
**Entwicklung und Anwendung gaschromatographischer Methoden
zur Charakterisierung des extrazellulären volatilen Metaboloms von
Pseudomonas aeruginosa im Biofilm**

DISSERTATION

*Zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften*

*– Dr. rer. nat. –
vorgelegt von*

TIMO KÖHLER

*Geboren in
Essen*

*Angewandte Analytische Chemie
Fakultät Chemie der Universität Duisburg-Essen
Campus Essen*

Diese Dissertation wird via DuEPublico, dem Dokumenten- und Publikationsserver der Universität Duisburg-Essen, zur Verfügung gestellt und liegt auch als Print-Version vor.

DOI: 10.17185/duepublico/74750

URN: urn:nbn:de:hbz:464-20210901-102548-1

Alle Rechte vorbehalten.

FÜR JENNY, MARTIN & ULRIKE

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von Oktober 2017 bis Dezember 2020 im Arbeitskreis von Prof. Dr. Oliver J. Schmitz in der Angewandten Analytischen Chemie der Universität Duisburg-Essen durchgeführt.

Tag der Disputation: 17.08.2021

Gutachter: Prof. Dr. Oliver J. Schmitz
PD Dr. Ursula Telgheder
Prof. Dr. Heiko Hayen

Vorsitzender: Prof. Dr. Jochen Niemeyer

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides statt durch meine Unterschrift, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Titel

***„Entwicklung und Anwendung gaschromatographischer Methoden zur
Charakterisierung des extrazellulären volatilen Metaboloms von
Pseudomonas aeruginosa im Biofilm“***

selbständig und ohne fremde Hilfe angefertigt und alle Stellen, die ich wörtlich oder inhaltlich übernommen habe, als solche kenntlich gemacht habe, mich auch keiner anderen als der angegebenen Literatur oder sonstiger Hilfsmittel bedient habe.

Ich habe weder in diesem noch einem anderen Fach ein gescheitertes Promotionsverfahren durchlaufen.

Ich versichere an Eides Statt, dass ich die vorgenannten Angaben nach bestem Wissen und Gewissen gemacht habe und dass die Angaben der Wahrheit entsprechen und ich nichts verschwiegen habe.

Die Strafbarkeit einer falschen eidesstattlichen Versicherung ist mir bekannt, namentlich die Strafandrohung gemäß § 156 StGB bis zu drei Jahren Freiheitsstrafe oder Geldstrafe bei vorsätzlicher Begehung der Tat bzw. gemäß § 161 Abs.1 StGB bis zu einem Jahr Freiheitsstrafe oder Geldstrafe bei fahrlässiger Begehung.

Essen, den 30.03.2021

Timo Köhler

Danksagung

Mein erster Dank gilt Herrn Prof. Dr. Oliver J. Schmitz für die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und die interessante Aufgabenstellung, die ich im Rahmen dieses DFG Projektes (Projektnr.: 352241003; GZ SCHM 1699/257/5-1) bearbeiten durfte.

Frau PD Dr. Ursula Telgheder möchte ich für ihre fortwährende fachliche und menschliche Unterstützung während der gesamten Zeit dieser Arbeit danken. Außerdem möchte ich mich bei Ihr für ihr immer offenes Ohr, die vielen kurzen und langen Gespräche und die Übernahme des Koreferates bedanken.

Herrn Dr. Jost Wingender danke ich für die Einführung in die Mikrobiologie, die Unterstützung bei der Anzucht der Biofilme sowie die Hilfestellung bei den mikrobiologischen Fragestellungen und der guten kollegialen Zusammenarbeit. Frau Astrid Dannehl und Frau Michelle Lüling danke ich für die hervorragende Zusammenarbeit innerhalb des Projektes und die Anzucht der Biofilme.

Außerdem bedanke ich mich bei Herrn Dr. Florian Uteschil für die Einarbeitung in die verschiedenen GC und GC-MS Systeme sowie für seine Unterstützung bei jeglichen kleinen und großen Problemen inner- und außerhalb des Labors.

Bedanken möchte ich mich auch bei der Firma GERSTEL GmbH & Co.KG für die Nutzung von vielen Bildern Ihrer Systeme bei verschiedenen Vorträgen sowie die Einladung zum Gerstel Anwenderseminar 2019. Im Besonderen möchte ich mich bei Herrn Christian Gahmann für den vielseitigen und exzellenten Support bei Fragen rund um das TDS/TDSA, den MPS und die GC-MS Systeme bedanken. Herrn Jan Garbe-Immel möchte ich für die vielen Informationen und Angebote danken. Zusätzlich danke ich dir für deinen jederzeit exzellenten Rat, die Einladung zum Gerstel Anwenderseminar und die Gespräche über unser gemeinsames Hobby, dem Laufsport.

Danken möchte ich dem gesamten Arbeitskreis der Angewandten Analytischen Chemie für die gute Zusammenarbeit und die nette Arbeitsatmosphäre. Im Besonderen möchte ich mich bei meinen Bürokollegen, Claudia Hellmann, Lidia Montero, Martin Meyer, Christian Lipok und Julia Klein für die stets besondere Arbeitsatmosphäre sowie die vielen lustigen und interessanten Gespräche bedanken.

Danksagung

Außerdem möchte ich mich bei Imke Ackermann und Laurin Domenic Grabler bedanken, die durch ihre Bachelorarbeiten entscheidend zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen haben. Weiterhin möchte ich Herrn Dominik Brecht für die guten Gespräche und Diskussionen danken.

Meiner Familie möchte ich für Ihre vielfältige Unterstützung danken.

Zuletzt möchte ich meiner Freundin Jennifer meinen allergrößten Dank aussprechen. Du, Jenny, bist und warst immer für mich da und bist mit mir durch Höhen und Tiefen gegangen. Du standest immer an meiner Seite egal was passiert ist. Dafür liebe ich dich sehr.

Danke!

Abstract

Cystic fibrosis (CF) is an autosomal recessive hereditary disease that leads to the production of thickened mucus in the infected organ (e.g. lung). Conditions in the infected lung favour polymicrobial infections, such as chronic lung infections with *Pseudomonas aeruginosa*. *P. aeruginosa* is the major pathogenic bacterium that colonises CF-lungs at the end of the lifetime of CF-patients.

The aim of the present work is, on the one hand, the development of an *in vitro* system for the cultivation of biofilms of the bacterium *P. aeruginosa* and the development and characterisation of a sampling and analysis method for bacterial, extracellular volatile metabolites from the *in vitro* system. On the other hand, the model system will be optimised concerning an *in vitro* study of the extracellular volatile metabolome of *P. aeruginosa* strains in the context of cystic fibrosis. Finally, an *in vitro* characterisation of the extracellular volatile metabolome of *P. aeruginosa* will be performed. The *in vitro* biofilm model consists of a Petri dish into which a solid nutrient is placed and the biofilms are cultivated on this nutrient. A sampling of volatile extracellular metabolites was performed by thin-film microextraction (TFME) using polydimethylsiloxane films (PDMS). The analysis of the loaded films was carried out by gas chromatography coupled with a quadrupole mass spectrometer and thermal desorption (TD-GC-qMS).

After the development and characterisation of the *in vitro* biofilm model and the sampling and analysis methodology, which is presented in the first part of the thesis, an *in vitro* study on influencing parameters on the extracellular volatile metabolome of *P. aeruginosa* in the context of CF-disease was conducted in the second part of the thesis. These investigations revealed that under two different oxygen conditions (aerobic vs. anaerobic) as well as between different phenotypes (muroid vs. non-muroid) of the different strains, differences in the volatile metabolome could be observed. Thus, e.g. 1-undecene was released only under aerobic conditions whereas 2-undecanone only under anaerobic conditions. Volatile metabolites of the substance classes of ketones and alcohols seem to be particularly suitable to distinguish between muroid and non-muroid strains of *P. aeruginosa* since ketones such as 2-undecanone could only be detected with non-muroid strains (here: *P. aeruginosa* ATCC 10145 and PAO1) and the alcohols only with muroid strains (here: *P. aeruginosa* FRD1).

Abstract

Based on the knowledge that the nutrient medium influences the extracellular volatile metabolome, a nutrient medium was developed which simulates the nutrient conditions in the CF-lung. With the help of this nutrient medium, the *in vitro* characterisation of the extracellular volatile metabolome of *P. aeruginosa* under CF-like conditions, as presented in the third part of this thesis, was carried out. In these studies, a significant difference between the three strains used could be demonstrated with an PCA, as well as by comparing the peak intensities. When comparing the clinical strains *P. aeruginosa* PAO1 and FRD1 (CF-relevant), 31 mVOCs were determined, showing a significant change in peak intensity.

The development and establishment of a cultivation method for biofilms under CF-like conditions as well as the sampling and analysis method for extracellular volatile metabolites of these biofilms, presented in this thesis, can be used in the future for *in vitro* studies of clinical *P. aeruginosa* strains and other CF-relevant bacterial pathogens. The aim of these investigations is to identify CF-relevant bacteria from CF sputum based on selective metabolites. Furthermore, these results could be used for the development and establishment of a clinical non-invasive "at-bedside" breath analysis method for CF-patients.

Abkürzungsverzeichnis

CF	cystic fibrosis; zystische Fibrose
e.g.	exempli gratia; zum Beispiel
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
TFME	Thin-film microextraction; Dünnschichtmikroextraktion
PDMS	Polydimethylsiloxan
TD	Thermodesorption
GC	Gaschromatographie bzw. Gaschromatograph
MS	Massenspektrometrie bzw. Massenspektrometer
qMS	Quadrupolmassenspektrometer
PCA	Principal component analysis; Hauptkomponentenanalyse
mVOC	Metabolische volatile organische Substanzen
bzw.	Beziehungsweise
z.B.	zum Beispiel
i.d.R.	In der Regel
u.a.	unter anderem
CFTR	cystic fibrosis transmembrane regulator

Abkürzungsverzeichnis

RNA	Ribonukleinsäure
AMP	Adenosinmonophosphat
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>H. influenzae</i>	<i>Haemophilus influenzae</i>
MRSA	<i>methicillin-resistenter Staphylococcus aureus</i>
<i>S. maltophilia</i>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
<i>A. xylooxidans</i>	<i>Achromobacter xylooxidans</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
QS	<i>Quorum sensing</i>
EPS	extrazelluläre polymere Substanzen
SCV	<i>small-colony variant</i>
ggf.	gegebenenfalls
2-AA	2-Aminoacetophenon
DC	Dünnschichtchromatographie
IMS	Ionenmobilitätsspektrometrie
PTR	Proton-Transfer-Reaktions- Massenspektrometrie
SIFT	Selektive-Ionisierungs-Flugzeit- Massenspektrometrie
SPME	solid phase micro extraction; Festphasenmikroextraktion

Abkürzungsverzeichnis

SBSE	stir bar sorptive extraction
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie
IR	Infrarotspektroskopie
UV	Ultraviolettabsorptionsspektroskopie
PTV	programmed temperature vaporizer; programmierten Temperaturverdampfer
THC	Tetrahydrocannabinol
PIA	Pseudomonas Isolierungs-Agar
ASM	artifizielles Sputummedium
GCxGC	zweidimensionale comprehensive Gaschromatographie/ Gaschromatograph
TG	Thermogravimetrie
APPI	Atmosphärendruckphotoionisation
EI	Elektronenstoßionisation
NIST	National Institute of Standards and Technology
MoNA	MassBank of North America
vgl.	vergleiche
LOD	limit of detection; Nachweisgrenze
LOQ	limit of quantification; Bestimmungsgrenze

Abkürzungsverzeichnis

TIC	total ion chromatogram; Totalionenchromatogramme
ca.	circa
PS	Polystyrol
Z	Zellzahl
Kf	Kammerfaktor
Vf	Verdünnungsfaktor
DTPA	Diethylentriaminpentaessigsäure
TDS	Thermodesorptionssystem
VUV	Vakuum-Ultraviolett
LC	Flüssigchromatographie
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie
NMR	Kernspinresonanz
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
etc.	Et cetera
POM	Polyoxymethylen
DTG	derivativen Thermogravimetrie
FWHM	full width at half maximum; Peakbreite auf halber Höhe bzw. Halbwertsbreite
bzgl.	bezüglich
Abb.	Abbildung

Abkürzungsverzeichnis

inkl.	inklusive
C-Atome	Kohlenstoffatome
VOSC	flüchtige organische schwefelhaltige Verbindungen
KBE; y	koloniebildenden Einheiten
z	Gesamtzellzahl
THF	Tetrahydrofuran
DMS	Dimethylsulfid
DMDS	Dimethyldisulfid
2D-GC	zweidimensionale Gaschromatographie/ Gaschromatograph
m/z-Verhältnis	Mass-zu-Ladungsverhältnis

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
2	Theoretische Grundlagen.....	3
2.1	Zystische Fibrose	3
2.2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9
2.3	Dünnschichtmikroextraktion	15
3	Problemstellung und Zielsetzung.....	19
4	Material und Methoden	21
4.1	Materialien, Chemikalien und Bakterienstämme.....	21
4.1.1	Methodenentwicklung und -optimierung.....	21
4.1.2	Dünnschichtmikroextraktion.....	23
4.1.3	Anzucht der bakteriellen Biofilme und verwendete Bakterienstämme.....	24
4.1.4	Mikrobiologische Analytik	29
4.1.5	Thermische Desorption von Dünnschichtmikroextraktion Sorptionsfilmen.....	30
4.1.6	Flüssigextraktion von TFME Sorptionsfilmen	31
4.2	Instrumente und Software	32
4.2.1	Instrumente für die Probenvorbereitung	32
4.2.2	Instrumente für die mikrobiologische Analytik	33
4.2.3	Instrumente für die chemische Analytik.....	33
4.2.4	Software und Datenbanken	35
4.3	Probenvorbereitung	37
4.3.1	Systematische Untersuchungen mit Hilfe der gaschromatographischen Methoden	37
4.3.2	Methodenoptimierung der thermogravimetrischen Methoden und Untersuchung der Sorptionsfilme	39

4.3.3	Kultivierung von bakteriellen Biofilmen im <i>in vitro</i> Biofilmmodell ..	39
4.3.4	Probenvorbereitung der TFME Filme zur Anreicherung der mVOCs im <i>in vitro</i> Biofilmmodell ..	44
4.4	Methoden für die biochemische Analytik ..	45
4.4.1	Ermittlung der Gesamtzellzahl mittels DAPI-Färbung ..	45
4.4.2	Bestimmung des Uronsäuregehalts (Uronsäure-Assay) der Biofilme von <i>P. aeruginosa</i> ..	46
4.5	Methoden für die chemische Analytik ..	47
4.5.1	TD-GC-qMS ..	48
4.5.2	GCxGC-qMS ..	49
4.5.3	TG und TG-APPI-qMS-Analyse ..	50
4.6	Prozess zur Auswertung und statistischen Analyse der TD-GC-qMS Daten ..	51
5	Ergebnisse und Diskussion ..	55
5.1	Entwicklung und Etablierung eines <i>in vitro</i> Biofilmmodell mit einem Vollmedium ..	55
5.2	Entwicklung und Etablierung einer Probenahme- und <i>suspected-target</i> Analysemethode für mVOCs aus dem <i>in vitro</i> Biofilmmodell ..	70
5.2.1	Probennahme der mVOCs aus dem <i>in vitro</i> Biofilmmodell mittels Dünnschichtmikroextraktion ..	71
5.2.2	Entwicklung einer Thermodesorption-Gaschromatographie-Massen-spektrometrie Methode zur <i>suspected-target</i> Analyse von mVOCs aus dem <i>in vitro</i> Biofilmmodell ..	83
5.2.3	Anwendung der TFME TD-GC-qMS Methode auf das <i>in vitro</i> Biofilmmodell ..	90
5.3	Charakterisierung des extrazellulären volatilen Metaboloms von <i>P. aeruginosa</i> im <i>in vitro</i> Biofilmmodell unter CF-ähnlichen Bedingungen ..	98

Inhaltsverzeichnis

5.3.1 Vergleich des extrazellulären volatilen Metaboloms von <i>P. aeruginosa</i> bei unterschiedlicher Sauerstoffverfügbarkeit.....	100
5.3.2 Untersuchung des extrazellulären volatilen Metaboloms von Bakterienstämmen mit verschiedenen Phänotypen.....	108
5.3.3 Vergleichsstudie zum extrazellulären volatilen Metaboloms von <i>P. aeruginosa</i> bei einer Kultivierung auf zwei verschiedenen festen Kulturmedien	112
5.3.4 Entwicklung eines festen artifiziellen Sputummediums	116
5.3.5 Charakterisierung des extrazellulären volatilen Metaboloms von <i>P. aeruginosa</i> unter CF-ähnlichen Bedingungen im <i>in vitro</i> Biofilmmodell	125
5.4 Entwicklung und Anwendung einer Flüssigextraktionsmethode für TFME Sorptionsfilme zur Analyse von mVOCs mittels GCxGC-qMS	135
5.4.1 Optimierung einer GCxGC-qMS Methode zur Analyse von mVOCs.....	135
5.4.2 Entwicklung und Optimierung einer Flüssigextraktion von TFME Filmen für die Analyse mittels GCxGC-qMS.....	139
5.4.3 Anwendung der Flüssigextraktionsmethode zur Untersuchung der mVOCs aus dem Biofilm von <i>P. aeruginosa</i> unter Verwendung des <i>in vitro</i> Biofilmmodells.....	147
6 Zusammenfassung und Ausblick	155
7 Literatur	159
Anhang A Entwicklung und Etablierung eines Probenahmesystems für mVOCs aus dem <i>in vitro</i> Biofilmmodell.....	i
Anhang B Charakterisierung des extrazellulären Metaboloms von <i>P. aeruginosa</i> im <i>in vitro</i> Biofilmmodell	iii
Anhang C Entwicklung und Anwendung einer Flüssigextraktionsmethode für TFME Sorptionsfilme zur Analyse von mVOCs mittels GCxGC-qMS.....	xliv
Anhang D Abbildungsverzeichnis	xlvii

Inhaltsverzeichnis

Anhang E	Tabellenverzeichnis	lix
Anhang F	Publikationsverzeichnis.....	lxiv
Anhang G	Curriculum Vitae.....	lxv

Erklärung zum wissenschaftlichen Beitrag

Erklärung zum wissenschaftlichen Beitrag

Auszüge aus den in dieser Arbeit gezeigten Ergebnissen wurden publiziert in:

T. Koehler, I. Ackermann, D. Brecht, F. Uteschil, J. Wingender, U. Telgheder*, O.J. Schmitz*, Analysis of volatile metabolites from in vitro biofilms of *Pseudomonas aeruginosa* with thin-film microextraction by thermal desorption gas chromatography-mass spectrometry, *Anal. Bioanal. Chem.* (2020) 412:2881–2892.

Meine Beiträge sowie die Beiträge der Co-Autoren sind im Folgenden deklariert:

Die wissenschaftlichen Versuche wurden von Timo Köhler geplant, überwacht und durchgeführt. Imke Ackermann hat einige der TD-GC-qMS Messungen und die Anzucht der bakteriellen Biofilme durchgeführt. Timo Köhler, Dominik Brecht und Florian Uteschil haben die TG-APPI-MS Kopplung aufgebaut sowie die TG und TG-APPI-MS Messungen durchgeführt. Die Auswertung aller erhaltenen Daten erfolgte von Timo Köhler. Timo Köhler hat das Manuskript zu dieser Publikation verfasst. Redaktionell wurde das Manuskript von Florian Uteschil, Jost Wingender, Ursula Telgheder und Oliver J. Schmitz überarbeitet. Die Studie wurde von Jost Wingender, Ursula Telgheder und Oliver J. Schmitz betreut.

1 Einleitung

Mukoviszidose, auch zystische Fibrose (*engl.: cystic fibrosis*; CF) genannt, ist eine rezessiv vererbte Stoffwechselerkrankung, in deren Folge sich an den Organwänden, vor allem der Lunge, der Bauchspeicheldrüse, der Leber, des Pankreas und den Fortpflanzungsorganen ein zäher Schleim (Mucus) ablagert. Weiterhin begünstigt dies die Inflammation und geht mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit einer (polymikrobiellen) Besiedlung bzw. Infektion der Organe mit Mikroorganismen, wie z.B. Bakterien oder Pilze, einher [1–3]. Die Folge einer chronischen, bakteriellen Infektion der Lunge ist die sukzessive Abnahme der Lungenfunktion und abschließend das Lungenversagen, welches die Haupttodesursache von CF-Patienten¹ ist (2018 in D: 68,7% aller Todesfälle bei CF-Patienten [4]) [1,2,5]. Das gramnegative Bakterium *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) ist ein opportunistischer Krankheitserreger, bei dem ein epidemiologischer Zusammenhang zwischen einer Atemwegsinfektion und der erhöhten Morbiditäts- und Mortalitätsrate von CF-Patienten festgestellt werden konnte [2]. *P. aeruginosa* weist eine große Persistenz und eine hohe Anpassungsfähigkeit bezogen auf extreme Umweltbedingungen, wie denen im Mucus, auf [1]. Diese Persistenz in den Atemwegen ist u.a. auf die Bildung von Biofilmen sowie der Anpassungsfähigkeit der Atmung auf anaerobe, mikroaerophile Bedingung zurückzuführen [5–7]. *P. aeruginosa*-infizierte CF-Patienten werden i.d.R. mit Hilfe von Antibiotika behandelt, allerdings lässt sich, u.a. wegen der hohen Antibiotikaresistenz, eine chronische bakterielle Infektion kaum verhindern. Damit eine Eradikation oder Unterdrückung chronischer Infektionen möglich ist, ist eine schnelle Einleitung der Antibiotikatherapie notwendig. Damit einhergehend muss eine schnelle, nicht invasive Diagnose möglich sein, die zurzeit nicht zur Verfügung steht. Eine solche Diagnosemethode ist u.a. die Atemgasanalytik. Allerdings müssen vor der klinischen Anwendung dieser Analytik, *in vitro* Studien zum extrazellulären volatilen Metabolom der bakteriellen Pathogenen durchgeführt werden, damit eine Identifizierung und Differenzierung dieser aus der Ausatemluft der Patienten möglich ist. Damit eine Übertragung der *in vitro* Ergebnisse auf *in vivo* Studien erfolgen kann, ist eine Durchführung der *in vitro* Studien unter CF-ähnlichen Bedingungen essenziell.

¹ Aus Gründen der besseren Lesbarkeit wird ausschließlich das generische Maskulinum verwendet. Diese Formulierungen umfassen gleichermaßen weibliche und männliche Personen, so sind stets beide Geschlechter gemeint.

2 Theoretische Grundlagen

2.1 Zystische Fibrose

Die zystische Fibrose (engl.: *cystic fibrosis*, CF), welche in Deutschland auch als Mukoviszidose bekannt ist, ist eine komplexe, humane erbliche Stoffwechselkrankheit mit Funktionsstörung verschiedener Organe. Diese Erkrankung basiert auf genetischen Mutationen und ist autosomal rezessiv vererbbar [8–11]. 1938 beschrieb Dorothy Andersen, bezogen auf das Pankreas, diese Erkrankung zum ersten Mal [12]. Später wurden auch Lungeninfektionen mit der CF-Erkrankung in Verbindung gebracht [13,14]. In den ersten Jahren nach der Entdeckung der Erkrankung lag das mediane Überlebensalter von Neugeborenen bei lediglich wenigen Monaten [8,14,15]. In den folgenden Jahrzehnten konnte das mediane Überlebensalter auf 38 – 44 Jahre [Stand: 2012 (USA [16] und Deutschland [17]) und 2013 (UK [18])] gesteigert werden. Dies wurde aufgrund von intensivierter Grundlagenforschung und der damit einhergehenden Entwicklung von zielführenden Therapiemethoden erreicht [1,19]. Das mittlere Überlebensalter in Deutschland lag im Jahr 2018 bei 49 Jahren und die Lebenserwartung eines Neugeborenen bei 53 Jahren [20]. Im Jahr 2019 wiesen ca. achtzigtausend Personen weltweit diese Erkrankung auf [21]. In Deutschland wurde im Jahr 2017 eine Inzidenz der Erkrankung zwischen 1:3300 und 1:4800 Neugeborenen ermittelt [11,22]. Der Vergleich der Prävalenzen zwischen verschiedenen Staaten sowie Ethnien zeigt, dass die CF-Erkrankung eine der häufigsten Erbkrankheiten innerhalb der weißen Weltbevölkerung ist [8,9,11,14,23].

