

Aus dem Department für Pathobiologie der  
Veterinärmedizinischen Universität Wien

Institut für Mikrobiologie

(Leiterin: Univ.-Prof. Dipl.-Ing. Dr. rer. Nat. Monika Ehling-Schulz)

**Phänotypische und genotypische Charakterisierung von  
Mykoplasmen-Isolaten aus Zieseln (*Spermophilus citellus*)**

Diplomarbeit

Veterinärmedizinische Universität Wien

Vorgelegt von

Bernadette Pletzer

Wien, im Dezember 2022

Betreuer:

Priv.-Doz. Dr. med. vet. Joachim Spergser Dipl. ECVM

Department für Pathobiologie

Institut für Mikrobiologie

Veterinärplatz 1, 1210 Wien Österreich

[Joachim.Spergser@vetmeduni.ac.at](mailto:Joachim.Spergser@vetmeduni.ac.at)

# Danksagung

Mein Dank gilt im Besonderen Priv.-Doz. Dr.med.vet. Dipl.ECVM Joachim Spergser für die Betreuung meiner Diplomarbeit und den mir durch ihn zur Verfügung gestellten Freiraum, der mir die Möglichkeit zu meiner Weiterentwicklung gegeben hat.

Weiters danke ich Mag.rer.nat Martina Zimmermann für die freundliche und geduldige Unterstützung bei meinen Laborarbeiten.

Besonders erwähnen will ich auch MSc. BSc. Anna Korath und Michael Steinbrecher, die stets für meine Anliegen offen waren.

Ich danke allen MitarbeiterInnen des Teams des Instituts der Mikrobiologie an der Veterinärmedizinischen Universität Wien, ohne die ein reibungsloser Arbeitsablauf nicht möglich wäre.

# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	- 1 -
2	Literaturrecherche .....	- 2 -
2.1	Europäischer Ziesel ( <i>Spermophilus citellus</i> ) .....	- 2 -
2.2	Mykoplasmen .....	- 3 -
2.2.1	Taxonomie .....	- 3 -
2.2.2	Allgemeine Eigenschaften.....	- 4 -
2.3	Mykoplasmen bei Zieseln.....	- 5 -
3	Material und Methode.....	- 6 -
3.1	Mykoplasmen-Stämme.....	- 6 -
3.1.1	Mykoplasmen-Isolate .....	- 6 -
3.1.2	Mykoplasmen-Vergleichsstämme .....	- 7 -
3.2	Kultivierung von Mykoplasmen.....	- 7 -
3.3	Genotypische Charakterisierung .....	- 8 -
3.3.1	DNA-Extraktion .....	- 8 -
3.3.2	PCR.....	- 9 -
3.3.3	Amplifikation des 16S-rRNA-Gens.....	- 10 -
3.3.4	Amplifikation der 16S-23S-intergenetischen-Spacer-Region.....	- 11 -
3.3.5	Amplifikation eines <i>rpoB</i> -Genfragments.....	- 11 -
3.3.6	Agarose-Gelelektrophorese .....	- 12 -
3.3.7	Aufreinigen der PCR-Produkte.....	- 13 -
3.3.8	Phylogenetische Verwandtschaftsanalyse .....	- 13 -
3.4	Phänotypische Charakterisierung .....	- 14 -
3.4.1	Koloniemorphologie .....	- 14 -
3.4.2	Filtration .....	- 14 -

3.4.3	Wachstumstemperatur und Sauerstoffanforderungen .....	- 15 -
3.4.4	Digitonin-Sensitivität.....	- 15 -
3.4.5	Enzymatische Aktivität .....	- 15 -
3.4.6	Glukose-Fermentation und Arginin-Hydrolyse .....	- 16 -
3.4.7	Urea-Hydrolyse .....	- 17 -
3.4.8	Reduktion von Tetrazoliumchlorid und Kaliumtellurit .....	- 17 -
3.4.9	Elektronenmikroskopische Untersuchung .....	- 18 -
3.4.10	MALDI-TOF Massenspektrometrie .....	- 18 -
3.4.11	Proteinanalyse .....	- 19 -
3.4.12	SDS-PAGE.....	- 19 -
3.4.13	Silberfärbung.....	- 21 -
4	Ergebnisse.....	- 22 -
4.1	Genotypische Charakterisierung .....	- 22 -
4.1.1	Phylogenetische Verwandtschaftsanalyse .....	- 22 -
4.2	Phänotypische Charakterisierung .....	- 25 -
4.2.1	Koloniemorphologie .....	- 25 -
4.2.2	Filtration .....	- 26 -
4.2.3	Wachstumstemperatur und Sauerstoffanforderungen .....	- 28 -
4.2.4	Digitonin-Sensitivität.....	- 28 -
4.2.5	Enzymatische Aktivitäten .....	- 29 -
4.2.6	Glukose-Fermentation und Arginin-Hydrolyse .....	- 29 -
4.2.7	Urea-Hydrolyse .....	- 29 -
4.2.8	Reduktion von Tetrazoliumchlorid und Kaliumtellurit .....	- 29 -
4.2.9	Elektronenmikroskopische Untersuchung .....	- 30 -
4.2.10	MALDI-TOF Massenspektrometrie .....	- 31 -
4.2.11	Proteinanalyse, SDS-PAGE und Silberfärbung .....	- 33 -
5	Diskussion .....	- 36 -

6	Zusammenfassung .....	- 39-
6.1	Zusammenfassung.....	- 39-
6.2	Summary.....	- 40-
7	Abkürzungsverzeichnis.....	- 42-
8	Literaturverzeichnis .....	- 43-
9	Tabellen- und Abbildungsverzeichnis.....	- 47-
9.1	Tabellenverzeichnis.....	- 47-
9.2	Abbildungsverzeichnis.....	- 47-

# 1 Einleitung

Die bislang aus dem Europäischen Ziesel isolierten Mykoplasmen-Stämme können keiner valide beschriebenen Mykoplasmen-Art zugeordnet werden. Erst die genotypische und phänotypische Charakterisierung der gewonnenen Mykoplasmen-Isolate ermöglicht eine umfassende Eigenschaftsanalyse und die Abgrenzung von anerkannten Mykoplasmen-Arten.

Ziel dieser Arbeit war es daher, 23 Mykoplasmen-Isolate, die aus dem Respirationstrakt des Europäischen Ziesels (*Spermophilus citellus*) isoliert werden konnten, auf ihre genotypischen und phänotypischen Charakteristika zu untersuchen.

Zur genotypischen Charakterisierung wurde die phylogenetische Positionierung der Erregerisolate durch 16S rRNA-Gen, 16S-23S intergenische Spacer- und partielle *rhoB*-Gen-Sequenzanalyse bestimmt.

Zur phänotypischen Charakterisierung der Erregerisolate wurden ihre morphologischen (Kolonie- und Zellmorphologie) und kulturellen Eigenschaften bestimmt, sowie biochemische Charakteristika, Proteinexpressionsmuster und Protein-Massen-Fingerprints ermittelt.

Insgesamt lieferten die Untersuchungsergebnisse eine solide Basis für die Beschreibung einer neuen Spezies innerhalb der Gattung *Mycoplasma*.

## 2 Literaturrecherche

### 2.1 Europäischer Ziesel (*Spermophilus citellus*)

Der Europäische Ziesel (*Spermophilus citellus*) gehört zur Ordnung der Nagetiere (*Rodentia*), zur Unterordnung der Hörnchenverwandten (*Sciuromorpha*), zur Familie der Hörnchen (*Sciuridae*), zur Unterfamilie der Erdhörnchen (*Xerinae*) und zur Gattung Ziesel (*Spermophilus*) [Ramos-Lara et al. 2014].

Europäische Ziesel sind mittelgroße, tagaktive Nagetiere der Familie der Hörnchen. Sie besitzen einen lang gestreckten Körper mit kurzen Beinen, kleine Ohren und haben ein gelbgraues Fell. Die Größe des bis zu sieben Zentimeter langen, buschigen Schwanzes macht 20-40% der Kopf-Körperlänge aus.

Ihre Hauptnahrung besteht aus Samen, Getreidekörnern, Blüten, Pflanzen und Kräutern, aber auch Insekten und verschiedenste Evertebraten. Die Ziesel besitzen, wie alle Nagetiere kleine Backentaschen, welche zur Aufbewahrung von Nahrung genutzt wird. Dauerhaft wachsende Schneidezähne im Ober- und Unterkiefer findet man ebenfalls bei diesen Nagetieren [Niethammer und Krapp 1978].

Zu den Feinden der Europäischen Ziesel gehören sowohl Greifvögel, Füchse, Iltisse, Marder, Hunde und Katzen, als auch der Mensch [Niethammer und Krapp 1978].

Europäische Ziesel bewohnen meist Grasland in Mittel- und Südosteuropa. Die meisten Tiere in Mitteleuropa sind in Gebieten unter 950 Meter angesiedelt. Dort bevorzugen sie unbebaute und offene Grasflächen mit einer niedrigen Grasvegetation. In den südosteuropäischen Ländern schaffen es die Europäischen Ziesel auf Höhen von bis zu 2500 Meter [Niethammer und Krapp 1978].

Die Nagetiere leben in Kolonien in gemeinsamen Bauten unter der Erde. Diese werden als Schutz- und Ruheort verwendet. Die Paarungszeit des Europäischen Ziesel beginnt im Frühjahr von März bis April. In dieser Zeit dienen die Erdbauten zum Großziehen der Jungen. Ziesel-Männchen pflanzen sich normalerweise ab dem zweiten Lebensjahr fort. Ziesel-Weibchen sind im Gegensatz schon ab dem ersten Lebensjahr paarungsaktiv und haben maximal einen Wurf pro Jahr. Nach zirka 25 Tagen Trächtigkeit bringt das Ziesel-Weibchen 3 bis 7 Jungtiere zur Welt, welche nach ungefähr einem Jahr eigenständig werden. Spätestens im Oktober gehendie Tiere in den Winterschlaf, welcher bis zum nächsten Frühjahr andauert [Millesi und Hoffmann 2008].

In Österreich bewohnen die Europäischen Ziesel die Bundesländer Wien, Burgenland und Niederösterreich. Durch die Intensivierung der Landwirtschaft und den Bau von neuen Wohngebieten in Wien sind die Nagetiere auf vereinzelte Rückzugsgebiete in der Stadt angewiesen [Hoffmann 2011].

Durch schwindende Lebensräume und maßgebliche Veränderungen in der Landwirtschaft über die letzten Jahrzehnte sind Europäische Ziesel heute in jedem Gebiet, welches sie bewohnen, stark vom Aussterben bedroht [Ramos-Lara et al. 2014].

Europäische Ziesel stehen europaweit mit der Richtlinie 92/43/Europäische Wirtschaftsgemeinschaft (EWG) in der Flora- und Fauna-Richtlinie unter Schutz. Sie sind nicht nur auf der Roten Liste der IUCN verzeichnet, sondern werden auch in Österreich in der Roten Liste als stark gefährdet eingestuft.

Über Krankheitserreger beim Ziesel ist bis zum heutigen Tag wenig bekannt. Durch die geringe Populationszahl der Europäischen Ziesel und die Tatsache, dass sie dadurch unter Naturschutz stehen, erschwert die Probenentnahme und den Zugang zu brauchbarem Forschungsmaterial.

## **2.2 Mykoplasmen**

### **2.2.1 Taxonomie**

Mykoplasmen sind Bakterien, welche zum Phylum *Mycoplasmatota* und zur Klasse der *Mollicutes* gehören. Sie sind zellwandlos und gelten als die kleinsten, sich selbstständig vermehrenden Bakterien. Die am häufigsten bei Wirbeltieren gefundenen Mykoplasmen sind der Ordnung *Mycoplasmatales*, Familie der *Mycoplasmatatacae* zugehörig, die wiederum in die Gattungen *Mycoplasma* und *Ureaplasma* unterteilt wird [Brown 2010, Tully et al 1993].

## 2.2.2 Allgemeine Eigenschaften

Mykoplasmen sind 0,3-0,8 µm große, pleomorphe Bakterien, die meist eine kokkenähnliche, aber auch birnen-, flaschen- und fadenförmige Zellmorphologie aufweisen können [Weisburg et al 1989, Sirand-Pugnet et al. 2007]. Das wichtigste Unterscheidungsmerkmal zu anderen Bakterien ist das Fehlen einer Zellwand. Vergleichende phylogenetische Untersuchungen zeigten, dass Mykoplasmen sich evolutionär aus der *Bacillus-Lactobacillus-Streptococcus*-Gruppe der *Bacillota* (ehemals *Firmicutes*) entwickelt haben [Woese et al. 1980, Woese 1987].

Mykoplasmen können weder Peptidoglykan noch dessen Vorstufen synthetisieren. Dieses Merkmal macht sie daher unempfindlich gegenüber Antibiotika die in die Zellwandsynthese (z.B. Beta-Laktam-Antibiotika) eingreifen. Die optimale Wachstumstemperatur für Mykoplasmen liegt bei endothermen Wirten bei 37°C [Sirand-Pugnet et al. 2007]. Bei ektothermen Tieren, wie Fische oder Reptilien, wachsen die Bakterien am besten bei 20°C bis 28°C. Mykoplasmen sind entweder aerob oder fakultativ anaerob. Werden Mykoplasmen auf festen Nährboden kultiviert, bilden sich kleine Kolonien (< 1 mm), die typischerweise eine Spiegeleiform aufweisen.

Zur Gattung *Mycoplasma* gehören mehr als 150 Arten. Viele davon sind pathogen und für verschiedenste Erkrankungen und Krankheitsbilder bei Menschen und Tieren verantwortlich. Obwohl Mykoplasmen ubiquitär vorkommen, weisen die meisten Mykoplasmen-Arten dennoch eine hohe Wirtsspezifität auf [Razin 1981]. Meist besiedeln sie im Wirt die Schleimhäute des Atmungs- und Urogenitaltraktes, können aber auch aus Gelenken, den Augen, den serösen Häuten und der Milchdrüse isoliert werden [Levisohn und Kleven 2000].

Die Genome der Mykoplasmen weisen im Vergleich zu anderen Bakterien eine geringe Größe von 580 bis 1360 Kilobasen und einen geringen Guanin- und Cytosin-Gehalt von 23 bis 40 Mol% auf [Sirand-Pugnet et al. 2007]. Aufgrund ihres kleinen Genoms besitzen Mykoplasmen eine begrenzte Biosynthesefähigkeit und sind dadurch erheblich von der Nährstoffzufuhr aus ihrer Umgebung abhängig. Somit ist ihre in vitro Kultivierung um einiges schwieriger und aufwendiger als die Kultur von anderen Bakterien [Razin 1981]. Daher sind für die in vitro Kultivierung von Mykoplasmen reichhaltige Nährmedien mit Tierseren- und Hefeextrakt-Zusätzen erforderlich [Masover und Hayflick 1985]. Außerdem werden den Kulturmedien Hemmstoffe beigefügt, die das Wachstum der schneller wachsenden, zellwandtragenden Bakterien verhindern sollen [Selbitz 2002].

Adenin-Triphosphat (ATP) dient den Mykoplasmen als vorrangige Energiequelle, welches durch Substratkettenphosphorylierung gewonnen wird [Wieslander und Rosen 2002]. Viele Mykoplasmen-Arten sind in der Lage Kohlenhydrate, wie Glukose über Fermentationsprozesse für die Energiegewinnung zu verstoffwechseln [Miles 1992, Razin 1981]. Bei nicht-fermentativen Mykoplasmen wird durch Hydrolyse von Arginin Energie bereitgestellt. Bei einigen wenigen Mykoplasmen-Arten, die weder Kohlenhydrate noch Arginin verstoffwechseln können, wird die benötigte Energie durch Oxidierung von organischen Säuren, wie Pyruvat oder Laktat, gewonnen. Eine besondere Stellung nehmen Ureaplasmen ein, bei denen ausschließlich durch die Hydrolyse von Harnstoff ATP bereitgestellt wird.

