist es interessant und eigentlich unabdingbar zu testen, inwieweit sich das Wachstum von Wildstämmen und den verwendeten Referenzstämmen in einem Lebensmittel unterscheidet. Denn erst damit wird das Wachstumsverhalten von Bakterienstämmen, die durch Umwelteinflüsse von der (erwarteten) Standardisierung abweichen können, der Realität entsprechend abgebildet. Erfahrungen dieser Testreihen könnten die Qualitätssicherung in der Lebensmittelindustrie voranbringen und die Haltbarkeit der Produkte weiter optimieren.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Dissertation wurden verschiedene Kälteanpassungsmechanismen bakterieller Zellmembranen untersucht. Die übergeordnete Leitfrage war, ob und wie andere lipophile Komponenten der Zellmembran von Bakterien einen Einfluss auf die Kälteanpassung haben.

Dafür wurden kälteadaptierte Bakterienisolate aus Lebensmitteln und lebensmittelassoziierten Habitaten isoliert und bei den Wachstumstemperaturen 10°C und 30°C inkubiert. Untersucht wurden sie zuerst auf Unterschiede im Fettsäuremuster und dann auf Unterschiede im Chinonmuster bzw. Chinongehalt sowie dem Carotinoidgehalt. Zusätzlich wurde von ausgewählten Isolaten das jeweilige Wachstumsverhalten bei verschiedenen Temperaturen untersucht und mit dem Wachstumsverhalten bestimmter Referenzstämme verglichen. Darüber hinaus wurden mit einem Wildstamm der Spezies *Listeria monocytogenes* ein Kälteresistenztest in Bezug auf Gefriertemperaturen und ein Überlebenstest im Modelllebensmittel Milch durchgeführt. Die Ergebnisse wurden mit Ergebnissen eines Referenzstammes aus der Stammsammlung verglichen. Zudem konnte die Speziesneubeschreibung von *Pedobacter nutrimenti* veröffentlicht werden.

Die Ergebnisse der Fettsäureanalyse entsprachen weitestgehend den Erwartungen: So war bei Kälte bei vielen Bakterien eine deutliche Verschiebung des Fettsäuremusters hin zu verzweigten, kurzkettigen, ungesättigten bzw. hydroxylierten Fettsäuren erkennbar. Bei gram-positiven Vertretern zeigte sich diese Verschiebung nicht so deutlich wie bei gram-negativen Vertretern. Der nächste Schritt dieser Arbeit bestand deswegen darin, dieser Tendenz auf den Grund zu gehen und diese Isolate in Bezug auf Chinone und Carotinoide weiter zu untersuchen.

Die Ergebnisse der Chinonanalyse zeigten dann oft eine Abnahme des Chinongehaltes bei 10°C Inkubation, obwohl bei wenigen, ausgewählten Isolaten es entweder zu einem Anstieg im Chinongehalt bzw. zu einer Veränderung des Chinonmusters bei Kälteeinfluss kam.

Damit konnte gezeigt werden, dass unterschiedliche Chinongehalte bzw. Chinonmuster einen potentiellen fettsäureunabhängigen Kälteanpassungsmechanismus darstellen können.

Die Ergebnisse der Carotinoidanalyse ergaben, dass bestimmte Isolate bei 10°C eine größere Carotinoidmenge aufwiesen als bei 30°C. Der Vergleich mit den Fettsäuremustern unterstützte die Erkenntnis, dass es einen Zusammenhang zwischen

Carotinoiden und einem fettsäureunabhängigen Kälteanpassungsmechanismus der Bakterien gibt.

Eigentlich sollten in der vorliegenden Arbeit nur Fettsäuren, Chinone und Carotinoide von Bakterien und ihr Einfluss auf die Kälteanpassung analysiert werden. Aber auch das Wachstumsverhalten einiger der untersuchten Bakterien zeigte einen auffallenden Effekt durch Kälteeinfluss. Somit brachte diese Arbeit eine weitere, nicht erwartete Erkenntnis: Die Zellausbeute bei einer Inkubation von 10°C war bei einigen Isolaten stark erhöht im Gegensatz zu einer Inkubation bei 30°C. Auffällig zudem: Dieser Effekt trat nur bei Wildisolaten, nicht aber bei den Vergleichs- und Referenzstämmen auf.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass bei einigen Bakterienstämmen bei sinkender Umgebungstemperatur eine Zunahme bzw. Änderung der Chinonsynthese und Carotinoidsynthese stattfindet. Diese Ergebnisse unterstützen die in dieser Arbeit voranstehende Hypothese, nämlich dass Chinone und Carotinoide als lipophile Komponenten in der Zellmembran einen Einfluss auf die Membranstruktur bei Kälteeinfluss haben können und die Kälteanpassung der Bakterienzelle auch fettsäureunabhängig ablaufen kann. Somit wird die Fluidität der Zellmembran beeinflusst, um auch bei niedrigeren Temperaturen in der flüssig-kristallinen und damit funktionellen Phase zu bleiben.

In zukünftigen Arbeiten sollte der Einfluss dieser Substanzen auf die Membranfluidität genauer untersucht und der Grad der Fluidität gemessen werden.

Außerdem sollte der Effekt der höheren Zellausbeute bei niedrigeren Temperaturen auf ein Modelllebensmittel bezogen werden. Dieser Effekt und das Resultat, dass eine erhöhte Zellausbeute bei einer niedrigeren Temperatur nachgewiesen wurde, obwohl das Wachstumsoptimum dieser Isolate laut Literatur eher im mesophilen Bereich liegt, kann auch für die Lebensmittelindustrie wichtig sein.

Zusätzlich sollte darauf geachtet werden, das Wachstumsverhalten eines Bakteriums nicht immer auf eine komplette Spezies zu beziehen, sondern stammspezifisch zu untersuchen. Gerade in der Lebensmittelindustrie wäre dies wichtig, da oft Versuche zu Vermehrungsfähigkeit und Überdauerung in Lebensmitteln mit Referenzorganismen aus Stammsammlungen durchgeführt werden, diese sich jedoch stark im Wachstumsverhalten zu Wildisolaten unterscheiden können. Dieser Aspekt ist in der Literatur kaum beschrieben und muss für die Qualitätssicherung stärker untersucht werden.

6. Literaturverzeichnis

- Aguilar, P. S. & de Mendoza, D. (2006).** Control of fatty acid desaturation: a mechanism conserved from bacteria to humans. *Molecular Microbiology* **62**, 1507–1514.
- Alexander, B. & Priest, F.G. (1989).** *Bacillus gluconolyticus*, a new species that degrades a variety of β -glucans. *International Journal of Systematic Bacteriology* **39**, 112–115.
- Annous, B. (1997).** Critical role of anteiso-C15:0 fatty acid in the growth of *Listeria monocytogenes* at low temperatures. *Applied and Environmental Microbiology*, 3887–3894.
- Asai, Y. & Watanabe, S. (1999).** The interaction of ubiquinone-3 with phospholipid membranes. *FEBS Letters* **446**, 169–172.
- Ashcroft, J.R. & Haddock, B.A. (1975).** Synthesis of alternative membrane-bound redox carriers during aerobic growth of *Escherichia coli* in the presence of potassium cyanide. *Biochemical Journal* **148**, 349–352.
- Ashcroft, J.R. & Haddock, B.A. (1975).** Synthesis of alternative membrane-bound redox carriers during aerobic growth of *Escherichia coli* in the presence of potassium cyanide. *Biochemical Journal* **148**, 349–352.
- Bakermans, C. & Neilson, K.H. (2004).** Relationship of critical temperature to macromolecular synthesis and growth yield in *Psychrobacter cryopegella*. *Journal of Bacteriology* **186**, 2340–2345.
- Bast, E. (1999).** Mikrobiologische Methoden. Eine Einführung in grundlegende Arbeitstechniken. Heidelberg: Spektrum Akad. Verlag
- Beales, N. (2004).** Adaptation of microorganisms to cold temperatures, weak acid preservatives, low pH, and osmotic stress: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* **3**, 1–20.
- Belitz, H.D.; Grosch, W.; Schieberle, P. (2008).** Lehrbuch der Lebensmittelchemie. Mit 634 Tabellen. 6., vollst. überarb. Aufl., [Nachdr.]. Berlin: Springer
- Bentley, R. & Meganathan, R. (1982).** Biosynthesis of vitamin K (menaquinone) in bacteria. *Microbiological reviews* **46**, 241–280.

- Berg, J.M.; Tymoczko, J.L.; Stryer, L. (2003).** Biochemie. 5. Aufl. Heidelberg: Spektrum Akad. Verl (Spektrum-Lehrbuch).
- Bradshaw, J.G.; Peeler, J.T.; Corwin, J. J.; Hunt, J. M.; Tierney, J. T.; Larkin, E. P. & Twedt, R. M. (1985).** Thermal resistance of *Listeria monocytogenes* in milk. *Journal of food protection* **48**.
- Bringer, S.; Härtner, T.; Poralla, K. & Sahn, H. (1985).** Influence of ethanol on the hopanoid content and the fatty acid pattern in batch and continuous cultures of *Zymomonas mobilis*. *Archives of Microbiology* **140**, 312–316.
- Britton, G. (1995).** Structure and properties of carotenoids in relation to function. *The FASEB Journal*, 1551–1558.
- Britton, G. (2008).** Functions of Intact Carotenoids. In: George Britton, Synnøve Liaaen-Jensen und Hanspeter Pfander (Hg.): Carotenoids, Bd. 4. Basel: Birkhäuser Basel, 189–212.
- Buchanan, R.L. & Klawitter L.A. (1992).** The effect of incubation temperature, initial pH, and sodium chloride on the growth kinetics of *Escherichia coli* O157: H7. *Food Microbiology* **9**, 185–196.
- Buck, J.D. (1982).** Nonstaining (KOH) method for determination of gram reactions of marine bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **44**, 992–993.
- Bülte, Michael (2008a).** *Listeria monocytogenes* Band 1. [Jubiläumsausg.]. Hamburg: Behr (Pathogene Mikroorganismen, 1).
- Bülte, Michael (2008b).** *Listeria monocytogenes* Band 2. [Jubiläumsausg.]. Hamburg: Behr (Pathogene Mikroorganismen, 2).
- Busta, F. (1978).** Introduction to injury and repair of microbial cells. In: Advances in Applied Microbiology Volume 23, Bd. 23: Elsevier (Advances in Applied Microbiology), 195–201.
- Campenni', L.; Nobre, B. P.; Santos, C.A.; Oliveira, A.C.; Aires-Barros, M.R.; Palavra, A.M.F. & Gouveia, L. (2013).** Carotenoid and lipid production by the autotrophic microalga *Chlorella protothecoides* under nutritional, salinity, and luminosity stress conditions. *Applied Microbiology and Biotechnology* **97**, 1383–1393.
- Chan, K.F.; Le Tran, H.; Kanenaka, R.Y. & Kathariou, S. (2001).** Survival of clinical and poultry-derived isolates of *Campylobacter jejuni* at a low temperature (4 °C). *Applied and Environmental Microbiology* **67**, 4186–4191.