Ausgelöst wird die CF-Erkrankung durch eine Vielzahl unterschiedlicher Mutationen des Gens, welches das sogenannte *cystic fibrosis transmembrane regulator* (CFTR) Protein kodiert. Der Verlauf der Erkrankung ist unter anderem von der Art der Mutation abhängig. Bislang sind mehr als 2000 Mutationen des CFTR-Gens bekannt, von denen ein Teil die zystische Fibrose verursachen [24]. Es werden sechs Klassen von CFTR-Mutationen unterschieden, wobei jede der verschiedenen Mutationsklassen unterschiedliche Defekte aufweist [9,25]. Zum einen kann ein vollständiger Verlust der Funktionalität des Proteins auftreten. Zum anderen ist der teilweise Ausfall einiger Funktionen beschrieben. Neben der Funktionalität des CFTR-Proteins kann eine weitere Klassifizierung der Mutationen basierend auf der Struktur des Proteins erfolgen. Bei schweren Formen der Mukoviszidose, wie z.B. der Typ I und II

Theoretische Grundlagen

Mukoviszidose, ist ein Einbau des hergestellten Proteins in die Zellmembran über den Golgi-Apparat nicht möglich. Dies beruht auf der fehlerhaften Faltung des Proteins durch die Mutation. Diese wird durch Proteasen erkannt, welche wiederum das Protein abbauen. Bei leichteren Formen der Mukoviszidose, Typ III – VI, wird das defekte CFTR-Protein in die Zellmembran eingebaut. Allerdings sind eine Hemmung der Funktion sowie eine Instabilität zu beobachten. Durch diese Instabilität ist eine frühzeitige Degeneration des Proteins wahrscheinlich [14,26]. Die häufigste krankheitsauslösende Mutation ist die sogenannte *Phe508del* Mutation (Typ II) [9–11,21]. Bei dieser Mutation werden drei Nukleotide des Gens an der Position 508 entfernt, wodurch der Verlust von Phenylalanin in diesem Protein auftritt [8,9]. In Deutschland lagen laut Deutschem Mukoviszidose Register bei 85,9% der CF-Patienten mindestens eine *Phe508del* Mutation vor, wobei hiervon 46,4% homozygot und 39,5% heterozygot waren [20].

Das CFTR-Protein ist ein Membranprotein, welches auf der apikalen Oberfläche von epithelialen Zellen lokalisiert ist. Hier gewährleisten die zyklischen Adenosinmonophosphat (cAMP) regulierten CFTR-Proteine den Transport von Chlorid- und Hydrogencarbonationen durch die Zellmembrane, wodurch das osmotische Gleichgewicht im menschlichen Körper über die Epithelien aufrechterhalten wird [1,9,10]. Die Folgen der Mutation und des dadurch bedingten teilweisen bzw. vollständigen Funktionsverlustes des CFTR-Proteins ist eine Ablagerung von zähem Schleim, welcher auch Mukus genannt wird, an den Zellwänden der betroffenen Organe. Der Mukus wird durch die Verhinderung oder Minimierung des Transportes der Chloridionen aus den Zellen sowie der gleichzeitigen Erhöhung des Transports von Natriumionen in die Zellen gebildet. Diese Prozesse führen zu einer Entfernung von Wasser aus den Sekreten, was zur Erhöhung der Viskosität des Mukus beiträgt. Dieses hat mit zunehmendem Lebensalter u.a. eine drastische Reduktion der Organfunktion zur Folge, was zu der beschriebenen Reduzierung des medianen Überlebensalters der Patienten führt [10,11,27]. Außerdem beschränkt sich die Erkrankung nicht nur wie von Andersen [12] beschrieben auf das Pankreas und die Lunge, sondern auch auf weitere Organe des menschlichen Körpers, wie die oberen Atemwege, die Leber, der Darm und die Fortpflanzungsorgane. Die Ausprägung der Erkrankung bei den verschiedenen Organen ist dabei von Patient zu Patient unterschiedlich. Hauptsächlich manifestiert

sich die Erkrankung allerdings in der Lunge sowie des Pankreas. Die Erkrankung der Lunge trägt dabei maßgeblich zu der erhöhten Morbidität und Mortalität der CF-Patienten bei [10,11,28].

Die menschliche Lunge kann im Allgemeinen in die konduktive und die respiratorische Zone aufgeteilt werden. Die konduktive Zone besteht aus der Trachea – dem ersten Teil der Lunge – sowie den Bronchien und Bronchiolen. Den Übergang von der konduktiven in die respiratorische Zone bilden die terminalen (konduktive Zone) und respiratorischen Bronchiolen (respiratorische Zone). Im untersten Teil der Lunge befinden sich die Alveolen. Das Sputum von CF-Patienten sowie der darin enthaltenen Bakterien, wie z.B. *P. aeruginosa*, befindet sich in der konduktiven Zone. Die konduktive Zone wird im Allgemeinen auch als die oberen Atemwege bezeichnet [5,24,29]. Schädigung und Funktionsverlust der Lunge sowie der oberen Atemwege sind auf Obstruktionen, Entzündungen und (chronischen) Infektionen mit Mikroorganismen zurückzuführen [1,11,14]. Generell können Mikroorganismen über die Schleimhäute oder offene Wunden aufgenommen werden. Die Besiedlung von Mikroorganismen, wie z.B. Bakterien oder Pilze, der Lunge sowie den oberen Atemwegen wird durch Entzündungen sowie die Bildung und Retention des Mukus an der Lungenwand begünstigt. Durch die bakteriellen (chronischen) Infektionen sowie die Ausbildung eines Biofilmes (vgl. Kapitel 2.2) werden weitergehende Entzündungsprozesse in den Organen ausgelöst sowie aufrechterhalten. Der Mukus fungiert zum einen als Nährmedium für die aufgenommenen Mikroorganismen [1]. Zum anderen ist die körpereigene Entfernung des Mukus mit den Bakterien gehemmt. Diese Entfernung des Mukus erfolgt über das Flimmerhaarepithel der Lunge, wobei die Hemmung dieser Entfernung auf den viskosen Mukus, welcher sich auf die Flimmerhärchen legt, zurückzuführen ist. Dieser Selbstreinigungsmechanismus der Bronchien wird als mukoziliäre *Clearance* bezeichnet [7,30]. Tierexperimente konnten zeigen, dass die Entfernung von Bakterien durch die Immunabwehr abhängig vom pH-Wert ist [31,32]. Die Fehlfunktion des CFTR-Proteins induziert eine Änderung des pH-Wertes der Atemwegsoberfläche, so dass die Entfernung der Bakterien von dieser gehemmt ist [33–38]. Die Kombination dieser Einflüsse führt zu einer Besiedlung der Lunge und im Verlaufe der Erkrankung zu einer chronischen Infektion mit Mikroorganismen. Vor allem die polymikrobielle Besiedlung bzw. Infektion mit verschiedenen bakteriellen Krankheitserregern ist von großer Bedeutung. Eine

Theoretische Grundlagen

Besiedlung der Lunge mit bakteriellen Pathogenen ist bereits zwischen zwei und sechs Monaten nach der Geburt nachzuweisen [19,39,40]. In den ersten Lebensjahren sind vor allem Besiedlungen mit *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) und *Haemophilus influenzae* (*H. influenzae*) zu beobachten [11,14,17,41]. Bezogen auf die Häufigkeit der bakteriellen Lungeninfektion über den gesamten Lebenszyklus eines CF-Patienten, sind weiterhin Infektionen mit methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Stenotrophomonas maltophilia* (*S. maltophilia*), *Burkholderia* spp. und *Achromobacter xylosoxidans* (*A. xylosoxidans*) von Relevanz [1,14,20]. Die wiederholte Infektion mit *S. aureus* und *H. influenzae* und die daraus resultierenden Entzündungsreaktionen führen zu Schädigungen an der Lunge und den oberen Atemwegen [41]. Hierbei ist der Grad der Schädigung davon abhängig, wie schnell die Infektion erkannt und mittels einer Antibiotikatherapie behandelt wird. Der Versuch einer Eradikation der Mikroorganismen erfolgt bei Kindern über eine orale und bei Erwachsenen meistens über eine intravenöse Verabreichung von Antibiotikapreparaten. Im erwachsenen Alter können weitere gramnegative Bakterien, wie z.B. *Stenotrophomonas maltophilia*, *Achromobacter* spp. und *Burkholderia cenocepacia*, sowie nicht tuberkulöse Mykobakterien, wie z.B. *Mycobacterium abscessus* und *Mycobacterium avium-intracellulare*, in der Lunge nachgewiesen werden [14]. Die gramnegativen Bakterien werden von den Patienten hauptsächlich aus der Umwelt aufgenommen und lösen beim Menschen lediglich dann Infektionen aus, wenn wie bei CF-Patienten eine Schädigung des Epithels oder eine Immunsuppression vorliegt. Diese Bakterien werden als fakultativ pathogene Umweltbakterien bezeichnet [42,43]. Das bei erwachsenen CF-Patienten am häufigsten nachgewiesene Bakterium ist *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) [1,11,14]. Die Behandlung von *P. aeruginosa* erfolgt, wie bei den anderen Bakterien durch eine aggressive Antibiotikatherapie, wobei diese bei einer Infektion mit *P. aeruginosa* intravenös durchgeführt wird. Mittels einer intravenösen Antibiotikatherapie mit Tobramycin oder einer Kombination aus Ciprofloxacin und Colistin konnte bei einer einmonatigen Anwendung bei 70 – 80% der Patienten eine Eradikation von *P. aeruginosa* hervorgerufen werden [44–46]. Mit fortschreitendem Lebensalter entwickeln die Patienten intermittierende Infektionen, aus welchen dann chronische Infektionen resultieren [47]. Eine vollständige Eradikation ist dann nicht mehr möglich. Der Beginn dieser chronischen Infektion kann durch eine erfolgreiche

Eradikation verzögert werden, allerdings ist eine Verhinderung nach aktuellem Stand der Forschung nicht möglich. Mit Hilfe genetischer Studien konnte belegt werden, dass bei 25% der erneut infizierten Patienten eine Kolonisierung mit Bakterienstämmen des gleichen Genotyps erfolgte [48–50]. Jelsbak et al. [51] zeigten, dass der Ursprung der erneuten Besiedlung auf eine Umweltquelle aber auch auf ein Bakterienreservoir innerhalb des Patienten zurückzuführen sein kann. Ein solches Reservoir können die Nasennebenhöhlen sein, da Aanaes et al. [52] herausgefunden haben, dass in den Nasennebenhöhlen die Effizienz der Antibiotika, im Vergleich zu der Lunge, reduziert ist [1,14]. Chronische Infektionen mit *P. aeruginosa* können mit der Persistenz des Bakteriums begründet werden. Die Persistenz von *P. aeruginosa* ist auf eine hohe Antibiotikaresistenz [53] sowie dem Vorkommen und Wachstum in Form von Biofilmen [5] zurückzuführen. Weiterhin ist *P. aeruginosa* in der Lage, aktiv in den Schleim einzudringen, wo hypoxische bzw. anaerobe Bedingungen herrschen, und wächst dort über die anaerobe Atmung mit Nitrat als endständigem Elektronenakzeptor (Denitrifikation) [6,7]. Eine Eradikation ist bei einer chronischen Infektion nicht möglich, so dass lebenszeitverlängernde Maßnahmen in der Endphase der Erkrankung ausschließlich durch eine Lungentransplantation erfolgen können [54].

Die Mukoviszidose ist nach aktuellem Stand der Forschung nicht heilbar, so dass sich allgemeine Therapiemaßnahmen vor allem auf die symptomatische und prophylaktische Behandlung fokussieren. Diese Maßnahmen haben das Ziel der Verlängerung der Lebenszeit sowie der Erhöhung der Lebensqualität der CF-Patienten. Zur Erreichung dieser Ziele ist die Behandlung von CF-Patienten in spezialisierten CF-Zentren erforderlich, da diese Erkrankung eine multidisziplinäre Behandlung erforderlich macht [55]. Hauptsächlich ist eine Verhinderung bzw. Minimierung der bakteriellen Infektionen notwendig, da diese zu einem erheblichen Verlust der Lungenfunktion führen. Prophylaktisch erfolgt dies durch die Implementierung von strengen Hygienekonzepten. Des Weiteren ist vor allem bei den Bakterien *P. aeruginosa* und MRSA eine direkte Übertragung von Patient zu Patient nachgewiesen. Deswegen ist die Minimierung der Kreuzinfektion und der nosokomialen Ausbreitung durch Kontaktminimierungen sowie Hygiene- und Isolierungsstrategien notwendig [14]. Bei einer Erkrankung der Lunge werden symptomatische Therapien wie z.B. eine Atmungstherapie, eine sekretolytische Therapie (z.B. mit hypertone Kochsalzlösung) oder eine Antibiotikatherapie

Theoretische Grundlagen

durchgeführt. Des Weiteren sind antiobstruktive und antientzündliche Therapie begleitend zu den vorhergenannten Therapien empfohlen [11]. Die Erfüllung der Ziele der symptomatischen Therapien ist allerdings nur möglich bei einer frühzeitigen Erkennung der Besiedlung bzw. Infektion sowie der CF-Erkrankung. Eine Früherkennungsstrategie für die CF-Erkrankung wurde durch die Implementierung der CF-Diagnostik in das vorgeschriebene Neugeborenen-Screening, welches durch den gemeinsamen Bundesausschusses über die Früherkennung von Krankheiten bei Kindern in 2016 initiiert wurde, etabliert [11]. Die Diagnose wird durch die Durchführung von Analyseverfahren mit unterschiedlicher Empfindlichkeit und Genauigkeit gestellt. Als Testverfahren werden pathologische Schweißtests, Gentests und Potentialdifferenzmessungen durchgeführt [11]. Die Vorteile bei einer frühzeitig diagnostizierten CF-Erkrankung liegen in verringerten Atemwegsentzündungen [56], welche mit einer verbesserten Lungenstruktur [57] und Lungenfunktion [58–60] sowie einer verspätet einsetzenden chronischen Lungeninfektion einhergehen [57]. Weiterhin konnte eine geringere Inzidenz von Infektionen mit mukoiden Stämmen des Bakteriums *P. aeruginosa* nachgewiesen werden [61]. Außerdem hat die Früherkennung einen Einfluss auf die Lebensqualität der Patienten, so konnte z.B. ein besseres Wachstum von Kindern mit CF festgestellt werden [19]. Weiterhin sind im Allgemeinen weniger Krankenhausaufenthalte notwendig [61,62] und das Überlebensalter der Patienten steigt [19,59,63–65]. Neben Antibiotikatherapien werden hauptsächlich Methoden zur Reinigung der Atemwege vom Mukus angewendet. Hierbei wird der Mukus von den Patienten über den Rachen- und Mundraum abgeführt, welches zur Vorbeugung gegen Infektionen dienen kann. Für die Reinigung der Atemwege werden Atmungstherapien eingesetzt, welche die Patienten teilweise selbstständig durchführen können. Hierzu zählen die Mobilisierung des Mukus unter Verwendung der Brustmuskulatur sowie das effektive Abhusten des mobilisierten Mukus [11].

Zusätzlich zu den symptomatischen und prophylaktischen Therapien werden Therapien entwickelt, welche die Ursache der CF-Erkrankung behandeln sollen. Hierzu werden zum einen Medikamente basierend auf kleinen Molekülen entwickelt, welche dem CFTR-Protein gleichen und dadurch in die Zellmembran eingebaut werden sollen, um so den Ionentransport durch die Epithelzellen zu gewährleisten. Ein anderer Ansatz ist die Gentherapie, welche die Mutation der Desoxyribonukleinsäure

(DNA) reparieren soll. Hierdurch soll dann die Herstellung von nativen funktionellen CFTR-Proteinen gewährleistet werden [14].

2.2 *Pseudomonas aeruginosa*

Das bei erwachsenen CF-Patienten am häufigsten vorkommende Bakterium *P. aeruginosa* ist ein gramnegatives stäbchenförmiges Bakterium, welches zur Familie der *Pseudomonadaceae* zählt. Das Bakterium wurde von Migula und Schroeter zuerst beschrieben. Die beiden Wissenschaftler benannten das Bakterium nach der blaugrünligen Farbe des Eiters, der bei Infektionskrankheiten durch dieses Bakterium gebildet wird [66]. *P. aeruginosa* ist ein ubiquitäres Bakterium, welches in der Umwelt weit verbreitet ist. Beispielsweise konnte *P. aeruginosa* in Abwässern, Oberflächengewässern, oberflächennahen Grundwässern sowie Böden nachgewiesen werden [67,68]. Zusätzlich ist *P. aeruginosa* ein fakultativ pathogener, opportunistischer Erreger, welcher vor allem bei Menschen mit lokaler oder allgemeiner Immunsuppression schwerwiegende bis tödliche Erkrankungen hervorruft. Eine erhöhte Prävalenz von *P. aeruginosa* weisen Personen mit CF-Erkrankung auf [67,68]. Bei diesen kann sich *P. aeruginosa* in der Lunge ansiedeln und temporäre sowie chronische Lungeninfektionen hervorrufen. Zusätzlich ist das Bakterium verantwortlich für 10 - 20 % aller Krankenhausinfektionen [67,69] und somit ein häufiger Krankenhauskeim. Hierdurch ergibt sich ein erhöhtes Risiko für eine Infektion mit *P. aeruginosa* von immunsupprimierten Personen in Krankenhäusern. Die Pathogenese sowie die erhöhte Persistenz von *P. aeruginosa* in der Umwelt und dem Menschen ist auf die genetische Diversität zurückzuführen. Dies resultiert in der intrinsischen Resistenz gegenüber vielen Antibiotika und Desinfektionsmitteln sowie der metabolischen Variabilität und der Bildung von einer Vielzahl an Virulenzfaktoren [67].

Die Bildung von Virulenzfaktoren durch die Bakterienzellen erfolgt mittels einer regulierten und koordinierten Genexpression. Die Koordination zwischen den Bakterienzellen erfolgt über eine chemische Kommunikation, die *Quorum sensing* (QS) genannt wird. Im Detail basiert die Kommunikation mittels QS auf der Produktion von und der Reaktion auf Signalmoleküle, welche zwischen den Bakterienzellen diffundieren. Bei dem Bakterium *P. aeruginosa* wurden bislang die QS-Systeme *las* und *rhl* beschrieben. Die QS-Systeme sind u.a. für die Ausbildung von mikrobiellen

Theoretische Grundlagen

Gemeinschaften in Form von Zellaggregaten sowie der Sekretion von Substanzen, welche die Zellen umgeben, verantwortlich [67]. Solche Gemeinschaften werden als Biofilme bezeichnet. Biofilme wurden bereits von IUPAC definiert [70]. Der Begriff Biofilm wird mittlerweile in vielen unterschiedlichen Fachgebieten, wie z.B. der Abwassertechnik und der Medizin verwendet, so dass Flemming et al. [71] einen Vorschlag für eine aktualisierte Definition für den Begriff Biofilm veröffentlicht haben. Flemming et al. [71] definieren Biofilme als „[...] Aggregate von Mikroorganismen, bei denen Zellen häufig in eine selbstproduzierte Matrix aus extrazellulären polymeren Substanzen (EPS) eingebettet sind, die aneinander und/oder an einer Grenzfläche haften“ [71]. Die extrazellulären polymeren Substanzen (EPS), welche die Matrix dieser Aggregate bilden, bestehen hauptsächlich aus Proteinen, Polysacchariden, Lipiden und Nukleinsäuren [72]. Der Prozess der Ausbildung eines Biofilmes ist in fünf Teilschritte gegliedert. Im ersten Schritt erfolgt eine reversible Adhäsion von einzelnen Bakterienzellen an eine abiotische oder biotische Oberfläche. In Folge der irreversiblen Adhäsion der Bakterienzellen an die Oberfläche (2. Schritt) kommt es zur Ausbildung von Mikrokolonien (3. Schritt). Resultierend aus der Zellteilung der Bakterienzellen sowie der Adhäsion weiterer Bakterienzellen an die Mikrokolonien bildet sich im Laufe der Zeit ein Biofilm aus (4. Schritt) [67]. Die Bakterienzellen produzieren und segregieren dann die Substanzen, welche zur Bildung der hydratisierten EPS notwendig sind. Hierzu zählen z.B. Alginat, Proteine, Lipide und Nukleinsäuren [67,72]. Die EPS als Matrix des Biofilmes, ist u.a. für die mechanische Stabilität sowie die Ausbildung eines dreidimensionalen Netzwerkes verantwortlich. Aufgrund der Ausbildung dieses Netzwerkes kommt es zu einer Verbindung zwischen den Bakterienzellen sowie der Immobilisierung der Zellen [67,72]. Eine andere Form des Vorkommens von Bakterien, bei denen diese nicht in Biofilmen wachsen, sondern frei beweglich sind, ist die planktonische Form. Gegenüber dieser Form des Wachstums weist das Wachstum im Biofilm einige Vorteile auf. *P. aeruginosa* Bakterienzellen, welche als Biofilm wachsen, haben eine erhöhte Resistenz gegenüber der Störung bzw. Abtötung der Bakterienzellen durch antimikrobielle Substanzen, wie z.B. Antibiotika, Biozide oder Tenside sowie durch Fressfeinde [67]. Costerton et al. [73] haben in ihrer 1999 publizierte Studie herausgefunden, dass das Wachstum von Bakterien im Biofilm zu einer 1.000-fach größeren Toleranz der Bakterien gegenüber antimikrobiellen Substanzen führt. Dies könnte auf den, von Hentzer et al. [74]

identifizierten einzigartigen Phänotyp der Bakterien im Biofilm zurückzuführen sein. Weiterhin ist bekannt, dass bedingt durch Mutationen eine Änderung des Phänotyps von *P. aeruginosa* auftreten kann. Zum Beispiel induzieren, im Falle einer CF-Erkrankung, die Bedingungen einer CF-Lunge die Umwandlung von *P. aeruginosa* vom nicht-mukoiden zum mukoiden Phänotyp [1,7]. Bei dem Bakterium *P. aeruginosa* bezeichnet mukoid die übermäßige Produktion von Alginat, welche makroskopisch durch schleimige Biofilme bzw. Bakterienkolonien – vor allem auf Agar-Nährmedien – charakterisiert sind [1,72,75,76]. Der mukoid Phänotyp bei *P. aeruginosa* ist aufgrund der zusätzlichen Produktion und Sekretion von Alginat als dominierende EPS gegenüber bestimmten Antibiotika toleranter. Dies wurde am Beispiel des Antibiotikums Tobramycin von Hentzer et al. [77], nachgewiesen und wird auf die Bildung von Alginat zurückgeführt [67,77]. Im Gegensatz zu mukoiden *P. aeruginosa* Stämmen bilden *P. aeruginosa* Stämme mit nicht-mukoidem Phänotyp weniger oder kein Alginat [78], so dass eine Unterscheidung zwischen den beiden Phänotypen durch die Bestimmung der Alginatkonzentration im Biofilm möglich ist. Hentzer et al. [74] und Costerton et al. [73] vermuten, dass bei 65 – 80% der mikrobiellen Infektionen Biofilme ausgebildet werden. Ein weiteres Stadium im Biofilmwachstum ist der Dispersionsschritt (5. Schritt). Bei diesem werden einzelne Bakterienzellen, Zellaggregate oder *small-colony variants* (SCVs) aus dem Biofilm und seiner Matrix abgegeben. SCVs sind kleine Kolonien, welche sich nur bei einigen wenigen Bakterien, wie z.B. dem *P. aeruginosa*, bilden. Die dispergierten SCVs weisen häufig veränderte Phänotypen im Vergleich zum initialen Phänotyp auf [67]. Bei dem Bakterienstamm *P. aeruginosa* PAO1 konnten Kirov et al. [79] eine erhöhte Resistenz gegenüber antimikrobiellen Substanzen sowie eine erhöhte Fähigkeit zur Bildung von Biofilmen nachweisen. Dadurch ist das Biofilmwachstum gegenüber dem planktonischen Wachstum weiterhin bevorzugt [67].