## 2.3 Mykoplasmen bei Zieseln

Im Jahre 1977 gelang es erstmalig, Mykoplasmen aus zwei Richardson-Zieseln (*Urocitellus richardsonii*) in Abstrichen des oberen Atmungstrakts und Gewebeproben der Lunge, Milz und Leber nachzuweisen [Langford 1977]. Im Jahr darauf wurden die neuentdeckten Mykoplasmen als neue Mykoplasmen-Art beschrieben, *Mycoplasma citelli*. Die isolierten Mykoplasmen-Stämme waren in der Lage verschiedene Kohlenhydrate, darunter auch Glukose, zu fermentieren. Weiters konnte eine optimale Wachstumstemperatur von 30°C bis 37°C festgestellt werden. Die Isolate unterschieden sich in ihren serologischen und morphologischen Eigenschaften von jenen der damals bekannten Mykoplasmen-Arten [Rose et al. 1978].

## 3 Material und Methode

### 3.1 Mykoplasmen-Stämme

#### 3.1.1 Mykoplasmen-Isolate

Im Zuge dieser Diplomarbeit wurden 23 nicht identifizierbare Mykoplasmen-Isolate analysiert. Diese Isolate stammen ausschließlich aus dem Atmungstrakt von Europäischen Zieseln.

Tabelle 1: Mykoplasmen-Isolate (Stammnummer, Jahr der Isolierung und Habitat)

Stammnummer	Jahr der Isolierung	Habitat
35d	2014	Lunge
5313d	2017	Lunge
1579d	2015	Lunge
15h	2015	Lunge
Z3795d	2015	Lunge
3686h	2015	Lunge
23h	2015	Lunge
28h	2015	Lunge
12d	2015	Lunge
3686d	2015	Lunge
15d	2015	Lunge
1579h	2015	Lunge
97	2013	Lunge
5438d	2017	Lunge
140h	2016	Lunge
ac959	2019	Trachea
129d	2016	Lunge
2821h	2018	Lunge
5389bh	2017	Lunge
5389ah	2017	Lunge
5395ah	2017	Lunge
5395bd	2017	Lunge
5395bh	2017	Lunge

### 3.1.2 Mykoplasmen-Vergleichsstämme

Für Vergleichsanalysen wurden die Typstämme der vier phylogenetischen nächstverwandten Mykoplasmen-Arten, nämlich *Mycoplasma citelli* RG-2C<sup>T</sup>, *Mycoplasma columborale* MMP-4<sup>T</sup>, *Mycoplasma cricetuli* CH<sup>T</sup> und *Mycoplasma felis* CO<sup>T</sup>, kultiviert und in die phänotypische und genotypischen Untersuchungsmethoden miteinbezogen.

## 3.2 Kultivierung von Mykoplasmen

Zur Kultivierung der Mykoplasmen-Isolate und -Stämme wurde jeweils eine kleine Menge der kryokonservierten Kulturen (zirka 10-50 µl) entnommen und auf einer SP4-Agarplatte mithilfe einer Einwegöse ausgestrichen. Die beimpften Agarplatten wurden im Anschluss für mindestens 72 Stunden in einem CO<sub>2</sub>-Brutschrank (7%ige-CO<sub>2</sub>-Atmosphäre) bei 37°C inkubiert.

Nach Koloniebildung wurde je eine Einzelkolonie von den Agar-Kulturen mithilfe steriler Glaspipetten unter stereomikroskopischer Kontrolle gepickt und diese in SP4-Flüssigmedium überführt. Die Flüssigkulturansätze wurden anschließend aerob bei 37°C bis zum Auftreten eines Farbumschlags des Phenolrot-Indikators von rötlich auf orange/gelb (Ansäuerung durch Glukose-Fermentationsprozesse) bebrütet.

Nach Aliquotierung der aus Einzelkolonien gewonnenen Mykoplasmen-Kulturen wurden diese bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

Bei dem verwendeten SP4-Medium handelt es sich um ein komplexes und nährstoffreiches Kulturmedium, welches speziell für die Anzucht schwer kultivierbarer Mykoplasmen entwickelt wurde. Das SP4-Flüssigmedium wurde wie folgt hergestellt:

PPLO Broth (BD Difco™, Österreich)	2,5 g
Tryptone (BD Difco™, Österreich)	7 g
Peptone G (BD Difco™, Österreich)	3,5 g
DNA (Sigma-Aldrich, Österreich)	0,14 g
dH <sub>2</sub> O	700 ml

Nach Einstellung des pH-Werts auf 7,5 wurde das Basismedium für 15 Minuten bei 121°C autoklaviert. Nach Abkühlen auf 50°C wurden folgende Medium-Komponenten hinzugefügt:

Hitze-inaktiviertes Pferdeserum (Biowest, Frankreich)	50 ml
Hitze-inaktiviertes Schweineserum (Biowest, Frankreich)	50 ml
Hitze-inaktiviertes fetales Kälberserum (Biowest, Frankreich)	20 ml
50%ige Glukoselösung (Roth, Deutschland)	7 ml
10x konzentriertes CMLR 1066 (Thermo Scientific Gibco™, Österreich)	35 ml
4%ige Hefeextrakt-Lösung (Oxoid, Österreich)	35 ml
4%ige Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Lösung (Roth, Deutschland)	11 ml
1%ige L-Cystein-Lösung (Sigma-Aldrich, Österreich)	17 ml
Penicillin (Sandoz, Österreich)	1,000,000 I.U.
10%ige Thalliumazetat-Lösung (Sigma-Aldrich, Österreich)	1,4 ml
0,6%ige Phenolrot-Lösung	4 ml

Die SP4-Agarplatten wurden analog zu den SP4-Flüssigmedien hergestellt, mit Ausnahme der Zugabe von 8,5 g Agar Purified (Oxoid, Österreich) nach Einstellung des pH-Werts auf 7,5.

### 3.3 Genotypische Charakterisierung

Durch die genotypische Charakterisierung wurden die genetischen bzw. phylogenetischen Eigenschaften der zu charakterisierenden Mykoplasmen-Isolate erfasst.

#### 3.3.1 DNA-Extraktion

Zur Extraktion von DNA aus den gewonnenen Mykoplasmen-Kulturen wurde das GenElute™ Bacterial Genomic DNA-Kit (Sigma-Aldrich, USA) verwendet.

Um die Isolate für die DNA-Extraktion vorzubereiten, wurden 100 µl der bei -80°C kryokonservierten Mykoplasmen-Kulturen in SP4-Medium überführt und bei 37°C aerob für 24 bis 48 Stunden bebrütet. Im Anschluss wurde 1 ml der SP4-Flüssigkultur für 7 Minuten bei 20.000 x g zentrifugiert, danach der Überstand abpipettiert und die erhaltenen Bakterien-Pellets bei -20°C zwischengelagert.

Zu Beginn der DNA-Extraktion wurden die Pellets bei Raumtemperatur aufgetaut und die im Extraktionskit enthaltenen Filterröhrchen vorbereitet, in dem sie mit 500 µl Filterpräparationslösung befüllt und bei 1200 x g für 1 Minute zentrifugiert wurden. Die aufgetauten Bakterien-Pellets wurden mit 200 µl Resuspensionslösung gelöst und schließlich 200 µl Lyse-Lösung C und 20 µl Proteinase K-Lösung hinzu pipettiert.

Danach wurde das Gemisch bei 70°C für 10 Minuten in einem Thermoblock (Eppendorf AG, Deutschland) inkubiert und anschließend 200 µl 95%iges Ethanol hinzugegeben und für 5 Sekunden gevortext. Das Lysat wurde schließlich in das vorbereitete Filterröhrchen transferiert und bei 6.500 x g für 1 Minute zentrifugiert. Das Filtrat wurde verworfen und im Anschluss die Filtereinheit mit der gebundenen DNA mithilfe zweier Waschdurchgänge mit jeweils 500 µl Waschlösung gereinigt. Der erste Durchgang erfolgte bei 12.000 x g für 1 Minute, der Zweite mit 14.000 x g für 3 Minuten. Bei beiden Waschschritten wurde das Filtrat verworfen. Zum Schluss wurde das Filterröhrchen noch einmal bei 14.000 x g für 1 Minute zentrifugiert, um Restbestände der Waschlösung vollständig zu entfernen. Im letzten Schritt wurde die Filtereinheit in ein neues Röhrchen überführt und 200 µl Elutionslösung hinzugegeben. Nach 5-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde das Röhrchen für 1 Minute bei 12.000 x g zentrifugiert und die extrahierte DNA bei -20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

### 3.3.2 PCR

Zur Herstellung des Mastermix für die PCR wurde die OneTaq® Quick-Load® DNA-Polymerase (New England BioLabs®, USA) mit den entsprechenden Primern (Thermo Scientific, Österreich) (siehe Tab. 3, 4 und 5) gemischt, in die PCR-Röhrchen überführt und die DNA-Templates hinzugefügt. Die PCR wurde in einem Mastercycler® Nexus-Thermocycler (Eppendorf, Deutschland) durchgeführt.

Tabelle 2: Primer (Zielsequenz, Primer ID, Primer-Sequenz und Referenz)

Zielsequenz	Primer ID	Primer-Sequenz	Referenz
<b>16S rRNA-Gen</b>	27f	5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3'	Lane 1991
	1492r	5'-TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T-3'	
<b>16S-23S-intergenische-Spacer-Region</b>	ITSavian-F	5'-CGT TCT CGG GTC TTG TAC AC-3'	Ramirez et al. 2008
	ITSavian-R	5'-CGC AGG TTT GCA CGT CCT TCA TCG-3'	
<b>rpoB-Genfragment</b>	rpoB-F-MYC	5'-AGT TAT CAC AAT TTA TGG ATC AAA-3'	Volokhov et al. 2007
	rpoB-R-MYC	5'-GCT CAH ACT TCC ATT TCH CCA AA-3'	

### 3.3.3 Amplifikation des 16S-rRNA-Gens

Bei allen 23 Mykoplasmen-Isolaten wurde zur phylogenetischen Einordnung das 16S-rRNA-Gen amplifiziert und anschließend mittels Sanger-Sequenzierung (LGC, Berlin) die Sequenzfolge bestimmt.

Tabelle 3: Mastermixansatz für die Vervielfältigung des 16S-rRNA-Gens (Bestandteil und Menge)

Bestandteil	Menge/Isolat
OneTaq	12,5 µl
Vorwärts-Primer 27f	0,5 µl
Rückwärts-Primer 1492r	0,5 µl
DNA	2,5 µl
ddH <sub>2</sub> O	9 µl
Summe des Ansatzes für eine Probe	25 µl

Tabelle 4: Thermozyklische Bedingungen für die Vervielfältigung des 16S-rRNA-Gens (Schritt, Grad, Dauer in Minuten und Zyklen)

Schritt	°C	Dauer in Minuten	Zyklen
Initiale Denaturierung	95	5	1
Denaturierung	94	2	
Annealing	50	1,5	
Elongation	72	5	30
Finale Elongation	72	1	1

### 3.3.4 Amplifikation der 16S-23S-intergenetischen-Spacer-Region

Basierend auf den Ergebnissen der Sequenzanalyse des 16S-rRNA-Gens wurden acht repräsentative Isolate (1579d, ac959, 2821h, 35d, 129d, 3686h, 3686d und 5438d) ausgewählt. Bei diesen Isolaten wurde die 16S-23S-intergenetische-Spacer-Region amplifiziert und ebenfalls eine Sequenzanalyse durchgeführt.

Tabelle 5: Mastermixansatz für die Vervielfältigung der 16S-23S-intergenetische-Spacer-Region (Bestandteil und Menge)

Bestandteil	Menge/Isolat
OneTaq	12,5 µl
Vorwärts-Primer ITSavianF	0,5 µl
Rückwärts-Primer ITSavianR	0,5 µl
DNA	2,5 µl
ddH <sub>2</sub> O	9 µl
Summe des Ansatzes für eine Probe	25 µl

Tabelle 6: Thermozyklische Bedingungen für die Vervielfältigung der 16S-23S-intergenischen-Spacer-Region (Schritt, Grad, Dauer in Minuten und Zyklen)

Schritt	°C	Dauer in Minuten	Zyklen
Initiale Denaturierung	94	0,25	1
Denaturierung	95	0,25	
Annealing	60	0,5	
Elongation	72	2	35
Finale Elongation	72	5	1

### 3.3.5 Amplifikation eines *rpoB*-Genfragments

Zur Bestätigung der phylogenetischen Einordnung der acht repräsentativen Isolate (1579d, ac959, 2821h, 35d, 129d, 3686h, 3686d und 5438d) wurde ein Teilfragment des *rpoB*-Gens amplifiziert und einer Sequenzanalyse unterzogen.

Tabelle 7: Mastermixansatz für die Vervielfältigung des *rpoB*-Genfragments (Bestandteil und Menge)

Bestandteil	Menge/Isolat
OneTaq	12,5 µl
Vorwärts-Primer <i>rpoB</i> -F-MYC	0,5 µl
Rückwärts-Primer <i>rpoB</i> -R-MYC	0,5 µl
DNA	2,5 µl
ddH <sub>2</sub> O	9 µl
Summe des Ansatzes für eine Probe	25 µl

Tabelle 8: Thermozyklische Bedingungen für die Vervielfältigung des *rpoB*-Genfragements (Schritt, Grad, Dauer in Minuten und Zyklen)

Schritt	°C	Dauer in Minuten	Zyklen
Initiale Denaturierung	95	6	1
Denaturierung	95	1	
Annealing	50	1	
Elongation	68	2	45
Finale Elongation	68	5	1

### 3.3.6 Agarose-Gelelektrophorese

Nach Durchführung der PCR wurden die Amplifikate mithilfe der Agarose-Gelelektrophorese sichtbar gemacht. Hierzu wurde ein 2%iges Agarose-Gel (6 g Agarose) (Sigma-Aldrich, Österreich) in 300 ml TBE (TRIS-Borat-EDTA) Pufferlösung (Roth, Germany) angefertigt. Nach Erhitzen wurde das Agarose-Gel in eine Gelkammer mit Geltaschenkamm gegossen und bei Raumtemperatur ausgehärtet. Anschließend wurden je 8 µl der PCR-Produkte in die mittleren Geltaschen pipettiert, während in die erste und letzte Geltasche 4,5 µl eines Molekulargewichtsmarkers (Gene Ruler 100 Base Pair plus DNA Ladder, Thermo Fisher Scientific, Deutschland) hinzugefügt wurden. Das Agarose-Gel wurde im Anschluss in einer Laufkammer (Bio-Rad Laboratories GmbH, Österreich) unter Spannung (220 Volt) für ca. eine Stunde laufen gelassen. Zur Visualisierung der Amplifikationsprodukte wurde das Gel für 20

Minuten in eine Ethidiumbromid-Lösung (2,5 mg/l) (Bio-Rad Laboratories GmbH, Österreich) gelegt und danach überschüssiges Ethidiumbromid durch 5-minütiges Schwenken des Gels in einem Wasserbad wieder entfernt. Die PCR-Produkte wurden schließlich mithilfe des Transilluminators Gel Doc2000 (Bio-Rad Laboratories GmbH, Österreich) sichtbar gemacht und die Gele im systeminternen Datenträger abgespeichert.

### 3.3.7 Aufreinigen der PCR-Produkte

Für die anschließende Sequenzierung wurden die PCR-Produkte vorerst aufgereinigt. Dazu wurden für jedes PCR-Produkt 1,5 µl Exonuclease I (Sigma-Aldrich, Österreich) und 1,5 µl rSAP (Shrimp Alkaline Phosphate) (Sigma-Aldrich, Österreich) in einem Reaktionsgefäß gemischt und 7 µl des PCR-Produkts hinzu pipettiert. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch in einem Mastercycler® Nexus (Eppendorf, Deutschland) unter bestimmten Temperaturbedingungen inkubiert.

Tabelle 9: Thermozyklische Bedingungen für die Aufreinigung der PCR-Produkte (Schritt, Grad und Dauer in Minuten)

Schritt	°C	Dauer in Minuten
1	37	15
2	80	15

Im Anschluss wurde dem aufgereinigten PCR-Produkt 10 µl dH<sub>2</sub>O beigefügt und 13 µl dieser Verdünnung in ein neues Reaktionsgefäß überführt und 2 µl des entsprechenden Primers (Vorwärts- und Rückwärts-Primer) hinzugefügt.

Die Sequenzierung der Amplifikate wurde schließlich von LGC Genomics, Berlin, durchgeführt.