- Chattopadhyay, M.; Jagannadham, M.; Vairamani, M. & Shivaji, S. (1997).** Carotenoid pigments of an antarctic psychrotrophic bacterium *Micrococcus roseus*: temperature dependent biosynthesis, structure, and interaction with synthetic membranes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **239**, 85–90.
- Chattopadhyay, M.K. (2006).** Mechanism of bacterial adaptation to low temperature. *Journal of Biosciences* **31**, 157–165.
- Chintalapati, S.; Kiran, M.D. & Shivaji, S. (2004).** Role of membrane lipid fatty acids in cold adaptation. *Cellular and Molecular Biology* **50**, 631–642.
- Cleland, D.; Krader, P.; McCree, C.; Tang, J. & Emerson, D. (2004).** Glycine betaine as a cryoprotectant for prokaryotes. *Journal of Microbiological Methods* **58**, 31–38.
- Cogdell, R.J. & Frank, H.A. (1987).** How carotenoids function in photosynthetic bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Bioenergetics* **895**, 63–79.
- Collins, M.D. & Jones, D. (1981).** Distribution of isoprenoid quinone structural types in bacteria and their taxonomic implications. *Microbiological Reviews* **45**, 316–354.
- Collins, M.D.; Jonse, D.; Goodfellow, M. & Minnikin, D.E. (1979).** Isoprenoid quinone composition as a guide to the classification of *Listeria*, *Brochothrix*, *Erysipelothrix* and *Caryophanon*. *Journal of General Microbiology* **111**, 453–457.
- Collins, M.D.; Farrow, J.A.; Phillips, B.A. & Kandler, O. (1983).** *Streptococcus garvieae* sp. nov. and *Streptococcus plantarum* sp. nov. *Journal of General Microbiology* **129**, 3427–3431.
- Crockett, E.L. (1998).** Cholesterol function in plasma membranes from ectotherms: membrane-specific roles in adaptation to temperature. *American zoologist* **38**, 291–304.
- Deming, J.W. (2002).** Psychrophiles and polar regions. *Current opinion in microbiology* **5**, 301–309.
- Denich, T.; Beaudette, L.; Lee, H. & Trevors, J. (2003).** Effect of selected environmental and physico-chemical factors on bacterial cytoplasmic membranes. *Journal of Microbiological Methods* **52**, 149–182.
- Derichs, J.; Kämpfer, P. & Lipski, A. (2014).** *Pedobacter nutrimenti* sp. nov., isolated from chilled food. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **64**, 1310-1316.

- Dexter, Y. & Cooke, R. (1984).** Fatty acids, sterols and carotenoids of the psychrophile *Mucor strictus* and some mesophilic *Mucor* species. *Transactions of the British Mycological Society* **83**, 455–461.
- Dieser, M.; Greenwood, M. & Foreman, C.M. (2010).** Carotenoid pigmentation in Antarctic heterotrophic bacteria as a strategy to withstand environmental stresses. *Arctic, Antarctic and Alpine Research* **42**, 396–405.
- Donato, M.M.; Antunes-Madeira, M.C.; Jurado, A.S. & Madeira, V.M. (1997).** Partition of DDT and DDE into membranes and extracted lipids of *Bacillus stearothermophilus*. *Bulletin of environmental contamination and toxicology* **59**, 696–701.
- Effenberger-Neidnicht, K. (2011).** Biochemische Charakterisierung und Wirkoptimierung potentieller Chemotherapeutika auf Basis der natürlichen Chinone Doxorubicin und Thymochinon. Dissertation, Universität Bayreuth.
- Epand, R.M. (1998).** Lipid polymorphism and protein–lipid interactions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Biomembranes* **1376**, 353–368.
- Feller, G. & Gerday, C. (1997).** Review-Psychrophilic enzymes: molecular basis of cold adaptation. *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)* **53**, 830–841.
- Feller, G. & Gerday, C. (2003).** Psychrophilic enzymes: hot topics in cold adaptation. *Nature reviews* **1**, 200–208.
- Feller, G.; Narinx, E.; Arpigny, J. L.; Zekhnini, Z.; Swings, J. & Gerday, C. (1994).** Temperature dependence of growth, enzyme secretion and activity of psychrophilic Antarctic bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology* **41**, 477–479.
- Felsenstein, J. (1985).** Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, 783–791.
- Fong, N. J. C.; Burgess, M.L.; Barrow, K.D. & Glenn, D.R. (2001).** Carotenoid accumulation in the psychrotrophic bacterium *Arthrobacter agilis* in response to thermal and salt stress. *Applied Microbiology and Biotechnology* **56**, 750–756.
- Freedman, R.B. (1981).** Membrane-bound enzymes. *New Comprehensive Biochemistry* **1**, 161–214.
- Fritsch, C. (2012).** Beeinflussung des Wachstumsverhaltens von Bakterien bei niedrigen Temperaturen durch Zugabe von Chinonen. Masterarbeit. Universität Bonn.

- Fulco, A. (1974).** Metabolic alterations of fatty acids. *Annual review of biochemistry* **43**, 215–241.
- Georlette, D.; Blaise, V.; Collins, T.; D'Amico, S.; Gratia, E.; Hoyoux, A. et al. (2004).** Some like it cold: biocatalysis at low temperatures. *FEMS Microbiology Reviews* **28**, 25–42.
- Gerhardt, P.; Murray, R.G.; Costilow, R.N.; Nester, E.W.; Wood, W.A.; Krieg, N.R. & Phillips, G.B. (1981).** Manual of methods for general bacteriology.
- Gounot, A.M. & Russell, N.J. (1999).** Physiology of cold-adapted microorganisms. In: Rosa Margesin und Franz Schinner (Hg.): Cold-adapted organisms. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 33–55.
- Gram, H.C.J.; Friedländer, C. (1884).** Über die isolierte Färbung der Schizomyceten: in Schnitt-und Trockenpräparaten: Theodor Fischer's medizinischer Buchhandlung.
- Graumann, P.; Schröder, K.; Schmid, R. & Marahiel, M. A. (1996).** Cold shock stress-induced proteins in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* **178**, 4611–4619.
- Guedes, A.C.; Amaro, H.M. & Malcata, F.X. (2011).** Microalgae as sources of carotenoids. *Marine Drugs* **9**, 625–644.
- Guendouzi, A. & Mekelleche, S.M. (2012).** Prediction of the melting points of fatty acids from computed molecular descriptors: A quantitative structure–property relationship study. *Chemistry and Physics of Lipids* **165**, 1–6.
- Guenicrl, A.M. & Linton, R.H. (2003).** Growth and survival of selected pathogens in margarine-style table spreads.
- Guillier, L.; Pardon, P. & Augustin, J.-C. (2005).** Influence of stress on individual lag time distributions of *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology* **71**, 2940–2948.
- Guinebretiere, M.-H.; Auger, S.; Galleron, N.; Contzen, M.; Sarrau, B. de; Buyser, M.-L. de et al. (2013).** *Bacillus cytotoxicus* sp. nov. is a novel thermotolerant species of the *Bacillus cereus* group occasionally associated with food poisoning. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **63**, 31–40.
- Guyer, S. & Jemmi, T. (1991).** Behavior of *Listeria monocytogenes* during fabrication and storage of experimentally contaminated smoked salmon. *Applied and Environmental Microbiology* **57**, 1523–1527.

Hamasaki, Y.; Ayaki, M.; Fuchu, H.; Sugiyama, M. & Morita, H. (2003). Behavior of psychrotrophic lactic acid bacteria isolated from spoiling cooked meat products. *Applied and Environmental Microbiology* **69**, 3668–3671.

Harder, W. & Veldkamp, H. (1968). Physiology of an obligatory psychrophilic marine *Pseudomonas* species. *Journal of Applied Microbiology* **31**, 12–23.

Harder, W. & Veldkamp, H. (1971). Competition of marine psychrophilic bacteria at low temperatures. *Antonie van Leeuwenhoek* **37**, 51–63.

Harrison, W.A.; Peters, A.C. & Fielding, L.M. (2000). Growth of *Listeria monocytogenes* and *Yersinia enterocolitica* colonies under modified atmospheres at 4 and 8 °C using a model food system. *Journal of Applied Microbiology* **88**, 38–43.

Härtig, C.; Loffhagen, N. & Babel, W. (1999). Glucose stimulates a decrease of the fatty acid saturation degree in *Acinetobacter calcoaceticus*. *Archives of Microbiology* **171**, 166–172.

Havaux, M. (1998). Carotenoids as membrane stabilizers in chloroplasts. *Trends in Plant Science* **3**, 147–151.

Hazel, J.R. & Eugene Williams, E. (1990). The role of alterations in membrane lipid composition in enabling physiological adaptation of organisms to their physical environment. *Progress in lipid research* **29**, 167–227.

Hébraud, M. & Potier, P. (1999). Cold shock response and low temperature adaptation in psychrotrophic bacteria. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* **1**, 211–219.

Heipieper, H.-J.; Diefenbach, R. & Keweloh, H. (1992). Conversion of *cis* unsaturated fatty acids to *trans*, a possible mechanism for the protection of phenol-degrading *Pseudomonas putida* P8 from substrate toxicity. *Applied and Environmental Microbiology* **58**, 1847–1852.

Heipieper, H.J.; Meinhardt, F. & Segura, A. (2003). The *cis-trans* isomerase of unsaturated fatty acids in *Pseudomonas* and *Vibrio*. Biochemistry, molecular biology and physiological function of a unique stress adaptive mechanism. *FEMS Microbiology Letters* **229**, 1–7.

Heller, H.; Schaefer, M. & Schulten, K. (1993). Molecular dynamics simulation of a bilayer of 200 lipids in the gel and in the liquid crystal phase. *The Journal of Physical Chemistry* **97**, 8343–8360.

