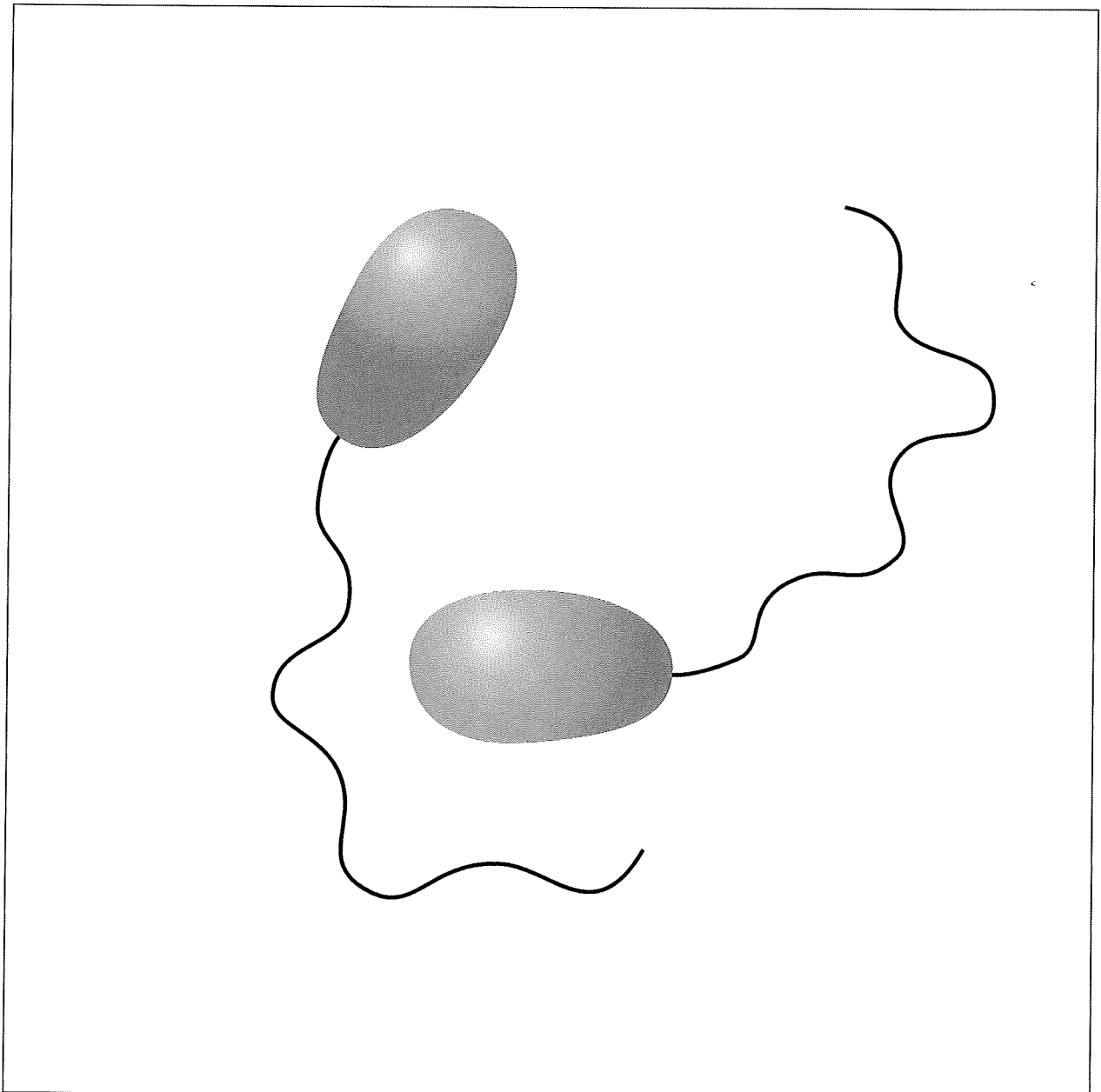


RAPPORT LNR 4320-2000

## **“Pinpoint”** bakterien

Karakterisering og  
identifikasjon



**Hovedkontor**

Postboks 173, Kjelsås  
0411 Oslo  
Telefon (47) 22 18 51 00  
Telefax (47) 22 18 52 00  
Internet: www.niva.no

**Sørlandsavdelingen**

Televeien 3  
4879 Grimstad  
Telefon (47) 37 29 50 55  
Telefax (47) 37 04 45 13

**Østlandsavdelingen**

Sandvikaveien 41  
2312 Ottestad  
Telefon (47) 62 57 64 00  
Telefax (47) 62 57 66 53