### 3.3.8 Phylogenetische Verwandtschaftsanalyse

Die von LGC Genomics ermittelten und übersandten Sequenzen wurden mit Einträgen der öffentlichen GenBank-Datenbank ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) verglichen. Dafür wurde der BLAST-Algorithmus ([www.blast.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.blast.ncbi.nlm.nih.gov)) verwendet, Sequenzähnlichkeitswerte bestimmt und Einträge der nächstverwandten Mykoplasmen-Arten auf einen lokalen Datenträger gespeichert. Im Anschluss wurden die Sequenzen einem ClustalW-Alignment (MEGA6-

Software-Paket) unterzogen und zweifelhafte Sequenzfolgen manuell bereinigt. Zur Darstellung der phylogenetischen Verwandtschaftsverhältnisse wurden die ausgerichteten Sequenzen (16S rRNA-Gen, 16S-23S intergenische Spacer-Region, partielles *rpoB*-Gen) einer Maximum-Likelihood-Distanzanalyse mit Bootstrapping (1000 Replikationen) unter Verwendung des Kimura-2-Parameter-Substitutionsmodells unterzogen (MEGA6-Software-Paket) und dabei phylogenetische Stammbäume erstellt.

## **3.4 Phänotypische Charakterisierung**

In den Untersuchungen wurden die phänotypischen Eigenschaften der zu charakterisierenden Mykoplasmen-Isolate erfasst.

### **3.4.1 Koloniemorphologie**

Die Koloniemorphologie wurde von allen 23 Mykoplasmen-Isolaten mithilfe eines Stereomikroskops (Olympus, Deutschland) bei 40-fachen Vergrößerung bestimmt. Um die Mykoplasmen-Isolate vorzubereiten, wurden 100 µl der bei -80°C kryokonservierten Mykoplasmen-Kulturen auf eine SP4-Agarplatte ausgestrichen, bei 37°C unter 7%iger-CO<sub>2</sub>-Atmosphäre für 4 Tage bebrütet und die Einzelkolonien schließlich koloniemorphologisch beurteilt.

### **3.4.2 Filtration**

Die Filterbarkeit wurde bei einem repräsentativen Mykoplasmen-Isolat (1579d) getestet. Zur Vorbereitung wurden 100 µl der bei -80°C kryokonservierten Mykoplasmen-Kultur in 3 ml SP4-Medium überführt und bei 37°C aerob für 24 bis 48 Stunden bebrütet. Im Anschluss wurden die Flüssigkulturen unter Einsatz von Spitzen-Membranfilter mit Porengrößen von 450 nm und 220 nm (Braun, Österreich) filtriert. Von den Flüssigkulturen und den Filtraten wurden im Anschluss 100 µl auf SP4-Agarplatten überimpft, bei 37°C und 7%igen CO<sub>2</sub>-Milieu für 4 Tage bebrütet und Wachstumsunterschiede durch Zählung der ausgebildeten Kolonien bestimmt.

### 3.4.3 Wachstumstemperatur und Sauerstoffanforderungen

Die optimale Wachstumstemperatur und die Sauerstoffanforderung wurde bei vier repräsentativen Mykoplasmen-Isolaten (1579d, ac959, 3686d, 3686h) bestimmt. Dafür wurden jeweils 100 µl der bei -80°C kryokonservierten Mykoplasmen-Kulturen in 3 ml SP4-Medium überführt und bei 37°C aerob für 24 bis 48 Stunden bebrütet und anschließend 100 µl der Flüssigkultur auf SP4-Agarplatten ausgeimpft. Die optimalen Wachstumstemperaturen und die Sauerstoffanforderungen wurden durch Bebrütung der Agarplatten unter aeroben, mikroaeroben und anaeroben Bedingungen (letztere unter Einsatz von Gas-Pack-Systemen [BD, Österreich] in Kulturtöpfen) bei unterschiedlichen Temperaturen (15, 23, 28 und 42°C) ermittelt.

### 3.4.4 Digitonin-Sensitivität

Die Digitonin-Sensitivität wurde bei vier repräsentativen Mykoplasmen-Isolaten (1579d, ac959, 3686d, 3686h) zum indirekten Nachweis der Abhängigkeit des Wachstums von Cholesterin und somit zur Differenzierung zwischen der Gattung *Mycoplasma* und *Acholeplasma* überprüft. Hierfür wurden jeweils 100 µl der bei -80°C kryokonservierten Mykoplasmen-Kulturen in 3 ml SP4-Medium überführt und bei 37°C aerob für 24 bis 48 Stunden bebrütet und anschließend 100 µl der Flüssigkultur auf SP4-Agarplatten ausgeimpft. In die Mitte der ausgeimpften SP4-Agarplatten wurde ein Filterplättchen mit einer 1,5%igen Digitonin-Lösung platziert und anschließend für 4 Tage unter 7%iger CO<sub>2</sub>-Atmosphäre bei 37°C bebrütet. Die Digitonin-Sensitivität und somit die Abhängigkeit des Wachstums von Cholesterin wurde durch Ausbildung eines Wachstumshemmhofes rund um das Digitonin-Filterplättchen angezeigt.

### 3.4.5 Enzymatische Aktivität

Zur Bestimmung der enzymatischen Aktivität der Mykoplasmen-Isolate wurde das API-ZYM-Testkit (Biomerieux, Frankreich) verwendet. Dieser Test wurde bei zwei repräsentativen Mykoplasmen-Isolaten (1579d und ac959) und *Mycoplasma citelli* RG-2C<sup>T</sup> durchgeführt. Folgende 19 Enzyme wurden getestet: Alkalische Phosphatase, Esterase (C4), Esterase-Lipase (C8), Lipase (C14), Leucin-Arylamidase, Valin-Arylamidase, Cystin-Arylamidase, Trypsin, α-Chymotrypsin, Saure Phosphatase, Naphthol-AS-BI-Phosphohydrolase, α-Galactosidase, β-Galactosidase, β-Glucuronidase, α-Glucosidase, β-Glucosidase, N-Acetyl-β-Glucosaminidase, α-Mannosidase und α-Fucosidase.

Zur Vorbereitung wurden je 100 µl der bei -80°C kryokonservierten Mykoplasmen-Kulturen in 3 ml SP4-Medium überführt und bei 37°C aerob für 24 bis 48 Stunden bebrütet. Im Anschluss wurden 2 ml der Flüssigkultur bei 20.000 x g für 7 Minuten zentrifugiert, der Überstand abpipettiert und das erhaltene Bakterien-Pellet mit 100 µl Wasser (HPLC-Grad, Sigma-Aldrich, Österreich) resuspendiert, erneut zentrifugiert und gewaschen. Das Bakterien-Pellet wurde im Anschluss erneut mit 1 ml Wasser (HPLC-Grad, Sigma-Aldrich, Österreich) resuspendiert. Das API-ZYM-Testkit wurde vorbereitet, indem eine Inkubationswanne mit Deckel mit 5 ml destilliertem Wasser befüllt wurde, um eine feuchte Kammer herzustellen. Danach wurde die Kammer mit einem Enzymteststreifen ausgestattet und in jeden Becher des Enzymteststreifens je 65 µl der Bakterien-Suspension pipettiert. Die Enzymteststreifen wurden im Anschluss bei 37°C aerob viereinhalb Stunden inkubiert. Nach der Inkubation wurde je ein Tropfen ZYM-A-Reagenz und ein Tropfen ZYM-B-Reagenz in jeden einzelnen Becher zugegeben und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Auswertung der Ergebnisse wurde eine Farbskala des Herstellers verwendet.

### **3.4.6 Glukose-Fermentation und Arginin-Hydrolyse**

Vier repräsentative Mykoplasmen-Isolate (1579d, ac959, 3686d, 3686h) wurden auf ihre Kapazität getestet, Glukose zu fermentieren bzw. Arginin zu hydrolysieren. Als Kontrollstamm wurde *M. bovirhinis* PG43<sup>T</sup> (Glukose-Fermentation) und *M. arginini* G230<sup>T</sup> (Arginin-Hydrolyse) eingesetzt. Dazu wurden jeweils 100 µl der bei -80°C kryokonservierten Mykoplasmen-Kulturen und *M. bovirhinis* PG43<sup>T</sup> in je 3 ml SP4-Medium (enthält 50%ige Glukoselösung) bzw. *M. arginini* G230<sup>T</sup> in je 3 ml modifiziertem SP4-Medium (enthält 50%ige L-Arginin-Lösung statt der 50%igen Glukoselösung) überführt und bei 37°C aerob für 24 bis 48 Stunden bebrütet. Anschließend wurden je 100 µl der Flüssigkulturen auf SP4- bzw. modifizierten SP4-Agarplatten (enthält 50%ige L-Arginin-Lösung statt 50%ige Glukoselösung) ausgeimpft, für 24 bis 48 Stunden unter 7%igen CO<sub>2</sub>-Bedingungen bei 37°C bebrütet und regelmäßig beobachtet. Die Fähigkeit Glukose zu fermentieren, wurde durch einen Farbwechsel der SP4-Bouillon und des SP4-Agarmediums von Rot auf Gelb (Säurebildung) angezeigt. Eine positive Reaktion und somit die Kapazität, Arginin zu spalten bzw. zu verstoffwechseln, wurde durch einen Farbwechsel der modifizierten SP4-Bouillon und des SP4-Agarmediums von Rot auf Pink oder Magenta (Alkalisierung) angezeigt.

### 3.4.7 Urea-Hydrolyse

Bei vier repräsentativen Mykoplasmen-Isolaten (1579d, ac959, 3686d, 3686h) wurde getestet, ob sie die Kapazität besitzen, Urea zu hydrolysieren. Als Kontrollstamm wurde *U. diversum* A417<sup>T</sup> eingesetzt. Um die Mykoplasmen-Isolate vorzubereiten, wurden je 100 µl der bei -80°C kryokonservierten Mykoplasmen-Kulturen und der Kontrollstamm auf U4-Agarplatte (Institut für Mikrobiologie, Veterinärmedizinische Universität Wien, Österreich) ausgeimpft und bei 37°C und 7%iger CO<sub>2</sub>-Atmosphäre für 24 bis 48 Stunden bebrütet. Eine positive Reaktion wurde angezeigt, wenn ein Farbumschlag von Gelb auf Pink oder Magenta (Alkalisierung) sichtbar wurde.

### 3.4.8 Reduktion von Tetrazoliumchlorid und Kaliumtellurit

Zwei repräsentative Mykoplasmen-Isolate (1579d und ac959) und *Mycoplasma citelli* RG-2C<sup>T</sup> wurden auf ihr Vermögen überprüft, Tetrazoliumchlorid und Kaliumtellurit zu reduzieren. Die Testung erfolgte auf PPLO-Agarplatten, die wie folgt hergestellt wurden:

PPLO Broth (BD Difco, Österreich)	21 g
dH <sub>2</sub> O	700 ml
Agar Noble (BD Difco, Österreich)	9,8 g

Nach Einstellung des pH-Wert auf 7,5 wurde das Basismedium für 15 Minuten bei 121°C autoklaviert. Nach Abkühlen auf 50°C wurden folgende Medium-Komponenten hinzugefügt:

25%ige Hefeextrakt-Lösung (Merck, Deutschland)	85 ml
Hitze-inaktiviertes Pferdeserum (Biowest, Frankreich)	170 ml
2%ige 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid-Lösung (Merck, Österreich)	10 ml
ODER	
1%ige Kaliumtellurit-Lösung (Sigma-Aldrich, Österreich)	5 ml
Penicillin (Sandoz, Österreich)	1.000.000 I.U.

Weiters wurden je 100 µl der µl bei -80°C kryokonservierten Mykoplasmen-Kulturen in 3 ml SP4-Medium überführt und diese bei 37°C aerob für 24 bis 48 Stunden bebrütet. Anschließend wurden 100 µl der Flüssigkultur auf PPLO-Agarplatten mit Tetrazoliumchlorid- oder Kaliumtellurit-Supplementierung ausgeimpft und für 10 Tage unter 7%igen CO<sub>2</sub>-Bedingungen

(mikroaerob) und unter anaeroben Kulturbedingungen (Gaspack-System, BD, Österreich) bei 37°C bebrütet und regelmäßig beobachtet. Die Fähigkeit, Tetrazoliumchlorid zu reduzieren, wurde durch rot- bzw. pink-gefärbte Kolonien angezeigt, bei Reduktion von Kaliumtellurit waren die Kolonien schwarzgefärbt.

### **3.4.9 Elektronenmikroskopische Untersuchung**

Zur Darstellung der Zellmorphologie wurde ein repräsentatives Mykoplasmen-Isolat (1579d) am Institut für Pathologie der Veterinärmedizinischen Universität Wien transelektronenmikroskopisch untersucht. Als Vorbereitung wurde 100 µl der bei -80°C kryokonservierten Mykoplasmen-Kulturen in 3 ml SP4-Medium überführt und diese bei 37°C aerob für 48 Stunden bebrütet. Im Anschluss wurde 1 ml der Flüssigkultur bei 12.000 x g für 15 Minuten zentrifugiert, der Überstand verworfen, das Pellet mit 50 µl PBS (Phosphat-gepufferte Saline-Lösung) resuspendiert und zur weiteren Aufarbeitung an das Institut für Pathologie übergeben.

### **3.4.10 MALDI-TOF Massenspektrometrie**

Bei allen 23 Mykoplasmen-Isolaten wurde eine MALDI-TOF (Matrix-Assistierte Laser Desorption Ionisierung – Flugzeitanalyse [Time of Flight]) Massenspektrometrie durchgeführt. Diese diente der Artdiagnose und der Bestimmung von Verwandtschaftsverhältnissen durch Vergleich der erzeugten Massenspektren.

Zur Vorbereitung der Isolate wurden 100 µl der bei -80°C kryokonservierten Mykoplasmen-Kulturen in 3 ml SP4-Medium überführt und bei 37°C aerob für 24 bis 48 Stunden bebrütet. Im Anschluss wurde 1 ml der SP4-Flüssigkultur bei 20.000 x g für 7 Minuten zentrifugiert, der Überstand abpipettiert, das erhaltene Bakterien-Pellet mit 100 µl Wasser (HPLC-Grad, Sigma-Aldrich, Österreich) gewaschen und erneut bei 20.000 x g für 5 Minuten zentrifugiert. Das erhaltene Bakterien-Pellet wurde anschließend mit 15 µl 70%iger Ameisensäure (Sigma-Aldrich, Österreich) und 15 µl 100%igem Acetonitril (Sigma-Aldrich, Österreich) aufgelöst und erneut bei 20.000 x g für 2 Minuten zentrifugiert. Anschließend wurde je 1 µl der Proteinextrakte auf eine MALDI-Trägerplatte aus Edelstahl (Bruker Daltonik, Deutschland) pipettiert, luftgetrocknet und mit 1 µl α-Cyano-4-Hydroxymethylsäure-Matrixlösung (Sigma-Aldrich, Österreich) überschichtet. Nach dem erneuten Lufttrocknen wurde die MALDI-TOF

Massenspektrometrie mithilfe des Microflex LT Biotyper (Bruker Daltonics, Deutschland) unter Verwendung des Programms FlexControl 3.4 und der Software MTB Compass Explorer 4.1 durchgeführt. Anschließend wurden die generierten Spektren der zu untersuchenden Mykoplasmen-Isolaten, mit einer In-House- und der systemintegrierten Referenzspektren-Datenbank verglichen und die Artzugehörigkeit anhand eines numerischen Identifikationswerts von  $\geq 2.00$  ermittelt. Konnten die Isolate massenspektrometrisch nicht identifiziert werden, wurden für ausgewählte Mykoplasmen-Isolate Referenzspektren (MSP, Main Spectrum Profile) mithilfe einer Erstellungsfunktion in MTB Compass Explorer 4.1 generiert und in die In-House Datenbank aufgenommen. Infolge wurden die Spektren- Distanzwerte basierend auf Peak-Intensitätsunterschieden und Peak-Verschiebungen ermittelt und als Dendrogramm dargestellt. Außerdem wurden mithilfe der FlexAnalysis 3.4 Software die Peak-Unterschiede durch Überlagerung der generierten Spektren sichtbar gemacht.

### 3.4.11 Proteinanalyse

Zur Proteinanalyse wurden acht repräsentative Mykoplasmen-Isolate (1579d, ac959, 5438D, 35d, 129d, 3686h, 3686d, 2821h) und die Typstämme *Mycoplasma citelli* RG-2C<sup>T</sup>, *Mycoplasma columborale* MMP-4<sup>T</sup>, *Mycoplasma cricetuli* CH<sup>T</sup> und *Mycoplasma felis* CO<sup>T</sup> ausgewählt. Dazu wurden je 100  $\mu$ l der bei -80°C kryokonservierten Mykoplasmen-Kulturen in 3 ml SP4-Medium überführt und diese bei 37°C aerob für 24 bis 48 Stunden bebrütet. Im Anschluss wurden die Flüssigkulturen für 10 Minuten bei 12.000 x g zentrifugiert, danach der Überstand abpipettiert und das erhaltene Bakterien-Pellet mit 500  $\mu$ l PBS zwei Mal gewaschen, erneut zentrifugiert und zur Weiterverarbeitung bereitgestellt.