Die beschriebenen Fähigkeiten des Bakteriums *P. aeruginosa* zur Ausbildung von Biofilmen sowie zum Wechsel des Phänotyps und den Resistenzen, die sich hieraus ergeben, führen zu der erhöhten Persistenz des Bakteriums *P. aeruginosa* in der CF-Lunge. Weiterhin begünstigen die Bedingungen in der CF-Lunge das Biofilmwachstum von *P. aeruginosa*, da aufgrund der Dicke und Viskosität des Mukus eine verringerte Sauerstoffkonzentration im Biofilm vorhanden ist [80]. Hierdurch ergibt sich, dass die Bakterien unter anaeroben, mikroaerophilen Bedingungen in der CF-Lunge wachsen.

Theoretische Grundlagen

[7,30,80,81]. Ein anaerobes Wachstum der Bakterienzellen von *P. aeruginosa* ist möglich, da das Bakterium einen Stoffwechsel mittels unterschiedlicher Kohlenstoff- und Stickstoffquellen durchführen kann. Der Stoffwechsel von Stickstoffquellen erfolgt unter Zuhilfenahme von terminalen Elektronenakzeptoren, wie z.B. Kaliumnitrat. Das Wachstum mittels der Denitrifikation von terminalen Elektronenakzeptoren wird von Hassett et al. [30] als schnelles Wachstum beschrieben. Die Autoren weisen allerdings auch darauf hin, dass *P. aeruginosa* unter anaeroben Bedingungen auch mittels der Phosphorylierung von Arginin wachsen kann, was im Vergleich ein langsames Bakterienwachstum zur Folge hat [30]. In der CF-Lunge ist allerdings ein anaerobes Wachstum mittels der Denitrifikation, aufgrund der hohen Nitrat- und Nitritkonzentrationen zu erwarten [7,82–84]. Die Regulation der Denitrifikation erfolgt laut Yoon et al. [85] durch das *rhl*-System. O'May et al. [86] konnten herausfinden, dass eine Korrelation zwischen dem anaeroben Wachstum von *P. aeruginosa* und der Bildung von Biofilmen besteht. Hierdurch vermuten die Autoren, dass die anaeroben Bedingungen im Mukus der CF-Lunge das Biofilmwachstum fördern. Diese Untersuchungen führten O'May et al. [86] anhand des Stammes *P. aeruginosa* PAO1 sowie von CF-Isolaten durch [67,86].

Aufgrund der beschriebenen Anpassungsfähigkeit sowie der intrinsischen Resistenz gegenüber antimikrobiellen Substanzen, ist eine Eradikation von *P. aeruginosa*, z.B. aus der CF-Lunge, schwierig. Elborn et al. [87] postulieren sogar, dass die Behandlung von Infektionen bei CF-Patienten in Zukunft voraussichtlich komplexer wird, weil die Prävalenz von resistenten Bakterien, aufgrund der langfristigen Behandlung der CF-Patienten mit Antibiotika, zunimmt. Dadurch ist eine frühzeitige und schnelle Diagnose sowie ggf. die Einleitung der Antibiotikatherapie zur Heilung oder Unterdrückung chronischer Infektionen notwendig. Metabolomanalysen CF-relevanter Bakterien könnten z.B. für die Identifikation einer *P. aeruginosa*-Infektion und deren Stadium und Verlauf sowie der Differenzierung zwischen verschiedenen Bakterienstämmen von *P. aeruginosa* eine bedeutsame Rolle spielen [88].

Der Forschungsbereich Metabolomics beschäftigt sich im Allgemeinen mit von Organismen, wie z.B. Menschen, Tieren oder Bakterien, über den Stoffwechsel produzierten Substanzen, welche Metabolite genannt werden. Metabolite sind Moleküle mit einer geringen Masse (i.d.R. < 1500 Da [88]) und aufgrund ihrer Strukturvielfalt werden diese in Subkategorien, wie z.B. Lipide, aufgeteilt [89]. Das

Metabolom eines Organismus setzt sich im Allgemeinen aus Substanzen zusammen, welche in der Zelle produziert werden und dort verbleiben (intrazelluläre Metabolite) oder an die Umgebung abgegeben werden (extrazelluläre Metabolite) [88]. In den letzten Jahren wurden verschiedene Untersuchungen des intra- und extrazellulären Metaboloms von verschiedenen *P. aeruginosa* Stämmen durchgeführt [88], wobei die Forschung zu spezifischen Metaboliten für die Identifizierung von Mikroorganismen in den 1960er Jahren begann [90]. S. Mann [90] identifizierte 2-Aminoacetophenon (2-AA) mittels der Dünnschichtchromatographie (DC) und korrelierten diesen Befund mit dem spezifischen Geruch von *P. aeruginosa*. Mit Hilfe von gaschromatographischen (GC) Methoden gekoppelt mit einem Massenspektrometer (MS) konnte die Identifizierung von 2-AA bestätigt werden [91,92]. Mit Hilfe von 2-AA konnte eine Unterscheidung von CF-Patienten mit und ohne einer Kolonisierung von *P. aeruginosa* erfolgen [93]. Scott-Thomas et al. [93] untersuchten hierbei die Ausatemluft von CF-Patienten und konnten einen deutlichen Unterschied feststellen. Allerdings kann 2-AA auch aus exogenen Quellen, wie z.B. der Nahrung, aufgenommen werden. Scott-Thomas et al. [94] konnten nachweisen, dass die Aufnahme von 2-AA aus exogenen Quellen einen nachweisbaren Einfluss auf den Gehalt in der Ausatemluft hat [94]. Kesarwani et al. [95] haben herausgefunden, dass 2-AA ein QS-Molekül ist. Dieser Metabolit kann das metabolische Profil von *P. aeruginosa* verändern sowie die Expression von Virulenzfaktoren induzieren. Weiterhin wird vermutet, dass 2-AA die Entwicklung von chronischen Infektionen fördert [95–97]. Neben 2-AA konnten in weiteren *in vitro* Studien zahlreiche andere metabolische volatile organische Substanzen (engl.: metabolic volatile organic compounds; mVOCs) von *P. aeruginosa* identifiziert werden. Die Identifizierung erfolgte durch die Analyse des Gasraumes von *P. aeruginosa*-Kulturen. In diesen Studien konnten die Metabolite Essigsäure, Acetaldehyd, Aceton, 2-Butanon, 2-Nonanon, 1-Undecen, 2,4-Dimethyl-1-hepten, Ethanol, 1-Decanol, Schwefelwasserstoff, Dimethylsulfid, Dimethyldisulfid, Dimethyltrisulfid, Methanthiol und Cyanwasserstoff identifiziert werden [98–103]. Bos et al. [104] kritisieren in ihrer Publikation die eingeschränkte Vergleichbarkeit von Metabolomstudien unterschiedlicher Bakterienspezies. Die eingeschränkte Vergleichbarkeit wurde auf die Verwendung unterschiedlicher Versuchsbedingungen zurückgeführt. Bei Metabolomstudien werden verschiedene Bakterienstämme desselben Bakteriums (genomische Variation), unterschiedliche

Theoretische Grundlagen

Kultivierungsbedingungen, wie z.B. Kulturmedien, Inkubationszeit und -temperatur, sowie unterschiedliche Beprobungszeitpunkte (unterschiedliche Wachstumsphase) gewählt. Weiterhin ist eine Variation der Beprobungsmethodik, der Beprobungsdauer sowie der chemischen Analyse zu beobachten [104]. Hierdurch ist laut Bos et al. [104] keine Vergleichbarkeit von Studien zum Metabolom desselben Bakteriums noch zwischen verschiedenen Bakterienspezies gegeben.

Zusätzlich zu den zuvor aufgeführten extrazellulären volatilen Metaboliten, wurde auch das intrazelluläre Metabolom von *P. aeruginosa* untersucht [105,106]. Von besonderem Interesse im Rahmen dieser Arbeit ist allerdings das extrazelluläre Metabolom, da zur Minimierung der Ausbildung einer chronischen Infektion von CF-Patienten durch eine frühzeitige und niedrig-dosierte Antibiotikatherapie sowie der Patient-zu-Patient Übertragung durch Präventionsmaßnahmen, eine schnelle und nicht-invasive Diagnosemethode notwendig ist. Hierzu wäre ebenfalls eine Analyse des Metaboloms aus CF-Sputum denkbar. Allerdings stellt die Entnahme von Sputum eine hohe Belastung für die Patienten dar. Eine solche Probennahme ist insbesondere bei Kindern sehr schwer durchzuführen. Hierdurch ergibt sich, dass eine Vermeidung der Beprobung des Sputums für die Patienten vorteilhaft ist. Weiterhin könnte das extrazelluläre volatile Metabolom zur Identifizierung und Differenzierung von CF-relevanten Bakterienstämmen, wie z.B. *P. aeruginosa*, verwendet werden. Hierzu wäre lediglich eine nicht-invasive Beprobung des Atemgases der CF-Patienten notwendig. Untersuchungen des Atemgases von CF-Patienten mit und ohne *P. aeruginosa* Infektionen wurden bereits publiziert [107,108]. Allerdings konnte eine reproduzierbare und verlässliche Bestimmung der Bakterien, welche die Atemwege kolonisiert hatten, nicht erfolgen [108–110]. Mielko et al. [88] berichten allerdings auch, dass Forschungen zu volatilen Metaboliten in der Ausatemluft gezeigt haben, dass die Atemgasanalytik für die Identifizierung von Bakterien, welche die Atemwege kolonisiert haben, vorteilhaft ist. Weiterführende *in vitro* Studien unter den Bedingungen der zu untersuchenden Erkrankung, wie z.B. CF, sind deswegen essenziell. Die vorgestellten Studien zum extrazellulären Metabolom wurden hauptsächlich unter der Verwendung von Ionenmobilitätsspektrometrie (IMS) [111], Proton-Transfer-Reaktionen (PTR)-MS [112], Selektive-Ionisierungs-Flugzeit (SIFT)-MS [113] und GC-MS [92] durchgeführt. Außerdem wurden unterschiedliche Beprobungs- und Anreicherungsverfahren, wie z.B. Festphasenmikroextraktion angewendet [93,114].

2.3 Dünnschichtmikroextraktion

Die Dünnschichtmikroextraktion (engl.: *thin-film microextraction*, TFME) ist eine, auf der Festphasenmikroextraktion (engl. *solid phase micro extraction*, SPME) aufbauende, membranbasierte Extraktions- und Anreicherungsmethode. Diese Methode wurde 2003 von Bruheim et al. [115] zur Extraktion und Anreicherung polyzyklischer aromatischer Kohlenwasserstoffe von wässrigen Proben mit anschließender Analyse mittels GC-MS entwickelt [115–117].

Die analytische Herausforderung die Sensitivität der SPME zu erhöhen, endete in der Entwicklung der TFME. Eine Erhöhung der Sensitivität bei der SPME kann durch eine Vergrößerung des Volumens der Extraktionsphase erreicht werden. Dies basiert auf der Tatsache, dass bei einer Extraktion mittels SPME die Menge an extrahiertem Analyten proportional zu dem Volumen der Extraktionsphase ist. Das Volumen der Extraktionsphase wurde in den ersten Entwicklungsschritten durch eine Vergrößerung der Filmdicke erreicht. Hierzu wurden zum einen dickere SPME Fasern mit einer dickeren Beschichtung verwendet. Zum anderen wurde hieraus u.a. die *stir bar sorptive extraction* Methode (SBSE) entwickelt. Der Nachteil einer Vergrößerung des Volumens der Extraktionsphase durch eine Vergrößerung der Filmdicke ist die simultane Erhöhung der Zeit bis zur Gleichgewichtseinstellung bei der Extraktion. Eine gleichzeitige Erhöhung der Sensitivität bei mindestens gleichbleibender Extraktionszeit ist gegeben, wenn nicht die Filmdicke, sondern die Oberfläche der Extraktionsphase vergrößert wird. Dieses kann durch die TFME erreicht werden, da bei der TFME ein dünner Film der Extraktionsphase, in Form einer Membran, zur Aufkonzentrierung der Analyten verwendet wird. Für Anwendungen der TFME werden in den meisten Studien kommerzielle oder selbsthergestellte Membrane aus Polydimethylsiloxan (PDMS) verwendet. Weiterhin wurden für spezielle Anwendungen Mischphasen entwickelt, wie z.B. Carboxen/PDMS und Divinylbenzen/PDMS Mischphasen [116,117]. Hu et al. [118] haben zum Beispiel für die Beprobung von Östrogenen und Bisphenol A eine Mischphase bestehend aus PDMS und β -Cyclodextrin verwendet. Die Autoren konnten in ihrer Studie nachweisen, dass die Extraktionseffizienz der Mischphase größer war als bei einer reinen PDMS-Phase [118]. Diese Studie zeigt, dass die verwendete Extraktionsphase auf die spezifische Anwendung angepasst werden muss. Jiang et al. [116] erklären den häufig

Theoretische Grundlagen

universellen Einsatz von PDMS bei TFME Applikationen durch die hohe thermische Stabilität, die einfache Reinigung sowie die einfache Herstellung.

TFME ist eine universelle Anreicherungsverfahren, da sie sowohl bei flüssigen und gasförmigen Proben als auch bei feste Proben Anwendung findet. Bei der Anwendung bei festen Proben, wird die TFME Membran auf die Probe gelegt. Die Anreicherung der Substanzen erfolgt dann in Abhängigkeit von der Beprobungszeit [116]. Bei flüssigen Proben kann die TFME Membran in zwei verschiedenen Modi angewendet werden. Zum einen kann die Membran in die Flüssigkeit eingetaucht werden, was als immersiver Modus bezeichnet wird [119]. Hierbei kann die Anreicherung unter dem Einfluss einer erhöhten Temperatur erfolgen. Dies hat verringerte Extraktionszeiten bzw. erhöhte Extraktionsraten im Vergleich zu einer Extraktion bei Raumtemperatur und ohne Konvektion zur Folge. Zum anderen können mit der TFME ebenfalls Analyten im Gasraum oberhalb der flüssigen Probe angereichert werden, was als Headspace Modus bezeichnet wird [119]. Hierzu wird die Membran in den Gasraum oberhalb der flüssigen Probe eingeführt und fixiert. Eine Erhöhung der Temperatur sowie eine Konvektion der Flüssigkeit, können analog zum immersiven Modus, zu erhöhten Extraktionsraten führen. Die Beprobung von gasförmigen Proben erfolgt, in dem die Membran dem Gasraum ausgesetzt oder ein Gasstrom über die Membran geleitet wird [116,119].

Mit Hilfe der TFME werden heutzutage unterschiedlichste Substanzen aus komplexen Matrices angereichert. Jiang et al. [116] fassen in Ihrem Übersichtsartikel zahlreiche Anwendungsbeispiele sowie Zielanalyten zusammen. Laut den Autoren findet die TFME z.B. Anwendung bei Lebensmittelproben, in Wasser, Kraftstoff, Fischgewebe, Boden, Sediment, im menschlichen Urin und Blut sowie auf der Haut [116]. Dabei werden hauptsächlich flüchtige organische Verbindungen, Aromaten, Herbizide, polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe, Pestizide, Chlorbenzole, schwerflüchtige hydrophobe Verbindungen, Sebum, Substanzen von explosiven und illegalen Drogen sowie Benzodiazepine analysiert [116]. Zur Analyse der auf dem TFME Film angereicherten Substanzen, wurden verschiedene Methoden publiziert. Anwendung fanden u.a. die GC und Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC), meist gekoppelt an ein MS, die IMS sowie die Infrarot- (IR) und Ultraviolettabsorptionsspektroskopie (UV) [116]. Im Vergleich zu den anderen etablierten Anreicherungstechniken, wie SPME, ist, wie Jiang et al. [116] berichten, die

Desorption der auf dem TFME Filmen angereicherten Substanzen die größte Herausforderung bei der analytischen Methode. Die Autoren begründen dies mit der Geometrie der TFME Filme [116]. Die Sorption der Analyten kann zum einen mittels der direkten thermischen Desorption (engl.: thermal desorption; TD) oder einer Flüssigextraktion erfolgen. Laut Jiang et al. [116] ist die TD der Goldstandard für die Desorption von Analyten, welche mittels der TFME angereichert worden sind. Die TD wird meistens in Kombination mit einem GC-MS verwendet, wobei die TD direkt an das Analysensystem gekoppelt ist. Bei einer TD, direkt gekoppelt mit einem GC-MS System, müssen Verluste der Analyten während der Injektion von dem TD in das GC-MS vermieden werden. Dieses konnte durch die Verwendung eines programmierten Temperaturverdampfers (*engl.: programmed temperature vaporizer; PTV*) als Injektor realisiert werden [116]. Durch die anfänglich tiefen Temperaturen im Injektor, werden alle desorbierten Analyten im GC-Liner fokussiert und durch eine anschließende kontrollierte Erwärmung des Liners auf die GC-Säule überführt. Die direkte TD ist laut den Autoren der Goldstandard, da hierbei eine Überführung aller Substanzen in das Analysensystem möglich ist. Im Vergleich dazu kann bei der Flüssigextraktion nur ein Teil der Substanzen, in Abhängigkeit der Polarität des gewählten Extraktionsmittels, analysiert werden. Zusätzlich ist die geringe Stabilität von PDMS in einigen Lösungsmitteln limitierend. Lee et al. [120] haben in ihrer Studie die Stabilität von PDMS in verschiedenen Lösungsmitteln untersucht und haben herausgefunden, dass vor allem unpolare Lösungsmittel ein Quellen von PDMS verursachen [120]. Dieses Quellen bedingt die Emission von Monomeren des PDMS in das Extraktionsmittel, wodurch Überlagerungen mit Analyten bei der anschließenden Analyse hervorgerufen werden können. Hierauf ist mutmaßlich die geringe Anzahl an publizierten Studien zurückzuführen, welche Flüssigextrakte von mittels TFME angereicherten Substanzen verwendet. Zum Beispiel haben Jahnke et al. [121] und Goto et al. [122] die Flüssigextraktion mittels TFME angereicherter Substanzen in Fischgewebe bzw. für die Analyse von Phenylethylamin und THC-Metaboliten aus menschlichem Urin angewendet.

Die steigende Anzahl der TFME-Anwendungen als Anreicherungsverfahren ist auf die verschiedenen Vorteile gegenüber der SPME und SBSE zurückzuführen. Die TFME weist zum einen ein größeres Oberfläche-zu-Volumen-Verhältnis der

Theoretische Grundlagen

Extraktionsphase auf. Zum anderen ist das Volumen der Extraktionsphase erhöht. Beide Vorteile führen zu erhöhten Extraktionsraten und Empfindlichkeiten [116].

In Bezug auf die Applikation der TFME zur Anreicherung extrazellulärer volatiler Metabolite aus dem Gasraum oberhalb von Biofilmen des Bakteriums *P. aeruginosa*, weist diese im Gegensatz zu den anderen Mikroextraktionstechniken Vorteile auf. Mit Hilfe der TFME ist eine Beprobung des Gasraumes über den gesamten Kultivierungszeitraum unter anaeroben Bedingungen möglich, ohne das Kultivierungssystem zu öffnen. Des Weiteren resultiert aus dem größeren Oberflächen-zu-Volumen-Verhältnis eine erhöhte Analytkapazität auf dem Film, so dass sich die TFME für die Beprobung des großvolumigen Gasraumes am besten eignet. Die erhöhten Empfindlichkeiten ermöglichen die Extraktion von niedrig abundanten Analyten, welche mutmaßlich selektiv bezogen auf das Bakterium *P. aeruginosa* sowie den Bakterienstamm sind. Zusammengefasst weist die TFME alle erforderlichen Eigenschaften auf, um eine reproduzierbare Beprobung des Gasraumes oberhalb des Biofilmes zu gewährleisten.

3 Problemstellung und Zielsetzung

Die Mukoviszidose hat die Anreicherung von zähem Mukus u.a. in der Lunge zur Folge, was mit einer erheblichen Reduktion der Lungenfunktion sowie einer erhöhten Mortalität, aufgrund von bakteriellen Infektionen der Atemwege, einhergeht. Die Haupttodesursache von CF-Patienten ist das Lungenversagen, aufgrund von chronischen Infektionen der Atemwege mit antibiotikaresistenten Bakterien, hauptsächlich dem *Pseudomonas aeruginosa*. Für eine Eradikation oder Unterdrückung der chronischen Infektion ist eine möglichst schnelle Diagnose und ggf. Einleitung der Antibiotikatherapie essenziell, so dass die Atemgasanalytik als eine schnelle und nicht-invasive Diagnosemethode eine Alternative darstellen könnte. Hierzu sind allerdings vorhergehende *in vitro* Studien zum extrazellulären volatilen Metabolom CF-relevanter bakterieller Pathogene notwendig.

In dieser Arbeit soll das extrazelluläre volatile Metabolom von *P. aeruginosa* unter CF-ähnlichen Bedingungen in *in vitro* Studien charakterisiert werden. Hierzu soll zunächst ein *in vitro* Modell für die Kultivierung von Biofilmen verschiedener Stämme von *P. aeruginosa* entwickelt und etabliert werden. Anschließend ist die Entwicklung und Charakterisierung einer Beprobungsmethode der extrazellulären volatilen Metabolite im *in vitro* Modell sowie der Analysemethoden notwendig. Zur Beprobung soll eine einfach zu realisierende und für die erwarteten Substanzklassen der Metabolite geeignete Methode ausgewählt werden. Die für die Beprobungsmethode geeignete Analysemethoden soll mittels Standards von potenziellen Metaboliten des Bakteriums *P. aeruginosa* charakterisiert werden, in dem u.a. die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen mit der 3σ -Methode nach Kaiser und Specker [123] ermittelt werden. Weiterhin soll mittels dieser Analysemethoden sowie dem *in vitro* Modell der Einfluss verschiedener Parameter, wie der Kultivierungsatmosphäre, dem mukoiden Phänotyp und dem Nährmedium, auf das extrazelluläre volatile Metabolom untersucht werden. Diese Ergebnisse sollen dazu verwendet werden, die abschließende *in vitro* Charakterisierung des extrazellulären volatilen Metaboloms von Stämmen des Bakteriums *P. aeruginosa* unter CF-ähnlichen Bedingungen zu ermöglichen.

4 Material und Methoden

In diesem Kapitel sind die verwendeten Verbrauchsmaterialien und Instrumente für die mikrobiologische und analytische Probenvorbereitung aufgeführt. Des Weiteren sind die Methoden beschrieben, welche zur biochemischen Charakterisierung der bakteriellen Biofilme, für die chemische Charakterisierung der erworbenen Polydimethylsiloxan (PDMS) Sorptionsfilme sowie für die Analyse der extrazellulären volatilen Metabolite verwendet worden sind.

Die in dieser Arbeit beschriebenen biochemischen Charakterisierungen (Assays) der Biofilme, die Herstellung der verschiedenen Nährmedien sowie die Kultivierung der Bakterienstämme im *in vitro* Biofilmmodell wurden im Arbeitskreis für Aquatische Mikrobiologie der Universität Duisburg-Essen, unter der Leitung von Herrn Dr. Jost Wingender durchgeführt. Die Durchführung dieser Experimente wurde von Frau Michelle Lüling (Aquatische Mikrobiologie, Universität Duisburg-Essen) vorgenommen. Herr Dr. Jost Wingender (Aquatische Mikrobiologie, Universität Duisburg-Essen) konzipierte – zusammen mit mir – die mikrobiologischen Experimente und half bei der Interpretation der daraus erhaltenen Daten.