**Vestlandsavdelingen**

Nordnesboder 5  
5008 Bergen  
Telefon (47) 55 30 22 50  
Telefax (47) 55 30 22 51

**Akvaplan-niva**

9296 Tromsø  
Telefon (47) 77 75 03 00  
Telefax (47) 77 75 03 01

Tittel "Pinpoint" bakterien. Karakterisering og identifikasjon	Løpenr. (for bestilling) 4320	Dato 12. desember 00
	Prosjektnr. Undernr. 20173 1	Sider Pris 10
Forfatter(e) Harry Efraimsen Olav Skulberg Henning Mohn	Fagområde 37	Distribusjon
	Geografisk område ØS	Trykket NIVA

Oppdragsgiver(e) Oslo kommune. Vann- og avløpsetaten (VAV)	Oppdragsreferanse Stein Fosser
---	-----------------------------------

**Sammendrag**

Under første halvår 2000 ble det påvist fremvekst av små bakteriekolonier i tester for heterotrofe bakterier (kimtall) i vannprøver tatt fra forskjellige steder på ledningsnett. Bakteriens karakteristiske vekst i kolonier på standard kimtallsmedium førte til at den ble kalt "pinpoint bakterie". Periodevis høye kimtall aktualiserte behovet for at bakterien ble identifisert. Temperatur og pH-toleranse er undersøkt, samt fysiologiske egenskaper med bruk av identifikasjonssystemet API 20 NE. Renkultur av bakterien ble dyrket på R2A medium og sendt til et spesiallaboratorium i USA for typifisering basert på 16S rRNA sekvensering. Resultater derfra viste at "pinpoint bakterien" med størst sannsynlighet er *Pseudomonas mephitica*.

Fire norske emneord	Fire engelske emneord
1. Drikkevann	1. Drinking water
2. Heterotrofe bakterier	2. Heterotrophic bacteria
3. Identifisering av bakterier	3. Identification of bacteria
4. <i>Pseudomonas mephitica</i>	4. <i>Pseudomonas mephitica</i>

  
Henning Mohn  
Prosjektleder

  
Svein Stene-Johansen  
Forskningsleder

  
Bente M. Wathne  
Forskningsjef

**"Pinpoint" bakterien**  
**Karakterisering og identifikasjon**

Undersøkelse for Oslo kommune

Vann- og avløpsetaten

Delprosjekt 1

## Forord

I løpet av år 2000 har det forekommet stedvise oppblomstringer av en hittil ikke-identifisert bakterietype i drikkevannsnettet i Oslo kommune. Denne bakterien har blitt omtalt som en pinpoint bakterie, da den har dannet små særegne bakteriekolonier på dyrkningsplater.

Hensikten med dette prosjektet har vært å identifisere hvilken art eller slekt denne "problembakterien" tilhørte, og om det kan bli avklart hvorvidt bakterien har negativ betydning for kvaliteten på drikkevannet.

Rapporten er utarbeidet av Norsk institutt for vannforskning (NIVA) på oppdrag fra Vann- og avløpsetaten i Oslo kommune. Stein Fosser har vært NIVAs kontakt i Vann- og avløpsetaten. Kari Dommersnes fra Helsevernetaten var behjelpelig med å skaffe kolonier av den relevante bakterien.

Ved NIVA har Åse Bakketun stått for dyrkningen av bakterien i renkulturer og utført de fysiologiske testene. Olav Skulberg og Harry Efraimsen har hatt det faglige ansvaret og stått for rapporteringen.

Henning Mohn har vært koordinator og prosjektleder.

Oslo, 14 desember 2000

*Henning Mohn*

---

# Innhold

<b>1. Innledning</b>	<b>5</b>
<b>2. Testbetingelser og metoder</b>	<b>5</b>
<b>3. Resultater</b>	<b>6</b>
3.1 Mikroskopiering	6
3.2 Mediumpreferanse	6
3.3 Temperatur og pH toleranse	6
3.4 Identifikasjon med API 20 NE	7
3.5 Typifisering basert på 16S rRNA sekvensering	7
3.6 Økologiske forhold	8
<b>4. Konklusjon</b>	<b>8</b>
<b>Vedlegg A.</b>	<b>9</b>
<b>Vedlegg B.</b>	<b>14</b>

## 1. Innledning

Under førte halvår 2000 ble det i vannprøver fra flere steder på ledningsnettet påvist fremvekst av bakteriekolonier i tester med standard dyrkningsmedium for heterotrofe bakterier (kimtall). Det var langsomt voksende bakterier som dannet svært små lyse kolonier selv med forlenget inkubering. Når de ble påvist, var antallet ofte så høyt at ansvarlige for den hygieniske kontrollen ved Oslo vann- og avløpsetat reagerte. De hadde behov for å finne årsaken til fremveksten. Dette var en type bakterie, med karakteristisk kolonidannelse som ikke var observert tidligere. NIVA ble engasjert i problemstillingen og foreslo et delprosjekt med oppgave å foreta systematisk bestemmelse av mikroorganismen betegnet "pinpoint" bakterien.