### 3.4.12 SDS-PAGE

Mithilfe der SDS-PAGE ( *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) werden die Proteine gelelektrophoretisch aufgetrennt. Hierfür wurde das Bakterien-Pellet zur Weiterverarbeitung mit 72  $\mu$ l SDS-Ladepuffer gemischt und für 5 Minuten bei 95°C denaturiert. Der SDS-Ladepuffer wurde wie folgt hergestellt:

0,5 M TRIS-HCl-Lösung, pH 7,0 (Sigma-Aldrich, Österreich)	4 ml
87%ige Glycerol-Lösung (v/v) (Roth, Deutschland)	1 ml
10%ige SDS-Lösung (w/v) (Roth, Deutschland)	15 mg
2-Mercaptoethanol (Sigma-Aldrich, Österreich)	0,5 ml
Bromphenolblau (Sigma-Aldrich, Österreich)	
dH <sub>2</sub> O	

Das Proteingel wurde wie folgt hergestellt:

Trennungsgel:

40%ige Acrylamid/Bis-Lösung (29:1) (Bio Rad Laboratories, Deutschland)	10 ml
1,5 M TRIS-HCl-Lösung, pH 8,8 (Sigma-Aldrich, Österreich)	10 ml
10%ige SDS-Lösung (Roth, Deutschland)	0,4 ml
10%ige Ammonium-Persulfat-Lösung (w/v) (Sigma-Aldrich, Österreich)	0,4 ml
TEMED (Sigma-Aldrich, Österreich)	16 µl
dH <sub>2</sub> O	40 ml

Überschichtgel:

40%iges Acrylamid/Bis-Lösung (29:1) (Bio Rad Laboratories, Deutschland)	1,25 ml
1,0 M TRISA-HCl, pH 6,8 (Sigma-Aldrich, Österreich)	1,25 ml
10%ige SDS-Lösung (Roth, Deutschland)	0,1 ml
10%ige Ammonium-Persulfat-Lösung (w/v) (Sigma-Aldrich, Österreich)	0,1 ml
TEMED (Sigma-Aldrich, Österreich)	10 µl
dH <sub>2</sub> O	10 ml

Je 30 µl der denaturierten Proteine wurden in die mittleren Geltaschen eines Proteingels pipettiert, während in die erste und letzte Geltasche 10 µl eines Molekulargewichtsmarkers (Page Ruler, Unstained Protein Ladder, Thermo Scientific, Österreich) hinzugefügt wurden. Das Proteingel wurde im Anschluss für 12 Stunden in einer Elektrophorese-Kammer unter Spannung (130 Volt) laufen gelassen.

### 3.4.13 Silberfärbung

Die aufgetrennten Proteine wurden mithilfe der Silberfärbung sichtbar gemacht.

Tabelle 10: Protokoll der Silberfärbung des Proteingels (Schritt, Lösung, Zusammensetzung und Zeit)

Schritt	Lösung	Zusammensetzung	Zeit
1	Fixierung	40% Ethanol 10% Essigsäure 500 ml mQ H <sub>2</sub> O	> 60 Minuten
2	Waschen 3x	mQ H <sub>2</sub> O	3 x 20 Minuten
3	Sensibilisator	0,02% Natrium-Thiosulfat	Einmal Spülen, dann 60 Sekunden inkubieren
4	Spülen	0,2% Silbernitrat 0,02% 37% Formaldehyd	2 x 20 Sekunden
5	Silber	6% Natriumcarbonat 0,1% 37% Formaldehyd 0,0005% Natriumthiosulfat	Einmal Spülen, dann 20 Minuten im Dunklen inkubieren
6	Spülen 2x	mQ H <sub>2</sub> O	2 x 20 Sekunden
7	Entwickler		Einmal Spülen, dann inkubieren, bis Spots sichtbar werden (3-10 Minuten)
8	Stopp	5% Essigsäure	Ein paar Minuten
9	Waschen	mQ H <sub>2</sub> O	Zum Lagern

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Genotypische Charakterisierung

In den Ergebnissen wurden die genetischen bzw. phylogenetischen Eigenschaften der zu charakterisierenden Mykoplasmen-Isolate erfasst.

#### 4.1.1 Phylogenetische Verwandtschaftsanalyse

Die phylogenetischen Verwandtschaftsverhältnisse der Mykoplasmen-Isolate und nächstverwandten Mykoplasmen-Arten konnten durch Bestimmung von Sequenzähnlichkeitswerten und durch die Erstellung von phylogenetischen Stammbäumen ermittelt werden.

Für die 16S rRNA-Gene der untersuchten Mykoplasmen-Isolate wurden höchste Sequenzähnlichkeitswerte mit *Mycoplasma citelli* RG-2C<sup>T</sup> (97,4-97,5%), *Mycoplasma columborale* MMP-4<sup>T</sup> (96,4-96,5%) und *Mycoplasma cricetuli* CH<sup>T</sup> (95,2-95,3%) berechnet. Die nahe Verwandtschaft dieser Mykoplasmen-Arten zu den untersuchten Mykoplasmen-Isolaten konnte anhand des konstruierten phylogenetischen Stammbaums bestätigt werden (Abbildung 1).

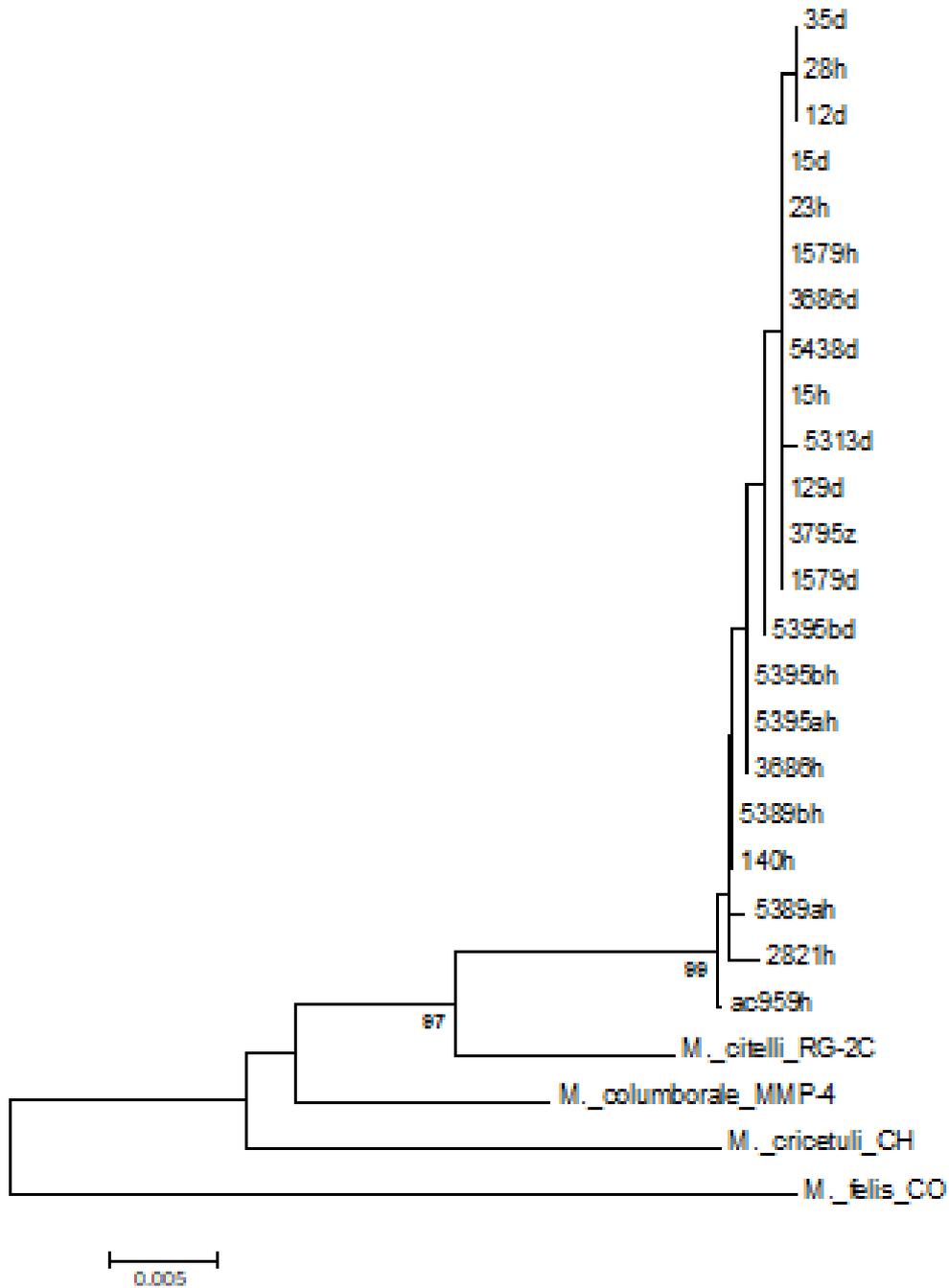


Abbildung 1: Phylogenetische Position der untersuchten Mykoplasmen-Isolate basierend auf 16S-rRNA-Gensequenzen. Der Konsensus-Baum wurde aus 1000 Bootstrap-Replikaten konstruiert (nur Werte über 70 sind angegeben). Der Maßstabbalken vermittelt die Distanz zwischen den Mykoplasmen-Stämmen (Substitution/Position). Die Berechnung wurde mittels MEGA6 durchgeführt.

Bei der Analyse der 16S-23S intergenischen Spacer-Region ausgewählter Mykoplasmen-Isolate konnten höchste Sequenzähnlichkeitswerte mit *Mycoplasma citelli* RG-2C<sup>T</sup> (90,5-90,7%), *Mycoplasma columborale* MMP-4<sup>T</sup> (89,8%) und *Mycoplasma cricetuli* CH<sup>T</sup> (89,7%) ermittelt werden. Auch hier konnten die Verwandtschaftsverhältnisse anhand des konstruierten phylogenetischen Stammbaums bestätigt werden (Abbildung 2).

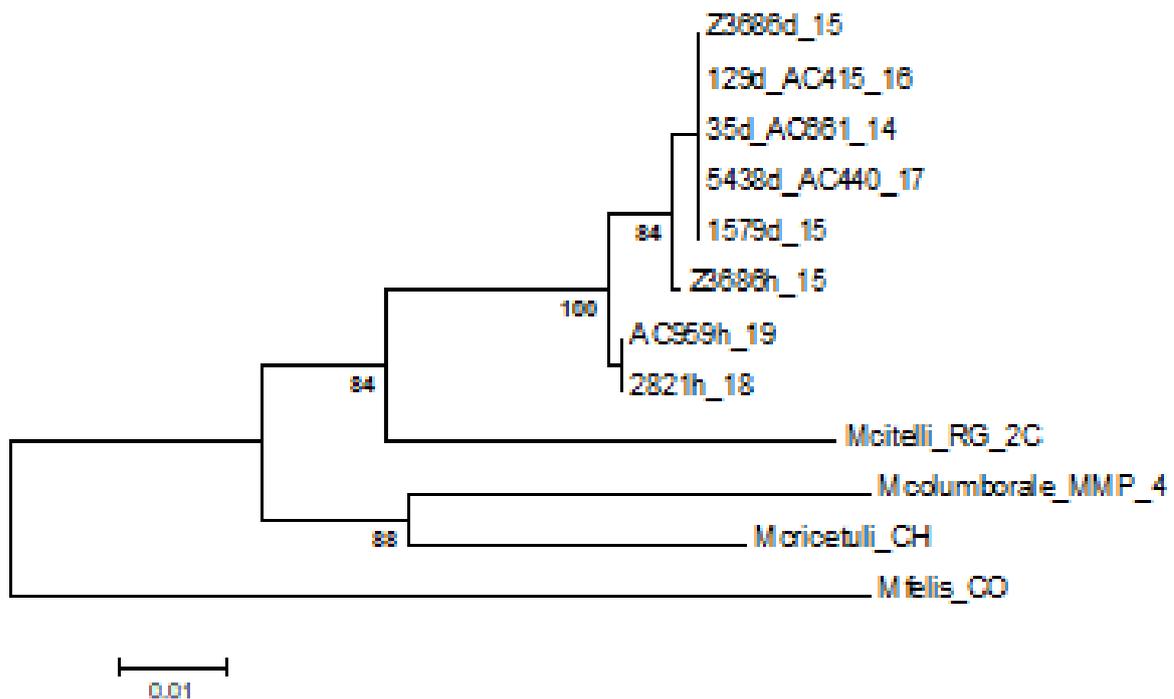


Abbildung 2: Phylogenetische Position ausgewählter Mykoplasmen-Isolate basierend auf 16S-23S-intergenischen-Spacer-Sequenzen. Der Konsensus-Baum wurde aus 1000 Bootstrap-Replikaten konstruiert (nur Werte über 70 sind angegeben). Der Maßstabbalken vermittelt die Distanz zwischen den Mykoplasmen-Stämmen (Substitution/Position). Die Berechnung wurde mittels MEGA6 durchgeführt.

Für die partiellen *rpoB*-Sequenzen ausgewählter Mykoplasmen-Isolate konnten höchste Sequenzähnlichkeitswerte mit *Mycoplasma citelli* RG-2C<sup>T</sup> (86,9-87%), *Mycoplasma columborale* MMP-4<sup>T</sup> (84,9%) und *Mycoplasma cricetuli* CH<sup>T</sup> (82,7%) ermittelt werden. Die Verwandtschaftsverhältnisse konnten durch den konstruierten Stammbaum bestätigt werden, wobei sich die ausgewählten Mykoplasmen-Isolate im Stammbaum eindeutig in zwei Cluster auftrennten (Abbildung 3).

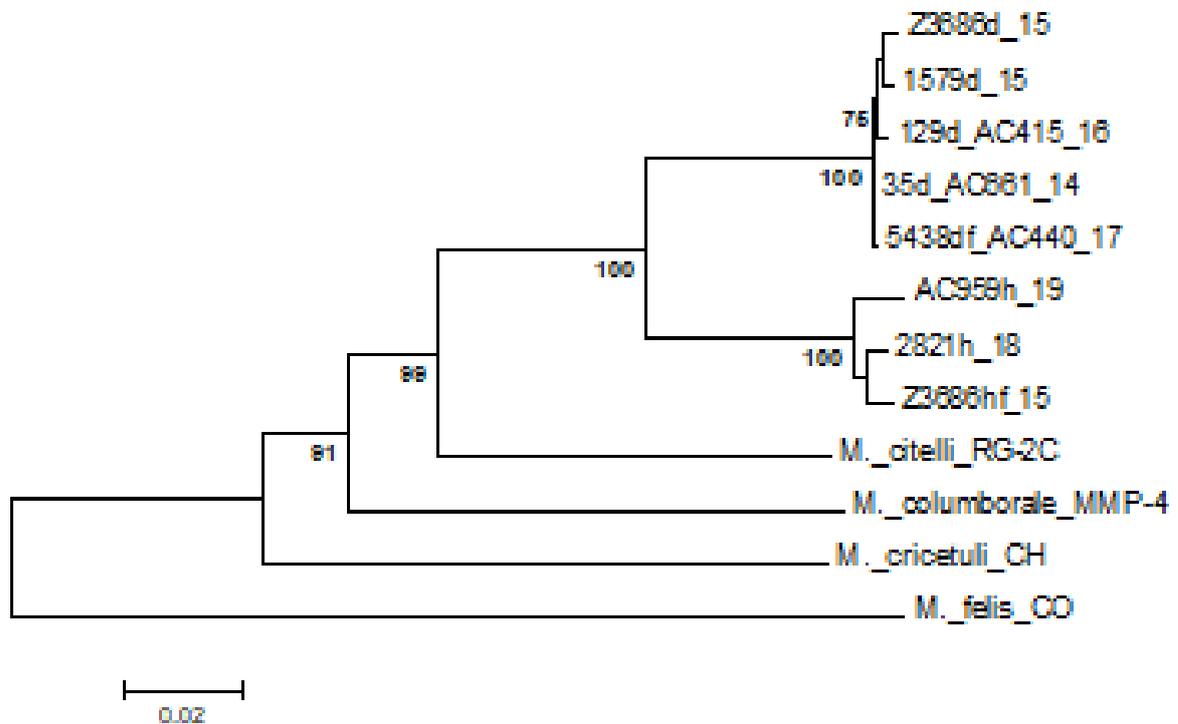


Abbildung 3: Phylogenetische Position ausgewählter Mykoplasmen-Isolate basierend auf partiellen *rpoB*-Gensequenzen. Der Konsensus-Baum wurde aus 1000 Bootstrap-Replikaten konstruiert (nur Werte über 70 sind angegeben). Der Maßstabbalken vermittelt die Distanz zwischen den Mykoplasmen-Stämmen (Substitution/Position). Die Berechnung wurde mittels MEGA6 durchgeführt.