- Helmke, E. & Weyland, H. (2004).** Psychrophilic versus psychrotolerant bacteria-occurrence and significance in polar and temperate marine habitats. *Cellular and molecular Biology* **50**, 553–561.
- Herranen, M.; Kariluoto, S.; Edelmann, M.; Piironen, V.; Ahvenniemi, K.; Iivonen, V. et al. (2010).** Isolation and characterization of folate-producing bacteria from oat bran and rye flakes. *International Journal of Food Microbiology* **142**, 277–285.
- Hiraishi, A.; Ueda, Y.; Ishihara, J.B & Mori, T. (1996).** Comparative lipoquinone analysis of influent sewage and activated sludge by high-performance liquid chromatography and photodiode array detection. *The Journal of General and Applied Microbiology* **42**, 457–469.
- Hiraishi, A. (1999).** Isoprenoid quinones as biomarkers of microbial populations in the environment. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **88**, 449–460.
- Hiraishi, A.; Umezawa, T.; Yamamoto, H.; Kato, K. & Maki, Y. (1999).** Changes in quinone profiles of hot spring microbial mats with a thermal gradient. *Applied and Environmental Microbiology* **65**, 198–205.
- Hu, H.-Y.; Fujie, K. & Urano, K. (1999).** Development of a novel solid phase extraction method for the analysis of bacterial quinones in activated sludge with a higher reliability. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **87**, 378–382.
- Hudson, J. & Mott, S. (1993).** Growth of *Listeria monocytogenes*, *Aeromonas hydrophila* and *Yersinia enterocolitica* on cold-smoked salmon under refrigeration and mild temperature abuse. *Food Microbiology* **10**, 61–68.
- Isaksen, M.F. & Jorgensen, B.B. (1996).** Adaptation of psychrophilic and psychrotrophic sulfate-reducing bacteria to permanently cold marine environments. *Applied and Environmental Microbiology* **62**, 408–414.
- IUPAC-IUB, Commission on Biochemical Nomenclature (1978).** The nomenclature of lipids. *Chemistry and Physics of Lipids* **21**, 159–173.
- Jacobsen, M. (2013).** Der Carotenoidgehalt bei Bakterien in Abhängigkeit von der Wachstumstemperatur. Masterarbeit. Universität Bonn.
- Jagannadham, M.V.; Chattopadhyay, M.K.; Subbalakshmi, C.; Vairamani, M.; Narayanan, K.; Mohan Rao, C. & Shivaji, S. (2000).** Carotenoids of an Antarctic psychrotolerant bacterium, *Sphingobacterium antarcticus*, and a mesophilic bacterium, *Sphingobacterium multivorum*. *Archives of Microbiology* **173**, 418–424.

- Janda, J.M. & Abbott, S.L. (2007).** 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. *Journal of Clinical Microbiology* **45**, 2761–2764.
- Jeffries, L., Cawthorne, M.A., Harris, M., Diplock, A.T., Green, J. & Price, S.A. (1967).** Distribution of menaquinones in aerobic *Micrococcaceae*. *Nature* **215**, 257–259.
- Jiang, X.; Islam, M.; Morgan, J. & Doyle, M. P. (2004).** Fate of *Listeria monocytogenes* in bovine manure-amended soil. *Journal of Food Protection* **67**, 1676–1681.
- Junttila, J.R.; Niemelä, S.I. & Hirn, J. (1988).** Minimum growth temperatures of *Listeria monocytogenes* and non-haemolytic listeria. *Journal of Applied Microbiology* **65**, 321–327.
- Kageyama, B.; Nakae, M.; Yagi, S. & Sonoyama, T. (1992).** *Pantoea punctata* sp. nov., *Pantoea citrea* sp. nov., and *Pantoea terrea* sp. nov. isolated from Fruit and Soil Samples. *International Journal of Systematic Bacteriology* **42**, 203–210.
- Kaiser, P.; Surmann, P.; Vallentin, G. & Fuhrmann, H. (2007).** A small-scale method for quantitation of carotenoids in bacteria and yeasts. *Journal of Microbiological Methods* **70**, 142–149.
- Kalinowski, R.M.; Tompkin, R.B.; Bodnaruk, P.W. & Pruett, W.P. (2003).** Impact of cooking, cooling, and subsequent refrigeration on the growth or survival of *Clostridium perfringens* in cooked meat and poultry products. *Journal of Food Protection* **66**, 1227–1232.
- Kämpfer, P. (1996).** Klassische Methoden zur Charakterisierung von Abwasserbakterien - Grenzen und Möglichkeiten. In: Ökologie der Abwasserorganismen: Springer, 45–68.
- Kandror, O.; DeLeon, A. & Goldberg, A.L. (2002).** Trehalose synthesis is induced upon exposure of *Escherichia coli* to cold and is essential for viability at low temperatures. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **99**, 9727–9732.
- Kaneda, T. (1991).** Iso-fatty and anteiso-fatty acids in bacteria - Biosynthesis, function and taxonomic significance. *Microbiological Reviews* **55**, 288–302.
- Kannenbergh, E.L. & Poralla, K. (1999).** Hopanoid biosynthesis and function in bacteria. *Naturwissenschaften* **86**, 168–176.

Keweloh, H. & Heipieper, H.J. (1996). Trans unsaturated fatty acids in bacteria. *Lipids* **31**, 129–137.

Kim, D.-U.; Kim, Y.-J.; Shin, D.-H.; Weon, H.-Y.; Kwon, S.-W.; Seong, C.-N. & Ka, J.-O. (2013). *Pedobacter namyangjuensis* sp. nov. isolated from soil and reclassification of *Nubsella zeaxanthinifaciens* Asker et al. 2008 as *Pedobacter zeaxanthinifaciens* comb. nov. *Journal of Microbiology* **51**, 25–30.

Kim, H.-B.; Srinivasan, S.; Sathiyaraj, G.; Quan, L.-H.; Kim, S.-H.; Bui, T. P. N. et al. (2010). *Stenotrophomonas ginsengisoli* sp. nov., isolated from a ginseng field. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **60**, 1522–1526.

Kim, O.-S.; Cho, Y.-J.; Lee, K.; Yoon, S.-H.; Kim, M.; Na, H. et al. (2012). Introducing EzTaxon-e: a prokaryotic 16S rRNA gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **62**, 716–721.

Kiran, M. D.; Prakash, J.S.S.; Annapoorni, S.; Dube, S.; Kusano, T.; Okuyama, H. et al. (2004). Psychrophilic *Pseudomonas syringae* requires trans-monounsaturated fatty acid for growth at higher temperature. *Extremophiles* **8**, 401–410.

Knoblauch, C. & Jorgensen, B.B. (1999). Effect of temperature on sulphate reduction, growth rate and growth yield in five psychrophilic sulphate-reducing bacteria from Arctic sediments. *Environmental Microbiology* **1**, 457–467.

Ko, R.; Smith, L.T. & Smith, G.M. (1994). Glycine betaine confers enhanced osmotolerance and cryotolerance on *Listeria monocytogenes*. *Journal of Bacteriology* **176**, 426–431.

Kovacs, G.; Burghardt, J.; Pradella, S.; Schumann, P.; Stackebrandt, E. & Marialigeti, K. (1999). *Kocuria palustris* sp. nov. and *Kocuria rhizophila* sp. nov., isolated from the rhizoplane of the narrow-leaved cattail (*Typha angustifolia*). *International Journal of Systematic Bacteriology* **49**, 167–173.

Kraft, A.A. (1992). Psychrotrophic Bacteria in Foods: Disease and Spoilage. Boca Raton, Florida: CRC Press.

Krämer, J. (2007). Lebensmittel-Mikrobiologie. 6. Auflage, Stuttgart: Ulmer (UTB Lebensmittelwissenschaften, Biologie).

Krishnamurthi, S.; Chakrabarti, T. & Stackebrandt, E. (2009). Re-examination of the taxonomic position of *Bacillus silvestris* Rheims et al. 1999 and proposal to transfer it to

Solibacillus gen. nov. as *Solibacillus silvestris* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **59**, 1054–1058.

Kropinski; A.M., Lewis, V. & Berry, D. (1987). Effect of growth temperature on the lipids, outer membrane proteins, and lipopolysaccharides of *Pseudomonas aeruginosa* PAO. *Journal of Bacteriology* **169**, 1960–1966.

Kröckel, L. (2007). Ein bakterielles Carotinoid färbt vorverpackte, kühl gelagerte Weißwurst gelb. *Mitteilungsblatt der Fleischforschung Kulmbach* **46**, 223–230.

Kunihiro, T.; Veuger, B.; Vasquez-Cardenas, D.; Pozzato, L.; Le Guitton, M.; Moriya, K. et al. (2014). Phospholipid-derived fatty acids and quinones as markers for bacterial biomass and community structure in marine sediments. *PloS one* **9**, e96219.

Kwon, S.-W.; Kim, B.-Y.; Lee, K.-H.; Jang, K.-Y.; Seok, S.-J.; Kwon, J.-S. et al. (2007). *Pedobacter suwonensis* sp. nov., isolated from the rhizosphere of Chinese cabbage (*Brassica campestris*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **57**, 480–484.

Laksanalasmai, P.; Burall, L. & Datta, A.R. (2011). Adaptation Mechanisms of Psychrotolerant Bacterial Pathogens. *Extremophiles Handbook*, 817–837.

Lechner, S.; Mayr, R.; Francis, K. P.; Prü, B. M.; Kaplan, T.; Wießner-Gunkel, E. et al. (1998). *Bacillus weihenstephanensis* sp. nov. is a new psychrotolerant species of the *Bacillus cereus* group. *International Journal of Systematic Bacteriology* **48**, 1373–1382.

Lee, H.-G.; Kim, S.-G.; Im, W.-T.; Oh, H.-M. & Lee, S.-T. (2009). *Pedobacter composti* sp. nov., isolated from compost. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **59**, 345–349.

Lin, S.-Y.; Hameed, A.; Liu, Y.-C.; Hsu, Y.-H.; Lai, W.-A.; Chen, W.-M. et al. (2013). *Pseudomonas sagittaria* sp. nov., a siderophore-producing bacterium isolated from oil-contaminated soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **63**, 2410–2417.

Liu, G. Y. (2005). *Staphylococcus aureus* golden pigment impairs neutrophil killing and promotes virulence through its antioxidant activity. *Journal of Experimental Medicine* **202**, 209–215.

Luo, X.; Wang, Z.; Dai, J.; Zhang, L.; Li, J.; Tang, Y. et al. (2010). *Pedobacter glucosidilyticus* sp. nov., isolated from dry riverbed soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **60**, 229–233.

- Madigan, M. T.; Martinko, J. M.; Dunlap, P. V. & Clark, D. P. (2008).** Brock Biology of microorganisms 12th edn. *International Microbiology* **11**, 65–73.
- Madigan, M.T.; Martinko, J.M.; Stahl, D.A.; Clark, D.P.; Thomm, M.; Wirth, R. (2013).** Brock Mikrobiologie. 13., aktualisierte Aufl. München: Pearson Higher Education (Bio Biologie).
- Magnuson, K.; Jackowski, S.; Rock, C.O. & Cronan, J.E. (1993).** Regulation of fatty acid biosynthesis in *Escherichia coli*. *Microbiological reviews* **57**, 522–542.
- Malhotra, J.; Anand, S.; Jindal, S.; Rajagopal, R. & Lal, R. (2012).** *Acinetobacter indicus* sp. nov., isolated from a hexachlorocyclohexane dump site. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **62**, 2883–2890.
- Marshall, J.H. & Wilmoth, G. J. (1981).** Pigments of *Staphylococcus aureus*, a series of triterpenoid carotenoids. *Journal of Bacteriology* **147**, 900–913.
- Margesin, R. (2003).** *Pedobacter cryoconitis* sp. nov., a facultative psychrophile from alpine glacier cryoconite. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **53**, 1291–1296.
- Margesin, R. (2009).** Effect of temperature on growth parameters of psychrophilic bacteria and yeasts. *Extremophiles* **13**, 257–262.
- Margesin, R.; Neuner, G. & Storey, K.B. (2007).** Cold-loving microbes, plants, and animals - fundamental and applied aspects. *Naturwissenschaften* **94**, 77–99.
- Margesin, R. & Shivaji, S. (2011).** Genus II. *Pedobacter* Steyn, Segers, Vancanneyt, Sandra, Kersters and Joubert 1998, 171 VP. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* **4**, 339–347.
- Margesin, R.; Gerday, C.; Marx, J.-C.; Schinner, F. (2008).** Psychrophiles: from biodiversity to biotechnology. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Matissek, R.; Steiner, G.; Fischer, M. (2010).** Lebensmittelanalytik: Springer Germany.
- Meganathan, R. (2001).** Ubiquinone biosynthesis in microorganisms. *FEMS Microbiology Letters* **203**, 131–139.
- Miller, L.T. (1982).** Single derivatization method for routine analysis of bacterial whole-cell fatty acid methyl esters, including hydroxy acids. *Journal of Clinical Microbiology* **16**, 584–586.