4.1 Materialien, Chemikalien und Bakterienstämme

4.1.1 Methodenentwicklung und -optimierung

Die Entwicklung und Optimierung aller chemisch analytischen Methoden erfolgten mit den im Folgenden aufgeführten Materialien:

- Thermo Scientific™ 9 mm-Klarglasfläschchen mit Schraubgewinde, 2 mL, Art.-Nr.: 12443578, *Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland*
- Thermo Scientific™ 9 mm-PP-Schraubgewindekappen für Autosamplerfläschchen, Red Natural Rubber Septum, Art.-Nr.: 1328640, *Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland*
- Schraubgewindeglas (Volumen: 20 mL), Art.-Nr.: 702021, *MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland*
- Schraubdeckel (geschlossen, weiß), Art.-Nr.: 702061, *MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland*
- Kolbenhubpipetten, 2 – 20 µL, 20 – 200 µL, 100 – 1000 µL, 1 – 10 mL, *Brand GmbH & Co. HG, Wertheim, Deutschland*

Material und Methoden

- Pipettenspitzen für Kolbenhubpipetten, 2 – 20 µL, 20 – 200 µL, 100 – 1000 µL, 1 – 10 mL, *Brand GmbH & Co. HG, Wertheim, Deutschland*
- TDS-Desorptionsrohr (für GERSTEL-TDS 2, -TDS G und -TDS A, ungefüllt, mit Markierung), Art.-Nr.: 012518-010-00, *Gerstel GmbH & Co. KG, Mülheim an der Ruhr, Deutschland*
- TDS-Desorptionsrohr (für Twister bis 1 mm Schichtdicke), Art.-Nr.: 012518-010-00, *Gerstel GmbH & Co. KG, Mülheim an der Ruhr, Deutschland*
- Verschlusskappen (für TDS-Desorptionsrohr, PTFE), Art.-Nr.: 012659-010-00, *Gerstel GmbH & Co. KG, Mülheim an der Ruhr, Deutschland*

Zur Durchführung der Entwicklung und Optimierung der verwendeten gaschromatographischen Methoden wurden die folgenden Chemikalien verwendet:

- Dimethylsulfid (CAS-Nr.: 75-18-3, Reinheit: anhydrous, $\geq 99\%$), Art.-Nr.: 274380, *Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland*
- 2-Methylbutanal (CAS-Nr.: 96-17-3, Reinheit: 95%), Art.-Nr.: M33476, *Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland*
- Dimethyldisulfid (CAS-Nr.: 624-92-0, Reinheit: ≥ 98), Art.-Nr.: W353604, *Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland*
- 2-Hexanon, (CAS-Nr.: 591-78-6, Reinheit: analytischer Standard), Art.-Nr.: 02473, *Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland*
- 2-Heptanon (CAS-Nr.: 110-43-0, Reinheit: for synthesis, $\geq 98\%$), Art.-Nr.: 818711, *Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland*
- 1-Octanol (CAS-Nr.: 111-87-5, Reinheit: anhydrous, $\geq 99\%$), Art.-Nr.: 297887, *Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland*
- 2-Nonanon (CAS-Nr.: 821-55-6, Reinheit: $\geq 99\%$), Art.-Nr.: 108731, *Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland*
- 1-Undecen (CAS-Nr.: 821-95-4, Reinheit: 97%), Art.-Nr.: 242527, *Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland*
- 1-Decanol (CAS-Nr.: 112-30-1, Reinheit: $\geq 98\%$), Art.-Nr.: 239763, *Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland*
- 2-Aminoacetophenon (CAS-Nr.: 551-93-9, Reinheit: analytischer Standard), Art.-Nr.: 49868, *Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland*

- Methanol (BAKER ANALYZED™ ULTRA LC/MS), Art. Nr.: 9822.1000GLE, *VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland*
- Reinstwasser (Wasseraufbereitungssystem arium ® pro VF), *Satorius Stedim Biotech, Aubagne, Frankreich*

Die Methodenentwicklung und -optimierung der thermogravimetrischen Methode erfolgte unter Verwendung der folgenden Standards:

- Octamethylcyclotetrasiloxan (D4, CAS-Nr.: 556-67-2, Reinheit: 98%), Art.-Nr.: A15240, *Thermo Fisher (Kandel) GmbH (Alfa Aesar), Kandel, Deutschland*
- Decamethylcyclopentasiloxan (D5, CAS-Nr.: 541-02-6, Reinheit: 97%), Art.-Nr.: 42412, *Thermo Fisher (Kandel) GmbH (Alfa Aesar), Kandel, Deutschland*
- Dodecamethylcyclohexasiloxan (D6, CAS-Nr.: 540-97-6, Reinheit: 95%), Art.-Nr.: AB126791, *abcr GmbH, Karlsruhe, Deutschland*

4.1.2 Dünnschichtmikroextraktion

Die Beprobung des Gasraumes des *in vitro* Biofilmmodells wurde mit Hilfe der Dünnschichtmikroextraktion durchgeführt. Als Sorptionsmaterial für die TFME wurde Polydimethylsiloxan von zwei verschiedenen Herstellern verwendet. Details zu den verwendeten Sorptionsfilmen, sowie zu den Materialien, die verwendet worden sind, um die Filme zuzuschneiden und zu reinigen, sind im Folgenden aufgelistet:

- Sorptionsmaterial
 - Polydimethylsiloxan Filme (Dicke = 0,36 mm), Art.-Nr.: SSPM823- 014, *Interstate Specialty Products, Sutton, USA*
 - Polydimethylsiloxan Filme (Dicke = 0,45 mm), Art.-Nr.: SI303045, *Goodfellow GmbH, Hamburg, Deutschland*
- Zuschnitte Sorptionsfolien
 - Dimensionen: L = 50 mm, B = 3,5 mm
 - Material der Stanze: V2A Stahl
 - Fertigung der Stanze: Feinmechanik der Universität Duisburg-Essen, *Essen, Deutschland*
 - CUTFIX® Einmalskalpell, *B. Braun Deutschland GmbH & Co. KG, Melsungen, Deutschland*
- Reinigung der Folien

Material und Methoden

- TDS-Desorptionsrohr (für GERSTEL-TDS 2, -TDS G und -TDS A, ungefüllt, mit Markierung), Art.-Nr.: 012518-010-00, *Gerstel GmbH & Co. KG, Mülheim an der Ruhr, Deutschland*
- TDS-Desorptionsrohr (für Twister bis 1 mm Schichtdicke), Art.-Nr.: 012518-010-00, *Gerstel GmbH & Co. KG, Mülheim an der Ruhr, Deutschland*
- Schraubgewindeglas (Volumen: 20 mL), Art. Nr.: 702021, *MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland*
- Schraubdeckel (geschlossen, weiß), Art. Nr.: 702061, *MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland*
- Pasteurpipetten (Material: Natron-Kalk-Glas, Volumen: 1,5 mL), Art. Nr.: 747720, *Brand GmbH & Co. HG, Wertheim, Deutschland*
- Pipettierhilfe (für Pasteurpipetten aus Glas, Material: Naturkautschuk), Art. Nr.: 124700, *Brand GmbH & Co. HG, Wertheim, Deutschland*

Die Reinigung der PDMS-Sorptionsfilme erfolgte mit den im Folgenden aufgeführten Chemikalien:

- Methanol (BAKER ANALYZED™ ULTRA LC/MS), Art. Nr.: 9822.1000GLE, *VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland*
- Decon 90®, Art. Nr.: 148-0324, *VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland*
- ARCAL Prime Argon (99,998%), *Air Liquide Deutschland, Düsseldorf, Deutschland*
- Gasförmiger Stickstoff
- Reinstwasser

4.1.3 Anzucht der bakteriellen Biofilme und verwendete Bakterienstämme

Zur Charakterisierung des extrazellulären volatilen Metaboloms von *P. aeruginosa* wurden drei verschiedene Bakterienstämme von *P. aeruginosa* eingesetzt. Diese drei Bakterienstämme sind im Folgenden aufgeführt:

- *P. aeruginosa* ATCC 10145 [124] (DSM 50071), Typstamm (Phänotyp: nicht-mukoid)
- *P. aeruginosa* PAO1 [125], klinisches Isolat (Phänotyp: nicht-mukoid)
- *P. aeruginosa* FRD1 [126], klinisches Isolat (Phänotyp: mukoid)

Die Anzucht der Biofilme erfolgte unter aeroben und anaeroben Bedingungen, wobei diese in einer sterilen Petrischale aus Glas mit einem Durchmesser von ca. 10 cm kultiviert worden sind. Bei der aeroben Kultivierung wurden die inokulierten Petrischalen ohne weitere Bearbeitung in den Brutschrank gegeben. Zur anaeroben Anzucht der bakteriellen Biofilme wurde das Anaerobsystem der Firma Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland) verwendet. Hierzu wurden die folgenden Bestandteile des Anaerobsystems verwendet:

- Anaerobentopf 2,5 L-Volumen, für die Mikrobiologie, Art.-Nr.: 116387, *Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland*
- Anaerocult® A, für die Mikrobiologie, Art.-Nr.: 113829, *Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland*
- Anaerotest®, für die Mikrobiologie, Art.-Nr.: 115112, *Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland*

Neben der Anzucht unter aeroben und anaeroben Bedingungen, wurden die Nährmedien, auf denen die Biofilme kultiviert worden sind, variiert. Die hierzu verwendeten Materialien und Chemikalien sind in den folgenden Kapiteln 4.1.3.1 bis 4.1.3.3 aufgeführt.

4.1.3.1 Aerobe und anaerobe Anzucht auf LB(N)-Lennox Agar

Die aerobe und anaerobe Anzucht der drei *P. aeruginosa* Stämme auf LB- und LBN-Lennox Agar erfolgte unter Verwendung der folgenden Materialien:

- Bechergläser (steril), *VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland*
- Bunsenbrenner
- Dosieraufsatz 20 mL mit NS 29/32 (steril), Art.-Nr.: 5 4760 19, *Lenz-Chemie GmbH, Westerburg, Deutschland*
- Drigalski-Spatel
- 500 mL-Erlenmeyerkolben, *VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland*
- 250 mL- Erlenmeyerkolben mit NS 29/32, *VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland*
- Impföse
- Kolbenhubpipetten 100 – 1000 µL, 10 – 100 µL, 2 – 20 µL, *Eppendorf, Hamburg, Deutschland*

Material und Methoden

- Pipettenspitzen für Kolbenhubpipetten 100 – 1000 µL, 10 – 100 µL, 2 – 20 µL, *Eppendorf, Hamburg, Deutschland*
- Rührfische
- Pinzette
- Reagenzgläser L 130mm, A-Ø 16 mm mit Kappe (steril)
- Laborflaschen, rund, klar, mit Schraubverschluss, DURAN®, V = 1 L, *VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland*
- Spatel (steril)
- Thomazählkammer Tiefe 0,1 mm
- Alufolie
- Polycarbonatfilter 0,2µm Porengröße, Art.-Nr.: GTBP02500, *Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland*
- Kryoröhrchen Cryobank gelb, Art. Nr.: 291703, *Mast Diagnostica GmbH, Reinfeld, Deutschland*

Zur Herstellung der Nährmedien LB-Lennox (LB; aerobe Kultivierung) und LBN-Lennox (LBN; LB mit Kaliumnitrat; anaerobe Kultivierung), sowie für die Anzucht der bakteriellen Biofilme fanden die folgenden Chemikalien Anwendung:

- Deionat steril
- Ethanol techn. 70%
- Kaliumnitrat, Art. Nr.: 1.05063, *Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland*
- LB-Agar (Lennox), Art. Nr.: X965.1, *Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland*
 - Trypton 10 g·L⁻¹
 - Hefeextrakt 5 g·L⁻¹
 - Natriumchlorid 5 g·L⁻¹
 - Agar-Agar 15 g·L⁻¹
 - pH 7,0 ± 0,2
- LB-Agar (Lennox), Art. Nr.: X964.1, *Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland*
 - Trypton 10 g·L⁻¹
 - Hefeextrakt 5 g·L⁻¹
 - Natriumchlorid 5 g·L⁻¹

- pH $7,0 \pm 0,2$

4.1.3.2 Aerobe und anaerobe Anzucht auf PIA(N) Agar

Zur aeroben und anaeroben Anzucht der untersuchten *P. aeruginosa* Stämme unter Verwendung des Pseudomonas Isolierungsagar (PIA bzw. PIAN), wurden folgende Materialien eingesetzt:

- Bechergläser (steril), *VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland*
- Bunsenbrenner
- Dosieraufsatz 20 mL mit NS 29/32 (steril), Art.-Nr.: 5 4760 19, *Lenz-Chemie GmbH, Westerborg, Deutschland*
- Drigalski-Spatel
- 500 mL-Erlenmeyerkolben, *VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland*
- 250 mL- Erlenmeyerkolben mit NS 29/32, *VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland*
- Impföse
- Kolbenhubpipetten 100 – 1000 μL , 10 – 100 μL , 2 – 20 μL , *Eppendorf, Hamburg, Deutschland*
- Pipettenspitzen für Kolbenhubpipetten 100 – 1000 μL , 10 – 100 μL , 2 – 20 μL , *Eppendorf, Hamburg, Deutschland*
- Rührfische
- Pinzette
- Reagenzgläser L 130mm, A-Ø 16 mm mit Kappe (steril)
- Laborflaschen, rund, klar, mit Schraubverschluss, DURAN®, V = 1 L, *VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland*
- Spatel (steril)
- Thomazählkammer Tiefe 0,1mm
- Alufolie
- Polycarbonatfilter 0,2 μm , Art.-Nr.: GTBP02500, *Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland*
- Kryoröhrchen Cryobank gelb, Art. Nr.: 291703, *Mast Diagnostica GmbH, Reinfeld, Deutschland*

Material und Methoden

Die im Folgenden aufgeführten Chemikalien wurden zur Herstellung der beiden Nährmedien, PIA und PIA mit Kaliumnitrat (PIAN), und zur Anzucht der bakteriellen Biofilme im *in vitro* Biofilmmodell verwendet:

- Pseudomonas-Isolierungs-Agar, Art.-Nr. 292710, *Otto Nordwald GmbH, Hamburg, Deutschland*
- Glycerin, *Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland*
- Kaliumnitrat, *Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland*

4.1.3.3 Aerobe und anaerobe Anzucht auf artifiziellem Sputummedium

Eine aerobe und anaerobe Anzucht der bakteriellen Biofilme auf festem artifiziellem Sputummedium, konnte unter der Verwendung der im Folgenden aufgeführten Materialien, durchgeführt werden:

- 500 mL- Erlenmeyerkolben, *VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland*
- Petrischalen PS mit Nocken, 92 x 16 mm, Art.-Nr.: 82.1473, *SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland*
- Impföse
- Bunsenbrenner
- Rührfische
- Alufolie
- Messzylinder
- pH-Meter
- Falcon Tubes, 15 mL
- Laborflaschen, rund, klar, mit Schraubverschluss, DURAN®, V = 1 L, *VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland*

Zur Anzucht der bakteriellen Biofilme und der Herstellung des ASM wurden die folgenden Chemikalien verwendet:

- DNA aus Lachssperma, Art.-Nr.: 31149—50G-F, *Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland*
- Mucin aus Schweinemagen (Typ II), Art.-Nr.: M2378-100G, *Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland*
- Diethylentriaminpentaessigsäure, Art.-Nr.: D6518-5G, *Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland*

- Natriumchlorid, *Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland*
- Kaliumchlorid, *Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland*
- Bacto Casamino­säure, Art.-Nr.: 223050, *Otto Nordwald GmbH, Hamburg, Deutschland*
- Eigelb Emulsion, Art.-Nr.: 17148, *Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland*
- Bacto-Agar, Art.-Nr.: 214010, *Otto Nordwald GmbH, Hamburg, Deutschland*
- Tris (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan), p. a., Art.-Nr.: 4855.1, *Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland*
- Reinstwasser (autoklaviert)

4.1.4 Mikrobiologische Analytik

Zur mikrobiologischen Charakterisierung der Biofilme wurde ein Uronsäure-Assay durchgeführt. Hierzu wurden die folgenden Materialien und Chemikalien verwendet:

- Reagenz­gläser
- Wasserbad
- Eisbad
- 96-Well Plate
- Kolbenhubpipetten 100 – 1000 µL, 10 – 100 µL, 2 – 20 µL, *Eppendorf, Hamburg, Deutschland*
- Pipettenspitzen für Kolbenhubpipetten 100 – 1000 µL, 10 – 100 µL, 2 – 20 µL, *Eppendorf, Hamburg, Deutschland*
- Amidosulfonsäure (Sulfaminsäure), Art.-Nr.: 383120, *Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland*
- Schwefelsäure (Konz. 95 % - 97%)
- Fluka™ di-Natriumtetraborat-Decahydrat, Art.-Nr.: 72000, *Honeywell International Inc., Bukarest, Rumänien*
- m-Hydroxybiphenyl (3-Phenylphenol), Art.-Nr.: 10647474, *Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland*
- D-Glucuronsäure (Uronsäure-Standard), Art.-Nr.: G5269, *Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland*
- Reinstwasser
- Natriumhydroxid, *Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland*

Material und Methoden

Des Weiteren wurde die Gesamtzellzahl der Biofilme mit Hilfe der DAPI-Färbung bestimmt. Hierzu wurden die folgenden Materialien und Chemikalien verwendet:

- Reagenzgläser
- Membranfiltrationsanlage
- Erlenmeyerkolben
- Membranfilter Isopore™ aus Polycarbonat (Porengröße 0,22 µm), *Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland*
- 4',6-Diamidin-2-phenylindol Dihydrochlorid (DAPI), Art.-Nr.: D8417-10MG, *Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland*
- Formaldehyd, *Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland*

4.1.5 Thermische Desorption von Dünnschichtmikroextraktion Sorptionsfilme

Zur thermischen Desorption der TFME Filme, sowie der nachträglichen Reinigung der TDS-Desorptionsröhrchen, wurden die folgenden Materialien verwendet:

- TDS-Desorptionsrohr (für GERSTEL-TDS 2, -TDS G und -TDS A, ungefüllt, mit Markierung), Art.-Nr.: 012518-010-00, *Gerstel GmbH & Co. KG, Mülheim an der Ruhr, Deutschland*
- TDS-Desorptionsrohr (für Twister bis 1 mm Schichtdicke), Art.-Nr.: 012518-010-00, *Gerstel GmbH & Co. KG, Mülheim an der Ruhr, Deutschland*
- Verschlusskappen (für TDS-Desorptionsrohr, PTFE), Art.-Nr.: 012659-010-00, *Gerstel GmbH & Co. KG, Mülheim an der Ruhr, Deutschland*
- Schraubgewindeglas (Volumen: 20 mL), Art. Nr.: 702021, *MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland*
- Schraubdeckel (geschlossen, weiß), Art. Nr.: 702061, *MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland*
- Pasteurpipetten (Material: Natron-Kalk-Glas, Volumen: 1,5 mL), Art. Nr.: 747720, *Brand GmbH & Co. HG, Wertheim, Deutschland*
- Pipettierhilfe (für Pasteurpipetten aus Glas, Material: Naturkautschuk), Art. Nr.: 124700, *Brand GmbH & Co. HG, Wertheim, Deutschland*
- Pinzette

Weiterhin sind zur Reinigung der TDS-Desorptionsröhrchen für die Mehrfachverwendung und die thermische Desorption Chemikalien notwendig. Diese sind im Folgenden aufgelistet:

- ALPHAGAZ 1 Helium (99,9%), *Air Liquide Deutschland, Düsseldorf, Deutschland*
- Dichlormethan (for analysis, 99,8%, stabilized with amylene), *ACROS Organics™, Geel, Belgien*
- Methanol (BAKER ANALYZED™ ULTRA LC/MS), Art. Nr.: 9822.1000GLE, *VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland*
- SupraSolv® n-Hexan (for gas chromatography MS), Art.-Nr.: 1007952500, *Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland*
- HiPerSolv CHROMANORM® 2-Propanol (für die LC-MS, ≥99,9%), Art.-Nr.: 84881.290P, *VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland*
- Reinstwasser

4.1.6 Flüssigextraktion von TFME Sorptionsfilmen

Die Flüssigextraktion der Sorptionsfilme wurde mit Hilfe der im Folgenden aufgeführten Materialien durchgeführt:

- 0,3ml Crimp Neck Vial (32 x 11.6mm, klar, mit Label, integriertem Insert), *BGB Analytik Vertrieb GmbH, Rheinfelden, Deutschland*
- Rollrandflasche R1 (klar, 3 mm), Art.-Nr.: 300001, *CS-Chromatographie Service GmbH, Langerwehe, Deutschland*
- Bördelkappe R11-rot (Alu-Kappen mit Loch und Dichtscheibe, Dichtschiebe aus PTFE, beidseitig), Art.-Nr.: 300207, *CS-Chromatographie Service GmbH, Langerwehe, Deutschland*
- 11 mm Manual Crimper (für Aluminium Caps, einstellbar), Art.-Nr.: 295021, *BGB Analytik Vertrieb GmbH, Rheinfelden, Deutschland*
- 11 mm Manual Decapper (für Aluminium Caps), Art.-Nr.: 295027, *BGB Analytik Vertrieb GmbH, Rheinfelden, Deutschland*
- Pasteurpipetten (Material: Natron-Kalk-Glas, Volumen: 1,5 mL), Art. Nr.: 747720, *Brand GmbH & Co. HG, Wertheim, Deutschland*
- Pipettierhilfe (für Pasteurpipetten aus Glas, Material: Naturkautschuk), Art. Nr.: 124700, *Brand GmbH & Co. HG, Wertheim, Deutschland*
- Spritzenfilter MULTOCLEAR-13 (Material: RC, Porendurchmesser: 0,2 µm, Filterdurchmesser: 13 mm), Art.-Nr.: 390834, *CS-Chromatographie Service GmbH, Langerwehe, Deutschland*

Material und Methoden

- Pinzette

Zur Flüssigextraktion der Sorptionsfilme wurden die folgenden Chemikalien verwendet:

- Aceton (for HPLC, $\geq 99\%$), Art.-Nr.: 270725, *Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland*
- Acetonitril (HiPerSolv CHROMANORM®, gradient grade für die HPLC, $\geq 99,9\%$), Art.-Nr.: 20060.290, *VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland*
- Dichlormethan (for analysis, 99,8%, stabilized with amylene), *ACROS Organics™, Geel, Belgien*
- Methanol (BAKER ANALYZED™ ULTRA LC/MS), Art. Nr.: 9822.1000GLE, *VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland*
- Reinstwasser

4.2 Instrumente und Software

4.2.1 Instrumente für die Probenvorbereitung

Zur Anzucht der bakteriellen Biofilme im *in vitro* Biofilmmodell wurden die im Folgenden aufgeführten Instrumente verwendet:

- DMLS Mikroskop, *Leica Biosystems, Nussloch, Deutschland*
- Vortex Genie 2, *Scientific Industries Inc., New York, USA*
- Präzisionswaage extend ED4202S-CW, *Sartorius Lab Instruments GmbH & Co. KG, Göttingen, Deutschland*
- Rührplatte RH basic 2, *IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland*
- VARIOKLAV® Dampfsterilisator (Modell: 400EP), *HP-Labortechnik GmbH, Oberschleißheim, Deutschland*
- Kühlbrutschrank mit Kühlaggregat, Typ ICP 500, *Memmert GmbH + Co. KG, Schwabach, Deutschland*
- Brutschrank, Typ BE 500, *Memmert GmbH + Co. KG, Schwabach, Deutschland*
- Wachstumsschrank, Typ KBW 720, *Binder GmbH, Tuttlingen, Deutschland*
- Heratherm mikrobiologischer Inkubator, Typ IMH 100, *Thermo Fisher Scientific Inc., Massachusetts, Vereinigte Staaten von Amerika*

- Heraeus® Mikrobiologische Brutschränke, Typ B 6120, *Thermo Fisher Scientific Inc., Massachusetts, Vereinigte Staaten von Amerika*
- Mikrowellenautoklav, MediJet 500, PHOENIX Instrument GmbH, Garbsen, Deutschland

Die Probenvorbereitung zur chemischen Analytik der TFME Filme umfasst die Reinigung der TDS-Desorptionsrohre, die Reinigung der TFME Filme und die Flüssigextraktion der TFME Filme zur GCxGC-qMS Analyse. Des Weiteren war zur Entwicklung und Optimierung der analytischen Methoden das Ansetzen und Verdünnen der analytischen Standards notwendig. Die hierzu verwendeten Instrumente sind im Folgenden aufgeführt:

- Wasseraufbereitungssystem arium ® pro VF, *Satorius Stedim Biotech, Aubagne, Frankreich*
- Vortex Schüttler VV3, *VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland*
- XSR-Analysenwaage (Modellnr.: XS204 DeltaRange®), *Mettler-Toledo GmbH, Gießen, Deutschland*
- Tube Conditioner 2, *Gerstel GmbH & Co. KG, Mülheim an der Ruhr, Deutschland*
- Rüttelplatte SM25, *Edmund Bühler GmbH, Bodelshausen, Deutschland*
- Kolbenhubpipetten 2 – 20 µL, 20 – 200 µL, 100 – 1000 µL, 1 – 10 mL, Transferpipette® S, *Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland*
- Eppendorf Concentrator Plus, *Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland*