## 4.2 Phänotypische Charakterisierung

In den Ergebnissen wurden die phänotypischen Eigenschaften der zu charakterisierenden Mykoplasmen-Isolate erfasst.

### 4.2.1 Koloniemorphologie

Bei allen 23 Mykoplasmen-Isolaten wiesen die Kolonien eine typische Spiegelform auf. Dabei konnte zwischen der Ausbildung von hellen und dunklen Kolonien unterschieden werden. Die Kolonien von 35d, 5313d, 1579d, Z3795d, 12d, 3686d, 15d, 5438d, 129d, 97 und

5395bd zeigten einen dunklen bzw. opaken Morphotyp, während die Kolonien von 15h, ac959, 3686h, 23h, 140h, 28h, 1579h, 2821h, 5389bh, 5389ah, 5395ah und 5305bh einen hellen Morphotyp aufwiesen (Abbildung 4).

Auffallend war dabei, dass die Unterteilung in zwei Koloniemorphotypen mit der Clusterbildung im phylogenetischen Stammbaum, basierend auf partiellen *rpoB*-Gensequenzen, übereinstimmte. So konnten die Isolate im ersten Cluster (ac959, 2821h und 3686h) dem hellen Koloniemorphotyp und die Isolate im zweiten Cluster (2686d, 1579d, 129d, 35d und 5438d) dem dunklen Morphotyp zugeordnet werden.

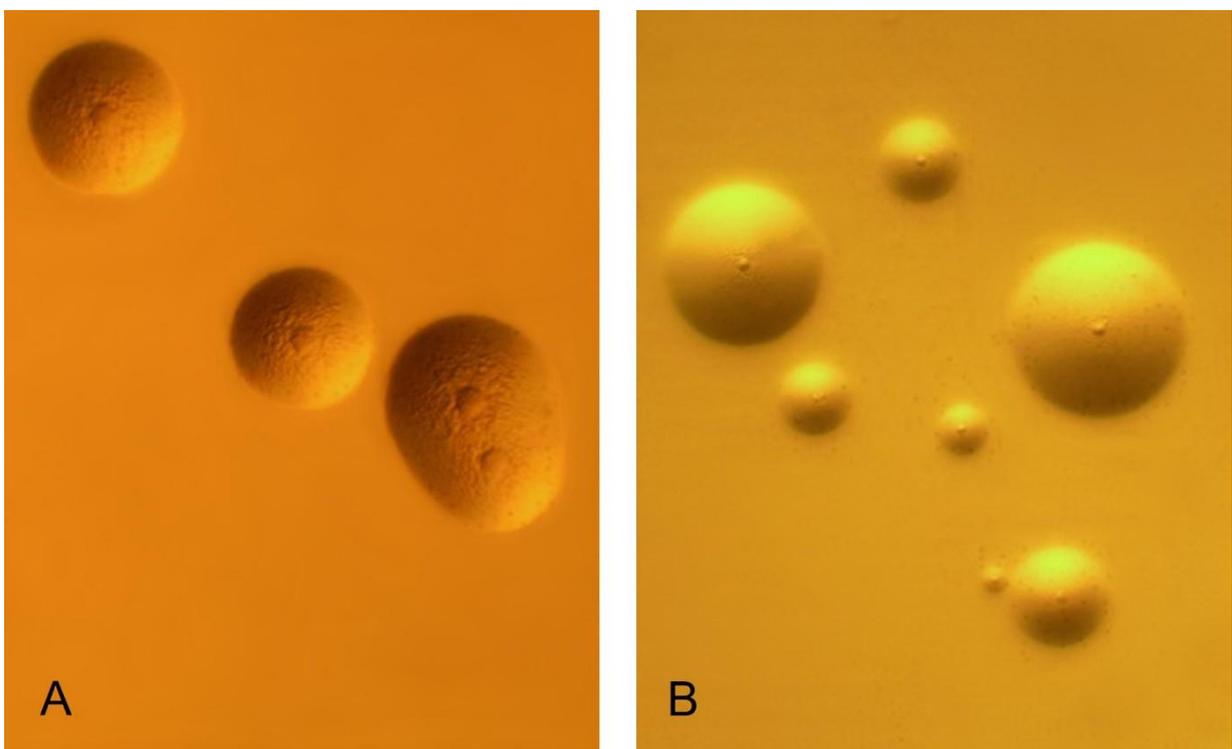


Abbildung 4: Kolonien von 3686d (A) auf SP4-Agar nach Bebrütung über vier Tage, 40-fache Vergrößerung, dunkler Koloniemorphotyp, Kolonien von 3686h (B) auf SP4-Agar nach Bebrütung über vier Tage, 40-fache Vergrößerung, heller Morphotyp

#### 4.2.2 Filtration

Die Filterbarkeit wurde an einem repräsentativen Mykoplasmen-Isolat (1579d) getestet. Dabei konnten nach Filtration mit einem Spitzen-Membranfilter der Porengröße 450 nm ein geringgradiger Unterschied zwischen der Koloniezahl des Filtrats (Abbildung 5B) und der

ungefilterten Kultur (Abbildung 5A) beobachtet werden. Hingegen zeigte das Filtrat nach Einsatz eines Spitzen-Membranfilters mit der Porengröße 220 nm ein deutlich reduziertes Kolonie-Wachstum (Abbildung 5C).

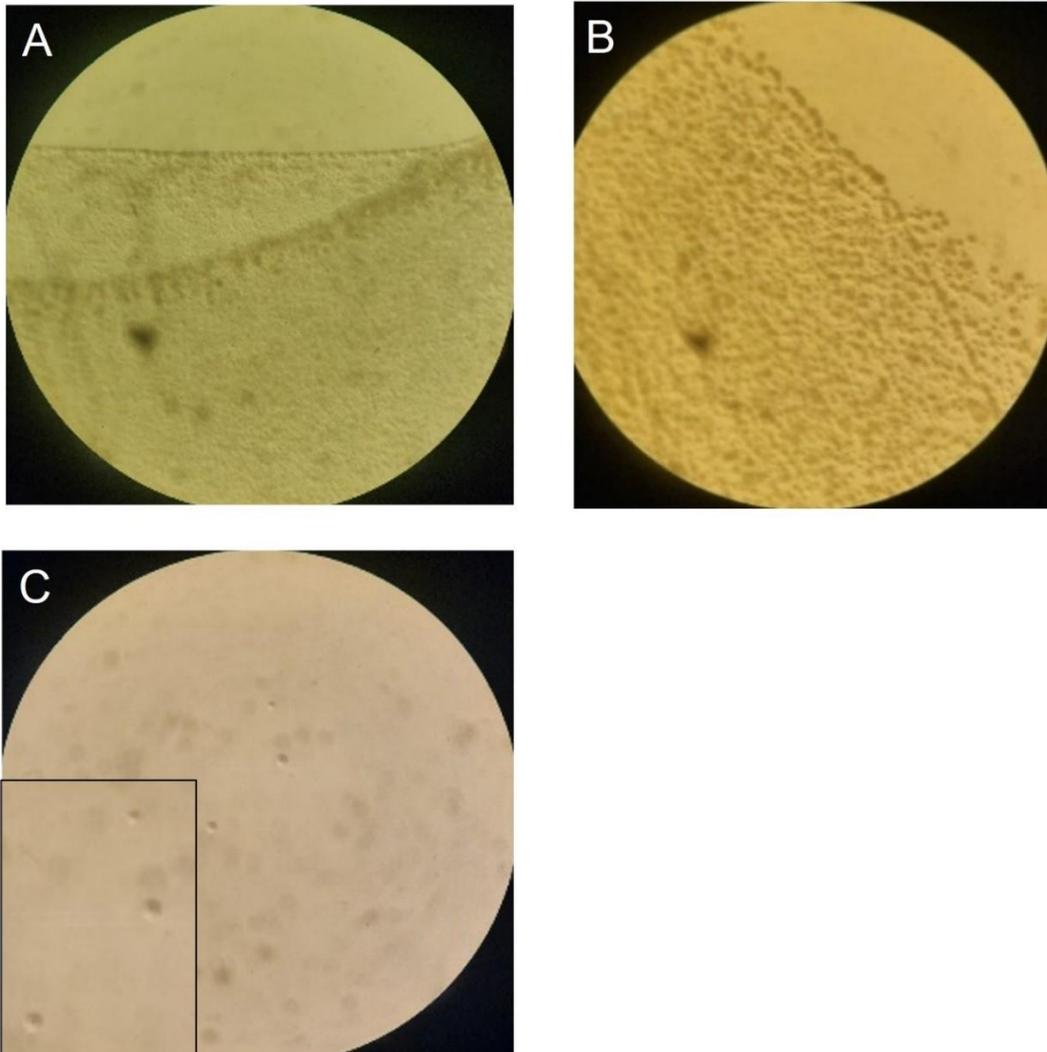


Abbildung 5: Koloniebildung von 1579d auf SP4-Agar nach Bebrütung über vier Tage, 40-fache Vergrößerung, (A) unfiltriert, (B) nach Filtration mit Spitzen-Membranfilter mit einer Porengröße von 450 nm, (C) nach Filtration mit Spitzen-Membranfilter mit einer Porengröße von 220 nm

### 4.2.3 Wachstumstemperatur und Sauerstoffanforderungen

Die optimale Wachstumstemperatur und die Sauerstoffanforderung wurden bei den Mykoplasmen-Isolaten 1579d, ac959, 3686d und 3686h bestimmt. Bei allen Isolaten lag die optimale Wachstumstemperatur bei 37°C. Die besten Wachstumsergebnisse wurden bei 37°C in einem 7%igen CO<sub>2</sub>-Milieu erreicht.

### 4.2.4 Digitonin-Sensitivität

Bei den Mykoplasmen-Isolaten 1579d, ac959, 3686d und 3686h wurde die Digitonin-Sensitivität überprüft. Alle Isolate wiesen nach 48 Stunden Bebrütung einen eindeutigen Hemmhof (Abbildung 6) um das Digitonin-Filterplättchen auf. Eine Wachstumsinhibition und somit die für die Gattung *Mycoplasma* charakteristische Abhängigkeit des Wachstums von Cholesterin konnte bestätigt werden.

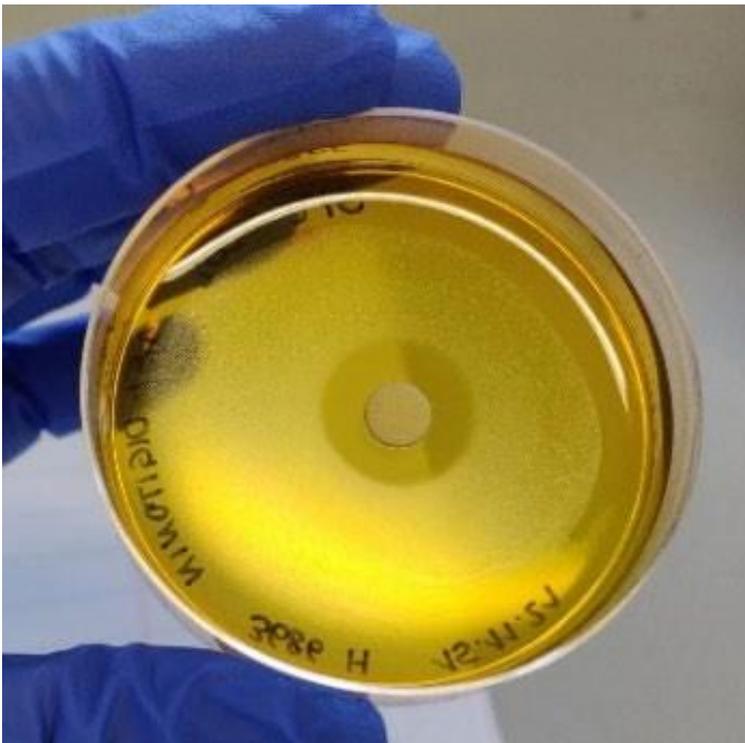


Abbildung 6: Ausbildung eines Wachstums-Hemmhofs um das Digitonin-Filterplättchen nach Bebrütung von Isolat 3686h über zwei Tage

#### 4.2.5 Enzymatische Aktivitäten

Zur Bestimmung der enzymatischen Aktivität der Mykoplasmen-Isolate wurde das API-ZYM-Testkit (Biomérieux, Frankreich) verwendet. Dieser Test wurde bei den Mykoplasmen-Isolaten 1579d und ac959 durchgeführt. Hierbei konnte die Aktivität der Enzyme Esterase (C4), Esterase Lipase (C8) und Naphthol-AS-BI-Phosphohydrolase festgestellt werden (Abbildung 7).

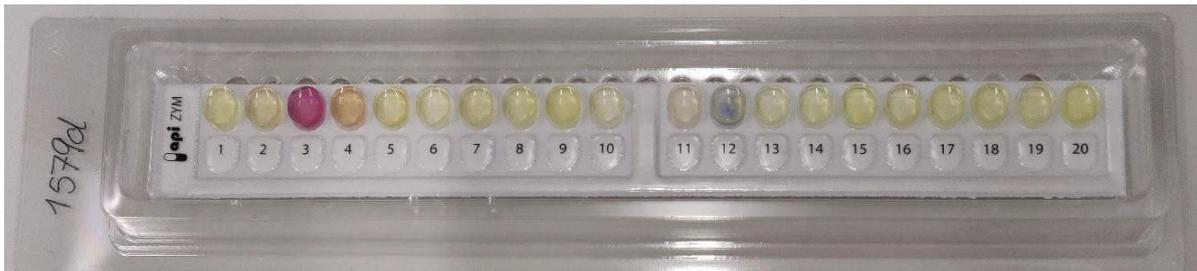


Abbildung 7: Enzymaktivität von Isolat 1579d (API-ZYM-Testkit), Farbumschlag bei Becher 3: Esterase (C4), Becher 4: Esterase Lipase (C8) und Becher 12: Naphthol-AS-BI-Phosphohydrolase

#### 4.2.6 Glukose-Fermentation und Arginin-Hydrolyse

Vier repräsentative Mykoplasmen-Isolate (1579d, ac959, 3686d, 3686h) wurden auf ihre Kapazität getestet, Glukose zu fermentieren bzw. Arginin zu hydrolysieren. Während alle getesteten Mykoplasmen-Isolate die Fähigkeit besaßen, Glukose zu fermentieren, war keines der untersuchten Mykoplasmen-Isolate in der Lage, Arginin zu verstoffwechseln.

#### 4.2.7 Urea-Hydrolyse

Bei den Mykoplasmen-Isolaten 1579d, ac959, 3686d und 3686h wurde getestet, ob sie in der Lage sind, Urea zu hydrolysieren. Keines der untersuchten Mykoplasmen-Isolate war befähigt, Harnstoff zu verstoffwechseln.