- Mitchell, C.; Iyer, S.; Skomurski, J. F. & Vary, J. C. (1986).** Red pigment in *Bacillus megaterium* spores. *Applied and Environmental Microbiology* **52**, 64–67.
- Minnikin, D.; O'Donnell, A.; Goodfellow, M.; Alderson, G.; Athalye, M.; Schaal, A. & Parlett, J. (1984).** An integrated procedure for the extraction of bacterial isoprenoid quinones and polar lipids. *Journal of Microbiological Methods* **2**, 233–241.
- Morishita, T.; Tamura, N.; Makino, T. & Kudo, S. (1999).** Production of menaquinones by lactic acid bacteria. *Journal of Dairy Science* **82**, 1897–1903.
- Morita (1975).** Psychrophilic bacteria. *Bacteriol. Rev.*, 144–167.
- Morita, N.; Shibahara, A.; Yamamoto, K.; Shinkai, K.; Kajimoto, G. & Okuyama, H. (1993).** Evidence for *cis-trans* isomerization of a double bond in the fatty acids of the psychrophilic bacterium *Vibrio* sp. strain ABE-1. *Journal of Bacteriology* **175**, 916–918.
- Mossel, D.A.A.; Corry, J.E.L.; Struijk, C.B.; Baird, R.M. (1995).** Essentials of the microbiology of foods: a textbook for advanced studies: John Wiley & Sons.
- Munk, K. (2008).** Biochemie. Zellbiologie. 1. Aufl. s.l: Georg Thieme Verlag KG.
- Muranushi, N.; Takagi, N.; Muranishi, S. & Sezaki, H. (1981).** Effect of fatty acids and monoglycerides on permeability of lipid bilayer. *Chemistry and Physics of Lipids* **28**, 269–279.
- Murr, D. (2013).** Carotinoidanalyse von Bakterien und deren Bedeutung in der bakteriellen Kälteanpassung. Abschlussarbeit. Universität Bonn
- Muyzer, G.; De Waal, E.C. & Uitterlinden, A.G. (1993).** Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology* **59**, 695–700.
- Muyzer, G.; Teske, A.; Wirsen, C.O. & Jannasch, H.W. (1995).** Phylogenetic relationships of *Thiomicrospira* species and their identification in deep-sea hydrothermal vent samples by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rDNA fragments. *Archives of Microbiology* **164**, 165–172.
- Nič, M.; Jiráť, J.; Košata, B.; Jenkins, A.; McNaught, A. (2009).** IUPAC Compendium of Chemical Terminology. Research Triangle Park, NC: IUPAC.
- Oh, H.-W.; Kim, B.-C.; Park, D.-S.; Jeong, W.-J.; Kim, H.; Lee, K.H. & Kim, S.U. (2013).** *Pedobacter luteus* sp. nov., isolated from soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **63**, 1304–1310.

- Okuyama, H.; Sasaki, S.; Higashi, S. & Murata, N. (1990).** A trans-unsaturated fatty acid in a psychrophilic bacterium, *Vibrio* sp. Strain ABE-1 *Journal of Bacteriology*, **172**, 3515–3518.
- Olsson, C.; Ahrné, S.; Pettersson, B. & Molin, G. (2003).** The bacterial flora of fresh and chill-stored pork: analysis by cloning and sequencing of 16S rRNA genes. *International Journal of Food Microbiology* **83**, 245–252.
- Ourisson, G. & Nakatani, Y. (1994).** The terpenoid theory of the origin of cellular life: the evolution of terpenoids to cholesterol. *Chemistry & biology* **1**, 11–23.
- Palleroni, N. J. & Bradbury, J.F. (1993).** *Stenotrophomonas*, a new bacterial genus for *Xanthomonas maltophilia* (Hugh 1980) Swings et al. 1983. *International Journal of Systematic Bacteriology* **43**, 606–609.
- Payza, A.N. & Korn, E.D. (1956).** Bacterial degradation of heparin. *Nature* **177**, 88–89.
- Pintea, A.; Diehl, H. A.; Momeu, C.; Aberle, L. & Socaciu, C. (2005).** Incorporation of carotenoid esters into liposomes. *Biophysical Chemistry* **118**, 7–14.
- Quinn, P.J. (1981).** The fluidity of cell membranes and its regulation. *Progress in biophysics and molecular biology* **38**, 1–104.
- Rähler, N. (2007).** Carotinoidbiosynthese in *Flavobacterium* spec P99-3. Universitätsbibliothek Frankfurt
- Ramos, E.; Ramírez-Bahena, M.-H.; Valverde, A.; Velázquez, E.; Zúñiga, D.; Velezmoro, C. & Peix, A. (2013).** *Pseudomonas punonensis* sp. nov., isolated from straw. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **63**, 1834–1839.
- Ratkowsky, D.A.; Olley, J.; McMeekin, T.A. & Ball, A. (1982).** Relationship between temperature and growth rate of bacterial cultures. *Journal of Bacteriology* **149**, 1–5.
- Razin, S.; Kutner, S.; Efrati, H. & Rottem, S. (1980).** Phospholipid and cholesterol uptake by mycoplasma cells and membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* **598**, 628–640.
- Rezwan, M.; Lanéelle, M.-A.; Sander, P. & Daffé, M. (2007).** Breaking down the wall: fractionation of mycobacteria. *Journal of Microbiological Methods* **68**, 32–39.
- Rieser, G.; Scherer, S. & Wenning, M. (2013).** *Micrococcus cohnii* sp. nov., isolated from the air in a medical practice. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **63**, 80–85.

Rheims, H.; Fruhling, A.; Schumann, P.; Rohde, M. & Stackebrandt, E. (1999). *Bacillus silvestris* sp. nov., a new member of the genus *Bacillus* that contains lysine in its cell wall. *International Journal of Systematic Bacteriology* **49**, 795–802.

Rodriguez-Amaya, D.B. (2001). A guide to carotenoid analysis in foods: ILSI press Washington, CDC.

Rothblat, G.H.; Ellis, D.S. & Kritchevsky, D. (1964). The carotenoid pigments of *Micrococcus lysodeikticus*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Specialized Section on Lipids and Related Subjects* **84**, 340–347.

Rottem, S. (1981). Cholesterol is required to prevent crystallization of *Mycoplasma arginini* phospholipids at physiological temperature. *FEBS Letters* **133**, 161–164.

Rottem, S.; Cirillo, V.P.; Kruyff, B. de; Shinitzky, M. & Razin, S. (1973). Cholesterol in mycoplasma membranes. Correlation of enzymic and transport activities with physical state of lipids in membranes of *Mycoplasma mycoides* var. *capri* adapted to grow with low cholesterol concentrations. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* **323**, 509–519.

Rucker, R.B.; Zempleni, J.; Suttie, J.W.; McCormick, D.B. (2010). Handbook of vitamins: CRC Press.

Rudolph, A.S.; Crowe, J.H. & Crowe, L.M. (1986). Effects of three stabilizing agents—proline, betaine, and trehalose—on membrane phospholipids. *Archives of biochemistry and biophysics* **245**, 134–143.

Russell, N.J. (1984). Mechanisms of thermal adaptation in bacteria: blueprints for survival. *Trends in Biochemical Sciences* **9**, 108–112.

Russell, N.J. (2002). Bacterial membranes: the effects of chill storage and food processing. An overview. *International Journal of Food Microbiology* **79**, 27–34.

Russell, N.J.; Harrison, P.; Johnston, I.A.; Jaenicke, R.; Zuber, M.; Franks, F. & Wynn-Williams, D. (1990). Cold adaptation of microorganisms *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **326**, 595–611

Saitou, N. & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* **4**, 406–425.

Sanderson, P.W.; Lis, L. J.; Quinn, P.J. & Williams, W.P. (1991). The Hofmeister effect in relation to membrane lipid phase stability. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* **1067**, 43–50.

- Sasser, M. (1990).** Identification of bacteria by gas chromatography of cellular fatty acids. Technical Note 101. *Microbial Identification Applied Microbiology* **42**, 457-469
- Saunders, N.F.W.; Thomas, T.; Curmi, P. M. G.; Mattick, J. S.; Kuczek, E.; Slade, R. et al. (2003).** Mechanisms of thermal adaptation revealed from the genomes of the Antarctic Archaea *Methanogenium frigidum* and *Methanococcoides burtonii*. *Genome Research* **13**, 1580–1588.
- Scherer, S. & Neuhaus, K. (2006).** Life at low temperatures. In: Martin Dworkin, Stanley Falkow, Eugene Rosenberg, Karl-Heinz Schleifer und Erko Stackebrandt (Hg.): *The Prokaryotes*. New York, NY: Springer New York, 210–262.
- Schlegel, H.G.; Eitinger, T.; Fuchs, G. (2007).** *Allgemeine mikrobiologie*: Georg Thieme Verlag.
- Schleifer, K.H. & Kloos, W.E. (1975).** Isolation and characterization of Staphylococci from human skin I. Amended descriptions of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus saprophyticus* and descriptions of three new species: *Staphylococcus cohnii*, *Staphylococcus haemolyticus*, and *Staphylococcus xylosus*. *International Journal of Systematic Bacteriology* **25**, 50–61.
- Shida, O.; Takagi, H.; Kadowaki, K.; Nakamura, L. K. & Komagata, K. (1997).** Transfer of *Bacillus alginolyticus*, *Bacillus chondroitinus*, *Bacillus curdolanolyticus*, *Bacillus glucanolyticus*, *Bacillus kobensis*, and *Bacillus thiaminolyticus* to the genus *Paenibacillus* and emended description of the genus *Paenibacillus*. *International Journal of Systematic Bacteriology* **47**, 289–298.
- Shivaji, S. (2005).** *Pedobacter himalayensis* sp. nov., from the Hamta glacier located in the Himalayan mountain ranges of India. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **55**, 1083–1088.
- Shivaji, S.; Kiran, M. D. & Chintalapati, S. (2007).** Perception and transduction of low temperature in bacteria. *Physiology and biochemistry of extremophiles*. ASM Press, Washington, DC, 194–207.
- Simon, C.; Wiezer, A.; Strittmatter, A.W. & Daniel, R. (2009).** Phylogenetic diversity and metabolic potential revealed in a glacier ice metagenome. *Applied and Environmental Microbiology* **75**, 7519–7526.
- Sinensky, M. (1974).** Homeoviscous Adaptation - a homeostatic process that regulates the viscosity of membrane lipids in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **71**, 522–525.