4.2.2 Instrumente für die mikrobiologische Analytik

Zur Bestimmung des Uronsäuregehalts wurde ein Uronsäure-Assay durchgeführt. Hierzu wurden verschiedene Instrumente verwendet, welche im Folgenden aufgeführt sind:

- Tecan Reader
- Vortex Genie 2, *Scientific Industries Inc., New York, USA*

4.2.3 Instrumente für die chemische Analytik

Die chemische Analyse der mVOCs von den drei untersuchten Stämmen des Bakteriums *P. aeruginosa* wurden zum einen durch eine direkten, online thermische Desorption der Filme mit einem Thermodesorptionssystem, gekoppelt mit einem

Material und Methoden

GC-qMS, durchgeführt. Zum anderen erfolgte eine Flüssigextraktion der Filme mit einer anschließenden Analyse der Extrakte mittels GCxGC-qMS. Die hierfür verwendeten Instrumente, mit den einzelnen Bestandteilen sind im Folgenden aufgeführt:

TD-GC-qMS

- Thermodesorptionssystem mit Autosampler
 - Autosampler: Gerstel TDS-A2, *Gerstel GmbH & Co. KG, Mülheim an der Ruhr, Deutschland*
 - Thermodesorber: Gerstel TDS 3, *Gerstel GmbH & Co. KG, Mülheim an der Ruhr, Deutschland*
- Injektor
 - PTV-Injektor: Gerstel Kaltaufgabesystem CIS 3, *Gerstel GmbH & Co. KG, Mülheim an der Ruhr, Deutschland*
- GC-MS System
 - Gaschromatograph: Agilent 7890 A, *Agilent Technologies Inc., Santa Clara, USA*
 - Quadrupolmassenspektrometer: *Agilent MSD 5975 C, Agilent Technologies Inc., Santa Clara, USA*
 - Ionenquelle: Elektronenstoßionenquelle, *Agilent Technologies Inc., Santa Clara, USA*

GCxGC-qMS

Das Shimadzu GCMS QP2010 System (2D-GC System, *Shimadzu Deutschland GmbH, Duisburg, Deutschland*) besteht aus den folgenden Komponenten:

- Autosampler
 - AOC-20i mit einer 10 µL Spritze, *Shimadzu Deutschland GmbH, Duisburg, Deutschland*
- Injektor
 - Split/splitlos Injektor mit Silikon-Septum, *Shimadzu Deutschland GmbH, Duisburg, Deutschland*
- Gaschromatograph
 - GC-2010 Plus, *Shimadzu Deutschland GmbH, Duisburg, Deutschland*
- Modulator

- Jet-Loop-Modulator („hot/cold-jet“), *ZOEX Corporation, Houston, Texas, USA*
- Quadrupolmassenspektrometer
 - GCMS-QP2010 Ultra, *Shimadzu Deutschland GmbH, Duisburg, Deutschland*
- Ionenquelle
 - Elektronenstoßionenquelle, *Shimadzu Deutschland GmbH, Duisburg, Deutschland*

TG und TG-APPI-qMS

Zur thermogravimetrischen Bestimmung der TFME Filme wurde das TG System STA 7200 (*Hitachi High-Technologies, Tokyo, Japan*) verwendet. Die eingesetzte Kopplung aus diesem TG System mit einem APPI-qMS wurde von Brecht et al. [127] entwickelt und besteht aus den im Folgenden aufgeführten Komponenten:

- TG System:
 - TG: STA 7200, *Hitachi High-Technologies, Tokyo, Japan*
 - Autosampler: AS-3, *Hitachi High-Technologies, Tokyo, Japan*
- Transferline (beheizbar):
 - Spezialanfertigung. Hergestellt von Brecht et al. [127] in Kooperation mit Masterflex SE (*Gelsenkirchen, Deutschland*)
- Geschlossene APPI Ionenquelle:
 - PKR 106 Vakuum Ultraviolett Krypton Lampe (*Heraeus, Hanau, Deutschland*)
- Massenspektrometer:
 - Quadrupolmassenspektrometer: Chrommaster 5610 (*Hitachi High-Technologies, Tokyo, Japan*)

4.2.4 Software und Datenbanken

Für die Datenaufnahme und -analyse wurden verschiedene Computerprogramme verwendet. Zunächst sind die zur Steuerung der Instrumente verwendeten Computerprogramme aufgelistet:

TD-GC-qMS

- MSD Chemstation, Version E.02.02.1431, *Agilent Technologies Inc., Santa Clara, USA*

Material und Methoden

- Gerstel Maestro, Version 1.5.3.36/3.5, *Gerstel GmbH & Co. KG, Mülheim an der Ruhr, Deutschland*

GCxGC-qMS

- GC Real Time Analysis, Version 4.11 SU2, *Shimadzu Deutschland GmbH, Duisburg, Deutschland*

Zur Auswertung der erhaltenen Daten wurden verschiedene kommerzielle und frei erhältliche Computerprogramme verwendet. Diese sind im Folgenden aufgeführt:

- Chemstation Analysis, MSD ChemStation, Version E.02.02.1431, *Agilent Technologies Inc., Santa Clara, USA*
- MassHunter Workstation Qualitative Analysis Navigator, Version B08.00, *Agilent Technologies Inc., Santa Clara, USA*
- MassHunter GC/MS Translator, Version B07.06.2704, *Agilent Technologies Inc., Santa Clara, USA*
- GC Postrun, Version 4.11 SU2, *Shimadzu Deutschland GmbH, Duisburg, Deutschland*
- GC Image, Version 2.0b5, *ZOEX Corporation, Houston, Texas, USA*
- Reifycs Analysis Base File Converter, *Reifycs Inc., Tokio, Japan*
- MS-DIAL, Version 4.18, *RIKEN, Wako, Japan*
- Origin Pro 2018G, *OriginLab Corporation, Northampton, USA*
- Origin Pro 2019b, *OriginLab Corporation, Northampton, USA*
- Microsoft Office Excel 2016, *Microsoft Corporation, Redmond, USA*
- SIMCA, Version.: 16.0.2.10561, *Sartorius AG, Göttingen, Deutschland*

Die Auswertung und Interpretation der erhaltenen Massenspektren aus den EI-MS Analysen wurde mit zwei verschiedenen Datenbanken durchgeführt. Zum einen wurde die EI-MS Referenzdatenbank NIST angewendet. Für die eindimensionalen GC-MS Daten stand die NIST Datenbank Version 17 (2017, National Institute of Standards and Technology) zur Verfügung. Die Auswertung der zweidimensionalen GC-MS Daten erfolgte mit der NIST Datenbank Version 08 (2008, National Institute of Standards and Technology). Zum anderen wurde eine Metabolitspezifische GC-MS Datenbank namens MassBank of North America (MoNA, Version 2019, *Oliver Fiehn, West Coast Metabolomics Center, University of California, Davis, USA*) zur Interpretation der eindimensionalen GC-MS Daten angewendet.

4.3 Probenvorbereitung

In dieser Arbeit wurden für die verschiedenen Zielsetzungen, wie der Methodenentwicklung und -optimierung sowie der Kultivierung bakterieller Biofilme, unterschiedliche Probenvorbereitungsprozesse angewendet. Diese werden in den folgenden Kapiteln detailliert beschrieben.

4.3.1 Systematische Untersuchungen mit Hilfe der gaschromatographischen Methoden

Zur Methodenentwicklung und -optimierung sowie der Evaluierung der entwickelten Methoden und zur Qualitätskontrolle, wurden wässrige bzw. methanolische Mischstandards der ausgewählten potenziellen Metabolite des Bakteriums *P. aeruginosa* (vgl. Kapitel 4.1.1) verwendet. Diese Standards wurden als methanolische Einzelstandards mit einer Konzentration von jeweils 100 mM vorbereitet. Danach wurde aus den Einzelstandards ein Multistandard mit einer Konzentration von 5 mM je Substanz hergestellt. Ausgehend von diesem Multistandard wurden, für die verschiedenen Zielsetzungen der Methodenentwicklungen und -optimierungen, unterschiedliche Verdünnungen erzeugt.

TD-GC-qMS

Die Entwicklung und Optimierung der TD-GC-qMS Methode wurde mit zwei verdünnten wässrigen Multistandards durchgeführt. Hierzu wurde die Konzentration des initialen wässrigen Multistandards ($c = 5 \text{ mM}$), durch eine dekadische Verdünnung mit Reinstwasser, auf eine Konzentration von $50 \text{ }\mu\text{M}$ und $500 \text{ }\mu\text{M}$ eingestellt. Zur thermischen Desorption der Analyten des Multistandards wurden die Sorptionsfilme mittels der immersiven Methode [119] beladen. Hierbei wurden Sorptionsfilme verwendet, deren Maße von denen der im *in vitro* Biofilmmodell verwendeten Sorptionsfilme (vgl. Kapitel 4.3.4) abwichen. Die Beladung wurde, aus Gründen der einfacheren Handhabung und der Risikominimierung durch Minimierung der Chemikalienmenge, in 2 mL GC-Vials durchgeführt. Dies führte dazu, dass eine Halbierung der Sorptionsfilme, welche im *in vitro* Biofilmmodell Anwendung finden, erfolgen musste. Die Sorptionsfilme wiesen entsprechend Maße von $3,5 \text{ mm} \times 27,5 \text{ mm}$ auf. Zur Beladung der Sorptionsfilme wurde 2 mL des

Material und Methoden

entsprechenden Multistandards in das GC-Vial gegeben. Die Beladung der Sorptionsfilme erfolgte für zwei Stunden bei Raumtemperatur (ca. 23 °C) und ohne konvektives Mischen.

Zur Charakterisierung der Methode wurde die Nachweis- (engl.: *limit of detection*, LOD) und Bestimmungsgrenze (engl.: *limit of quantification*, LOQ) nach der 3σ -Methode von Kaiser und Specker [123] ermittelt. Zur Bestimmung von LOD und LOQ wurden die Sorptionsfilme, analog zum Vorgehen bei der Methodenentwicklung und -optimierung beladen. Die Ermittlung von LOD und LOQ erfolgte unter Verwendung der Totalionenchromatogramme (engl.: *total ion chromatogram*, TIC) der Analysen der beladenen TFME Filme, wobei der Konzentrationsbereich der Analyten im Multistandard zwischen 5 fM und 500 μ M lag. Diese Konzentrationen wurden wiederum durch eine dekadische Verdünnung des initialen Multistandards mit Reinstwasser eingestellt.

GCxGC-qMS

Die Methodenentwicklung und -optimierung der GCxGC-qMS Methode wurde mittels eines methanolischen Multistandards mit einer Konzentration von 100 μ M je enthaltenem Standard durchgeführt. Die Verdünnung der Stammlösung erfolgte mit LC-MS *grade* Methanol. Zur Methodenentwicklung und -optimierung wurde die erhaltene Lösung in ein *crimp* Vial gegeben und verschlossen.

Damit die extrazellulären volatilen Metabolite mittels GCxGC-qMS analysiert werden konnten, ist nach deren Sorption eine Flüssigextraktion der beladenen Filme notwendig. Zur Extraktion der Metabolite von den PDMS-Filmen wurden die Filme mit einem Skalpell halbiert und beide Hälften zusammen in ein 11 mm *crimp* Vial überführt. Bei der ersten Methode (Methode A) wurden im Anschluss die Vials vollständig mit Methanol befüllt und verschlossen. Die Extraktion wurde bei Raumtemperatur (ca. 23 °C), ohne konvektives Mischen für 18 Stunden durchgeführt. Danach wurden die Filme aus dem Lösungsmittel entfernt und dieses mittels einer Vakuumzentrifuge bis zur Trockene eingengt. Anschließend erfolgte eine Resuspendierung der verbliebenen Analyten in 100 μ L Methanol. Zur vollständigen Resuspendierung erfolgte eine konvektive Vermischung. Abschließend wurde für die Analyse die Lösung mit einer Pasteurpipette in ein *crimp* Vial mit *Insert* überführt.

Zur Optimierung der Flüssigextraktion wurden vier weitere Methoden (Methode B – E) getestet. Bei Methode B wurden die Proben bei der 18-stündigen Extraktion mittels einer Schüttelplatte durchmischt. Anschließend wurde wie in Methode A weiterverfahren. Des Weiteren wurden die Proben dreimal zwei Stunden ohne Durchmischen extrahiert, wobei jeweils nach zwei Stunden das Extraktionsmittel entfernt, gesammelt und durch neues ersetzt wurde. Im Anschluss an die Extraktion wurden die drei Extraktionsfraktionen vereinigt sowie mittels Vakuumzentrifuge bis zur Trockene eingengt und anschließend wie in Methode A beschrieben weiterverfahren (Methode C). Bei Methode D wurde die Methode C durch ein kontinuierliches Durchmischen während der Extraktion ergänzt. Zuletzt wurde die Extraktion wie in Methode C beschrieben durchgeführt, allerdings im Anschluss an die drei Extraktionszyklen eine 15-minütige Ultraschallbehandlung durchgeführt (Methode E).

4.3.2 Methodenoptimierung der thermogravimetrischen Methoden und Untersuchung der Sorptionsfilme

Die Charakterisierung der zur Verfügung stehenden TFME Filme aus PDMS wurde mittels einer thermogravimetrischen (TG) Methode und einer TG-APPI-qMS Methode durchgeführt.

Der Nachweis der Analysierbarkeit von zyklischen Siloxanen mit der TG und TG-APPI-qMS Methode wurde durch die Analyse von authentischen Standards erbracht. Hierzu wurden die Reinstandards der zyklischen Siloxane D4 bis D6 (vgl. Kapitel 4.1.1) mit beiden Methoden analysiert.

Zur Charakterisierung der ausgewählten Sorptionsfilme der beiden Hersteller (vgl. Kapitel 4.1.2) wurden aus den produktionsseitig gelieferten PDMS-Platten kleinere Stücke mit einem Gewicht von 5 mg ausgeschnitten. Untersucht wurden je Hersteller drei Ausschnitte der gelieferten PDMS-Platten, wobei die Ausschnitte aus unterschiedlichen Bereichen (unten links, mittig, oben rechts) entnommen worden sind. Die Einwaage erfolgte mit Hilfe einer Analysenwaage sowie mit der in dem TG-System verbauten Waage.

4.3.3 Kultivierung von bakteriellen Biofilmen im *in vitro* Biofilmmodell

Die Untersuchung des extrazellulären volatilen Metaboloms des Bakteriums *P. aeruginosa* wurde mittels der drei Bakterienstämme *P. aeruginosa* ATCC 10145, PAO1 und FRD1 (vgl. Kapitel 4.1.3) durchgeführt. In dem *in vitro* Biofilmmodell,

Material und Methoden

welches in dieser Arbeit etabliert worden ist (vgl. Kapitel 5.1), wurden die Biofilme kultiviert und die metabolischen organischen Substanzen (engl.: *metabolic volatile organic compound*, mVOC) für die Analyse angereichert. Das *in vitro* Biofilmmodell ist in Kapitel 5.1 ausführlich beschrieben.

Zur Kultivierung der bakteriellen Biofilme wurden drei verschiedene Agar-Nährmedien verwendet, deren Herstellung in den Kapiteln 4.3.3.1 und 4.3.3.2 detailliert beschrieben sind. Die Herstellung des Inokulums sowie die Inokulation und die Kultivierung erfolgten unabhängig vom gewählten Nährmedium, so dass die Durchführung dieser Arbeitsschritte im Folgenden allgemein beschrieben ist.

Zunächst wurde das ausgewählte Nährmedium hergestellt (vgl. Kapitel 4.3.3.1 und 4.3.3.2) und anschließend in die Glas-Petrischalen gegeben. Diese wurden mit dem Deckel verschlossen und zur Verfestigung des Nährmediums 24 Stunden bei Raumtemperatur (ca. 23 °C) in einer mikrobiologischen Sicherheitswerkbank (*Clean-Bench*) gelagert. Zur Herstellung der Zellsuspensionen der Bakterienstämme wurde zunächst je verwendetem Bakterienstamm eine Agarplatte (1. Vorkultur) hergestellt. Hierzu wurde von der jeweiligen Kryokultur mit einer Impföse ein Einzelkoloniausstrich (Dreifach-Ausstrich) auf festem LB-Agar in einer Polystyrol-Petrischale (PS-Petrischale) durchgeführt. Diese Petrischalen wurden dann über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde mittels einer Impföse eine Einzelkolonie der Agarplatte entnommen und hiermit die erste Vorkultur hergestellt. Hierzu wurde mit der entnommenen Einzelkolonie erneut ein Einzelkoloniausstrich auf LB-Agar in einer PS-Petrischale durchgeführt. Die Inkubation der ersten Subkultur erfolgte analog zur Agarplatte der 1. Vorkultur über Nacht bei 37 °C. Am folgenden Tag erfolgte dann die Herstellung der Zellsuspensionen sowie die Inokulation der Zellsuspension auf den jeweiligen Nährmedien. Zur Herstellung der Zellsuspension wurde mit der Impföse eine Einzelkolonie von der ersten Subkultur entnommen, diese in 2 mL sterilem, deionisiertem Wasser suspendiert und durch Schütteln auf einem Vortex homogenisiert. Anschließend wurden zwei dezimale Verdünnungen aus der ursprünglichen Zellsuspension mit sterilem, deionisiertem Wasser hergestellt. Die Zellzahlen (Z) der beiden Verdünnungen wurden mit Hilfe einer Thomazählkammer (Tiefe: 0,1mm) bestimmt. Hierzu wurden die beiden Verdünnungen in eine Thomazählkammer pipettiert und unter Zuhilfenahme eines Phasenkontrast-Mikroskops die Anzahl der Bakterien in 20 c-Feldern der Thomazählkammer ermittelt.

Mit Hilfe der Bakterienzahlen in den Verdünnungen wurde die Zellzahl in der ursprünglichen Zellsuspension berechnet. Hierzu wird die Gleichung (1) verwendet [128].

$$\emptyset Z \text{ im } c - \text{Feld} \cdot Kf \cdot Vf = Z \left[\frac{\text{Zellen}}{\text{mL}} \right] \quad (1)$$

Der Kammerfaktor (Kf) ist abhängig von der verwendeten Thomazählkammer und beträgt bei der in dieser Arbeit verwendeten Thomazählkammer $4 \cdot 10^6$. Dieser berechnet sich aus der Kantenlänge eines c-Feldes sowie dem Abstand zwischen der Zählkammer und dem Deckglas der Kammer. Dadurch ergibt sich, dass das Volumen eines c-Feldes dem $4 \cdot 10^6$ ten Teil eines Milliliters entspricht. Der Verdünnungsfaktor Vf entspricht der ausgezählten, dezimalen Verdünnungsstufe. Wurde die erste dezimale Verdünnung zur Berechnung verwendet, entspricht dies einem Vf von 10. Dementsprechend ist ein Vf von 100 zu verwenden, wenn die Berechnung mit der zweiten dezimalen Verdünnung durchgeführt worden ist.

Ausgehend von den berechneten Zellzahlen der ursprünglichen Zellsuspension, wurde diese auf eine Zellzahl von $1 \cdot 10^8 \text{ Z} \cdot \text{mL}^{-1}$ mit sterilem, deionisiertem Wasser verdünnt. Die entsprechenden Nährmedien in den Glas-Petrischalen wurden dann mit $100 \mu\text{L}$ dieser Verdünnung beimpft. Anschließend wurde die aufgegebene Zellsuspension mit einem Drigalskispatel gleichmäßig auf der Oberfläche des Nährmediums ausgestrichen. Vor der Kultivierung der Petrischalen wurden die vorbereiteten TFME Filme (s. Kapitel 4.3.4; Maße: $3,5 \times 55 \text{ mm}$; Dicke: $0,45 \text{ mm}$) in den Deckel der Petrischale gelegt. Anschließend wurden die Petrischalen verschlossen und über Kopf inkubiert. Dies erfolgte entweder direkt im Brutschrank (aerobe Kultivierung) oder unter Zuhilfenahme eines Anaerobtopfs (anaerobe Kultivierung, vgl. Kapitel 4.1.3). Die anaerobe Atmosphäre wurde durch den Katalysator Anaerocult A erzeugt. Dieser setzt den anfänglich im Anaerobtopf vorhandenen Luftsauerstoff katalytisch in CO_2 um. Zur Kontrolle der Erzeugung einer anaeroben Atmosphäre, wurde ein Teststreifen (Anaerotest) in den Anaerobtopf gegeben. Die Kultivierungstemperatur sowie die Kultivierungsdauer betragen bei allen durchgeführten Versuchen $37 \text{ }^\circ\text{C}$ bzw. 48 Stunden. Zur Erstellung von Wachstumskurven der Bakterienstämme wurde die Kultivierungsdauer von

Material und Methoden

24 Stunden bis sieben Tage variiert. Hierbei erfolgte die Probenahme einmal täglich und 24 Stunden nach Inokulation bzw. nach der letzten Probenahme.

4.3.3.1 Herstellung eines nicht-selektiven und eines selektiven Mediums für *P. aeruginosa*

Das in dieser Arbeit verwendete nicht-selektive Vollmedium, ist der LB-Agar der Firma Carl Roth GmbH & Co. KG (vgl. Kapitel 4.1.3.1). Zur Herstellung der Agarplatten für die aerobe Kultivierung (LB-Agar) wurden 35 g LB-Agarpulver zu 1 L sterilen und destillierten Wasser in einen Erlenmeyerkolben gegeben ($c_{LB} = 35 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$). Dieses wurde dann mit Hilfe eines Rührfisches bei Raumtemperatur quellen gelassen und anschließend wurde der Erlenmeyerkolben in ein auf 98 °C temperiertes Wasserbad gestellt. Bis zur vollständigen Lösung des Agarpulvers, verblieb der Erlenmeyerkolben in dem Wasserbad. Im Anschluss erfolgte eine Autoklavierung des Nährmediums bei 121 °C für 15 min. Die autoklavierte Lösung wurde in einem Wasserbad auf 50 °C abgekühlt und danach wurden je 20 mL der Lösung mit Hilfe einer Kipp pipette in die Glas-Petrischalen gegeben. Anschließend wurde wie in Kapitel 4.3.3 beschrieben weiter verfahren. Bei der Herstellung der Agarplatten für die anaerobe Kultivierung (LBN-Agar) wurde vor dem Rühren der 35 g·L⁻¹ LB-Agarlösung zusätzlich Kaliumnitrat zugegeben. Die Konzentration von Kaliumnitrat in der LB-Agarlösung betrug 10,11 g·L⁻¹ (100 mM). Ansonsten wurde das gleiche Verfahren angewendet wie bei den Agarplatten für die aerobe Kultivierung.

Als *Pseudomonas* selektives Vollmedium, wurde *Pseudomonas* Isolierungsagar (PIA; vgl. Kapitel 4.1.3.2) verwendet. 45 g dieses Agars wurden in 980 mL sterilen und destillierten Wasser sowie 20 mL Glycerin dosiert ($c_{PIA} = 45 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$). Anschließend erfolgte eine Quellung des Agars unter ständigem Rühren, bei Raumtemperatur. Bis zur vollständigen Lösung aller Komponenten des Nährmediums wurde das Gemisch in ein 98 °C warmes Wasserbad gestellt. Nach der anschließenden Autoklavierung (15 min bei 121 °C) des Nährmediums erfolgte in einem 50 °C warmen Wasserbad die Abkühlung. Abschließend wurden je 20 mL der Lösung mit Hilfe einer Kipp pipette in die Glas-Petrischalen gegeben. Danach wurde wie in Kapitel 4.3.3 beschrieben weiter verfahren. Für die anaerobe Kultivierung (PIAN-Agar) wurde zu der Mischung aus PIA Agar, Wasser und Glycerin zusätzlich 10,11 g·L⁻¹ (100 mM) Kaliumnitrat gegeben. Im

Anschluss wurde mit dem Agar wie bei der Herstellung des aeroben PIA-Agars verfahren.

4.3.3.2 Herstellung des artifiziellen Sputummedium

Die Herstellung des ASM basiert auf den Publikationen von Sriramulu et al. [129] und Kirchner et al. [130]. Hierbei handelt es sich allerdings um ein Flüssigmedium, welches für die Anzucht von bakteriellen Biofilmen ungeeignet ist. Publikationen zu einem festen ASM sind zum Zeitpunkt dieser Arbeit nicht veröffentlicht worden. Deswegen wurde in dieser Arbeit auf Basis dieser Publikationen ein festes ASM hergestellt. Des Weiteren erfolgte eine Optimierung des Herstellungsprozesses. Im Folgenden ist zunächst der optimierte und endgültige Herstellungsprozess beschrieben.