Kimtallsskåler med vekst av "pinpoint" kolonier ble skaffet fra Helsevernetatens laboratorium i Oslo.

Målet med arbeidet var å identifisere hvilken bakterie det dreide seg om. Et interessant spørsmål var om denne bakterieart vanligvis forekommer i jord og vann, eller om det eventuelt var en opportunistisk patogen art. Første fase i identifikasjonen var å belyse temperatur- og pH-toleransen. Det ble utført noen tester for å avsløre evne til å utnytte enkle sukkerarter og aminosyrer (API bestemmelsesnøkkel). Dette forarbeidet var viktig for å gi tilleggsinformasjon for den avsluttende identifikasjonen med rRNA analyse. Etter at tilstrekkelig biomasse av renkulturen var dyrket frem, ble materialet sendt til Microbial ID, Inc. i USA, for rRNA sekvensiell bestemmelse. (Genom DNA ble isolert fra bakteriebiomassen).

## 2. Testbetingelser og metoder

To typer flytende medier ble preparert; R2A flytende medium (uten agar) fra DIFCO, og 50% styrke av flytende NA-medium (NS-EN 6222). Under arbeidet med dyrkning for å oppnå renkultur ble det benyttet R2A agar med utsåing i petriskåler.

Fra Miljøvernetaten ble det mottatt 3 petriskåler med "pinpoint" kolonier, merket henholdsvis 821-4, 821-5 og 826-6, (faste lokaliteter på ledningsnettet). En karakteristisk koloni fra hver av disse platene ble brukt til inokulering i begge alternative flytende medier. Etter 5 dager ble kulturene undersøkt i mikroskop for registrering av form, bevegelse og størrelse.

Testing av bakteriens temperatur og pH toleranse ble utført i flytende R2A medium. For temperaturtoleranse ble det benyttet medium med pH 7,2, og følgende temperaturer ble valgt; 4, 10, 30 og 35 °C. For pH-toleranse ble det benyttet pH ved 4,5; 5,5; 8,5 og 9,5. Inkubasjonstemperaturen var 20 °C, og varigheten var maksimalt 12 døgn.

Renkultur av isolat fra 621-5 med "pin point kolonier", ble testet i API 20 NE -test (bioMérieux sa) "Identification system for Gram-negative rods".

Den samme renkulturen ble strøket ut på R2A agar i petriskåler og sendt til Microbial ID, Inc. i USA. Typifisering ble utført basert på 16S rRNA sekvensering. Resultatene derfra er presentert i vedlegget.

### 3. Resultater

#### 3.1 Mikroskopiering

Bakterier fra lokalitet 821-5 og 6 viste identisk form og bevegelighet. Cellene var bevegelige med polare flageller. Bakteriene var ca én µm tykke og 3-5 µm lange. Bakterier fra lokalitet 821-4 var av samme størrelse, men relativt få viste seg å være bevegelige. De viste stor affinitet til glassflaten, hvor hele celledmassen ble liggende i samme plan. Det antas at kulturen var kommet lengre ut i vekstfasen enn de to øvrige, og at en begynnende aldring og begrenset næringstilgang gjorde seg gjeldende. Det ble antatt at dette isolatet var en annen art (stamme), enn fra 821-5.

#### 3.2 Mediumpreferanse

Vekst på de to næringsmediene som ble undersøkt er vist i tabellen nedenfor. Omfanget av vekst er betegnet med pluss-tegn (+ står for svakt vekst, ++ står for god vekst, +++ står for meget god vekst).

Tabell 1. Observert vekst

Medium	Vekst etter 2 dager	Vekst etter 5 dager	Utseende
R2A-buljong	+++		
10 % NA- flyt. medium	+++		
50 % NA- flyt. medium	++		
R2A-agar		+++	Gul-hvit
10 % NA-agar		+	
50 % NA-agar		++	Gul-hvit

+ svakt vekst, ++ god vekst, +++ meget god vekst

Isolatene utviklet meget raskt en høy bakterietetthet både i R2A-buljong og 10 % flytende NA-medium. I 50 % NA ble det observert lavere tetthet ved samme inkuberingstid. Fremvekst av kolonier på medier tilsatt agar var best på R2A-agar.