- Søballe, B. & Poole, R. K. (1999).** Microbial ubiquinones: multiple roles in respiration, gene regulation and oxidative stress management. *Microbiology* **145**, 1817–1830.
- Sousa, E.T.; da Silva, M.M.; de Andrade, S.J.; Cardoso, M.P.; Silva, L.A. & de Andrade, J.B. (2012).** Evaluation of thermal stability of quinones by thermal analysis techniques. *Thermochimica Acta* **529**, 1–5.
- Stackebrandt, E. & Goebel, B. M. (1994).** Taxonomic Note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *International Journal of Systematic Bacteriology* **44**, 846–849.
- Steele, F.M. & Wright, K.H. (2001).** Cooling rate effect on outgrowth of *Clostridium perfringens* in cooked, ready-to-eat turkey breast roasts. *Poultry Science* **80**, 813–816.
- Stein, Jürgen (2003).** Praxishandbuch klinische Ernährung und Infusionstherapie, Springer DE.
- Steyn, P.L.; Segers, P.; Vancanneyt, M.; Sandra, P.; Kersters, K. & Joubert, J.J. (1998).** Classification of heparinolytic bacteria into a new genus, *Pedobacter*, comprising four species: *Pedobacter heparinus* comb. nov., *Pedobacter piscium* comb. nov., *Pedobacter africanus* sp. nov. and *Pedobacter saltans* sp. nov. proposal of the family *Sphingobacteriaceae* fam. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* **48**, 165–177.
- Storey, K.B. & Storey, J.M. (1986).** Freeze tolerance and intolerance as strategies of winter survival in terrestrially-hibernating amphibians. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology* **83**, 613–617.
- Strand, A.; Shivaji, S. & Liaaen-Jensen, S. (1997).** Bacterial carotenoids 55. C50-carotenoids 25.† revised structures of carotenoids associated with membranes in psychrotrophic *Micrococcus roseus* *Biochemical systematics and ecology* **25**, 547–552.
- Subczynski, W.K.; Markowska, E. & Siewiesiuk, J. (1991).** Effect of polar carotenoids on the oxygen diffusion-concentration product in lipid bilayers. An EPR spin label study. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1068**, 68–72.
- Subczynski, W.K.; Markowska, E.; Gruszecki, W.I. & Siewiesiuk, J. (1992).** Effects of polar carotenoids on dimyristoylphosphatidylcholine membranes: a spin-label study. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* **1105**, 97–108.
- Suutari, M. & Laakso, S. (1994).** Microbial fatty acids and thermal adaptation. *Critical Reviews in Microbiology* **20**, 285–328.

Swart-Füchtbauer, H. (1957). Zur Strahlenresistenz pigmentierter Bakterien. *Archiv für Mikrobiologie* **26**, 132–150.

Takeuchi, A.; Inman, L. R.; O'Hanley, P.D.; Cantey, J.R. & Lushbaugh, W.B. (1978). Scanning and transmission electron microscopic study of *Escherichia coli* O15 (RDEC-1) enteric infection in rabbits. *Infection and immunity* **19**, 686–694.

Takeuchi, M. & Hatano, K. (1998). Proposal of six new species in the genus *Microbacterium* and transfer of *Flavobacterium marinotypicum* ZoBell and Upham to the genus *Microbacterium* as *Microbacterium maritypicum* comb. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* **48**, 973–982.

Takeuchi, M. & Yokota, A. (1992). Proposals of *Sphingobacterium faecium* sp. nov., *Sphingobacterium piscium* sp. nov., *Sphingobacterium heparinum* comb. nov., *Sphingobacterium thalpophilum* comb. nov. and two genospecies of the genus *Sphingobacterium*, and synonymy of *Flavobacterium yabuuchiae* and *Sphingobacterium spiritivorum*. *The Journal of General and Applied Microbiology* **38**, 465–482.

Tamura, K.; Dudley, J.; Nei, M. & Kumar, S. (2007). MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) Software Version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* **24**, 1596–1599.

Tani, Y. (1989). Microbial Production of Vitamin K2 (Menaquinone) and Vitamin K1 (Phylloquinone). In: *Biotechnology of Vitamins, Pigments and Growth Factors*: Springer, 123–134.

Tasara, T. & Stephan, R. (2006). Cold stress tolerance of *Listeria monocytogenes*: a review of molecular adaptive mechanisms and food safety implications. *Journal of Food Protection* **69**, 1473–1484.

Tsukamoto, T.; Murata, H. & Shirata, A. (2002). Identification of non-pseudomonad bacteria from fruit bodies of wild agaricales fungi that detoxify tolaasin produced by *Pseudomonas tolaasii*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **66**, 2201–2208.

United States Environmental Protection Agency, Washington, DC, USA. (2012). Estimation Programs Interface Suite™. Washington, DC, USA.: US EPA.

Varkonyi, Z.; Masamoto, K.; Debreczeny, M.; Zsiros, O.; Ughy, B.; Gombos, Z. et al. (2002). Low-temperature-induced accumulation of xanthophylls and its structural consequences in the photosynthetic membranes of the cyanobacterium

Cylindrospermopsis raciborskii: An FTIR spectroscopic study. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **99**, 2410–2415.

Wada, M.; Fukunaga, N. & Sasaki, S. (1989). Mechanism of biosynthesis of unsaturated fatty acids in *Pseudomonas* sp. strain E-3, a psychrotrophic bacterium. *Journal of Bacteriology* **171**, 4267–4271.

Warth, A.D. (1978). Relationship between the heat resistance of spores and the optimum and maximum growth temperatures of *Bacillus* species. *Journal of Bacteriology* **134**, 699–705.

Watanuki, M. & Aida, K.O. (1972). Significance of quinones in the classification of bacteria. *The Journal of General and Applied Microbiology* **18**, 469–472.

Wayne, L.G.; Brenner, D.J.; Colwell, R.R.; Grimont, P.A.; Kandler, O.; Krichevsky, M.I. et al. (1987). Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *International Journal of Systematic Bacteriology* **37**, 463–464.

White, G.F.; Racher, K.I.; Lipski, A.; Hallett, F. & Wood, J. M. (2000). Physical properties of liposomes and proteoliposomes prepared from *Escherichia coli* polar lipids. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1468**, 175–186.

Wieser, M.; Denner, E.B.M.; Kämpfer, P.; Schumann, P.; Tindall, B.; Steiner, U. et al. (2002). Emended descriptions of the genus *Micrococcus*, *Micrococcus luteus* (Cohn 1872) and *Micrococcus lylae* (Kloos et al. 1974). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **52**, 629–637.

Xu, J.-L.; He, J.; Wang, Z.-C.; Wang, K.; Li, W.-J.; Tang, S.-K. & Li, S.-P. (2007). *Rhodococcus qingshengii* sp. nov., a carbendazim-degrading bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **57**, 2754–2757.

Yabuuchi, E. & Yano, I. (1981). *Achromobacter* gen. nov. and *Achromobacter xylosoxidans* (ex Yabuuchi and Ohyama 1971) nom. rev. *International Journal of Systematic Bacteriology* **31**, 477–478.

Yoon, M.-H.; Ten, L.N.; Im, W.-T. & Lee, S.-T. (2007). *Pedobacter panaciterrae* sp. nov., isolated from soil in South Korea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **57**, 381–386.

Yu, Z.; Chang, M.; Wu, M.; Yang, G.; Zhou, S. & Zhuang, L. (2013). *Pseudomonas oryzae* sp. nov. isolated from a paddy soil in South China. *Archives of Microbiology* **195**, 815–822.

- Yu, L.; Lai, Q.; Yi, Z.; Zhang, L.; Huang, Y.; Gu, L. & Tang, X. (2013).** *Microbacterium sediminis* sp. nov., a psychrotolerant, thermotolerant, halotolerant and alkalitolerant actinomycete isolated from deep-sea sediment. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **63**, 25–30.
- Zelles, L. (1999).** Fatty acid patterns of phospholipids and lipopolysaccharides in the characterisation of microbial communities in soil: a review. *Biology and Fertility of Soils* **29**, 111–129.
- Zhao, T.; Ezeike, G.O.I.; Doyle, M. P.; Hung, Y.-C. & Howell, R.S. (2003).** Reduction of *Campylobacter jejuni* on poultry by low-temperature treatment. *Journal of Food Protection* **66**, 652–655.
- Zhou, Z.; Jiang, F.; Wang, S.; Peng, F.; Dai, J.; Li, W. & Fang, C. (2012).** *Pedobacter arcticus* sp. nov., a facultative psychrophile isolated from Arctic soil, and emended descriptions of the genus *Pedobacter*, *Pedobacter heparinus*, *Pedobacter daechungensis*, *Pedobacter terricola*, *Pedobacter glucosidilyticus* and *Pedobacter lentus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **62**, 1963–1969.
- Ziemke, F.; Höfle, M. G.; Lalucat, J. & Rossellö-Mora, R. (1998).** Reclassification of *Shewanella putrefaciens* Owen's genomic group II as *Shewanella baltica* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* **48**, 179–186.
- Zscheile, F.P. & White J.W. (1940).** Microscope hot stage for determination of melting points: application to carotenoid pigments. *Industrial & Engineering Chemistry Analytical Edition* **12**, 436–438.