Für die Herstellung von festen ASM wurden zunächst vier verschiedene Lösungen separat angesetzt. Bei der ersten Lösung werden portionsweise 0,8 g DNA aus Lachssperma zu 50 mL sterilem Wasser unter ständigem Rühren gegeben. Nach Abschluss der Zugabe wird die Lösung bis zur weiteren Verwendung über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Lösung 2 ist eine Lösung aus Mucin vom Schweinemagen (Typ II) in sterilem Wasser, mit einer Mucin Konzentration von $2 \cdot 10^{-5} \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$. Das Mucin wird analog zur DNA unter ständigem Rühren zum Wasser hinzugegeben und bis zur weiteren Verwendung über Nacht weiter gerührt. Zur Herstellung der Lösung der Casaminosäuren (Lösung 3), werden 1 g dieser in 30 mL sterilem Wasser gelöst. Diese Lösung wird über Nacht bei 4 °C gelagert. Abschließend werden 2,95 mg DTPA, 2,5 g Natriumchlorid und 1,1 g Kaliumchlorid zusammen in 50 mL sterilem Wasser gelöst (Lösung 4) und ebenfalls bis zur Verwendung (über Nacht) bei 4 °C gelagert.

Zur Herstellung des festen ASM, werden zunächst die Lösungen 1 bis 3 in einem autoklavierten Erlenmeyerkolben vereinigt. Anschließend werden 8 mL der Lösung 4 zu diesem Gemisch gegeben. Für die Herstellung des anaeroben Nährmediums werden zusätzlich 2,022 g (100 mM) Kaliumnitrat hinzugefügt. Der weitere Verlauf der Durchführung ist für die Herstellung des aeroben sowie des anaeroben Nährmediums identisch. Im zweiten Schritt wird dem Gemisch steriles Wasser hinzugegeben, so dass ein Gesamtvolumen von 170 mL erreicht wird. Anschließend wird mittels 1 M Tris Puffer der pH-Wert des Gemisches auf 6,9 eingestellt. Im vierten Herstellungsschritt erfolgt die Zugabe von 3 g Bacto Agar zu dem Gemisch. Des Weiteren wird das Volumen des Gemisches mit sterilem Wasser auf 199 mL erhöht. Anschließend wird

Material und Methoden

das Gemisch für 20 min bei Raumtemperatur (ca. 23 °C) quellen gelassen. Die Autoklavierung erfolgt im Anschluss an das Quellen im Mikrowellenautoklaven. Das Gemisch wird hierzu innerhalb von 2,4 min auf 135 °C erwärmt. Diese Temperatur wird für 22 s gehalten, bevor das Gemisch innerhalb von 6 min heruntergekühlt wird. Anschließend erfolgt eine weitere Abkühlung des Gemisches auf 50 °C im Wasserbad. Sobald die gewünschte Temperatur erreicht ist, wird 1 mL Eigelb Emulsion unter Schwenken hinzugefügt. Abschließend werden 20 mL Aliquote mittels einer Kipppipette in die Glas-Petrischalen gegeben. Nach der Aushärtung des Agars in der Sterilbank wurden die gegossenen Nährmedien bei 4 °C gelagert. Die Lagerungsdauer betrug maximal 14 Tage.

Zur Optimierung des Herstellungsprozesses wurden verschiedene Herstellungsschritte variiert und verändert. Zum einen wurde eine Herstellung ohne Autoklavierung der Komponenten des ASM getestet und zum anderen wurde die Zugabe der Eigelb Emulsion nach (finale Methode) und vor der Autoklavierung mittels Mikrowellenautoklaven durchgeführt. Des Weiteren wurde getestet, ob für die anaerobe Kultivierung die Zugabe von Kaliumnitrat notwendig ist. Hierzu wurden Versuche durchgeführt, bei dem die zusätzlich zugegebene Konzentration an Kaliumnitrat 0 mM, 1 mM, 10 mM und 100 mM betrug.

4.3.4 Probenvorbereitung der TFME Filme zur Anreicherung der mVOCs im *in vitro* Biofilmmodell

Die Beprobung des Gasraumes oberhalb des Biofilmes im *in vitro* Biofilmmodell, wurde mittels der TFME durchgeführt. Hierzu wurden TFME Filme aus dem Material Polydimethylsiloxan (PDMS) verwendet. Nach vorheriger Überprüfung zweier Hersteller von PDMS-Filmen (vgl. Kapitel 5.2.1.1), wurde der PDMS-Film der Firma Goodfellow GmbH (Hersteller A, Hamburg, Deutschland), dessen Filme eine Dicke von 0,45 mm (\pm 10%) aufweisen, ausgewählt. Die PDMS-Filme mussten vor der Verwendung mittels einer Metallstanze zurechtgeschnitten werden, um das Einbringen in das Thermodesorptionsröhrchen zu ermöglichen. Mit Hilfe der Stanze wurden somit Filmstreifen mit einer Länge von 55 mm und einer Breite von 3,5 mm hergestellt. Anschließend erfolgte eine Reinigung der Filme. Die Reinigung der Filme wurde vor der Applikation optimiert. Hierzu wurden die Lösungs- und Reinigungsmittel, die Waschzeiten, sowie die Behandlung nach der lösungsmittelbasierten Reinigung

variiert. Die optimierte Reinigungsmethode besteht aus zwei Phasen. In der ersten Phase, der lösungsmittelbasierten Reinigung, werden die Filme in einem zweistufigen Prozess mit zwei verschiedenen Lösungsmitteln behandelt. Zuerst wurden die Filme in 20 mL Methanol gegeben und 90 Minuten auf einer Rüttelplatte konvektiv durchmischt. Anschließend wurden die Filme in 20 mL einer 5 %-igen wässrigen Decon 90 Lösung überführt und erneut auf einer Rüttelplatte 90 Minuten lang konvektiv durchmischt. Zum Abschluss der ersten Reinigungsphase wurden die Filme aus der 5 %-igen wässrigen Decon 90 Lösung entnommen. Die an den Filmen haftenden Tensidrückstände, wurden mit Reinstwasser entfernt und die Filme für die zweite Reinigungsphase in Thermodesorptionsröhrchen überführt. In der zweiten Reinigungsphase folgte die thermische Reinigung der Filme mit Hilfe des Gerstel Tube Conditioner 2. Zur thermischen Reinigung wurden die Filme auf 200 °C erwärmt und bei dieser Temperatur für zwei Stunden ausgeheizt. Anschließend wurden die Filme auf 50 °C abgekühlt und danach wiederum auf 200 °C erwärmt und bei dieser Temperatur für zwei Stunden ausgeheizt. Dieser Ausheizzyklus wurde insgesamt sechs Mal wiederholt. Anschließend wurden die Filme bis zur Verwendung unter Schutzgas (Argon, 99,998 %) gelagert. Vor dem Transport der Filme unter Argon in die mikrobiologischen Laboratorien und der dortigen Verwendung, wurden die Filme erneut für eine Stunde bei 200 °C ausgeheizt.

4.4 Methoden für die biochemische Analytik

4.4.1 Ermittlung der Gesamtzellzahl mittels DAPI-Färbung

Zur Bestimmung der Gesamtzellzahl der Biofilme, wurde die Methode der DAPI-Färbung angewendet. Hierzu wurde zunächst eine DAPI-Arbeitslösung, bestehend aus 25 µg·mL⁻¹ 4',6-Diamidin-2-phenylindol Lösung in 2% Formaldehyd angesetzt. Diese Arbeitslösung wurde zum Schutz vor Lichteinstrahlung in Braunglasflaschen kühl (ca. 5 °C) gelagert.

Zunächst wurden die Biofilme vom Nährmedium mit Hilfe eines Spatels entfernt und in ein Reagenzglas überführt. Des Weiteren wurden die Biofilme von drei Replikaten vereinigt, damit ausreichend Biofilm für die Auszählung der Bakterienzellen zur Verfügung standen. Anschließend wurde eine dezimale Verdünnungsreihe mit sterilem Wasser bis zu einer Konzentration von 10⁸ Zellen·mL⁻¹ hergestellt. Die zur Bestimmung der Gesamtzellzahl verwendete Verdünnungsstufe wurde, basierend auf

Material und Methoden

der Zellkonzentration in den verschiedenen Biofilmen, ausgewählt. Hierzu erfolgte eine vorherige, grobe Auszählung der Bakterienzellen mit Hilfe des Mikroskops. In der Regel wurden für die Auszählung nach der DAPI-Färbung die Verdünnungsstufen 10^6 , 10^7 und 10^8 Zellen·mL⁻¹ verwendet. Zu 4 mL der ausgewählten Verdünnungsstufe wurde dann 1 mL der DAPI- Arbeitslösung dosiert. Bei Raumtemperatur erfolgte dann eine 15-minütige Inkubation im Dunkeln. Im Anschluss an die Inkubation wurden die Zellen der Bakteriensuspension durch eine Membranfiltration auf einem Polycarbonatfilter (0,22 µm Porengröße) angereichert. Die Zählung der angereicherten Zellen auf dem Filter wurde mit einem Epifluoreszenzmikroskop durchgeführt und basierend auf diesen Ergebnissen die Gesamtzellzahl berechnet. Des Weiteren wurden die epifluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen photographisch dokumentiert.

4.4.2 Bestimmung des Uronsäuregehalts (Uronsäure-Assay) der Biofilme von *P. aeruginosa*

Zur Charakterisierung der bakteriellen Biofilme wurden, hinsichtlich des mukoiden Phänotyps, die Gehalte an Uronsäuren bestimmt. Hierzu wurden die Biofilme vom Nährmedium entfernt und mit der neunfachen Menge an physiologischer Kochsalzlösung ($c_{\text{NaCl}} = 9 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) suspendiert. Weiterhin wurde die erhaltene Suspension im Anschluss mit Reinstwasser zehnfach verdünnt. Insgesamt wurde somit eine 100-fache Verdünnung des Biofilms zur Durchführung der Assays hergestellt. Generell wurden zur Bestimmung der Gehalte an Uronsäuren drei kultivierte Biofilme zur Biofilmprobe vereinigt. Außerdem wurde eine dreifache Bestimmung der Gehalte je Biofilmprobe und je Kalibrierniveau durchgeführt.

Die Bestimmung des Uronsäuregehalts in den bakteriellen Biofilmen wurde nach der von Filisetti-Cozzi und Carpita [131] publizierten Methode durchgeführt. Zur Kalibrierung wurde D-Glucuronsäure in einem Konzentrationsbereich von 0 – 150 mg·L⁻¹ verwendet. Die Verdünnungen wurden gemäß den Angaben in Tabelle 1 aus der Stammlösung ($c = 200 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) mit Hilfe von Reinstwasser hergestellt.

Tabelle 1: Übersicht über die verwendeten Konzentrationen der Kalibrierniveaus sowie der verwendeten Volumina von der Stammlösung der D-Glucuronsäure und des Reinstwassers für die Herstellung der Kalibrierniveaus aus der Stammlösung.

Konzentration D-Glucuronsäure [$\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$]	Volumen Stammlösung D-Glucuronsäure [mL]	Volumen Reinstwasser [mL]
0	0	2
25	0,25	1,75
75	0,75	1,25
150	1,50	0,50

Mit Hilfe der in Tabelle 1 aufgeführten Kaliverniveaus wurde eine externe Kalibration durchgeführt. Hierzu wurde die Absorption jedes Kalibrierniveaus gemessen. Anschließend erfolgte die Messung der Absorption der verdünnten Biofilmsuspensionen. Für alle Messungen wurde ein Proben bzw. Kalibrierlösungsvolumen von 0,4 mL verwendet.

Zur Bestimmung des Uronsäuregehalts der Biofilmprobe bzw. des Kalibrierniveaus, wurde zu den Proben 40 μL der Amidosulfonsäure-Lösung gegeben und die entstandene Lösung anschließend durchmischt. Nachfolgend wurde 2,4 mL Tetraborat-Lösung zugegeben und ebenfalls durchmischt. Im Anschluss erfolgte eine 20-minütige Inkubation der entstandenen Lösung bei 98 °C in einem Wasserbad. Vor der Zugabe von 80 μL der n-Hydroxybiphenyl-Lösung, wurde die Lösung für 5 Minuten im Eisbad heruntergekühlt. Nach der Zugabe der n-Hydroxybiphenyl-Lösung wurde die entstandene Lösung durchmischt und für 10 Minuten bei Raumtemperatur (ca. 23 °C) inkubiert. Für die Messung der Absorption mit Hilfe einer Tecan *Readers* wurden aus der vorbereiteten Lösung 250 μL Aliquote in eine 96-Well Plate überführt. Die Messung der Absorption erfolgte in einem Wellenlängenbereich von 400 – 700 nm, wobei die Auswertung bei 525 nm durchgeführt worden ist. Alle Messungen wurden in einem Zeitraum von 30 Minuten nach Abschluss des letzten Probenvorbereitungsschrittes durchgeführt.

4.5 Methoden für die chemische Analytik

Zur Charakterisierung des extrazellulären volatilen Metaboloms von den drei verschiedenen Stämmen des Bakteriums *P. aeruginosa* wurden zwei verschiedene analytische Methoden angewendet. Diese sind in den Kapiteln 4.5.1 und 4.5.2

Material und Methoden

detailliert beschrieben. Des Weiteren wurde zur Charakterisierung der zur Verfügung stehenden Sorptionsfilme aus PDMS, eine TG- und TG-APPI-qMS-Analyse durchgeführt. Die hierfür verwendeten Methoden sind im Kapitel 4.5.3 erläutert.

4.5.1 TD-GC-qMS

Für die Charakterisierung des extrazellulären volatilen Metaboloms wurde das in Kapitel 4.2.3 beschriebene TD-GC-qMS System verwendet. Die bei der Methodenoptimierung durchgeführten Änderungen der Methodenparameter sind in Kapitel 5.2.2 ausführlich dargelegt. Im Folgenden ist die optimierte TD-GC-qMS-Methode, welche zur Analyse der mVOCs der drei Bakterienstämmen von *P. aeruginosa* verwendet worden ist, beschrieben. Das verwendete Analysensystem besteht aus dem Gerstel TDS-A2 Autosampler, dem Thermodesorptionssystem Gerstel TDS 3, dem Gerstel Kaltaufgabesystem KAS 4 sowie einem Agilent 6890 Gaschromatograph und einem Agilent 5975 MSD Massenspektrometer. Alle aufgeführten Systeme sind direkt miteinander zu einem Analysensystem gekoppelt.

Die Analyten werden von den beladenen Sorptionsfilmen im Gerstel TDS 3 bei 200 °C für fünf Minuten thermisch desorbiert. Hierzu wird der Ofen des TDS von 10 °C (Haltezeit: 1 min) auf 200 °C mit einer temperaturprogrammierten Rate von 60 °C·min⁻¹ aufgeheizt. Gleichzeitig werden die desorbierten Analyten mit einem Desorptionsfluss von 60 mL·min⁻¹ splitlos (systembedingter Zwangssplit von 3 mL·min⁻¹) über eine auf 300 °C beheizte metallische Transferkapillare (Protosteel, deaktiviert; L = 140 mm, AD = 0,7 mm, ID = 0,53 mm; Gerstel GmbH & Co. KG; Art.-Nr.: 008687-005-00) in das Kaltaufgabesystem überführt. Die metallische Transferkapillare weist eine inerte Oberfläche auf, so dass keine Analyten an der inneren Oberfläche der Transferkapillare adsorbiert werden können. Im Kaltaufgabesystem wurde ein Liner, befüllt mit silanisierter Glaswolle (Gerstel GmbH & Co. KG; Art. Nr.: 010850-010-00), verwendet, auf welchem die gasförmigen Analyten bei einer Temperatur von -10 °C fokussiert werden. Nach Abschluss der thermischen Desorption der Filme, wird der Liner mit einer temperaturprogrammierten Rate von 12 °C·s⁻¹ auf eine Temperatur von 270 °C (Haltezeit: 5 min) aufgeheizt. Hierdurch werden die im Liner fokussierten Analyten auf die GC Säule überführt. Die Ofentemperatur beträgt, während der Heizphase des Kaltaufgabesystems -10 °C, so dass die aus dem Liner überführten Analyten am Säulenkopf erneut fokussiert werden. Die Haltezeit der initialen

Ofentemperatur, nach Abschluss der Überführung aus dem Liner, beträgt zwei Minuten. Anschließend wird die Ofentemperatur von -10 °C auf 325 °C (Haltezeit: acht Minuten), mit einer temperaturprogrammierten Rate von $10\text{ °C}\cdot\text{min}^{-1}$, erhöht. Die chromatographische Trennung erfolgt unter Anwendung von Helium (99,9%) als Trägergas, mit einem Volumenstrom von $1\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ auf einer Agilent DB-1 Säule (*Agilent Technologies Inc., Santa Clara, USA*). Die verwendete Agilent DB-1 Säule weist eine Länge von 30 m, einen Innendurchmesser von 0,25 mm und eine Filmdicke von $1\text{ }\mu\text{m}$ auf. Über eine auf 280 °C beheizte Transferline, werden die Analyten in die Elektronenstoßionenquelle überführt. Dort werden diese durch eine Stoßionisation mit 70 eV Elektronen ionisiert (Temperatur der Ionenquelle: 230 °C). Die Analyse der ionisierten Analyten erfolgt mittels eines qMS bei 150 °C im Scanmodus. Der Massenbereich liegt zwischen 40 – 600 Da und die Scanrate bei $2,24\text{ scans}\cdot\text{s}^{-1}$.

Die anschließende Zuordnung der Analyten über die erhaltenen EI-MS Spektren erfolgte unter Anwendung der NIST Datenbank (Version: 2017) sowie der MoNA Datenbank (Version: 2019).

4.5.2 GCxGC-qMS

Neben dem TD-GC-qMS System wurde zur Charakterisierung des extrazellulären volatilen Metaboloms von *P. aeruginosa* ein GCxGC-qMS System (vgl. Kapitel 4.2.3) verwendet. Im Folgenden sind die Methodenparameter der optimierten Analysenmethode beschrieben. Diese Methodenparameter ergeben sich aus der Methodenoptimierung, welche in Kapitel 5.4.1 ausführlich beschrieben ist. Die hier beschriebene optimierte Methode wurde zur Charakterisierung des extrazellulären volatilen Metaboloms von *P. aeruginosa* eingesetzt.

Das verwendete Analysensystem zur Analyse der Flüssigextrakte der TFME Sorptionsfilme ist ein GCMS QP 2010 der Firma Shimadzu Deutschland GmbH.

$1\text{ }\mu\text{L}$ der Flüssigextrakte bzw. des Multistandards wurde mittels Autosampler in den Liner des GCxGC-qMS injiziert. Die Injektortemperatur betrug während der Injektion 250 °C und ein Liner mit silanisierter Glaswolle wurde verwendet. Die gasförmigen Analyten wurden splitlos mit einem Trägergasfluss von $1\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ auf die Säule überführt, wobei Helium (99,9%) als Trägergas verwendet wurde. Zur chromatographischen Trennung wurde in der ersten Dimension eine Restek Rxi5Sil-MS Säule (*Restek GmbH, Bad Homburg, Deutschland*), mit einer Länge von 30 m,

Material und Methoden

einem Innendurchmesser von 0,25 mm und einer Filmdicke von 0,25 μm sowie in der zweiten Dimension eine Restek Rxi17Sil-MS Säule (*Restek GmbH, Bad Homburg, Deutschland*), mit einer Länge von 1 m, einem Innendurchmesser von 0,15 mm und einer Filmdicke von 0,15 μm verwendet. Die Modulation zwischen den beiden Dimensionen wurde mit Hilfe eines Jet-Loop Modulators der Firma ZOEX Corporation durchgeführt. Die von der ersten Dimension eluierenden Analyten werden bei diesem Modulator durch einen kalten gasförmigen Stickstoffstrom auf der Säule immobilisiert. Anschließend erfolgt die Remobilisierung mittels punktueller Erwärmung. Für die Modulation wurde eine Kühlzeit von 3,8 s und eine Aufheizzeit von 0,2 s gewählt. Die initiale Temperatur des Säulenofens beträgt 40 °C. Nach einer Haltezeit von sechs Minuten, wird die Ofenraumtemperatur mit einer temperaturprogrammierten Rate von 6 °C·min⁻¹ auf eine Temperatur von 300 °C erhöht. Die Analyten werden nach Abschluss der chromatographischen Trennung über eine auf 310 °C beheizte Transferline in eine EI-Quelle überführt. In der EI-Quelle erfolgt die Ionisation mit 70 eV Elektronen und bei einer Temperatur von 200 °C. Im Anschluss werden die ionisierten Analyten mittels eines qMS im Scanmodus analysiert. Die Temperatur des Quadrupols betrug 150 °C und der Scanbereich lag zwischen 40 und 600 Da.

4.5.3 TG und TG-APPI-qMS-Analyse

Zur Charakterisierung der beiden kommerziellen PDMS-Sorptionsfilme wurde eine thermische Analyse von Proben der Sorptionsfilme mittels Thermogravimetrie (TG) sowie einer Kopplung der TG mit einem qMS und einer Atmosphärendruck-Photoionisations-Ionenquelle (TG-APPI-qMS) durchgeführt. Die in diesen Experimenten verwendete instrumentelle Kopplung der TG mit dem APPI-qMS, wurde von Brecht et al. [127] entwickelt. Die genaue Geräteausstattung ist dem Kapitel 4.2.3 zu entnehmen.

Für jede thermische Analyse mittels TG und TG-APPI-qMS wurden 5 mg schwere Probenstücke der kommerziellen Sorptionsfilme verwendet. Es wurden pro Sorptionsfilm verschiedene Bereiche des Filmes beprobt, so dass je Sorptionsfilm drei Analysen durchgeführt worden sind.

Zur TG-Analyse wurden die Proben in einem Keramiktiegel mit einer Temperaturrate von 10 °C·min⁻¹ von 30 °C auf 900 °C erhitzt. Die Analyse erfolgte durch die Aufzeichnung des Masseverlustes gegen einen Referenztiegel, welcher ebenfalls aus

Keramik bestand. Die Verbrennung im TG Ofen erfolgte in einer Stickstoffatmosphäre, wobei ein Stickstoffstrom von $200 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ angelegt worden ist.

Die massenspektrometrische Untersuchung der mittels der TG in die Gasphase überführten Substanzen erfolgte mit den gleichen TG-Parametern. Von den $200 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ Stickstoff wurden $11 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ über eine auf $325 \text{ }^\circ\text{C}$ beheizte Transferline in das qMS überführt, während die verbleibenden $189 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ über den Splitausgang des TG Systems entfernt worden sind. Die Ionisation erfolgte in einer geschlossenen APPI Quelle mit Hilfe einer Vakuum-Ultraviolet (VUV)-Kryptonlampe. Mit Photonen einer Wellenlänge von 117 und 124 nm erfolgte die Ionisation der gasförmigen Analyten. Ein zusätzlicher Stickstofffluss von $450 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ wurde an die Ionenquelle angelegt. Alle Gasflüsse wurden mittels eines *Mass Flow Controller* (Bronkhorst High-Tech B.V., Ruurlo, Niederlande) eingestellt. Dies hat eine Verbesserung des Transfers der Analytionen von der Ionenquelle in das qMS zur Folge. Die Analyse erfolgte mit einer angelegten Spannung von 40 V bzw. 20 V an den *Skimmern* AP1 bzw. AP2 sowie einem Scanbereich von 50 – 700 Da und einer *dwell time* von 2000 ms. Die Temperatur des ersten *Skimmers* AP1 betrug $120 \text{ }^\circ\text{C}$ und die der Ionenquelle $250 \text{ }^\circ\text{C}$.

Zusätzlich zu der Analyse der Filme, wurde zur Verifizierung der Ionisation von zyklischen Siloxanen, Messungen von flüssigen Standards durchgeführt (vgl. Kapitel 4.3.2). Hierzu wurde ein Mikroliter des jeweiligen Standards in einen Aluminiumtiegel gegeben und anschließend von $50 \text{ }^\circ\text{C}$ auf $500 \text{ }^\circ\text{C}$ mit einer Temperaturrate von $150 \text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ erhitzt. Abweichend von den beschriebenen Einstellungen zur Analyse der Sorptionsfilme wurde eine Spannung von 90 V bzw. 10 V an den *Skimmern* AP1 bzw. AP2 angelegt. Die weiteren Ionenquellen und MS spezifischen Parameter wurden nicht verändert.