#### 3.3 Temperatur- og pH-toleranse

Resultatene fra denne undersøkelsen se vist i tabellen nedenfor. Omfanget av vekst er betegnet med plusstegn, fravær av bakterievekst vises med minustegn.

Tabell 2. Temperatur- og pH toleranse for isolat 821-5.

Temp °C	Vekst etter 4 dager	Vekst etter 6 dager	Vekst etter 12 dager	pH	Vekst etter 4 dager
4	(+)	+	++	4.5	++
10		++		5.5	+++
30	+(+)			8.5	+++
35	-	-	-	9.5	+++

+ svakt vekst, ++ god vekst, +++ meget god vekst, – ingen vekst

Isolat 821-5 viste i testene å vokse godt ved temperaturvalg til og med ved 30°C. Veksten var påviselig langsommere ved 4°C. Det ble ikke påvist vekst ved 35 °C.

Tilfredsstillende vekst ble påvist ved alle undersøkte pH-verdier.

### 3.4 Identifikasjon med API 20 NE

Resultater fra forsøk med identifikasjonssystemet API 20 NE er vist i tabellen nedenfor.

Av de undersøkte reaksjonene som foreligger i testen ble bare 3 registrert som positive. Dette er for lite til å gi en pålitelig typifisering av genus eller art.

Tabell 3. Karakterisering i fysiologiske tester.

TESTS	Substrates	Process	Results
NO3	potassium nitrate	nitrates to nitrites nitrates to nitrogen	-
TRP	tryptophane	indole production	-
GLU	glucose	acidification	-
ADH	arginine	arginine dehydrolase	-
URE	urea	urease	-
ESC	esculin	hydrolyses ( $\beta$ -glucosidase)	-
GEL	gelatin	hydrolyses	-
PNPG	p-nitrophenyl- $\beta$ -D-galctopyranoside	$\beta$ -galactisidase	-
GLU	glucose	assimilation	-
ARA	arabinose	assimilation	-
MNE	mannose	assimilation	-
MAN	mannitol	assimilation	-
NAG	N-acetyl-glucosamine	assimilation	-
MAL	maltose	assimilation	-
GNT	gluconate	assimilation	-
CAP	caprate	assimilation	-
ADI	adipate	assimilation	-
MLT	malate	assimilation	+
CIT	citrate	assimilation	+
PAC	phenyl-acetate	assimilation	-
OX	tertamethyl-p-phenylene diamine	cytochrome oxidase	+

+ vekst, - ingen vekst

### 3.5 Typifisering basert på 16S rRNA sekvensering

Resultatene fra arbeidet som ble utført ved Microbial ID, Inc. i USA er vist i vedlegget.

Det ble først utført en gasskromatografisk analyse for å bestemme den cellulære sammensetning av fettsyrer. Resultatet fra denne analysen viste at bakterien var en gram negativ art, som ikke var representert i databasen.

Identifikasjon basert på 16S rRNA sekvenslikhet viste størst overensstemmelse med arten *Pseudomonas mephitica* og *Janthinobacterium lividum*. Imidlertid produserer *J. lividum* fiolette kolonier på fast media, noe som ikke ble observert hos "pinpoint" bakterien, selv om både temperatur og pH -toleranse passer godt til denne arten også.

Bergey's "Manual of Determinative Bacteriology", Seventh edition, beskriver *Pseudomonas mephitica* som en aerob, gram-negativ stavbakterie, 0,5 til 1,0  $\mu\text{m}$  tykk og 1,5 til 14  $\mu\text{m}$  lang. organismen er organisert som enkelt-celler eller celler i par, men forekommer også i kjeder. Den er



aktiv bevegelig med polare flageller. Vekst på fast medium fremtrer som grå-hvite biomasse med ruglet overflate. En "stinkdyraktig" ubehagelig lukt vil utvikles etter 1-2 dager. Optimal temperatur er ca. 21 °C , men veksten er svakere ved 5 °C og 30 °C. Bakterien vokser ikke ved 37 °C.

### 3.6 Økologiske forhold

Arter i slekten *Pseudomonas* tilhører en fremgangsrik gruppe bakterier som utvikler seg både i vann og jordmiljøer. De viser preferanse for flytende substrat, og kan være knyttet til kloakkvann og andre substanser av organisk materiale under nedbrytning.