7. Anhang

Tabelle 15: Fettsäuremuster aller Isolate bei 10°C und 30°C; Angaben in %

	J1		J2		J3		J5		J7				J8		J9		J10		J11		J12				
	10°C	30°C	10°C	30°C	10°C	30°C	10°C	30°C	10°C	10°C	30°C	30°C	10°C	30°C	10°C	30°C	10°C	30°C	10°C	30°C	10°C	10°C	30°C	30°C	
10:0			0,00	0,05																					
11:0 iso																									
11:0 anteiso																									
11:0 3OH																									
12:0			1,90	5,30																					
12:0 cis 5																									
12:0 2OH																									
12:0 3OH			0,00	0,81																					
13:0																									
13:0 iso	76,14	9,32											68,38	25,22	0,00	1,26									
13:0 anteiso	0,00	0,18											5,06	1,22											
13:0 iso 3OH																									
14:0 iso	0,00	2,19			0,13	2,21							5,74	2,16	1,99	2,11			0,00	0,68	1,43	1,33	0,75	0,68	
14:0 3OH																									
14:1 trans 2																									
14:0			0,00	0,12									0,00	1,15					1,18	0,0	1,23	0,97	0,28	0,18	
15:0 iso	7,75	39,68			5,65	19,37	35,93	45,67	33,12	33,98	54,91	52,44	12,70	45,71	2,74	9,11	55,15	67,44	5,00	7,16	3,12	2,88	3,89	3,66	
15:0 anteiso	0,00	1,91			93,91	75,48	46,64	54,33	4,58	5,00	10,85	10,6	0,00	5,20	76,53	52,70	44,85	29,44	93,41	91,60	70,46	71,96	71,75	74,33	
15:0 2OH																									
15:0 iso 3OH																									
15:1 cis 10																									
15:0																					0,00	0,00	0,99	0,66	
16:1 cis 10 bzw. 16:1	6,91	7,60											0,00	9,16					0,41	0,00					
16:1 cis 9			54,89	42,90																					
16:1 cis 11																									
16:1 c/t 5	4,43	1,05																				11,52	10,45	2,16	1,64
16:1 iso 5									35,76	33,64	15,03	15,63										3,59	3,78	0,33	0,16
16:0 iso 2OH																									
16:0 3OH																									
16:0 iso	0,00	5,55			0,25	2,49	1,71	0,00	9,8	10,97	2,88	3,3	0,00	0,50				0,00	0,57	4,28	4,22	9,91	9,63		
16:0	4,77	9,37	14,34	32,37			1,70	0,00					4,16	4,61							1,56	1,2	3,11	2,86	
17:1 iso cis 9																									
17:1 iso cis 6 bzw. cis																									
17:1 iso 5	0,00	9,53							5,9	5,31	4,73	5,13	0,00	1,07	7,35	22,70	0,00	1,48			1,15	1,39	0,00	0,00	
17:1 (iso?) 10															0,00	4,92	0,00	1,53							
17:1 anteiso cis 5	0,00	1,58							3,19	2,75	3,74	4,02	0,00	0,24	3,89	0,00									
17:0 iso 3OH																									
17:0 cyclo																									
17:0 iso	0,00	11,45					6,93	0,00					0,00	1,82	0,00	1,50							0,39	0,32	
17:0 anteiso	0,00	0,67					5,95	0,00													1,66	1,79	6,42	5,87	
17:0																									
18:1 cis 7																4,29	3,07								
18:1 cis 9			19,88	13,70																					
18:1 cis 11			8,99	4,28																					
18:1 trans 9 bzw. cis																									
18:0			0,00	0,44																					

	J16		J17		J20		J21		J22		J23		J34		J39		J40	
	10°C	30°C	10°C	30°C	10°C	30°C	10°C	30°C	10°C	30°C	10°C	30°C	10°C	30°C	10°C	30°C	10°C	30°C
10:0																		
11:0 iso							1,59	4,13										
11:0 anteiso																		
11:0 3OH																		
12:0																		
12:0 cis 5																		
12:0 2OH																		
12:0 3OH																		
13:0																		
13:0 iso																		
13:0 anteiso																		
13:0 iso 3OH							0,00	2,45										
14:0 iso	0,00	0,68															0,52	0,36
14:0 3OH											0,99	1,81						
14:1 trans 2																		
14:0	1,18	0,00			3,06	3,61	2,2	2,81		4,57	3,11	3,31	1,2	5,82			2,01	0,65
15:0 iso	5,00	7,16					20,03	42,43	42,9	37,98					9,62	14,87		
15:0 anteiso	93,41	91,60	100	100			10,99	12,45	5,69						89,64	84,66	94,49	98,1
15:0 2OH																		
15:0 iso 3OH									1,58	2,6								
15:1 cis 10																		
15:0					1,09	0,00												
16:1 cis 10 bzw. 16:1 trans 9					31,32	12,81	6,29	0,00										
16:1 cis 9					1,49	0,00	32,47	12,36	31,84	17,31	53,73	19,3						
16:1 cis 11									6,99									
16:1 c/t 5							3,99	0,00										
16:1 iso 5																		
16:0 iso 2OH																		
16:0 3OH									2	3,94								
16:0 iso															0,54	0,26		
16:0							10,6	15,94	6,77	29,3	28,67	49,09	52,29	81,56				
17:1 iso cis 9							1,49	2,51										
17:1 iso cis 6 bzw. cis 9																		
17:1 iso 5																		
17:1 (iso?) 10																		
17:1 anteiso cis 5																		
17:0 iso 3OH									2,23	4,31								
17:0 cyclo							0,00	2,27			1,4	22,28						
17:0 iso							0,69	2,64										
17:0 anteiso																		
17:0																		
18:1 cis 7																		
18:1 cis 9							4,92	0,00										
18:1 cis 11							4,42	0,00			12,1	4,22	13,08	2,36				
18:1 trans 9 bzw. cis 11																		
18:0																		
19:0 cyclo 11-12													33,43	10,26				

	J44		J45		J48		J50		J52		J53		J54		J55		J57		
	10°C	30°C	10°C	30°C	10°C	30°C	10°C	30°C	10°C	30°C	10°C	30°C	10°C	30°C	10°C	30°C	10°C	30°C	
10:0 3OH																			
11:0 iso												1,20	1,00					1,60	2,80
11:0 anteiso																			
11:0 3OH																			
12:0												2,90	1,70			0,90	2,50		
12:0 cis 5																			
12:0 2OH												0,50	1,00						
12:0 3OH												2,10	2,90					1,90	0,00
13:0									0,80	0,00									
13:0 iso	37,12	28,19							51,10	8,99				17,54	3,50				
13:0 anteiso	10,90	2,46							2,20	0,00				1,43	0,00				
13:0 iso 3OH																		0,80	1,00
14:0 iso	0,60	4,02	1,11	0,61					2,70	0,00				4,70	0,00				
14:0 3OH																2,60	2,90		
14:1 trans 2							9,54	0,00											
14:0	0,00	3,11							0,00	1,72				1,73	0,00	3,80	3,60	1,70	0,50
15:0 iso	8,31	45,70	13,31	13,50	7,69	9,28	7,37	1,38	7,70	61,91				36,01	68,00			28,00	55,90
15:0 anteiso	5,98	5,75	81,01	85,03	76,64	69,41	49,78	56,70	0,00	4,04				10,40	5,90			17,90	22,00
15:0 2OH																			
15:0 iso 3OH																			
15:1 cis 10																			
15:0																			
16:1 cis 10 bzw. 16:1 trans	0,92	2,88							2,30	1,11	2,30	0,00	1,02	5,10					
16:1 cis 9	1,10	0,00							1,20	0,00	33,00	2,90			7,80	2,60	38,70	8,40	
16:1 cis 11																			
16:1 c/t 5	26,86	0,00							19,40	0,00				12,55	0,00				
16:1 iso 5																			
16:1 cis 7																		2,60	0,00
16:0 iso 2OH																			
16:0 3OH																			
16:0 iso	0,00	1,60	3,22	0,86	4,25	2,00	18,22	12,29	0,00	1,72			0,92	1,60					
16:0 10 oder 11 methyl																			
16:0	5,83	4,57			0,62	0,85	0,86	0,65	9,90	12,02	34,50	45,00	10,61	2,10	40,30	60,50	4,40	6,50	
17:1 iso cis 9																		0,70	1,10
17:1 iso cis 6 bzw. cis9																			
17:1 iso 5	2,39	0,00							2,80	2,53				2,04	0,00				
17:1 (iso?) 10																			
17:1 anteiso cis 5														0,00	2,70				
17:0 iso 3OH																			
17:0 cyclo											12,40	44,70			4,70	16,40			
17:0 iso	0,00	1,36					0,82	0,43	0,00	5,76				0,00	11,00			0,60	1,80
17:0 anteiso			0,38	0,00	11,08	18,06	12,85	28,56											
17:0														1,33	0,00				
18:1 cis 7																			
18:1 cis 9																			
18:1 cis 11											10,70	0,80			39,50	8,30	0,80	0,00	
18:1 trans 9 bzw. cis 11																			
18:2 cis, cis 9,12																			
18:3 cis 9,12,15																			
18:0																			
19:0 cyclo 11-12															0,40	3,10			

	J60		J61		J63		J67		J70		J72		J73		J74		J75		J76	
	10°C	30°C	10°C	30°C	10°C	30°C	10°C	30°C	10°C	30°C	10°C	30°C	10°C	30°C	10°C	30°C	10°C	30°C	10°C	30°C
Rt 4.018 (Aldehyd?)					1,92	2,19	0,66	1,36			2,42	2,64							1,46	2,70
10:0 3 methoxy																				
10:0 3OH			0,50	0,20	2,63	0,56	3,04	1,13												
10:0											0,00	0,24							0,00	0,23
11:0 iso			2,00	2,80					0,10	0,07										
11:0 anteiso									0,17	0,00										
11:0 3OH			0,00	0,40																
12:0					7,43	4,22	4,97	5,22			9,94	8,11							10,25	7,98
12:0 cis 5																				
12:0 2OH					3,10	1,68	1,99	2,74				0,44							0,00	0,17
12:0 3OH			2,10	0,50	2,17	0,95	1,71	2,60			0,95	1,92							1,22	0,90
13:0																				
13:0 iso									10,01	6,83										
13:0 anteiso									15,23	11,60										
13:0 iso 3OH			1,10	1,60																
14:0 iso	0,00	0,50							0,50	0,58										
14:0 3OH																				
14:1 trans 2															7,82	0,00	8,99			
14:0			2,00	1,40	0,14	0,33	0,12	0,41	0,92	0,66	0,00	0,52							0,00	0,26
15:0 iso	54,30	58,10	30,00	48,80					16,35	17,60			1,82	9,41	1,03	2,37	9,72	9,05		
15:0 anteiso	45,70	40,50	18,00	18,10					50,47	54,32			83,56	72,45	60,75	58,92	59,71	53,65		
15:0 2OH					48,84	34,12														
15:0 iso 3OH																				
15:0			0,00	0,70	0,00	0,89	0,19	0,94												
16:1 cis 10 bzw. 16:1 trans 9	0,00	0,90																		
16:1 cis 9			35,40	10,00			44,62	31,70			30,22	16,31							29,26	13,88
16:1 cis 11																				
16:1 c/t 5											0,32	0,00								
16:1 iso 5									0,13	0,00										
16:1 cis 7			3,30	0,80																
16:0 iso 2OH																				
16:0 3OH																				
16:0 iso			0,00	0,60					0,32	0,44			0,00	1,17	18,46	21,76	10,03	14,27		
16:0 10 oder 11 methyl																				
16:0			3,20	7,90	16,02	32,73	18,01	31,29	0,14	0,53	5,94	26,54	0,00	0,59					6,57	28,29
17:1 iso cis 9			1,00	2,50																
17:1 iso cis 6 bzw. cis 9					0,08	0,21	0,14	0,22			0,00	0,68							0,35	0,18
17:1 iso 5									0,71	0,00										
17:1 (iso?) 10																				
17:1 anteiso cis 5									0,75	0,00										
17:0 iso 3OH																				
17:0 cyclo					1,12	10,85	1,02	11,52												
17:0 iso			0,60	3,00					0,78	2,50			0,00	2,02	0,00	0,37	0,25	2,02		
17:0 anteiso									3,46	4,78			14,62	13,68	12,05	16,63	11,16	21,00		
17:0					0,00	0,80	0,12	0,80			0,00	0,45								
17:0 10 methyl																				
18:1 cis 7																				
18:1 cis 9											44,27	35,98							44,27	38,29
18:1 cis 11			0,70	0,70	16,28	10,08	23,35	9,72			5,94	5,34							6,28	6,28
18:0					0,00	0,21			0,00	0,11	0,00	0,46	0,00	0,40					0,00	0,62
18:0 10 methyl																				
19:0 cyclo 2OH																				
19:1 cis 7																				
19:0 cyclo 11-12					0,00	0,11														