#### 4.2.8 Reduktion von Tetrazoliumchlorid und Kaliumtellurit

Die Fähigkeit Tetrazoliumchlorid und Kaliumtellurit unter mikroaeroben und anaeroben Wachstumsbedingungen zu reduzieren, wurde bei zwei repräsentativen Mykoplasmen-

Isolaten (1579d und ac959) überprüft. Beide untersuchten Mykoplasmen-Isolate zeigten eine positive Reaktion bei der Tetrazoliumchlorid-Reduktion durch Ausbildung von Rot- bzw. pinkgefärbten Kolonien (Abbildung 8A), dies aber ausschließlich unter anaeroben Wachstumsbedingungen. Gleichsam waren beide untersuchten Mykoplasmen-Isolate in der Lage, Kaliumtellurit ausschließlich unter anaeroben Bedingungen zu reduzieren (angezeigt durch die Ausbildung von schwarzgefärbten Kolonien, Abbildung 8B)

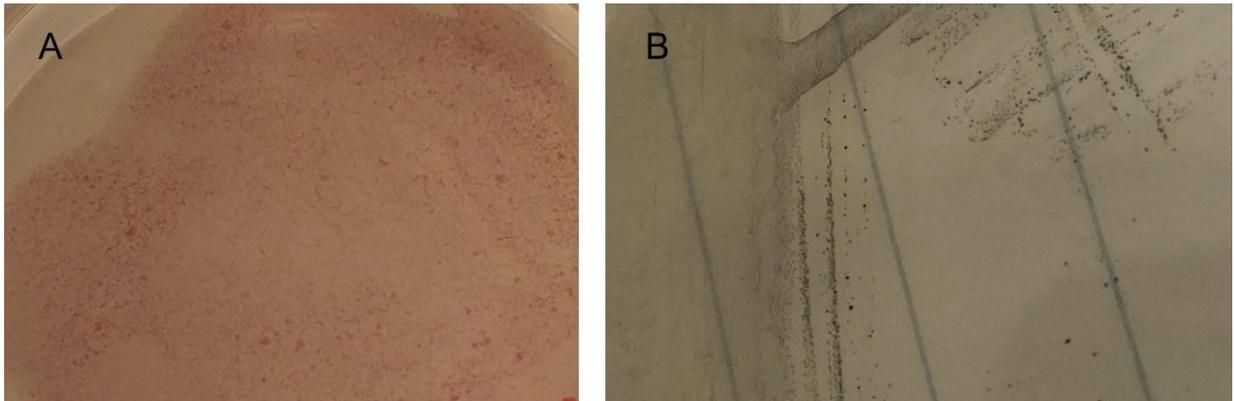


Abbildung 8: Kolonien von Isolat 1579d auf PPLO-Platten nach anaerober Bebrütung über 10 Tage. (A) Tetrazoliumchlorid-Reduktion, angezeigt durch Ausbildung von Rot- bzw. pinkgefärbten Kolonien (B) Kaliumtellurite-Reduktion, vermittelt durch Ausbildung schwarzgefärbter Kolonien

#### **4.2.9 Elektronenmikroskopische Untersuchung**

Zur Darstellung der Zellmorphologie wurde ein repräsentatives Mykoplasmen-Isolat (1579d) transmissionselektronenmikroskopisch untersucht. Dabei konnte die Zellwandlosigkeit des Mykoplasmen-Isolats und die Zellbegrenzung durch eine zweischichtige Plasmamembran festgestellt werden. Die Zellen stellten sich sphärisch bis ovoid dar.

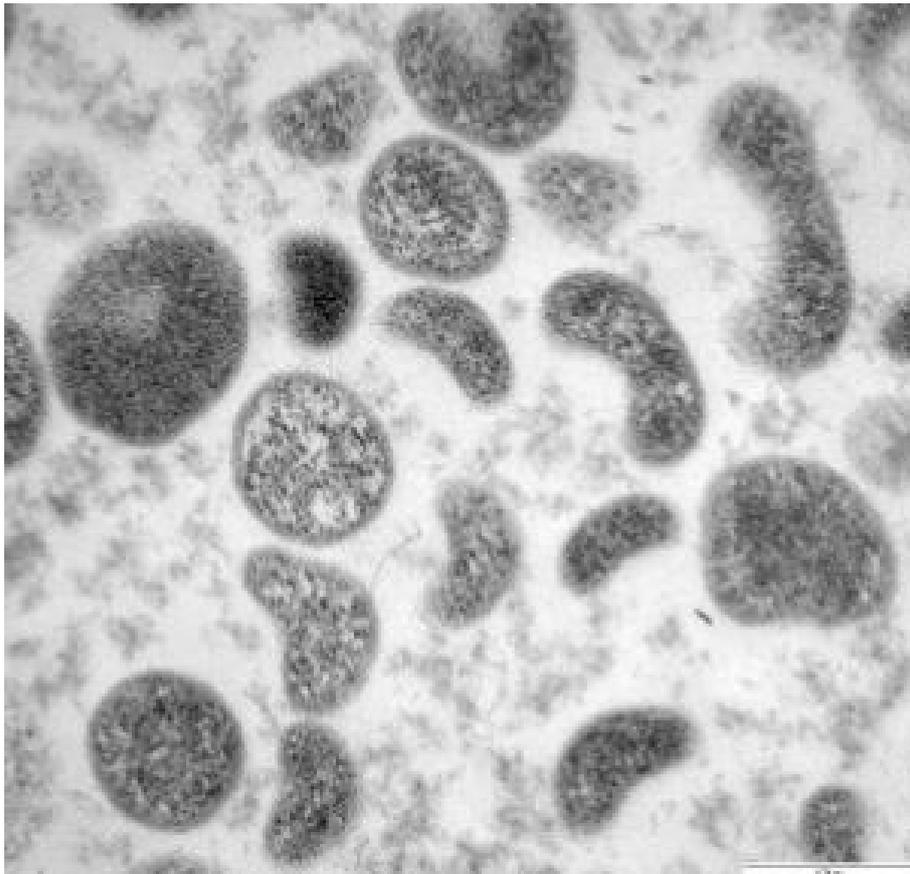


Abbildung 9: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen von Isolat 1579d

#### 4.2.10 MALDI-TOF Massenspektrometrie

Bei der massenspektrometrischen Untersuchung und Vergleich der generierten Spektren mit jenen der In-House- und systemintegrierten Referenzspektren-Datenbank konnte keines der 23 Mykoplasmen-Isolate artdiagnostisch identifiziert werden. Nach Erstellung von Referenzspektren (MSPs) ausgewählter Mykoplasmen-Isolate und Integration diese in die In-House-Referenzspektren-Datenbank konnte schließlich die Zugehörigkeit aller 23 Mykoplasmen-Isolate zu einer Art ermittelt werden. Bei dem auf Distanzwerten beruhenden Dendrogramm war eine deutliche Gruppierung der generierten MSPs in zwei Cluster erkennbar (Abbildung 10). Die massenspektrometrische Unterteilung und Zuordnung der Mykoplasmen-Isolate in zwei Gruppen stimmte wiederum mit der Gruppierung anhand des Koloniemorphotyps und mit der Clusterformation im phylogenetischen *rpoB*-Stammbaum überein.

Durch Überlagerung zweier Cluster-spezifischer Spektren (1579d, 3686h) konnte die Ursache für die Gruppenbildung anhand eindeutig identifizierbarer Peak-Intensitätsunterschiede und Peak-Verschiebungen ermittelt werden (Abbildung 11).

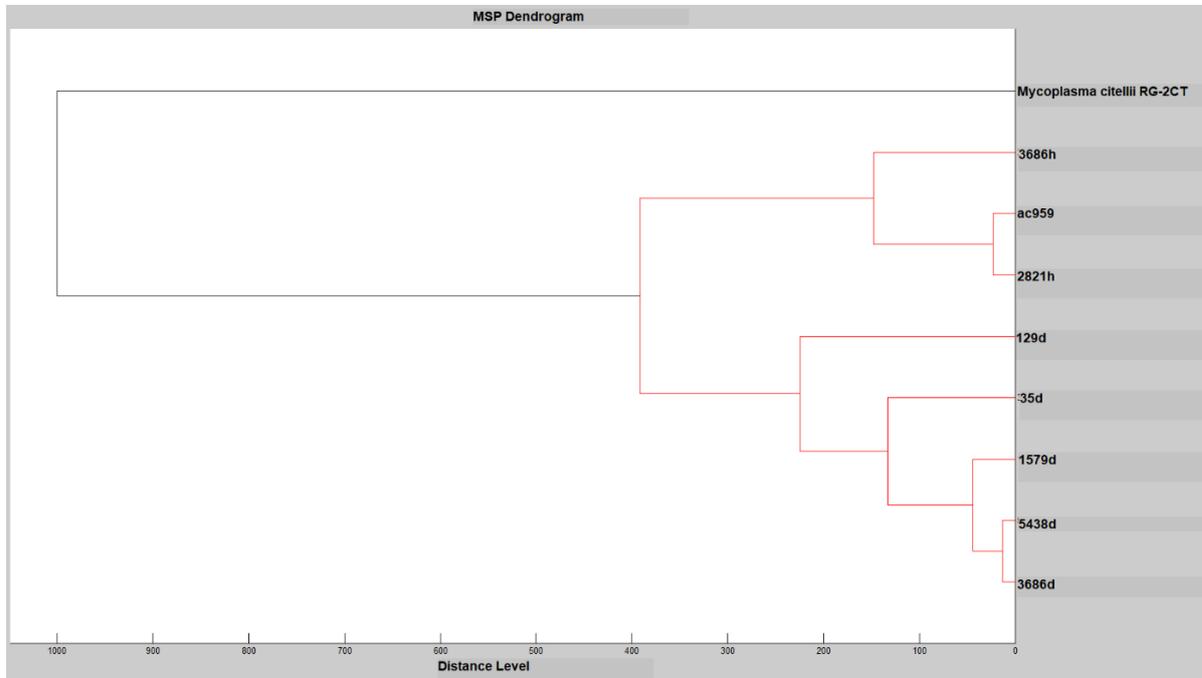


Abbildung 10: MALDI-TOF-Dendrogramm auf Grundlage von Distanzwerten zwischen den Mykoplasmen-Isolaten 2686h, ac959, 2821h, 129d, 35d, 1579d, 5438d, 3686d und *Mycoplasma citelli* RG-2C<sup>T</sup> mit Ausbildung zweier Cluster

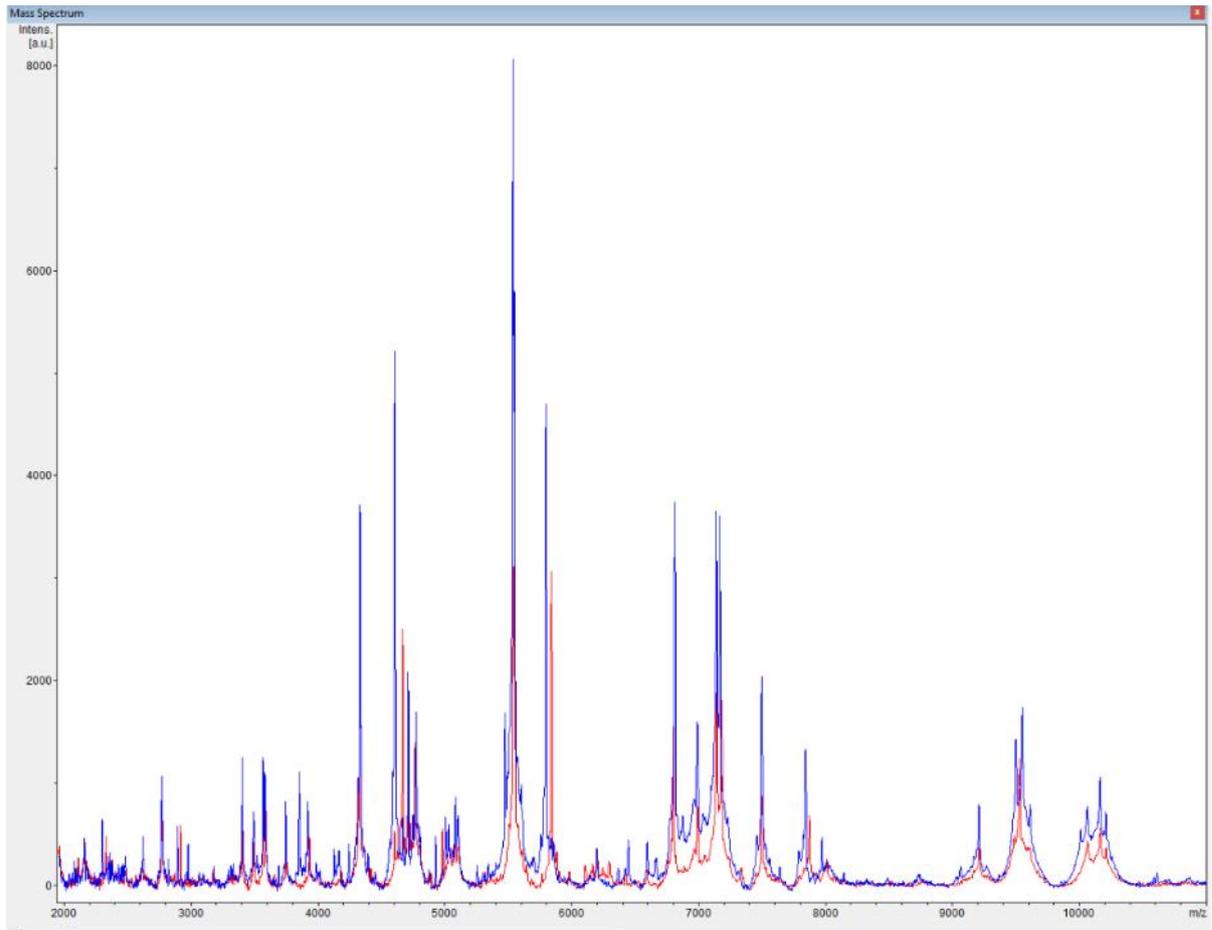


Abbildung 11: Überlagerung zweier Cluster-spezifischer Massenspektren (1579d – rot, 3686h – blau) mit Darstellung von Peak-Intensitätsunterschieden und Peak-Verschiebungen

#### 4.2.11 Proteinanalyse, SDS-PAGE und Silberfärbung

Für die Proteinanalyse wurden acht repräsentative Mykoplasmen-Isolate (1579d, ac959, 5438d, 35d, 129d, 3686h, 3686d, 2821h) und die Typstämme *Mycoplasma citelli* RG-2C<sup>T</sup>, *Mycoplasma columborale* MMP-4<sup>T</sup>, *Mycoplasma cricetuli* CH<sup>T</sup> und *Mycoplasma felis* CO<sup>T</sup> ausgewählt.

Die Bandenmuster der 4 Typstämme ergaben untereinander ein ähnliches Bandenmuster, ein merklicher Unterschied zwischen den Typstämmen war jedoch bei *Mycoplasma citelli* RG-2C<sup>T</sup> (4) im Bereich von 26 kDa zu sehen. Dieses Bandenmuster war ident mit den Bandenmustern der getesteten Mykoplasmen-Isolate (5-12).

Bei den Mykoplasmen-Isolaten ac959 (5), 2821h (6) und 3686h (7) konnten idente Bandenmuster erkannt werden, welche sich von den Bandenmustern 8-12 (2686d, 1579d, 129d, 35d und 5438d) geringgradig im Bereich von 43 bis 95 kDa unterschieden. Zusätzlich wurden im Bereich 34 bis 43 kDa kleine Abweichungen in den Bandenmustern innerhalb der Isolate 8-12 beobachtet.

Die Mykoplasmen-Isolate konnten durch die Bandenmuster in zwei Gruppen (5-7 und 8-12) eingeteilt werden, welche sich geringgradig voneinander unterschieden. Merklliche Unterschiede gab es von den Isolaten (5-12) zu den Typstämmen (1-4). *Mycoplasma citelli* RG-2C<sup>T</sup> (4) wies die meisten Gemeinsamkeiten mit den Mykoplasmen-Isolaten (5-12) auf (Abbildung 12).