Mange pseudomonader har utpreget proteolytiske egenskaper (kan spalte protein). De har enkle næringskrav (lite fordringsfulle), og lever i naturen i samspill med andre mikroorganismer, f.eks. Actinomyceter i blandete populasjoner. Det er kjent at stammer av *Pseudomonas* kan være bærere av plasmider med gener som overfører resistens for antibiotiske stoffer. Pseudomonadene opptrer hovedsakelig som saprofytiske organismer, til dels som plante- og dyrepatogene organismer. I hygienisk sammenhang kan nevnes at pseudomonader hører til organismer som kan bidra til at næringsmidler blir skjemt.

## 4. Konklusjon

Arbeidet med identifikasjonen av "pinpoint" bakterien fra isolat merket 821-5 har ved en avsluttende 16S rRNA sekvensering vist at denne arten med stor sannsynlighet er *Pseudomonas mephitca* (Claydon and Hammer, 1939).

Oppblomstring av denne arten kan bidra til å forringe vannkvaliteten ved eventuelt å sette vond lukt på vannet. Det er foreløpig ikke angitt at denne arten har annen negativ helsemessig betydning.

## **Vedlegg A.**

Typifisering basert på 16S rRNA sekvensering



# Alignment Report - 500 BP Identification

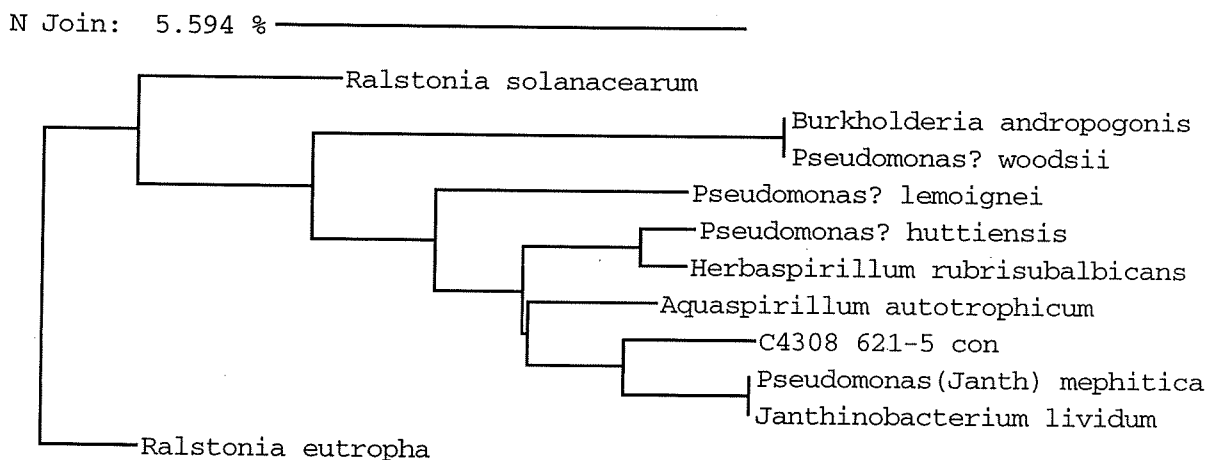
Customer: Efraimsen

Sample: C4308 621-5 con

Date: Wednesday, November 15, 2000 8:46 AM

- Alignment: 524 C4308 621-5 con
- 3.07 % 522 Pseudomonas(Janth) mephitica
  - 3.07 % 522 Janthinobacterium lividum
  - 4.39 % 524 Aquaspirillum autotrophicum
  - 4.58 % 524 Pseudomonas? huttiensis
  - 5.15 % 524 Herbaspirillum rubrisubalbicans
  - 6.68 % 524 Pseudomonas? lemoignei
  - 9.96 % 522 Burkholderia andropogonis
  - 9.96 % 522 Pseudomonas? woodsii
  - 10.11 % 526 Ralstonia solanacearum
  - 10.54 % 522 Ralstonia eutropha

## Neighbor Joining Tree



## Concise Alignment - 500 bp

```

111223444444
7788458147556666
1237781693341234
C4308 621-5 con      TGCACGCAGCCTCAGT
Janthinobacterium lividum -C-GTAAGAAAGTCTC
  
```

Reviewer's signature

For Research Use Only.

# Report Summary

Customer: Efraimsen

11/15/2000



## 500 bp Identification Summary

MicroSeq Database

C code	sample	closest match	% difference	confidence level
N346EFR	C4308 621-5 con	Pseudomonas(Janth) mephitica	3.07 %	No Match

### Key:

\* - See report for additional comments concerning this field.