	J79		J82		J84		J85		J86		J87		J88		J89		J90			J91		FFL1		Iso 1/11		
	10°C	10°C	10°C	10°C	10°C	10°C	10°C	10°C	10°C	10°C	10°C	10°C	10°C	10°C	10°C	30°C	30°C	30°C	30°C	30°C	30°C	30°C	30°C	30°C	30°C	30°C
Rt 4,018 (Aldehyd?)					1,83	2,61					3,02	12,50	2,67	2,57	5,53	5,55	4,26	3,11	2,28	0,00						
10:0 3 methoxy											1,08	0,82														
10:0 3OH											4,64	1,07														
10:0																				0,17	0,64					
11:0 iso																										
11:0 anteiso																										
11:0 3OH											4,30	1,69														
12:0											2,28	1,27														
12:0 cis 5					3,76	5,25							2,45	2,36	0,35	2,13	0,27	3,32	2,13	0,75						
12:0 2OH																										
12:0 3OH											3,13	0,00								0,14	0,57					
13:0					0,15	0,00			0,53	0,00										0,21	0,55					
13:0 iso																										
13:0 anteiso											0,45	0,00														
13:0 iso 3OH									0,29	0,64	5,35	0,00														
14:0 iso																										
14:0 3OH																										
14:1 trans 2	10,50	0,00									3,30	0,00	0,62	0,60			0,18	1,20								
14:0									1,00	5,77							0,09	0,14								
15:0 iso	17,65	12,20	0,67	9,60					98,20	81,51			6,07	5,84	1,12	2,82	2,84	5,20	0,00	0,20	8,30	5,63	5,58	3,62		
15:0 anteiso	49,96	53,29	85,68	78,96																	84,87	67,77	85,70	67,65		
15:0 2OH																										
15:0 iso 3OH											0,00	0,82														
15:1 cis 5											0,66	0,00														
15:1 cis 10																										
15:0																										
16:1 cis 10 bzw.													0,50	0,48					0,15							
16:1 cis 9											26,22	11,05														
16:1 cis 11					62,16	43,51							28,25	27,16	47,12	28,50	48,45	30,64	48,29	27,95						
16:1 c/t 5																										
16:1 iso 5																										
16:1 cis 7																										
16:0 iso 2OH											2,90	0,45														
16:0 3OH									0,00	2,79																
16:0 iso	15,31	15,21	0,00	0,15																						
16:0 10 oder 11											0,00	0,91														
16:0		0,27	0,00	0,23							18,79	41,82									0,00	1,02	0,00	0,33		
17:1 iso cis 9					7,53	26,17							54,51	52,41	39,67	50,48	27,39	45,33	26,16	61,05						
17:1 iso 5																										
17:1 (iso?) 10																										
17:1 anteiso cis 5																										
17:0 iso 3OH																										
17:0 cyclo																										
17:0 iso	0,39	1,82	0,00	1,05					0,00	9,29					0,00	4,35	0,00	4,93	0,56	5,71	0,00	0,42	0,00	0,14		
17:0 anteiso	6,58	17,69	13,34	9,62																	6,83	25,01	8,73	27,94		
17:0																					0,00	0,24	0,00	0,32		
17:0 10 methyl													0,46	0,44			0,00	0,12								
18:1 cis 7																										
18:1 cis 9					13,15	15,78																				
18:1 cis 11											13,36	2,96														
18:1 trans 9 bzw.					11,42	6,66							4,50	4,32	6,19	6,47	16,58	5,85	19,82	1,42						
18:0			0,00	0,26																						
19:0 cyclo 11-12																				0,16	0,00					
sonstige											10,53	24,63														

Tabelle 16: Ergebnisse des API 20E-Test von Isolat J22, *P. africanus* DSM12126^T, *P. heparinus* DSM2366^T und *P. panaciterrae* LMG23400^T

+: Positive Reaktion; - : negative Reaktion

	Isolat J22	<i>P. africanus</i> DSM12126 ^T	<i>P. heparinus</i> DSM2366 ^T	<i>P. panaciterrae</i> LMG23400 ^T
ONPG	+	+	+	+
ADH	-	-	-	-
LDC	-	-	-	-
ODC	-	+/-	-	-
CIT	-	-	-	-
H ₂ S	-	-	-	-
URE	-	-	-	-
TDA	-	-	-	-
IND	-	-	-	-
VP	+	+	+	+
GEL	-	-	-	-
GLU	-	-	+	+
MAN	-	-	-	-
INO	-	-	-	-
SOR	-	-	-	-
RHA	-	-	-	-
SAC	-	-	-	-
MEL	-	-	-	-
AMY	-	-	-	-
ARA	-	-	-	-
OX	+	+	+	+
NO ₂	-	-	-	-
N ₂	-	-	-	-

Tabelle 17: Ergebnisse des API 20E-Test von Isolat J22, *P. africanus* DSM12126^T, *P. heparinus* DSM2366^T und *P. panaciterrae* LMG23400^T

++: Stark positive Reaktion; +: schwach positive Reaktion; - : negative Reaktion

	Isolat J22	<i>P. panaciterrae</i> DSM 23400 ^T	<i>P. africanus</i> DSM12126 ^T	<i>P. heparinus</i> DSM2366 ^T
Kontrolle	-	-	-	-
Glycerin	-	-	-	-
Erythriol	-	-	-	-
D-Arabinose	+	++	++	++
L-Arabinose	-	++	+	++
D-Ribose	-	-	-	-
D-Xylose	-	++	-	++
L-Xylose	-	-	-	-
D-Adonitol	-	-	-	+
Methyl-βD- Xylopyranosid	-	+	-	-
D-Galactose	-	++	+	++
D-Glucose	+	++	+	++
D-Fructose	-	++	-	++
D-Mannose	+	++	+	++
L-Sorbose	-	-	-	-
L-Rhamnose	-	-	-	++
Dulcitol	-	-	-	-
Inositol	-	-	-	-
D-Mannitol	-	-	-	++
D-Sorbitol	-	-	-	++
Methyl-αD- Mannopyranosid	-	++	-	+
Methyl-αD- Glucopyranosid	-	++	+	++
N-AcetylGlucosamin	-	++	+	++
Amygdalin	+	++	-	+
Arbutin	-	++	-	+
Esculin Eisensubstrat	++	++	++	++
Salicin	-	++	-	+
D-Cellobiose	+	++	+	++
D-Maltose	+	++	+	++
D-Lactose (bovin)	+	++	+	++
D-Melbiose	-	++	+	++
D-Saccharose	-	++	+	++
D-Trehalose	+	++	+	++
Inulin	-	+	-	-
D-Melezitose	-	+	-	-
D-Raffinose	-	++	-	+
Amidon	+	++	-	-
Glycogen	-	-	-	-
Xylit	-	-	-	-
Gentibiose	+	+	+	+
D-Turanose	-	++	+	++
D-Lyxose	-	-	-	-
D-Tagatose	-	-	-	-
D-Fucose	-	-	-	-
L-Fucose	+	+	+	+
D-Arabitol	-	-	-	-
L-Arabitol	-	-	-	-
Kaliumgluconat	-	-	-	-
Kalium-2-Ketogluconat	-	-	-	-
Kalium-5-Ketogluconat	-	-	-	-

Tabelle 18: Ergebnisse des Biolog-GN2 Testes von Isolat J22, *P. africanus* DSM12126^T, *P. heparinus* DSM2366^T und *P. panaciterrae* LMG23400^T

++: Stark positive Reaktion; +: schwach positive Reaktion; - : negative Reaktion

	Isolat J22	<i>Pedobacter panaciterrae</i> LMG23400T	<i>Pedoabacter africanus</i> DSM12126T	<i>Pedobacter heparinus</i> DSM2366T
a-Cyclodextrin	+	++		+
Dextrin	++	++	+	++
Glycogen				
Tween 40	++		+	++
Tween 80	++			+
N-Acetyl-D-Galactosamin	++	+		++
N-Acetyl-D-Glucosamin	++	++	++	++
Adonitol				+
L-Arabinose	+	+		+
D-Arabitol				
D-Cellobiose	++	++	++	++
i-Erythritol				
D-Fructose	++	++		++
L-Fructose	++	+		+
D-Galactose	++	++	+	++
Gentiobiose	++	++	+	++
a-D-Glucose	++	++	++	++
M-Inositol				
a-D-Lactose	++	++	+	++
Lactulose	++	++		++
Maltose	++	++	+	++
D-Mannitol				++
D-Mannose	++	++	+	++
D-Melibiose	++	++		+
β-Methyl-D-Glucoside	++	++		++
D-Psicose				
d-Raffinose		++		+
L-Rhamnose				
D-Sorbitol				++
Sucrose	+	++		+
D-Trehalose	++	++		+
Turanose	++	++	+	+
Xylitol				
Methyl-Pyruvat	++	+	+	++
Mono-methyl-Succinat	+		+	++
Acetic acid	++		+	++
cis-Aconitic-acid		++		
Citric acid		+		
Formic acid	+			+
D-Galactonic acid lactone		+		+
D-Galacturonic acid				
d-Gluconic acid		+		
D-Glucosaminic acid		++		
D-Glucuronid acid	+	+		+
a-hydroxy Butyric acid	++			+
β-Hydroxy-Butyric acid			+	
g-Hydroxy Butyric acid	+			
p-Hydroxy Phenylacetic acid				
Itaconic acid	++			
a-keto Butyric acid	++			
a-Keto Glutaric acid				
a-Keto Valeric acid	++		+	+
D,L-Lactic acid	++	+	+	++
Malonic acid		+		
Propionic acid	+			
Quinic acid				
D-Saccharic acid	+			
Sebacic acid				
Succinic acid			+	+
Bromo succinic acid				
succinamic acid				+

Glucuronamide				
L-Alaninamide	++			+
D-Alanine	++			
L-Alanine	++	+		+
L-Alanyl-glycine	++	+	+	+
L-Asparagine	++			+
L-Aspartic acid	++			
L-Glutamic acid	++	+	+	++
Glycyl-L-Aspartic acid	++		+	+
Glycyl-L-Glutamic acid	++		+	+
L-Histidine				
Hydroxy-L-Proline				
L-Leucine	++		+	
L-Ornithine	++			+
L-Phenylalanine	+			
L-Proline	++		+	
L-Pyroglutamic acid				
D-Serine				
L-Serine	++			+
L-Threonine	++	+	+	++
D,L-Carnitine	+		+	+
g-Amino Butyric acid			+	
Urocanic acid	++			
Inosine				
Uridine				+
Thymidine	++			
Phenylethylamine	+			
Putrescine				
2-Aminoethanol				
2,3,-Butanediol				
Glycerol	++			+
D,L- α -Glycerol phosphate	++			+
Glucose-1-phosphate	+		+	+
Glucose-6-phosphate	+		+	+