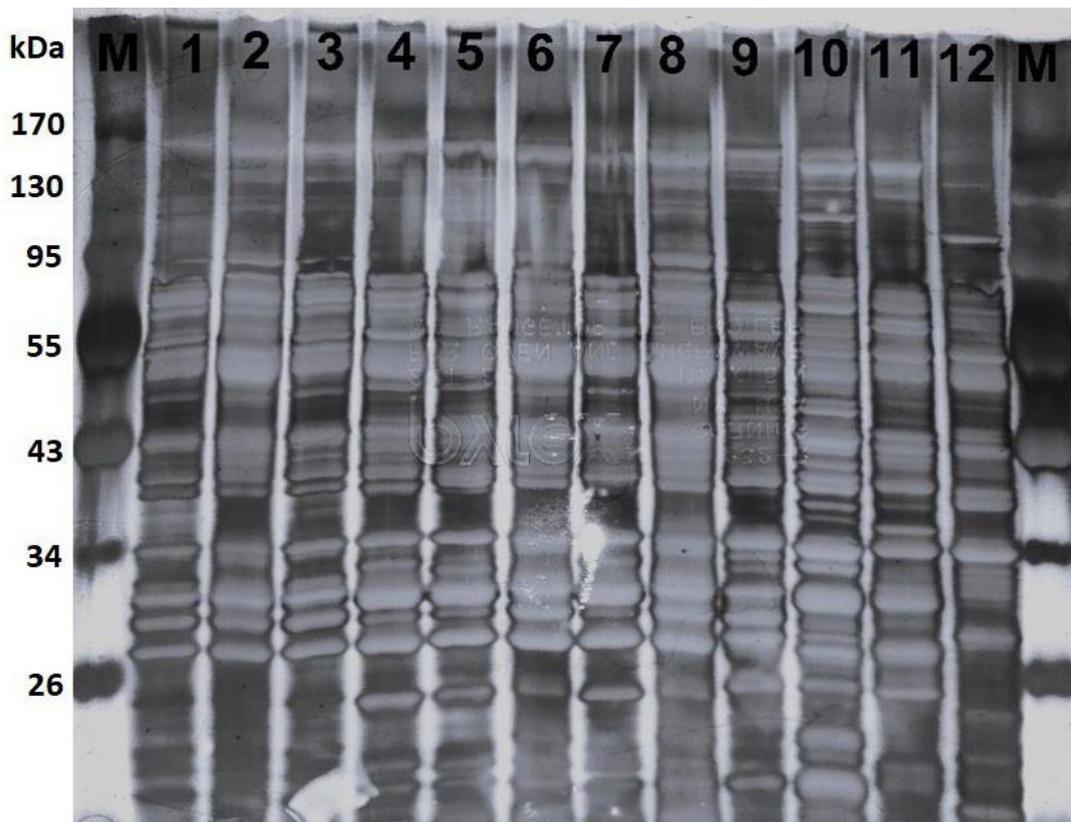


Abbildung 12: Proteinbandenmuster der untersuchten Mykoplasmen-Isolate und Mykoplasmen-Typstämme. M: Molekulargewichtsmarker, 1: *Mycoplasma cricetuli* CH<sup>T</sup>, 2: *Mycoplasma columborale* MMP-4<sup>T</sup>, 3: *Mycoplasma felis* CO<sup>T</sup>, 4: *Mycoplasma citelli* RG-2C<sup>T</sup>, 5: ac959, 6: 2821h, 7: 3686h, 8: 129d, 9: 35d, 10: 3686d, 11: 1579d, 12: 5438d

Auch bei der Proteinanalyse konnte, wie zuvor bei der phylogenetischen Verwandtschaftsanalyse (*rpoB*-Gen), der kolonimorphologischen Untersuchung und der MALDI-TOF Massenspektrometrie eine Gruppierung der untersuchten Mykoplasmen-Isolate beobachtet werden. So zeigten jene Isolate ein identes Bandenmuster (ac959, 2821h und 3686h), die sich in der phylogenetischen Verwandtschaftsanalyse und der MALDI-TOF Massenspektrometrie zu einem Cluster formierten und außerdem dem hellen Kolonimorphotyp zugeordnet werden konnten. Die Isolate 2686d, 1579d, 129d, 35d und 5438d wiederum wurden in der phylogenetischen Verwandtschaftsanalyse und der MALDI-TOF Massenspektrometrie dem zweiten Cluster zugeordnet, waren kolonimorphologisch dunkel und hatten ähnliche Proteinbandenmuster.

## 5 Diskussion

Die Gattung *Mycoplasma* weist mit über 150 beschriebenen Arten, die vorwiegend aus domestizierten Tierarten und dem Menschen isoliert werden konnten, eine hohe Diversität auf. Dahingegen sind Artenvielfalt und Eigenschaften der bei Wildtieren auftretenden Mykoplasmen noch weitgehend unbekannt. Ziel dieser Diplomarbeit war daher die phäno- und genotypische Charakterisierung von nicht identifizierbaren Mykoplasmen-Isolaten, die aus dem Respirationstrakt Europäischer Ziesel (*Spermophilus citellus*) gewonnen werden konnten. Die Ergebnisse der polyphasischen Eigenschaftsanalyse unterstreichen, dass es sich bei den untersuchten Mykoplasmen-Isolaten um Vertreter einer bislang unbeschriebenen Mykoplasmen-Art handelt. Die vorgelegte Studie schafft somit eine solide Basis für weiterführende Untersuchungen, wie z.B. die Gesamtgenomsequenzierung von ausgewählten Vertretern der untersuchten Mykoplasmen-Stämme, die schlussendlich zur Speziesneubeschreibung innerhalb der Gattung *Mycoplasma* führen werden.

Die taxonomische Einordnung und Klassifizierung von nicht identifizierbaren Mykoplasmen-Isolaten beruht auf mehrphasigen Eigenschaftsanalysen, die neben phänotypischen und genetischen Merkmale auch phylogenetische und genomische Charakteristika mitberücksichtigen. Ziel der phänotypischen Charakterisierung ist hierbei die Zuordnung eines unbekanntes Mykoplasmen-Isolats in höhere taxonomische Rangstufen. Phänotypische Tests erlauben somit die Einordnung eines Mykoplasmen-Isolats in die Klasse *Mollicutes*, die Ordnungen *Mycoplasmatales*, *Entomoplasmatales*, *Acholeplasmatales* oder *Anaeroplasmatales*, die Familien *Mycoplasmataceae*, *Entomoplasmataceae*, *Spiroplasmataceae*, *Acholeplasmataceae* oder *Anaeroplasmataceae*, sowie gegebenenfalls in untergeordnete Gattungen. Dies erfolgt anhand zellmorphologischer Eigenschaften (Zellwandlosigkeit, Zellgröße, Zellform) und durch Bestimmung kultureller Anforderungen und Wachstumscharakteristika wie Wachstumstemperatur, Koloniemorphologie, Sterol-Abhängigkeit, Sauerstoff-Empfindlichkeit und Kultivierbarkeit [Razin et al. 1998]. Aufgrund der eingeschränkten Biosynthese- und Stoffwechselleistung von Mykoplasmen spielen biochemische Analysen zur taxonomischen Einordnung von Mykoplasmen eine untergeordnete Rolle. Diese beschränken sich zumeist auf Testung der Fähigkeit eines Mykoplasmen-Isolats, Glukose zu fermentieren und Arginin oder Harnstoff zu hydrolysieren. Basierend auf diesen biochemischen Analysen werden Mykoplasmen der fermentativen (Glukose-Fermentation) oder nicht-fermentativen (Arginin-Hydrolyse bzw. weder Glukose-Fermentation noch Arginin-Hydrolyse) Stoffwechselgruppe innerhalb eines taxonomischen

Rangs zugeordnet, einzig die Fähigkeit der Harnstoff-Hydrolyse ermöglicht die Klassifizierung eines Mykoplasmen-Isolats als Vertreter der Gattung *Ureaplasma* [Brown et al. 2007; Volokhov et al. 2012].

Traditionell wurden zur phänotypischen Bestimmung der Artzugehörigkeit und Differenzierung zwischen Mykoplasmen-Arten im Rahmen von Artneubeschreibungen serologische Verfahren wie Wachstumsinhibitionstests oder die Epi-Immunfluoreszenz-Methode angewandt [Brown et al. 2007]. Dies erforderte neben der Herstellung eines spezifischen Antiserums gegen die neue Mykoplasmen-Art den Einsatz von spezies-spezifischen Antiseren gegen alle zum Zeitpunkt der Durchführung bekannten Mykoplasmen-Arten. Aufgrund der mangelnden Verfügbarkeit dieser Antiseren und des Auftretens von Kreuzreaktionen zwischen und von Antigenheterogenität innerhalb einer Mykoplasmen-Art, sowie aus tierschutzrechtlichen Gründen, wurden schließlich serologische Verfahren als Voraussetzung zur Beschreibung einer neuen Art innerhalb der Klasse *Mollicutes* [Brown et al. 2007] aufgegeben [Firrao und Brown 2013]. Im Gegensatz zur serologischen Artbestimmung konnte sich in den letzten Jahren die MALDI-TOF Massenspektrometrie (MS) als zuverlässige und einfach durchzuführende Methode für die Identifizierung und Differenzierung von Mykoplasmen-Arten durchsetzen [Pereyre et al. 2013; Baudler et al 2019; Spergser et al. 2019]. Neben der Identifizierung von bisher unbeschriebene Mykoplasmen-Arten bei Haus-, Nutz- und Wildtieren [Spergser et al. 2019; Hennig-Pauka et al. 2020] hat sich die Methode als zusätzliches phänotypisches Charakterisierungstool im Rahmen von Artneubeschreibungen innerhalb der Gattung *Mycoplasma* bewährt [Ramírez et al., 2019; Spergser et al. 2020; Spergser et al. 2022]. Auch in der vorliegenden Studie erwies sich die MALDI-TOF MS als einzig zuverlässiges Phänotypisierungsverfahren, welches neben der Abgrenzung von naheverwandten Mykoplasmen-Arten auch die Zugehörigkeit aller untersuchten Mykoplasmen-Isolate zu einer Art erlaubte. Außerdem konnte mithilfe der MALDI-TOF MS die beobachtete Gruppierung der untersuchten Mykoplasmen-Isolate anhand koloniemorphologischer Merkmale (helle versus dunkle Kolonien) und nachgewiesener Proteinexpressionsmuster bestätigt werden.

Die moderne Taxonomie von Mykoplasmen orientiert sich seit Jahrzehnten an Erkenntnissen, die durch phylogenetische Untersuchungen des 16S rRNA-Gens, einem Hauptvertreter der bakteriellen ribosomalen RNA mit außergewöhnlich langsamer Evolutionsrate, gewonnen werden konnten [Woese 1987; Weisburg et al. 1989]. Phylogenetische Vergleichsanalysen der 16S rRNA-Gene ermöglichen dabei die taxonomische Einordnung von Mykoplasmen und

Bestimmung der nächstverwandten Arten. Bei Ermittlung von 16S rRNA-Sequenzähnlichkeitswerten <97% gilt es als gesichert, dass es sich bei den untersuchten Mykoplasmen-Stämmen um unterschiedliche Arten handelt, während Sequenzähnlichkeitswerte >97% auf ein enges Verwandtschaftsverhältnis hinweisen [Pettersson et al. 2000]. Bei engverwandten Mykoplasmen-Arten sind Sequenzähnlichkeitswerte von 98-99,5% nicht ungewöhnlich, daher ist in diesen Fällen die Bestimmung der Artzugehörigkeit und die Artabgrenzung durch die alleinige Untersuchung des 16S rRNA-Gens nicht ausreichend. Bei einem durch 16S rRNA-Genanalyse festgestellten nahen phylogenetischen Verwandtschaftsverhältnis werden daher zur Unterscheidung von Mykoplasmen-Arten das *rpoB*-Gen und die 16S-23S intergenische Spacer-Region als zusätzliche phylogenetische Marker eingesetzt [Volokhov et al. 2012]. In der vorliegenden Studie konnten für die 16S rRNA-Gene der untersuchten Mykoplasmen-Isolate höchste Sequenzähnlichkeitswerte von 97,4-97,5% mit *M. citelli* RG-2C<sup>T</sup> ermittelt werden. Der 16S rRNA-gestützte phylogenetische Stammbaum bestätigte die Positionierung der Mykoplasmen-Isolate innerhalb des *M. synoviae*-Clusters und das phylogenetische Naheverhältnis zu *M. citelli*. Sequenzanalysen und Konstruktion phylogenetischer Stammbäume basierend auf *rpoB*-Genen und 16S-23S intergenische Spacer-Region-Sequenzen bekräftigen die Erkenntnisse der 16S rRNA-Genanalyse. Interessanterweise spiegelte sich die Gruppierung der untersuchten Mykoplasmen-Isolate in zwei Phänotypen (Koloniemorphologie, MALDI-TOF-Spektren, Proteinexpressionsmuster) ausschließlich in dem auf *rpoB*-Gensequenzen-basierenden phylogenetischen Stammbaum wider. Dies könnte auf Eignung des *rpoB*-Gens zur Feindifferenzierung von Mykoplasmen-Isolaten unterhalb der Artebene hindeuten.

Insgesamt unterstützen die gewonnenen Erkenntnisse der vorliegenden Untersuchungen die Annahme, dass es sich bei den 23 unbekanntenen Mykoplasmen-Isolaten aus den Europäischen Zieseln um eine neue Mykoplasmen-Art handelt. Die vorliegende Studie liefert daher eine robuste Basis für eine Speziesneubeschreibung innerhalb der Gattung *Mycoplasma*.

## 6 Zusammenfassung

### 6.1 Zusammenfassung

Die bislang aus dem Europäischen Ziesel isolierten Mykoplasmen-Stämme konnten keiner valide beschriebenen Mykoplasmen-Art zugeordnet werden. Ziel dieser Arbeit war es daher, 23 Mykoplasmen-Isolate, die aus dem Respirationstrakt des Europäischen Ziesels (*Spermophilus citellus*) isoliert werden konnten, auf ihre genotypischen und phänotypischen Charakteristika zu untersuchen.

Mithilfe genetischer Analysen wurde die phylogenetische Positionierung der Erregerisolate durch 16S rRNA-Gen, 16S-23S intergenische Spacer- und partielle *rpoB*-Gen-Sequenzanalyse bestimmt. Zur phänotypischen Charakterisierung der Erregerisolate wurden morphologische (Kolonie- und Zellmorphologie) und kulturelle Eigenschaften untersucht, sowie biochemische Charakteristika, Proteinexpressionsmuster und MALDI-TOF Protein-Massen-Fingerprints ermittelt.

Anhand phänotypischer Untersuchungen konnten die Mykoplasmen-Isolate in zwei Koloniemorphotypen (heller versus dunkler Morphotyp) unterteilt und dem fermentativen Stoffwechselltyp (Glukose-Fermenter) sowie der Gattung *Mycoplasma* (Sterol-abhängiges Wachstum) zugeordnet werden. Die MALDI-TOF MS erwies sich als artdiagnostisch zuverlässige Methode, welche neben der Abgrenzung von naheverwandten Mykoplasmen-Arten auch die Zugehörigkeit aller untersuchten Mykoplasmen-Isolate zu einer Art ermöglichte. Außerdem konnte mithilfe eines MALDI-TOF-Dendrogramms basierend auf Spektrum-Distanzwerten die beobachtete Gruppierung der Isolate anhand koloniemorphologischer Merkmale bestätigt werden.

Im Rahmen phylogenetischer Analysen konnten für die 16S rRNA-Gene der untersuchten Mykoplasmen-Isolate höchste Sequenzähnlichkeitswerte von 97,4-97,5% mit *M. citelli* RG-2C<sup>T</sup> (Vertreter des *M. synoviae*-Clusters) ermittelt werden. Phylogenetische Stammbäume basierend auf 16S rRNA-, 16S-23S intergenische Spacer- und partiellen *rpoB*-Gensequenzen bestätigten die Positionierung der Mykoplasmen-Isolate innerhalb des *M. synoviae*-Clusters und das phylogenetische Naheverhältnis zu *M. citelli*, wobei einzig der auf *rpoB*-Gensequenzen-basierende Stammbaum die phänotypische Gruppierung der untersuchten Mykoplasmen-Isolate widerspiegeln konnte.

Die Ergebnisse der vorliegenden Eigenschaftsanalyse unterstützen die Annahme, dass es sich bei den untersuchten Mykoplasmen-Isolaten vom Europäischen Ziesel um Vertreter einer neuen Mykoplasmen-Art handelt. Sie schafft somit eine solide Basis für eine zukünftige Speziesneubeschreibung innerhalb der Gattung *Mycoplasma*.

## 6.2 Summary

Mycoplasmas isolated from the European ground squirrel could not be assigned to any validly described *Mycoplasma* species, so far. Therefore, this study aimed to characterize 23 mycoplasma isolates recovered from the respiratory tract of European ground squirrels by defining their genotypic and phenotypic characteristics.

For genotypic characterization, the phylogenetic positioning of the isolates was determined by 16S rRNA gene, 16S-23S intergenic spacer, and partial *rpoB* gene sequence analyses. For phenotypic characterization, morphological (colony and cell morphology) and cultural properties were investigated, and biochemical traits, protein expression patterns, and MALDI-TOF protein mass fingerprints were determined.