**C code** - Customer number assigned by MIDI Labs.

**sample** - Sample number assigned by MIDI Labs, followed by name assigned by customer.

**closest match** - Closest match to sample when aligned in a pairwise manner against the MicroSeq Database.

**% difference** - Percent difference between the sample and the closest match. Mismatched basepairs, gaps, and ambiguity codes are all accounted for in this percentage.

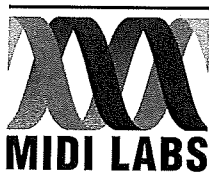
**confidence level** - This indicates the level of identification; see Identification Report Summary for additional information.

**For research use only**

# Alignment Report

Customer: Efraimsen

11/15/2000



## Partial 16S rRNA Gene Alignment with GenBank

sample #	closest GenBank match	% ID
C4308 621-5 con	<i>Pseudomonas mephitica</i>	96%

**C#** - Customer number assigned by MIDI Labs.

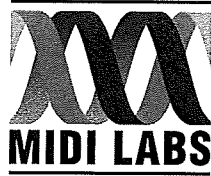
**sample #** - Sample number assigned by MIDI Labs, followed by name assigned by customer.

**closest GenBank match** - Results from blast search of GenBank database.  
**% ID** - percent identity; this is essentially the percent similarity.

See GenBank web page ([www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/blast\\_help.html](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/blast_help.html)) for more detailed information.

MIDI Labs claims no responsibility for the validity of sequences found in GenBank or RDP.

**For research use only**



## Identification Report Summary

Bacterial identifications assigned by MIDI Labs are based on 16S rRNA gene sequence similarity. Sample sequences are compared against PE Applied Biosystem's MicroSeq™ database using MicroSeq sequence analysis software. The top ten alignment matches are presented in a percent genetic distance format, which is basically the percent difference between two aligned sequences. This percentage takes into account any mismatched basepairs, gaps and IUB ambiguity codes. In this format a low percent indicates a close match.

**Species Level** - This indicates a species level match. A 16S rRNA sequence homology of greater than 99% is indicative of a species level match (Stackebrandt and Goebel). Our experience in developing the MicroSeq database leads us to agree with this conclusion, though we feel that there is no exact cut off point that can be applied to all groups. It is our opinion that each alignment needs to be analyzed individually, taking into account the percent genetic distance between known species within that group.

Note that our results are presented in a genetic distance format, which is essentially the opposite of percent homology.

**Genus Level** - This indicates that the sample appears to group within a particular genus but the alignment did not produce a species level match. A genus level match indicates that the sample species is not included in the MicroSeq database

**No Match** - This indicates that sample did not group well within any particular genus found in the MicroSeq database. In cases such as this, we search the GenBank database with the sample sequence to try to provide a closer match. If the sample sequence does not match well with either of these databases, it may be a new species or a species whose 16S rRNA gene sequence is not present in any of the databases.

### Reference:

Stackebrandt, E. and Goebel, B. M. 1994. Taxonomic Note: A Place for DNA-DNA Reassociation and 16S rRNA Sequence Analysis in the Present Species Definition in Bacteriology. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **44**:846-849

## **Vedlegg B.**

Fettsyre analyser

ID: 6889 UN-NIVA-10 (2-621 5 9/22/00-2d PCON KLG Date of run: 27-OCT-00 19:02:08  
 Bottle: 86 SAMPLE [TSBA40]

RT	Area	Ar/Ht	Respon	ECL	Name	%	Comment 1	Comment 2
1.817	341244744	0.031	. . .	7.003	SOLVENT PEAK . . . . .	. . . . .	< min rt	
2.107	2091	0.037	. . .	7.562	. . . . .	. . . . .	< min rt	
2.175	1944	0.035	. . .	7.693	. . . . .	. . . . .	< min rt	
4.478	6502	0.033	1.093	11.417	10:0 30H . . . . .	6.82	ECL deviates -0.005	
5.024	4258	0.034	1.065	12.000	12:0 . . . . .	4.35	ECL deviates -0.000	Reference -0.000
6.433	2664	0.039	1.016	13.177	12:0 20H . . . . .	2.60	ECL deviates -0.000	
7.570	622	0.049	0.989	14.000	14:0 . . . . .	0.59	ECL deviates 0.000	Reference -0.002
8.535	670	0.044	0.972	14.625	15:0 ISO . . . . .	0.62	ECL deviates 0.002	Reference -0.000
10.476	11309	0.048	0.946	15.815	Sum In Feature 3 . . .	10.26	ECL deviates -0.007	16:1 w7c/15 iso 20H
10.781	25441	0.046	0.942	15.998	16:0 . . . . .	23.01	ECL deviates -0.002	Reference -0.003
10.930	2440	0.069	. . .	16.084	. . . . .	. . . . .	. . . . .	
12.319	44635	0.051	0.929	16.887	17:0 CYCLO . . . . .	39.80	ECL deviates -0.001	Reference -0.000
13.827	2202	0.055	. . .	17.746	. . . . .	. . . . .	. . . . .	
13.954	3908	0.050	0.919	17.818	18:1 w7c . . . . .	3.45	ECL deviates -0.005	
15.030	3125	0.065	. . .	18.433	. . . . .	. . . . .	. . . . .	
15.396	1348	0.052	0.912	18.642	19:0 ISO . . . . .	1.18	ECL deviates 0.008	Reference 0.013
15.839	8363	0.053	0.910	18.895	19:0 CYCLO w8c . . .	7.31	ECL deviates -0.007	Reference -0.001
15.942	1096	0.049	. . .	18.954	. . . . .	. . . . .	. . . . .	
*****	11309	. . .	. . .	. . .	SUMMED FEATURE 3 . . .	10.26	16:1 w7c/15 iso 20H	15:0 ISO 20H/16:1w7c