4.6 Prozess zur Auswertung und statistischen Analyse der TD-GC-qMS Daten

Zur Charakterisierung des extrazellulären volatilen Metaboloms von *P. aeruginosa* Stämmen in Kapitel 5.3, wurde der im Folgenden beschriebene Prozess zur Auswertung der erhaltenen Daten sowie zur multivariaten und statistischen Datenanalyse angewendet.

Material und Methoden

Die aus den TD-GC-qMS Analysen erhaltenen Daten, im Agilent MSD Chemstation Datenformat, wurden zunächst mittels der Software MassHunter GC/MS Translator (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, USA) in das Agilent MassHunter Datenformat transformiert. Anschließend erfolgte eine Umwandlung in das Datenformat „.abf“ mit Hilfe der Software Reifycs Analysis Base File Converter (Reifycs Inc., Tokio, Japan). Dies ermöglicht eine Featureanalyse mittels MS-DIAL (Version 4.18, RIKEN, Wako, Japan), welches eine Dekonvolution und Annotierung der Daten durchführt. Für die Featureanalyse wurden die in Tabelle 2 aufgeführten Parameter angewendet.

Tabelle 2: Übersicht über die verwendeten Parameter für die Featureanalyse, Dekonvolution und Zuordnung („identification“) mit Hilfe der Software MS-DIAL.

<i>Parameter</i>	<i>Value</i>
Data collection	
<i>Retention time [min]</i>	0 – 44
<i>Mass range [Da]</i>	40 – 700
Peak detection	
<i>Smoothing method</i>	<i>Savitzky Golay Filter</i>
<i>Smoothing level [scan]</i>	3
<i>Average peak width [scan]</i>	20
<i>Minimum peak height [amplitude]</i>	100
<i>Mass slice width [Da]</i>	0.5
<i>Mass accuracy [Da]</i>	0.5
MS detection parameters	
<i>Sigma window</i>	0.5
<i>Amplitude cut off</i>	10

Fortsetzung von Tabelle 2: Übersicht über die verwendeten Parameter für die Featureanalyse, Dekonvolierung und Zuordnung („identification“) mit Hilfe der Software MS-DIAL.

Identification

<i>Retention time tolerance [min]</i>	0.5
<i>EI similarity library tolerance [%]</i>	30
<i>Identification score cut off [%]</i>	30

Alignment parameters

<i>Retention time tolerance [min]</i>	0.075
<i>EI similarity tolerance [%]</i>	30
<i>Retention time factor</i>	0.5
<i>EI similarity factor</i>	0.5

Filtering setting

<i>Peak count filter [%]</i>	0
------------------------------	---

Die multivariate Datenanalyse der erhaltenen Features erfolgte mit der Software *SIMCA* (Version.: 16.0.2.10561; Sartorius AG, Göttingen, Deutschland). Vorher wurden die Features manuell hinsichtlich der maximalen Signalintensität sowie der Übereinstimmungswahrscheinlichkeit der zugeordneten Metabolite mit der EI-MS Datenbank gefiltert. Es wurden ausschließlich Features verwendet, welche eine maximale Signalintensität von mindestens $1 \cdot 10^3$ counts und eine Übereinstimmungswahrscheinlichkeit von 70% oder mehr aufwiesen. Mit der Software *SIMCA* wurde mit diesen Daten eine Hauptkomponentenanalyse (engl.: *principle component analysis*; PCA) durchgeführt und sowohl *scores* und *loadings* ermittelt als auch die Varianz berechnet.

Die statistische Signifikanzanalyse wurde mit einem t-Test durchgeführt, wobei eine zweiseitige, heteroskedastische Verteilung der Daten angenommen worden ist. Für die statistische Signifikanzanalyse wurden ausschließlich Features verwendet, welche eine Übereinstimmungswahrscheinlichkeit mit der EI-MS Datenbank von 80% oder mehr aufwiesen.

Material und Methoden

Diese Auswahl wurde getroffen, da ab einer Übereinstimmungswahrscheinlichkeit von 80% mit ausreichender Sicherheit eine Zuordnung durchgeführt werden kann. Die Signifikanz wurde anhand des p-Wertes evaluiert und in die drei Signifikanzlevel, 0,001, 0,01 und 0,05, eingeordnet.

5 Ergebnisse und Diskussion

5.1 Entwicklung und Etablierung eines *in vitro* Biofilmmodell mit einem Vollmedium

Høiby et al. [5] haben nachgewiesen, dass *P. aeruginosa* in der Lunge von CF-Patienten als Biofilm im Mukus die Atemwege kolonisiert, weswegen bei mikrobiologischen *in vitro* Studien zur CF-Erkrankung Bakterien in Form von Biofilmen kultiviert werden sollten. Die Wachstumsbedingungen (planktonisch oder Biofilm) haben einen Einfluss auf viele der Omics Felder. Whiteley et al. [132] haben bereits im Jahr 2001 eine Studie zur Varianz des Genoms von *P. aeruginosa* durch eine Veränderung des Wachstumsmodus veröffentlicht. Die Autoren konnten in dieser Studie deutliche Unterschiede im Genom des Bakteriums feststellen. Allerdings konnten Unterschiede lediglich bei 1% der Gene festgestellt werden, so dass ein Einfluss zwar zu beobachten war, dieser aber nur sehr gering ist [132]. Ebenfalls ist ein Einfluss des Wachstumsmodus auf das Proteom von *P. aeruginosa* von Park et al. [133] nachgewiesen worden. Park et al. haben das Proteom von *P. aeruginosa* PAO1 bei den beiden Wachstumsmodi mittels LC-MS/MS analysiert und konnten 163 segregierte Proteine identifizieren. 68 dieser segregierten Proteine wurden ausschließlich bei einem planktonischen und 58 Proteine ausschließlich bei einem Biofilmwachstum gefunden werden [133]. Neben dem Genom und dem Proteom wurde von Gjersing et al. [134] auch ein Einfluss des Wachstumsmodus auf das Metabolom von *P. aeruginosa* PAO1 nachgewiesen. Das Metabolom haben die Autoren mittels ¹H-NMR bestimmt und konnten durch eine PCA die beiden Wachstumsmodi voneinander unterscheiden [134]. Diese Studien zeigen, dass Ergebnisse von Studien zu *P. aeruginosa* nur dann Rückschlüsse auf die CF-Erkrankung zulassen, wenn das Bakterium als Biofilm angezüchtet wird. Basierend auf diesen Erkenntnissen soll in diesem Kapitel die Entwicklung und Etablierung eines *in vitro* Modells zur Anzucht und Kultivierung von Biofilmen des Bakteriums *P. aeruginosa* für die Metabolomanalyse im Kontext der Atemwegsinfektion bei der CF-Erkrankung erfolgen. Das *in vitro* Biofilmmodell soll die reproduzierbare Kultivierung von bakteriellen Biofilmen und Analyse von extrazellulären volatilen Metaboliten des Bakteriums *P. aeruginosa* unter Bedingungen, welche die Bedingungen der Lunge eines CF-Patienten simulieren, ermöglichen. Das

Ergebnisse und Diskussion

Modellsystem soll mit Hilfe der Kultivierung des Referenzstammes *P. aeruginosa* ATCC 10145 auf einem Vollmedium (LB-Agar) entwickelt werden.

Damit belastbare und für zukünftige *in vivo* CF-Studien anwendbare Metabolomanalysen von *P. aeruginosa* durchgeführt werden können, muss eine Kultivierung sowohl unter aeroben als auch unter anaeroben Bedingungen durchführbar sein (vgl. Kapitel 2.1 und 2.2). Des Weiteren ist für die reproduzierbare Kultivierung, welche für eine reproduzierbare Analytik grundlegend ist, das Wachstum eines konfluenten und homogenen Biofilmes mit ausreichender Zelldichte (Gesamtzellzahl) notwendig. Damit dieses gewährleistet werden kann, wurde das in der Abbildung 1 gezeigte *in vitro* Biofilmmodell verwendet.

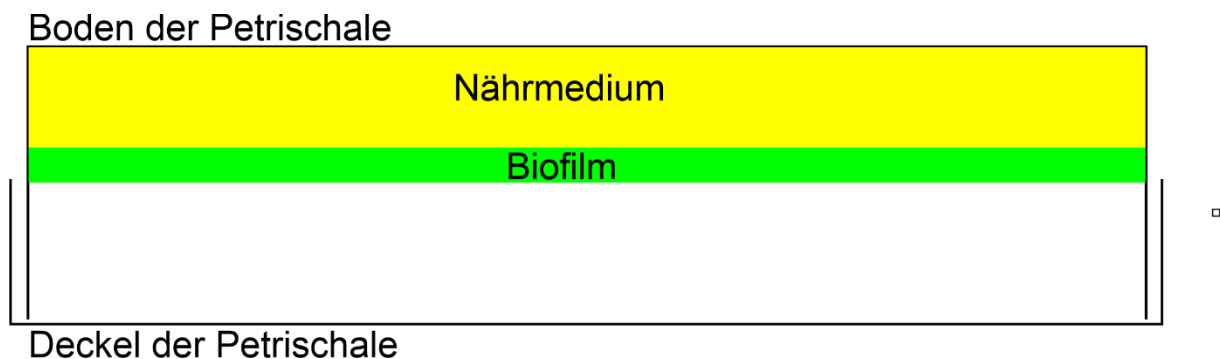


Abbildung 1: Schematische Darstellung des *in vitro* Biofilmmodells zur Kultivierung bakterieller Biofilme unter adaptierten Bedingungen einer CF-Lunge. In der Darstellung sind die Bestandteile des Modells, mit einer Petrischale aus Glas, in der sich das feste Agar-Nährmedium sowie der Biofilm befinden, gezeigt. Die Darstellung entspricht der Orientierung der Petrischale (Boden: oben; Deckel: unten) während der Kultivierung im Brutschrank. Graphik adaptiert von Koehler et al. [135].

Für das gezeigte Modellsystem wurde eine Petrischale aus Glas mit einem Durchmesser von 10 cm verwendet. Die Bakterien wurden unter aeroben oder anaeroben Bedingungen auf der Oberfläche des festen Agar-Nährmediums als flächendeckender (konfluenter) Bewuchs angezüchtet, der einen ungesättigten Biofilm an der Grenzfläche zum umgebenden Gasraum darstellte. Zur Kultivierung unter aeroben Bedingungen wurde das Modellsystem ohne weitere Behandlung in den Brutschrank gestellt. Die Kultivierung unter anaeroben Bedingungen konnte mit diesem System ebenfalls einfach realisiert werden. Hierzu wurde das Modellsystem in das geschlossene Anaerobsystem der Firma Merck KGaA gestellt (vgl. Kapitel 4.1.3). In diesem System wird der Luftsauerstoff mit Hilfe eines Katalysators zu Kohlenstoffdioxid umgesetzt, so dass nach 60 min eine anaerobe Atmosphäre in dem Anaerobsystem vorherrscht. Die Bildung dieser Atmosphäre ist nur erfolgreich, wenn

Ergebnisse und Diskussion

das Anaerobsystem ausreichend abgedichtet worden ist. Zur Überprüfung der anaeroben Atmosphäre wird in jedem Anaerobsystem zuvor ein Teststreifen gegeben. Die Bildung der anaeroben Atmosphäre wird visuell durch diesen Teststreifen angezeigt und wurde für jede Kultivierung in diesem System überprüft.

Voraussetzung für die Anwendbarkeit des *in vitro* Biofilmmodells für die Forschungsfragen dieser Arbeit ist, dass auch unter anaeroben Bedingungen ein konfluenter und homogener Biofilm entsteht. Für die anaerobe Kultivierung wurde dem Vollmedium zusätzlich Kaliumnitrat zugegeben (LBN-Agar). *P. aeruginosa* ist ein Bakterium, welches eine hohe Adaptivität hinsichtlich verschiedener exogener Einflüsse aufweist (hohe Anpassungsfähigkeit an variierende Umwelteinflüsse) [1]. Dementsprechend kann dieses Bakterium sowohl unter aeroben als auch unter anaeroben Bedingungen wachsen. *P. aeruginosa* kann zum einen durch die Phosphorylierung von Arginin unter anaeroben Bedingungen wachsen. Das Wachstum mit dieser Methode ist allerdings sehr langsam, so dass die anaerobe Atmung, falls möglich, über die Denitrifikation von terminalen Elektronenakzeptoren erfolgt. Ein solcher anorganischer, terminaler Elektronenakzeptor ist zum Beispiel, das in dieser Arbeit verwendete, Kaliumnitrat [30,85]. Sowohl das konfluente und homogene Biofilmwachstum als auch die Kultivierung unter anaeroben Bedingungen wurde durch die Analyse der gewachsenen Biofilme mittels der Bestimmung der Gesamtzellzahl begutachtet. Es wurden Inokulationskonzentrationen von 10^4 , 10^5 und 10^6 Zellen·cm⁻² auf das Nährmedium gegeben. Die Bestimmung der Gesamtzellzahl erfolgte mit Hilfe der Methode der Färbung mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI-Färbung) und anschließender Auszählung unter Verwendung eines Epifluoreszenzmikroskops. Die Gesamtzellzahl ist die Zahl aller Bakterienzellen, welche noch eine intakte DNA enthalten. Dies sind hauptsächlich lebende Bakterienzellen, allerdings können auch tote Bakterienzellen eventuell DNA enthalten.

Die Anpassung der Kultivierungsparameter im Modellsystem wurde zunächst mit Hilfe des Referenzstammes *P. aeruginosa* ATCC 10145 unter Verwendung des LB-Agar-Nährmediums untersucht. Im Anschluss daran erfolgt die Validierung der Optimierung mittels Kultivierung von den beiden klinischen Isolaten *P. aeruginosa* PAO1 und FRD1. In Abbildung 2 sind die mit DAPI gefärbten Bakterienzellen von *P. aeruginosa* ATCC 10145 als photographische Aufnahme des Epifluoreszenzmikroskops für alle verwendeten Inokulationskonzentrationen sowie den beiden untersuchten

Ergebnisse und Diskussion

Kultivierungsbedingungen (Abbildung 2 a – c: aerob und Abbildung 2 d – f: anaerob) dargestellt.

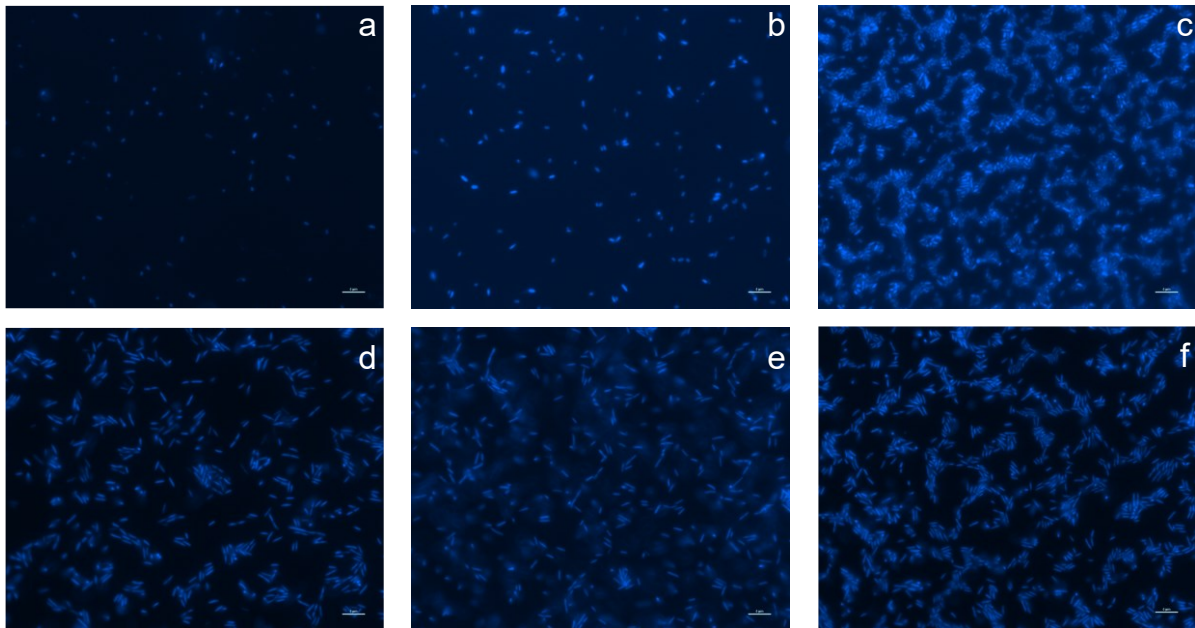


Abbildung 2: Fotografische Aufnahmen der mit DAPI angefärbten Bakterienzellen von *P. aeruginosa* ATCC 10145 im Epifluoreszenzmikroskop. Die Fotografien a – c zeigen die Bakterienzellen, welche unter aeroben und die Fotografien d – f die Bakterienzellen die unter anaeroben Bedingungen bei 37 °C für 2 Tage auf LB-Agar kultiviert worden sind. Bei den Bildern a und d wurde eine Inokulationskonzentration von 10^4 Zellen-Platte⁻¹, bei b und e von 10^5 Zellen-Platte⁻¹ und bei c und f von 10^6 Zellen-Platte⁻¹ verwendet.

Die Bildaufnahmen zeigen unterschiedliche Ausprägungen der Bildung von Zellaggregaten bei den unterschiedlichen Kultivierungsbedingungen sowie den verschiedenen Inokulationskonzentrationen. Visuell ist zu beobachten, dass bei der anaeroben Kultivierung bereits bei einer Inokulationskonzentration von 10^5 Zellen·cm⁻² ein geringer Grad der Aggregation vorhanden ist. Eine Änderung des Grades der Aggregation ist mit steigender Inokulationskonzentration kaum zu beobachten. Im Gegensatz dazu ist bei der aeroben Kultivierung eine Zunahme der Zelldichte sowie der Aggregation mit steigender Inokulationskonzentration qualitativ zu beobachten.

Mit Hilfe der Gesamtzellzahl soll eine quantitative Evaluation des Versuches zur Variation der Inokulationskonzentration durchgeführt werden. Die Gesamtzellzahl wurde durch Auszählen unter zur Hilfenahme der DAPI-Färbung ermittelt und die Ergebnisse für alle verwendeten Bakterienstämme sowie für die aeroben als auch die anaeroben Kultivierungsbedingungen sind in Abbildung 3 in Form von Balkendiagrammen dargestellt.

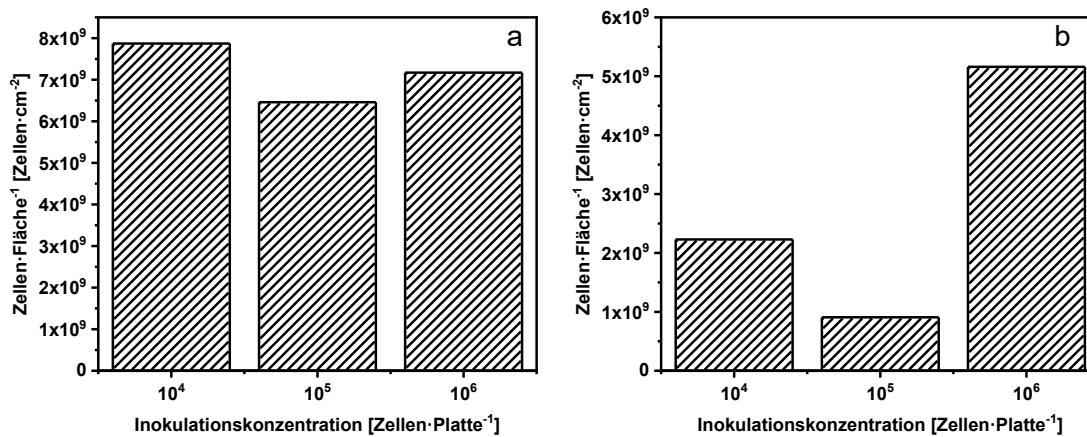


Abbildung 3: Ergebnisse der Gesamtzellzahlbestimmung mittels DAPI-Färbung und Auszählung im Epifluoreszenzmikroskop für die aerobe (Abb. a) und anaerobe (Abb. b) Kultivierung von *P. aeruginosa* ATCC 10145 im in vitro Biofilmodell. Bei diesem Experiment wurde die Inokulationskonzentration variiert. Es wurden Inokulationskonzentrationen von 10^4 , 10^5 und 10^6 Zellen·Platte⁻¹ verwendet.

Die ermittelten Gesamtzellzahlen weisen eine hohe Varianz zwischen den Bakterienstämmen sowie zwischen den beiden gewählten Kultivierungsbedingungen (aerob vs. anaerob) auf. Der Unterschied zwischen den Bakterienstämmen innerhalb einer Kultivierungsbedingung ist möglicherweise auf phänotypspezifische Effekte zurückzuführen, wobei die Varianz bei der anaeroben Kultivierung deutlich größer ist als bei der aeroben Kultivierung. Die zunächst abfallende und dann ansteigende Gesamtzellzahl bei der anaeroben Kultivierung könnte mit einer Beprobung zu Beginn der stationären Wachstumsphase begründet sein. Zu Beginn der stationären Phase, in dem die Absterberate und die Bildungsrate von Bakterienzellen in einem dynamischen Gleichgewicht sind, können größere Schwankungen der Gesamtzellzahl vorkommen. Aufgrund von unterschiedlichen Wachstumsraten der verschiedenen Bakterienstämme sowie bei den beiden Kultivierungsbedingungen und leichten Abweichungen des Probenahmezeitpunkts könnte eine solche Varianz in der Gesamtzellzahl begründet werden. Die minimale, ermittelte Gesamtzellzahl lag bei $9,08 \cdot 10^8$ Zellen·cm⁻². Somit sind nach Griebe und Flemming [136] bei allen Inokulationskonzentrationen sowie Bakterienstämmen und Kultivierungsbedingungen „multilayer Biofilme“ entstanden. „Multilayer Biofilme“ werden Biofilme mit einer Gesamtzellzahl von größer als $1 \cdot 10^8$ Zellen·cm⁻² genannt. Bei diesen sind die Bakterien in den Biofilmen dreidimensional gewachsen [136].

Ergebnisse und Diskussion

Unter Berücksichtigung des Zieles der Entwicklung einer Kultivierungsmethode, welche universell zur Kultivierung von Biofilmen des Bakteriums *P. aeruginosa* unter CF-ähnlichen Bedingungen angewendet werden kann, sowie der zuvor erläuterten Ergebnisse, wurde eine Inokulationskonzentration von 10^5 Zellen·cm⁻² für die standardmäßige Kultivierungsmethode festgelegt.

Weiterhin musste die Kultivierungsdauer festgelegt werden, was durch die experimentelle Aufnahme von Wachstumskurven des bakteriellen Wachstums der Bakterienstämme *P. aeruginosa* ATCC 10145, PAO1 und FRD1 erfolgte. Ziel war die Wahl einer Kultivierungsdauer, welche innerhalb der stationären Wachstumsphase aller Bakterienstämme liegt. Die stationäre Phase wurde bei der Entwicklung der Kultivierungsmethodik als Zielphase ausgewählt da vermutet wird, dass sich die Bakterien im Sputum von CF-Patienten vorwiegend nicht mehr im Wachstum befinden. Dies entspricht typischerweise der stationären Wachstumsphase bei Laborkulturen. Zur Aufnahme der Wachstumskurven bei 37 °C über einen Kultivierungszeitraum von sieben Tagen wurden für beide Kultivierungsbedingungen (aerob und anaerob) sieben Ansätze im *in vitro* Biofilmmodell parallel kultiviert. Die Beprobung erfolgte jeweils 24 h nach der vorherigen Beprobung bzw. der Inokulation. Je Kultivierungsdauer und Kultivierungsbedingung wurden drei Biofilme von *P. aeruginosa* ATCC 10145 angezüchtet. Zur Bestimmung der Gesamtzellzahl wurden die Massen von drei Biofilmen einer Kultivierungsdauer vereinigt. Die dadurch erhaltene Gesamtzellzahl entspricht somit dem Mittelwert aus drei Ansätzen. In Abbildung 4 sind die Wachstumskurven für *P. aeruginosa* ATCC 10145 unter aeroben und anaeroben Kultivierungsbedingungen gezeigt. Hierzu wurde die ermittelte Gesamtzellzahl logarithmisch gegen die Kultivierungsdauer aufgetragen.