By using phenotypic characterization methods, the mycoplasma isolates were divided into two colony morphotypes (bright versus opaque) and allocated to the fermentative metabolic group (glucose fermenting mycoplasmas) within genus *Mycoplasma* (sterol requirement for growth). MALDI-TOF MS was the most reliable phenotypic method for differentiation from closely related *Mycoplasma* species and for recognizing that all investigated mycoplasma isolates were members of a single species. Furthermore, a MALDI-TOF dendrogram based on spectrum distance values confirmed the grouping of the isolates by means of colony morphotyping.

Phylogenetic analyses of the 16S rRNA genes revealed highest similarity values of 97.4-97.5% to *M. citelli* RG-2C<sup>T</sup> (member of the *M. synoviae* cluster). Constructed phylogenetic trees based on 16S rRNA, 16S-23S intergenic spacer, and partial *rpoB* sequences supported the phylogenetic positioning of mycoplasma isolates within the *M. synoviae* cluster and underscored the close relatedness of mycoplasma isolates with *M. citelli*. However, only the phylogenetic tree based on partial *rpoB* genes was able to mirror the grouping of mycoplasma isolates determined by phenotypic characterization.

Overall, the results of the study suggest that the investigated mycoplasma isolates from European ground squirrels are members of a novel species, thus providing a substantial basis for the future description of a new species with genus *Mycoplasma*.

## 7 Abkürzungsverzeichnis

bzw. = beziehungsweise

IUCN = International Union for Conservation of Nature

*M.* = *Mycoplasma*

MALDI-TOF = Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight

Mbp = Megabasenpaare

ml = Milliliter

PBS = Phosphate buffered saline

PPLO = Pleuropneumoniae-Like Organism

*rpoB* = RNA-Polymerase  $\beta$ -Subunit-Gen

SDS-Page = Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese

TEMED = Tetramethylethylendiamin

TRIS = Tris(hydroxymethyl)aminomethane

## 8 Literaturverzeichnis

Baudler L, Scheufen S, Ziegler L, Möller Palau-Ribes F, Ewers C, Lierz M. 2019. Identification and differentiation of avian *Mycoplasma* species using MALDI-TOF MS. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 31: 620–624.

Brown DR, Whitcomb RF, Bradbury JM. 2007. Revised minimal standards for description of new species of the class *Mollicutes* (division *Tenericutes*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57(11): 2703–2719.

Brown DR. 2010. Phylum XVI *Tenericutes*. In: Krieg NR, Staley JT, Brown DR, Hedlund BP, Paster BJ, Ward NL, Whitman WL, Whitman WB, eds. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: The Bacteroidetes, Spirochaetes, Tenericutes (Mollicutes), Acidobacteria, Fibrobacteres, Fusobacteria, Dictyoglomi, Gemmatimonadetes, Lentisphaerae, Verrucomicrobia, Chlamydiae, and Planctomycetes*. Second edition. New York: Springer, 567–723.

Firrao G, Brown DR. 2013. International Committee on Systematics of Prokaryotes, Subcommittee on the taxonomy of *Mollicutes*: Minutes of the meetings, July 15<sup>th</sup> and the 19<sup>th</sup> 2012, Toulouse, France. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 63: 2361–2364.

Hennig-Pauka I, Sudendey C, Kleinschmidt S, Ruppitsch W, Loncaric I, Spergser J. 2020. Swine conjunctivitis associated with a novel *Mycoplasma* species closely related to *Mycoplasma hyorhinis*. *Pathogens* 10: 13.

Hoffmann IE. 2011. Artenkartierung Europäischer Ziesel und Feldhamster in Wien 21 Heeresspital und Umgebung östlich Brünner Straße. MA 22, 1422/2010.

Lane DJ. 1991. 16S/23S rRNA sequencing. In: Stackebrandt E, Goodfellow M, eds. *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*. New York: Wiley, 115–175.

Langford EV. 1977. The recovery of a mycoplasma from *Citellus richardsonii richardsonii* (ground squirrel). *Canadian Journal of Comparative Medicine*, 41(2): 224–225.

Levisohn S, Kleven SH. 2000. Avian mycoplasmosis (*Mycoplasma gallisepticum*). *Revue Scientifique et Technique* 19(2): 425–442.

Masover GK, Hayflick L. 1985. Fundamental biology of the class *Mollicutes*. In: *Infektionen durch Mycoplasmatales*. 1. Auflage. Gylstorff I, Köhler W, Mayr A, und Truszczyński M (eds.). Gustav Fischer Verlag, Jena, 15–29.

Miles RJ. 1992. Catabolism in *Mollicutes*. *Journal of General Microbiology* 138(9): 1773–1783.

Millesi E, Hoffmann IE. 2008. Body mass and timing of the active season in European ground squirrels (*Spermophilus citellus*) at high and low population density. *Lynx* 39(2): 305–315.

Niethammer J, Krapp F. 1978. Handbuch der Säugetiere Europas. In: Niethammer J, Krapp F. (Hrsg.): *Sciuridae – Hömchen*. Band 1 Rodentia 1. Erste Auflage. Wiesbaden: Akademische Verlagsgesellschaft, 122–144.

Pereyre S, Tardy F, Renaudin H, Cauvin E, Del Prá Netto Machado L, Tricot A, Benoit F, Treilles M, Bébéar C. 2013. Identification and subtyping of clinically relevant human and ruminant mycoplasmas by use of matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry. *Journal of Clinical Microbiology* 51: 3314–3323.

Pettersson B, Tully JG, Bölske G, Johansson KE. 2000. Updated phylogenetic description of the *Mycoplasma hominis* cluster (Weisburg et al 1989) based on 16S rDNA sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 50(1): 291–301.

Ramirez AS, Naylor CJ, Pitcher DG, Bradbury JM. 2008. High inter-species and low intraspecies variation in 16S-23S rDNA spacer sequences of pathogenic avian mycoplasmas offers potential use as a diagnostic tool. *Veterinary Microbiology* 128(3–4): 279–287.

Ramírez AS, Vega-Orellana OM, Viver T, Poveda JB, Rosales RS, Poveda CG, Spersger J, Szostak MP, Caballero MJ, Ressel L, Bradbury JM, Mar Tavío M, Karthikeyan S, Amann R, Konstantinidis KT, Rossello-Mora R. 2019. First description of two moderately halophilic and psychrotolerant *Mycoplasma* species isolated from cephalopods and proposal of *Mycoplasma*

*marinum* sp. nov. and *Mycoplasma todarodis* sp. nov. Systematic and Applied Microbiology 42: 457–467.

Ramos-Lara N, Koprowski JL, Krystufek B, Hoffmann IE. 2014: *Spermophilus citellus* (Rodentia: Sciuridae). Mammalian Species 46(913): 71–87.

Razin S. 1981. Mycoplasmas: The smallest pathogenic procaryotes. Israel Journal of Medical Sciences 17: 510–515.

Razin S, Yogev D, Naot Y. 1998. Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. Microbiology and Molecular Biology Reviews 62(4): 1094–1156.

Rose DL, Tully JG, Landford EV. 1978. *Mycoplasma citelli*, a new species from ground squirrels. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 28(4): 567–572.

Selbitz HJ. 2002. Bakterielle Krankheiten der Tiere. In: Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre. 7. Auflage. Rolle M, und Mayr A. Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart, Deutschland, 417–588.

Sirand-Pugnet P, Lartigue C, Marena M, Jacob D, Barre A, Barbe V, Schenowitz C, Mangelot S, Couloux A, Segurens B, de Daruvar A, Blanchard A, Citti C. 2007. Being pathogenic, plastic, and sexual while living with a nearly minimal bacterial genome. PLOS Genetics 3(5): e75.

Spergser J, Hess C, Loncaric I, Ramirez AS. 2019. MALDI-ToF mass spectrometry is a superior diagnostic tool for the identification and differentiation of mycoplasmas isolated from animals. Journal of Clinical Microbiology 57(9): e00316–19.

Spergser J, Botes A, Nel T, Ruppitsch W, Lepuschitz S, Langer S, Ries S, Dinhopf N, Szostak M, Loncaric I, Busse, HJ. 2020. *Mycoplasma nasistruthionis* sp. nov. and *Mycoplasma struthionis* sp. nov. isolated from ostriches with respiratory disease. Systematic and Applied Microbiology 43: 126047.

Spergser J, DeSoye P, Ruppitsch W, Cabal Rosel A, Dinhopf N, Szostak MP, Loncaric I, Chopra-Dewasthaly R, Busse, HJ. 2022. *Mycoplasma tauri* sp. nov. isolated from the bovine genital tract. Systematic and Applied Microbiology 45: 126292.

Tully JG, Bové JM, Laigret F, Whitcomb RF. 1993. Revised taxonomy of the class Mollicutes: Proposed elevation of a monophyletic cluster of arthropod-associated *Mollicutes* to ordinal rank (*Entomoplasmatales* ord. nov.), with provision for familial rank to separate species with nonhelical morphology (*Entomoplasmataceae* fam. nov.) from helical species (*Spiroplasmataceae*), and emended descriptions of the order *Mycoplasmatales*, family *Mycoplasmataceae*. *International Journal of Systematic Bacteriology* 43(2): 378–385.

Volokhov DV, Neverov AA, George J, Kong H, Liu SX, Anderson C, Davidson MK, Chizhikov V. 2007. Genetic analysis of housekeeping genes of members of the genus *Acholeplasma*: phylogeny and complementary molecular markers to the 16S rRNA gene. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 44(2): 699–710.

Volokhov DV, Simonyan V, Davidson MK, Chizhikov VE. 2012. RNA polymerase beta subunit (*rpoB*) gene and the 16S-23S rRNA intergenic transcribed spacer region (ITS) as complementary molecular markers in addition to the 16S rRNA gene for phylogenetic analysis and identification of the species of the family *Mycoplasmataceae*. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 62(1):515–528.

Weisburg WG, Tully JG, Rose DL, Petzel JP, Oyaizu H, Yang D, Mandelco L, Sechrest J, Lawrence TG, Van Etten J, Maniloff J, Woese CR. 1989. A phylogenetic analysis of the mycoplasmas: Basis for their classification. *Journal of Bacteriology* 171(12): 6455–6467.

Wieslander A, Rosen M. 2002. The Cell Membrane and Transport. In: Razin S, Herrmann R, eds. *Molecular Biology and Pathogenicity of Mycoplasmas*. First Edition. New York, Boston, Dordrecht, London, Moscow: Kluwer Academic Publishers, 131–161.

Woese CR. 1987. Bacterial evolution. *Microbiological Reviews* 51(2): 221–271.

Woese CR, Maniloff J, Zablen LB. 1980. Phylogenetic analysis of the mycoplasmas. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 77(1): 494–498.

## 9 Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

### 9.1 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Mykoplasmen-Isolate (Stammnummer, Jahr der Isolierung und Habitat)	- 6 -
Tabelle 2: Primer (Zielsequenz, Primer ID, Primer-Sequenz und Referenz)	- 9 -
Tabelle 3: Mastermixansatz für die Vervielfältigung des 16S-rRNA-Gens (Bestandteil und Menge)	- 10 -
Tabelle 4: Thermozyklische Bedingungen für die Vervielfältigung des 16S-rRNA-Gens (Schritt, Grad, Dauer in Minuten und Zyklen)	- 10 -
Tabelle 5: Mastermixansatz für die Vervielfältigung der 16S-23S-intergenetische-Spacer-Region (Bestandteil und Menge)	- 11 -
Tabelle 6: Thermozyklische Bedingungen für die Vervielfältigung der 16S-23S-intergenischen-Spacer-Region (Schritt, Grad, Dauer in Minuten und Zyklen)	- 11 -
Tabelle 7: Mastermixansatz für die Vervielfältigung des <i>rpoB</i> -Genfragments (Bestandteil und Menge)	- 11 -
Tabelle 8: Thermozyklische Bedingungen für die Vervielfältigung des <i>rpoB</i> -Genfragements (Schritt, Grad, Dauer in Minuten und Zyklen)	- 12 -
Tabelle 9: Thermozyklische Bedingungen für die Aufreinigung der PCR-Produkte (Schritt, Grad und Dauer in Minuten)	- 13 -
Tabelle 10: Protokoll der Silberfärbung des Proteingels (Schritt, Lösung, Zusammensetzung und Zeit)	- 21 -

### 9.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Phylogenetische Position der untersuchten Mykoplasmen-Isolate basierend auf 16S-rRNA-Gensequenzen. Der Konsensus-Baum wurde aus 1000 Bootstrap-Replikaten konstruiert (nur Werte über 70 sind angegeben). Der Maßstabbalken vermittelt die Distanz zwischen den Mykoplasmen-Stämmen (Substitution/Position). Die Berechnung wurde mittels MEGA6 durchgeführt.	- 23 -
Abbildung 2: Phylogenetische Position ausgewählter Mykoplasmen-Isolate basierend auf 16S-23S-intergenischen-Spacer-Sequenzen. Der Konsensus-Baum wurde aus 1000 Bootstrap-Replikaten konstruiert (nur Werte über 70 sind angegeben). Der Maßstabbalken vermittelt die	

Distanz zwischen den Mykoplasmen-Stämmen (Substitution/Position). Die Berechnung wurde mittels MEGA6 durchgeführt. - 24 -

Abbildung 3: Phylogenetische Position ausgewählter Mykoplasmen-Isolate basierend auf partiellen *rpoB*-Gensequenzen. Der Konsensus-Baum wurde aus 1000 Bootstrap-Replikaten konstruiert (nur Werte über 70 sind angegeben). Der Maßstabbalken vermittelt die Distanz zwischen den Mykoplasmen-Stämmen (Substitution/Position). Die Berechnung wurde mittels MEGA6 durchgeführt. - 25 -

Abbildung 4: Kolonien von 3686d (A) auf SP4-Agar nach Bebrütung über vier Tage, 40-fache Vergrößerung, dunkler Koloniemorphotyp, Kolonien von 3686h (B) auf SP4-Agar nach Bebrütung über vier Tage, 40-fache Vergrößerung, heller Morphotyp - 26 -

Abbildung 5: Koloniebildung von 1579d auf SP4-Agar nach Bebrütung über vier Tage, 40-fache Vergrößerung, (A) unfiltriert, (B) nach Filtration mit Spitzen-Membranfilter mit einer Porengröße von 450 nm, (C) nach Filtration mit Spitzen-Membranfilter mit einer Porengröße von 220 nm - 27 -

Abbildung 6: Ausbildung eines Wachstums-Hemmhofs um das Digitonin-Filterplättchen nach Bebrütung von Isolat 3686h über zwei Tage - 28 -

Abbildung 7: Enzymaktivität von Isolat 1579d (API-ZYM-Testkit), Farbumschlag bei Becher 3: Esterase (C4), Becher 4: Esterase Lipase (C8) und Becher 12: Naphthol-AS-BI-Phosphohydrolase - 29 -

Abbildung 8: Kolonien von Isolat 1579d auf PPLO-Platten nach anaerober Bebrütung über 10 Tage. (A) Tetrazoliumchlorid-Reduktion, angezeigt durch Ausbildung von Rot- bzw. pinkgefärbten Kolonien (B) Kaliumtellurite-Reduktion, vermittelt durch Ausbildung schwarzgefärbter Kolonien - 30 -

Abbildung 9: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen von Isolat 1579d - 31 -

Abbildung 10: MALDI-TOF-Dendrogramm auf Grundlage von Distanzwerten zwischen den Mykoplasmen-Isolaten 2686h, ac959, 2821h, 129d, 35d, 1579d, 5438d, 3686d und *Mycoplasma citelli* RG-2C<sup>T</sup> mit Ausbildung zweier Cluster - 32 -

Abbildung 11: Überlagerung zweier Cluster-spezifischer Massenspektren (1579d – rot, 3686h – blau) mit Darstellung von Peak-Intensitätsunterschieden und Peak-Verschiebungen - 33 -

Abbildung 12: Proteinbandenmuster der untersuchten Mykoplasmen-Isolate und Mykoplasmen-Typstämme. M: Molekulargewichtsmarker, 1: *Mycoplasma cricetuli* CH<sup>T</sup>, 2: *Mycoplasma columborale* MMP-4<sup>T</sup>, 3: *Mycoplasma felis* CO<sup>T</sup>, 4: *Mycoplasma citelli* RG-2C<sup>T</sup>, 5: ac959, 6: 2821h, 7: 3686h, 8: 129d, 9: 35d, 10: 3686d, 11: 1579d, 12: 5438d - 34 -