Solvent Ar	Total Area	Named Area	% Named	Total Amnt	Nbr Ref	ECL Deviation	Ref ECL Shift
341244744	118582	109719	92.53	104172	7	0.004	0.005

TSBA40 [Rev 4.10] \* NO MATCH \*

*gram(-) species not in the database*

*kd*

*10-30-00*



ID: 6890 UN-NIVA-10 (3A-821 5-2d PCON KLG Date of run: 27-OCT-00 19:27:33  
 Bottle: 87 SAMPLE [TSBA40]

RT	Area	Ar/Ht	Respon	ECL	Name	%	Comment 1	Comment 2
1.744	374618472	0.031	. . .	7.009	SOLVENT PEAK . . . . .	. . . . .	< min rt	
1.935	335	0.029	. . .	7.374	. . . . .	. . . . .	< min rt	
2.036	1921	0.029	. . .	7.567	. . . . .	. . . . .	< min rt	
2.104	1503	0.025	. . .	7.697	. . . . .	. . . . .	< min rt	
4.422	5175	0.032	1.100	11.419	10:0 30H . . . . .	6.88	ECL deviates -0.003	
4.969	3188	0.033	1.072	12.000	12:0 . . . . .	4.13	ECL deviates 0.000	Reference 0.001
6.389	2269	0.040	1.021	13.179	12:0 20H . . . . .	2.80	ECL deviates 0.002	
10.461	14758	0.047	0.939	15.819	Sum In Feature 3 . . .	16.73	ECL deviates -0.003	16:1 w7c/15 iso 20H
10.764	20230	0.044	0.935	15.999	16:0 . . . . .	22.84	ECL deviates -0.001	Reference -0.003
10.923	1636	0.062	. . .	16.090	. . . . .	. . . . .		
12.311	30061	0.049	0.919	16.888	17:0 CYCLO . . . . .	33.37	ECL deviates -0.000	Reference -0.001
13.831	1643	0.055	. . .	17.748	. . . . .	. . . . .		
13.956	5338	0.049	0.909	17.819	18:1 w7c . . . . .	5.86	ECL deviates -0.004	
15.042	2131	0.062	. . .	18.435	. . . . .	. . . . .		
15.406	983	0.050	0.904	18.642	19:0 ISO . . . . .	1.07	ECL deviates 0.008	Reference 0.014
15.849	5791	0.053	0.904	18.895	19:0 CYCLO w8c . . .	6.32	ECL deviates -0.007	Reference -0.001
15.963	823	0.051	. . .	18.959	. . . . .	. . . . .		
18.121	9565	0.120	. . .	20.199	. . . . .	. . . . .	> max rt	
19.725	472	0.062	. . .	21.132	. . . . .	. . . . .	> max rt	
*****	14758	. . . . .	. . . . .	. . . . .	SUMMED FEATURE 3 . . .	16.73	16:1 w7c/15 iso 20H	15:0 ISO 20H/16:1w7c

Solvent Ar	Total Area	Named Area	% Named	Total Amnt	Nbr Ref	ECL Deviation	Ref ECL Shift
374618472	94028	87795	93.37	82815	5	0.004	0.006

TSBA40 [Rev 4.10] \* NO MATCH \* *gram (-) species not in the database*

*kd  
10-30-00*

ID: 10260 UN-NIVA-10 (1A-621 5 10/6/00-3d PCON RR Date of run: 30-OCT-00 12:57:40  
 Bottle: 71 SAMPLE [TSBA40]