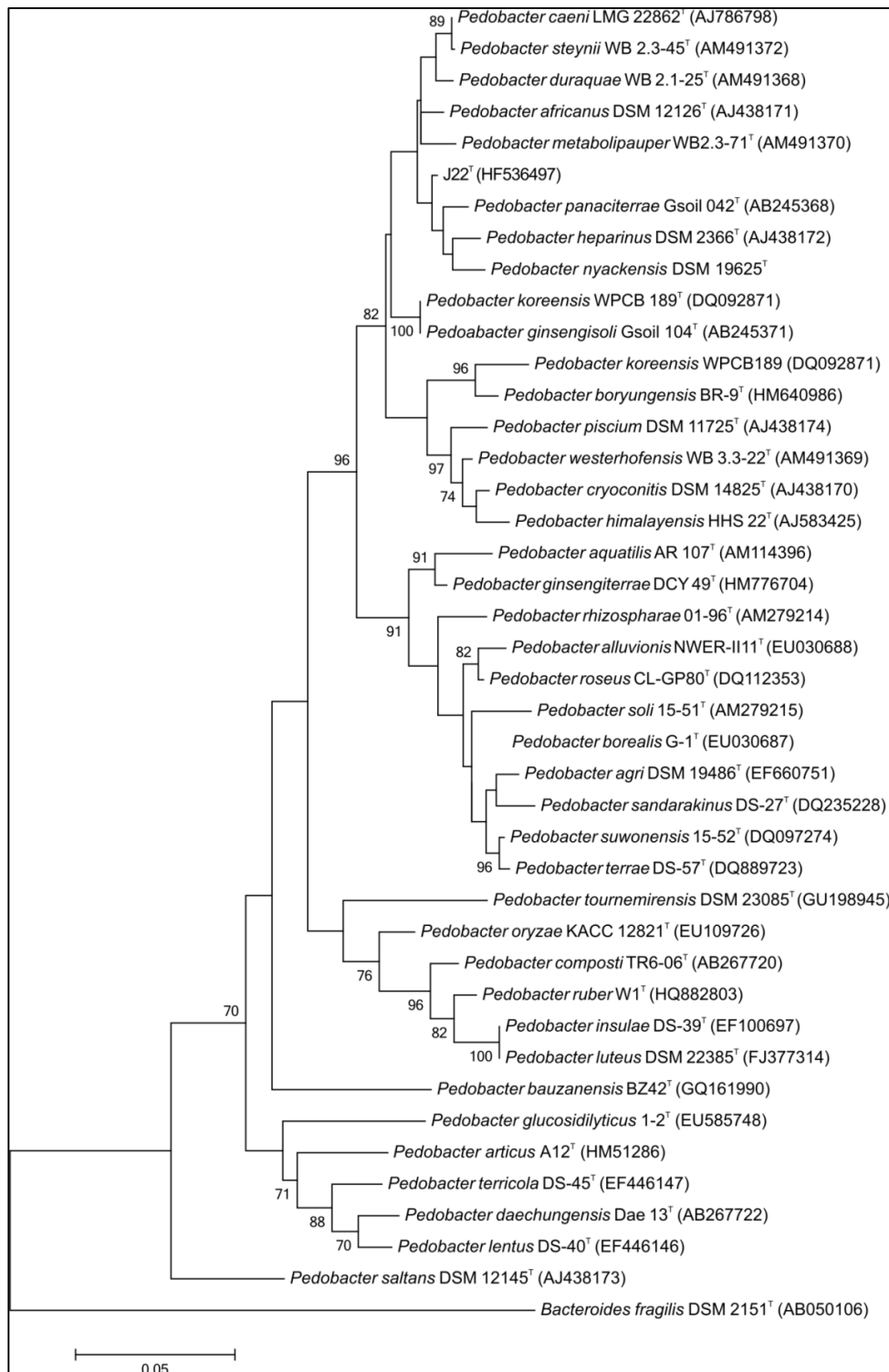


Abbildung 41: Phylogenetischer Stammbaum mit Maximum-Likelihood-Methode der 16S rRNA Gensequenzen von Isolat J22 in Relation zu 40 beschriebenen *Pedobacter* Spezies. *Bacteroides fragilis* DSM2151^T dient als Außenseiter. „Bootstrap“-Werte $\geq 70\%$ sind als Zahl gekennzeichnet. Der Skalierungsbalken entspricht einem Sequenzunterschied von 0,05%.

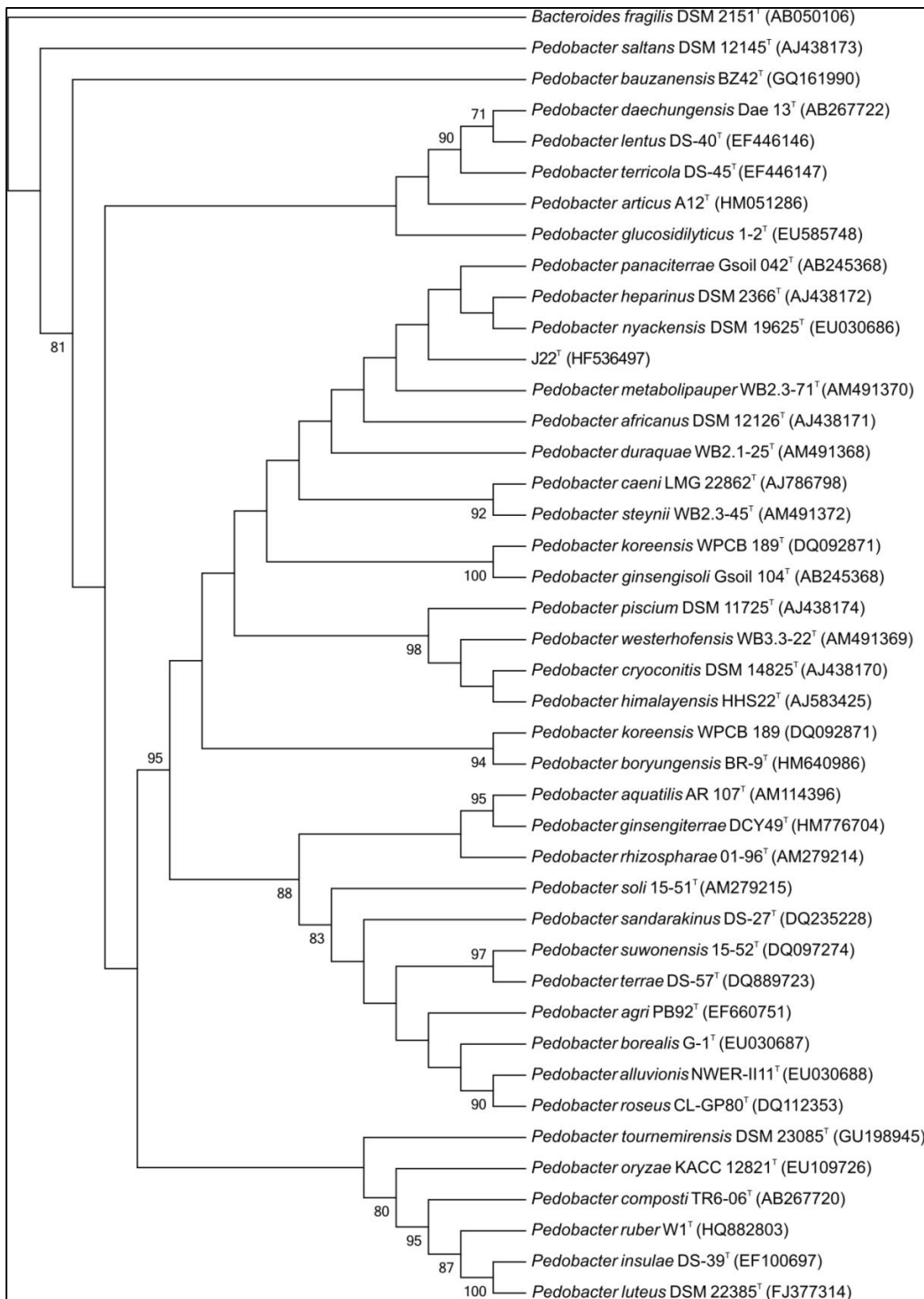


Abbildung 42: Phylogenetischer Stammbaum mit Maximum-Parsimony-Methode der 16S rRNA Gensequenzen von Isolat J22 in Relation zu 40 beschriebenen *Pedobacter* Spezies. *Bacteroides fragilis* DSM2151^T dient als Außenseiter.

8. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich während der letzten Jahre mit Rat und Tat unterstützt haben:

Als erstes gilt mein großer Dank Prof. Dr. André Lipski für die Bereitstellung des Themas, das entgegengebrachte Vertrauen und die wissenschaftliche Betreuung. Außerdem möchte ich mich bei ihm für das Ermöglichen mehrerer Kongressteilnahmen zur Veröffentlichung der Studienergebnisse und natürlich für die Unterstützung bedanken.

Herr Prof. Dr. Andreas Schieber möchte ich herzlich für die Übernahme des Korreferats danken.

Ein besonders herzlicher Dank gilt Eva Meyer. Bei Ihr möchte ich von Herzen für die enorme Unterstützung und Hilfsbereitschaft, all die vielen schönen Pausen und die unzähligen Gespräche während aller Höhen und Tiefen bedanken. Gleiches gilt für Mareike Weber. Bei Ihr möchte ich mich für ihre (vor allem im Endspurt) enorme Unterstützung in allen Bereichen der Arbeit, die unzähligen wissenschaftlichen und nicht-wissenschaftlichen Gespräche 😊 und das Korrekturlesen der Arbeit danken. Dieser Dank gilt natürlich auch Beate Silkens.

Frau Paula Nöthen danke ich für die schöne Zusammenarbeit und die vielen netten und lustigen Gespräche.

Ich danke allen im Laufe der Zeit wechselnden Mitgliedern meiner Arbeitsgruppe für die freundschaftliche und amüsante Zusammenarbeit. Ein besonders Dankeschön gilt hierbei Nina Müller, Nicole Breuer, Rommy Schmidt, Sandra Szczepanski, Alina Meyer, Jan Sieber, Daniela Reekers, Charlotte Weiß, Jonas Verbeek, Julian Weber, Caroline Fritsch, Dorothee Murr, Marina Jacobsen und Waldemar Seel.

Herrn Dr. Benno Zimmermann danke ich für seine hilfreichen Ratschläge bei der Carotinoidbestimmung.

Ich danke allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Ernährungs- und Lebensmittelwissenschaften und dem Institut für Mikrobiologie und Biotechnologie.

Ganz zum Schluss möchte ich mich bei meiner Familie und vor allem bei meinem Mann Marcus für die unendliche, liebevolle Unterstützung in allen Lebenslagen und Euren festen Glaube an mich und meine Fähigkeiten bedanken.