RT	Area	Ar/Ht	Respon	ECL	Name	%	Comment 1	Comment 2
1.676	407995969	0.026	. . .	7.017	SOLVENT PEAK . . . . .	. . . . .	< min rt	
1.949	1059	0.025	. . .	7.563	. . . . .	. . . . .	< min rt	
2.015	988	0.023	. . .	7.695	. . . . .	. . . . .	< min rt	
3.168	288	0.026	1.193	9.999	10:0 . . . . .	0.35	ECL deviates -0.001	Reference 0.002
4.248	6005	0.030	1.105	11.424	10:0 30H . . . . .	6.70	ECL deviates 0.002	
4.777	4364	0.031	1.075	12.002	12:0 . . . . .	4.73	ECL deviates 0.002	Reference 0.007
6.162	2239	0.034	1.023	13.177	12:0 20H . . . . .	2.31	ECL deviates -0.000	
7.283	660	0.038	0.993	13.999	14:0 . . . . .	0.66	ECL deviates -0.001	Reference 0.006
10.174	6387	0.045	0.944	15.817	Sum In Feature 3 . . .	6.09	ECL deviates -0.005	16:1 w7c/15 iso 20H
10.325	726	0.043	0.943	15.907	16:1 w5c . . . . .	0.69	ECL deviates -0.002	
10.477	24630	0.044	0.941	15.998	16:0 . . . . .	23.38	ECL deviates -0.002	Reference 0.005
10.633	2230	0.060	. . .	16.089	. . . . .	. . . . .		
12.014	48342	0.045	0.925	16.889	17:0 CYCLO . . . . .	45.11	ECL deviates 0.001	Reference 0.007
13.525	1972	0.051	. . .	17.752	. . . . .	. . . . .		
13.652	1669	0.042	0.911	17.824	18:1 w7c . . . . .	1.54	ECL deviates 0.001	
14.737	2750	0.057	. . .	18.443	. . . . .	. . . . .		
15.103	1167	0.044	. . .	18.652	. . . . .	. . . . .		
15.540	9304	0.046	0.900	18.902	19:0 CYCLO w8c . . . .	8.45	ECL deviates 0.000	Reference 0.003
15.653	1054	0.050	. . .	18.967	. . . . .	. . . . .		
*****	6387	. . . . .	. . . . .	. . . . .	SUMMED FEATURE 3 . . .	6.09	16:1 w7c/15 iso 20H	15:0 ISO 20H/16:1w7c

Solvent Ar	Total Area	Named Area	% Named	Total Amt	Nbr Ref	ECL Deviation	Ref ECL Shift
407995969	113786	104613	91.94	99092	6	0.002	0.005

TSBA40 [Rev 4.10] \* NO MATCH \*

*gram(-) species not in the database*  
*Kd/11-9-00*



Enclosed are your sample results, including fatty acid profiles and library matches. Dendrogram program analysis for tracking strains has been included, when applicable.

Microorganism identification at Microbial ID, Inc. is based on **Similarity Index**. Similarity index in the Microbial Identification System (MIS) is a numerical value which expresses how closely the fatty acid composition of an unknown sample compares with the mean fatty acid composition of the strains used to create the library entry listed as its match. The database search presents the best matches and associated similarity indices. An exact match of the fatty acid make-up of the unknown sample to the mean of a library entry results in a similarity index of 1.000. The similarity index will decrease as each fatty acid varies from the mean percentage.

**General guidelines** for MIS Similarity Index interpretation:

1. Strains with a similarity of 0.600 or higher and with a separation of 0.100 between first and second choice are **good** matches.
2. A similarity index between 0.400 and 0.600 may be a good match but would indicate an atypical strain.
3. Values lower than 0.400 suggest that the species is not in the database but those listed provide the most closely related species.

The Dendrogram program uses cluster analysis techniques to produce unweighted pair matchings based on fatty acid compositions. The results are displayed graphically in a diagram that depicts the relatedness of pairs of entries. Multiple analyses and experience with the program have shown that **species** link at **about 10** Euclidian Distance, **subspecies** at **about 6** Euclidian Distance, and **strains** at **about 2** Euclidian Distance. Duplicate *Bacillus* strains, due to the greater variability encountered from spore production, link at **about 3** Euclidian Distance.

A more detailed description of the interpretation can be found in the Similarity Index handout and Technical Note 102 included with your results. Please do not hesitate to contact us if you have questions or need more information. Thank you for your interest in Microbial ID, Inc.