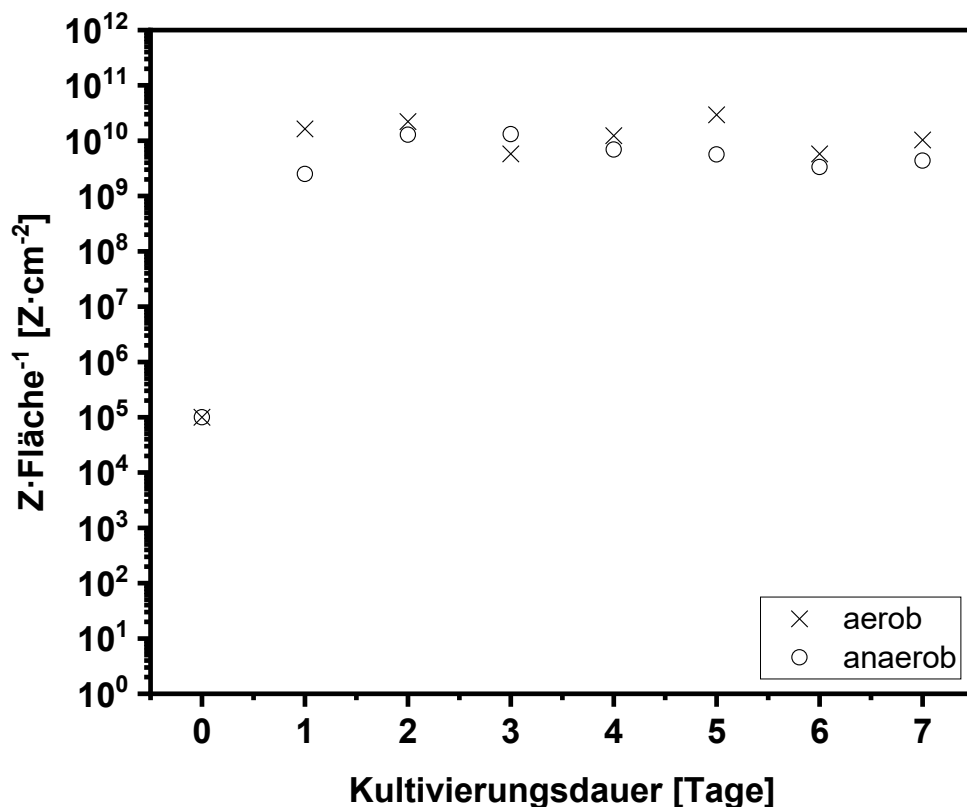


Abbildung 4: Graphische Darstellung der experimentell bestimmten Wachstumskurven unter aeroben („x“) und anaeroben („o“) Kultivierungsbedingungen. Die Wachstumskurven von *P. aeruginosa* ATCC 10145 wurde in einem Zeitraum von sieben Tage aufgenommen, wobei alle 24 h eine Beprobung stattfand. Hierzu wurden sieben Kultivierungsansätze je Kultivierungsbedingung im in vitro Biofilmmmodell angezchtet. Zur graphischen Darstellung der Wachstumskurve wurde die ermittelte Gesamtzellzahl logarithmisch gegen die Kultivierungsdauer aufgetragen.

Die Wachstumskurven unter aeroben und anaeroben Bedingungen unterscheiden sich nur geringfügig. Der größte Unterschied zwischen den beiden Kultivierungsbedingungen ist nach einem Tag Kultivierung, mit einer Differenz von ungefähr einer Zehnerpotenz, zu beobachten. Dies könnte auf ein geringfügig langsames Wachstum von *P. aeruginosa* ATCC 10145 unter anaeroben Kultivierungsbedingungen hindeuten. Anschließend fluktuieren die Gesamtzellzahlen für eine Kultivierung unter aeroben als auch unter anaeroben um einen Wert von ca. $1 \cdot 10^{10}$ Zellen·cm⁻². Anhand dieser Daten ist ersichtlich, dass das Bakterium unter beiden Bedingungen sehr schnell wächst. Nach einer Kultivierungsdauer von 24 h befindet sich das Wachstum der Bakterien am Ende der log-Phase. Die stationäre Wachstumsphase bei beiden Kultivierungsbedingungen (aerob und anaerob) ist nach 48 h erreicht. Des Weiteren bildet sich bereits nach einem Tag Kultivierung ein

Ergebnisse und Diskussion

„multilayer Biofilm“ [136]. Das schnelle Wachstum sowie die schnelle Ausbildung eines „multilayer Biofilms“ [136] könnte auf das Nährmedium zurückgeführt werden. Im LB- bzw. LBN-Agar sind die notwendigen Nährstoffe im Überschuss vorhanden, so dass ein relativ schnelles Wachstum und hohe maximale Zelldichten der Biofilme erreicht wurden. Basierend auf den Wachstumskurven wurde für die standardmäßige Kultivierungsmethodik für Biofilme im Kontext von Atemwegsinfektionen bei der CF-Erkrankung ein Kultivierungszeitraum von 48 h bei 37 °C ausgewählt, so dass sich die Bakterien unter beiden Kultivierungsbedingungen in der stationären Wachstumsphase befinden.

Zusammenfassend wurde somit ein *in vitro* Biofilmmodell entwickelt, mit dessen Hilfe eine Kultivierung von Biofilmen des Bakteriums *P. aeruginosa* unter CF-ähnlichen Bedingungen möglich ist. Hierfür ist eine 48-stündige Kultivierung mit einer Inokulationskonzentration von 10^5 Zellen·cm⁻² notwendig. In Abbildung 5 sind Bilder der nach dieser Methodik kultivierten Biofilme von *P. aeruginosa* ATCC 10145 unter aeroben und anaeroben Bedingungen gezeigt.

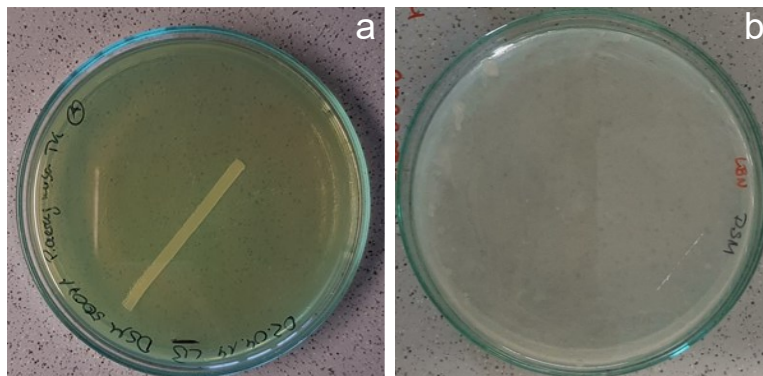


Abbildung 5: Photographische Aufnahme von Biofilmen des Bakteriums *P. aeruginosa* ATCC 10145, welche im *in vitro* Biofilmmodell mit der entwickelten Methode kultiviert worden sind. Die Abbildung a zeigt den Biofilm nach 48 h Kultivierung bei 37 °C auf LB-Agar unter aeroben Bedingungen und die Abbildung b für die 48-stündige Kultivierung bei 37 °C auf LBN-Agar unter anaeroben Bedingungen.

Anhand der photographischen Aufnahmen ist ersichtlich, dass mit den optimierten Parametern sowohl unter aeroben als auch unter anaeroben Bedingungen eine Kultivierung von konfluenten und homogenen Biofilmen möglich ist. Weiterhin ist zu beobachten, dass bei der Kultivierung unter anaeroben Bedingungen keine Pigmentierung des Biofilmes auftritt, wohingegen unter aeroben Kultivierungsbedingungen ein grünlicher Biofilm (Abbildung 5 a) entsteht. Die grünliche Färbung des Biofilmes geht auf die Bildung von verschiedenen Farbpigmenten wie

Ergebnisse und Diskussion

z.B. Pyocyanin [68,137] und Pyoverdine [68,100,138] zurück. Der blau-grüne Farbstoff Pyocyanin ist ein Virulenzfaktor des Bakteriums *P. aeruginosa*. Diederich et al. [137] vermuten, dass Pyocyanin zur Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies benötigt wird. Pyoverdine sind Siderophore und weisen eine gelb-grüne Färbung auf. Hauptsächlich sind Pyoverdine für den Eisentransport bei Pseudomonaden verantwortlich. Produziert werden Pyoverdine hauptsächlich von den sogenannten fluoreszierenden Pseudomonas Arten [138,139]. Die fehlende Pigmentierung des Biofilmes bei der anaeroben Kultivierung deutet darauf hin, dass die Produktionswege der Pigmente, wie z.B. des Pyocyanins und der Pyoverdine, gehemmt sind. Zum Beispiel könnten Gene, welche für die Biosynthese der Pigmente verantwortlich sind, nicht exprimiert werden. Außerdem ist eine Hemmung der Biosynthese dieser Pigmente denkbar. Des Weiteren könnten notwendige Stoffwechselprodukte, welche als Edukte zur Bildung der Pigmente dienen, aufgrund der veränderten Energiegewinnung, mittels terminaler Elektronenakzeptoren, nicht zur Verfügung stehen. Die Konsequenz hieraus ist die ausbleibende Färbung des Biofilms.

Die Anwendbarkeit der Kultivierungsmethode auf klinische sowie CF-relevante Stämme des Bakteriums *P. aeruginosa* wurde mittels der Bakterienstämme *P. aeruginosa* PAO1 und FRD1 getestet. Vor allem der mukoide Stamm *P. aeruginosa* FRD1 ist für Atemwegsinfektionen bei der CF-Erkrankung von Relevanz, da dieser ein CF-Lungenisolat ist. Zur Validierung der Methode, wurden die beiden Stämme mit der entwickelten Methode, im *in vitro* Biofilmmodell unter aeroben und anaeroben Bedingungen kultiviert. Die angezüchteten Biofilme für beide Bakterienstämme sowie beiden Kultivierungsbedingungen sind in Abbildung 6 als photographische Aufnahme gezeigt.

Ergebnisse und Diskussion

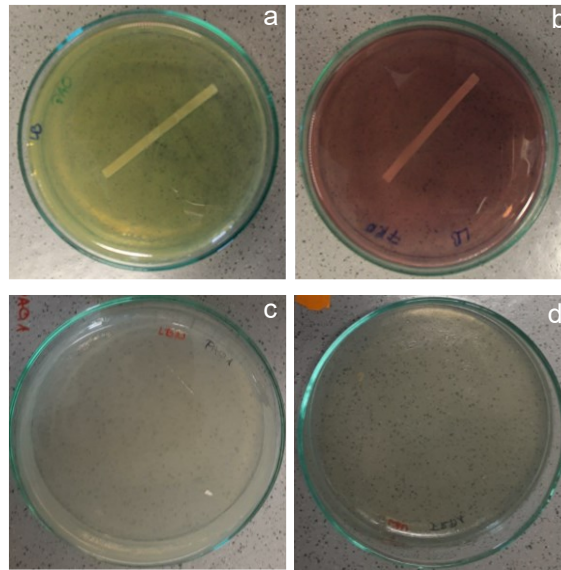


Abbildung 6: Photographische Aufnahme von Biofilmen der Bakterienstämme *P. aeruginosa* PAO1 (Abb. a und c) und FRD1 (Abb. b und d), welche im *in vitro* Biofilmmodell mit der entwickelten Methode kultiviert worden sind. Die Abbildungen a und b zeigen den jeweiligen Biofilm des entsprechenden Stammes nach 48 h Kultivierung bei 37 °C auf LB-Agar unter aeroben Bedingungen und die Abbildungen c und d für die 48-stündige Kultivierung bei 37 °C auf LBN-Agar unter anaeroben Bedingungen.

Die Kultivierung von homogenen und konfluenten Biofilmen im *in vitro* Biofilmmodell konnten mit den optimierten Kultivierungsparametern ebenfalls für die Stämme *P. aeruginosa* PAO1 und FRD1 erfolgreich durchgeführt werden (Abbildung 6). Ein Vergleich der Biofilme von den drei verschiedenen Bakterienstämmen unter aeroben Bedingungen zeigt, dass die Färbung des Biofilmes abhängig von dem Bakterienstamm ist. Feuerpfeil et al. [68] haben die Bildung verschiedener Pigmente von unterschiedlichen *P. aeruginosa* Stämmen beschrieben. Die gelbe Farbe des Biofilmes von *P. aeruginosa* PAO1 könnte somit mit einer erhöhten Produktion von Pyoverdinen und die rötliche Färbung von *P. aeruginosa* FRD1 mit einer erhöhten Konzentration an Pyorubin korrelieren [68]. Im Vergleich zwischen den aeroben und anaeroben Kulturen der beiden klinischen Stämme ist analog zu den Kulturen des Referenzstammes eine Entfärbung des Biofilmes unter anaeroben Bedingungen zu beobachten. Dies könnte, analog zur anaeroben Kultivierung von *P. aeruginosa* ATCC 10145, auf eine Hemmung des Produktionsweges oder der ausbleibenden Produktion von Edukten aufgrund der veränderten Energiegewinnung zurückzuführen sein. Trotzdem ist ein Biofilmwachstum bei beiden Stämmen unter anaeroben Kultivierungsbedingungen zu beobachten.

Ergebnisse und Diskussion

Zur quantitativen Evaluation der Kultivierung wurde die Gesamtzellzahl bestimmt. Die Gesamtzellzahl wurde wiederum mittels der DAPI-Färbung bestimmt. Die epifluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der beiden Bakterienstämme bei beiden Kultivierungsbedingungen sind in der Abbildung 7 gezeigt.

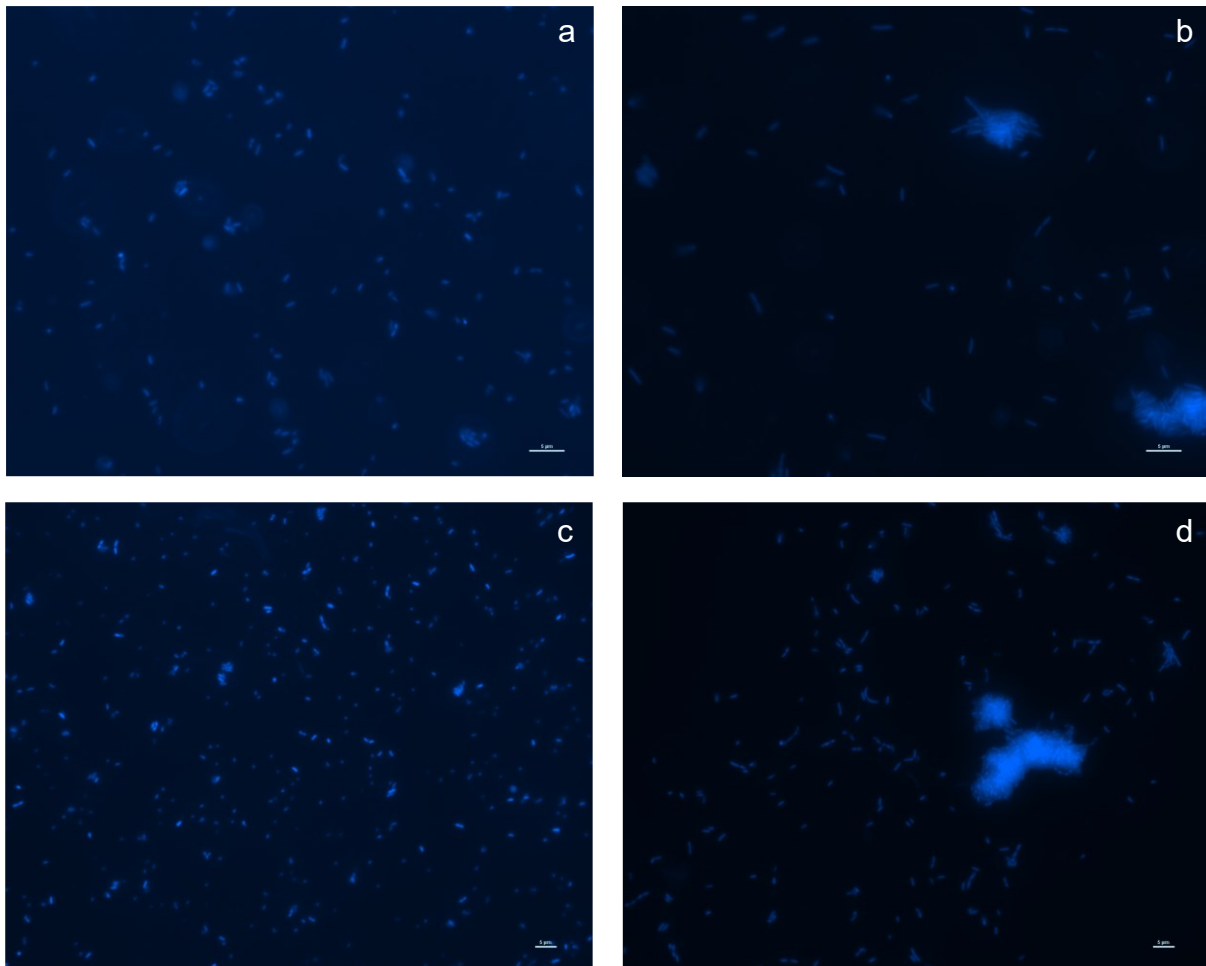


Abbildung 7: Übersicht über die epifluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der mit DAPI angefärbten Bakterienzellen von *P. aeruginosa* PAO1 (Abb. a und b) und FRD1 (Abb. c und d) mit einer Inokulationskonzentration von 10^7 Zellen-Platte⁻¹. Die Abbildungen a und c zeigen die Kultivierung des jeweiligen Bakterienstammes bei 37 °C auf LB-Agar unter aeroben Bedingungen und die Abbildungen b und d bei 37 °C auf LBN-Agar unter anaeroben Bedingungen.

Die epifluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen zeigen, dass analog zur Kultivierung von *P. aeruginosa* ATCC 10145 (Abbildung 2) eine Aggregation der Bakterienzellen unter anaeroben Bedingungen zu erkennen ist. Eine Aggregation der Bakterienzellen ist ebenfalls bei *P. aeruginosa* FRD1 zu beobachten. Im Vergleich der drei untersuchten Stämme ist zu erkennen, dass bei den Stämmen *P. aeruginosa* FRD1 und PAO1 (Abbildung 7 b und d) größere Zellaggregate gebildet werden, wohingegen bei dem Stamm *P. aeruginosa* ATCC 10145 kleinere, aber dafür in der Anzahl mehr

Ergebnisse und Diskussion

Aggregate entstehen (Abbildung 2 b). Yoon et al. [140] haben in Ihrer Publikation zu Studien an planktonischen Bakterienzellen von *P. aeruginosa* PAO1 ebenfalls unter anaeroben Bedingungen Zellaggregate beobachtet. Die Autoren stellten auf Basis weitergehender Untersuchungen der Bakterienzellen die Hypothese auf, dass die Verklumpung durch eine Elongation der Bakterienzellen induziert wird. Die Elongation soll, nach der Auffassung von Yoon et al., eine Veränderung der Zusammensetzung der äußeren Zellmembran hervorrufen. Hierdurch könnte es zu einer Veränderung der hydrophilen und hydrophoben Eigenschaften der Membran kommen, welche wiederum eine Zell-Zell Aggregation begünstigt. Die Aggregation der Bakterienzellen kann zu einer verbesserten Bildung von Biofilmen an Oberflächen führen. Weiterhin kann die Aggregation vorteilhaft bzgl. des Schutzes vor ungünstigen Umgebungsbedingungen, z.B. oxidativen Stress, sauerstoffarmen Atmosphären, etc., sein. Eine solche Aggregation der Bakterienzellen unter anaeroben Bedingungen konnte auch bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimenten zum Biofilmwachstum der Bakterienstämme *P. aeruginosa* ATCC 10145, PAO1 und FRD1 beobachtet werden. Zur quantitativen Evaluation der Elongation wurde die Länge der Bakterienzellen mittels epifluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen, welche für die Kultivierung aller drei untersuchten Bakterienstämme unter aeroben und anaeroben Kultivierungsbedingungen in Abbildung 8 gezeigt sind, bestimmt.

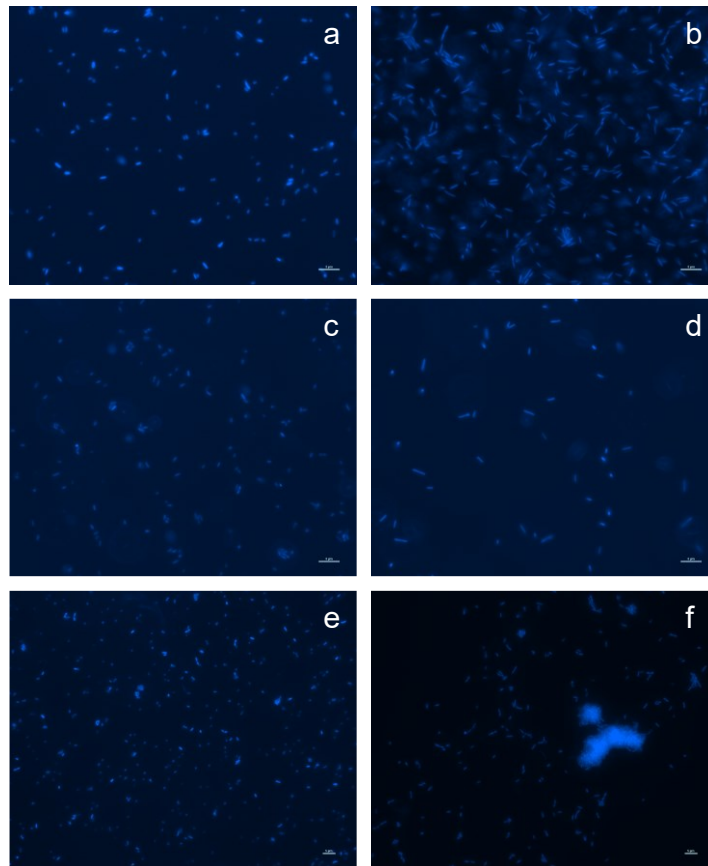


Abbildung 8: Epifluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der mit DAPI angefärbten Bakterienzellen von *P. aeruginosa* ATCC 10145 (Abb. a und b) PAO1 (Abb. c und d) und FRD1 (Abb. e und f) mit einer Inokulationskonzentration von 10^7 Zellen·Platte⁻¹ unter aeroben (linke Spalte) und anaeroben (rechte Spalte) Kultivierungsbedingungen zur Bestimmung der mittleren Zelllänge. Die Kultivierung erfolgte für 48 h bei 37 °C auf LB- bzw. LBN-Agar.

Abbildung 8 zeigt die epifluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der mit DAPI angefärbten Bakterienzellen bei einer Inokulationskonzentration von 10^7 Zellen·Platte⁻¹ unter aeroben (Abbildung 8 a, c, e) und anaeroben (Abbildung 8 b, d, f) Kultivierungsbedingungen für die Bakterienstämme *P. aeruginosa* ATCC 10145 (Abbildung 8 a, b), PAO1 (Abbildung 8 c, d) und FRD1 (Abbildung 8 e, f). Zur Ermittlung der mittleren Zelllänge wurden aus den in Abbildung 8 gezeigten Ausschnitten je Bakterienstamm und Kultivierungsbedingung (aerob und anaerob) die Zelllänge von zehn Bakterien bestimmt. In Tabelle 3 sind die ermittelten mittleren Zelllängen sowie die zugehörigen Standardabweichungen aufgeführt.

Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 3: Übersicht über die aus den epifluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der mit DAPI angefärbten Bakterienzellen von *P. aeruginosa* ATCC 10145, PAO1 und FRD1 bestimmten mittleren Zelllängen sowie deren Standardabweichung und der prozentualen Abweichung der mittleren Zelllänge zwischen der aeroben und anaeroben Kultivierung des jeweiligen *P. aeruginosa* Stammes. Die Kultivierung erfolgte im *in vitro* Biofilmmodell bei 37 °C mit einer Inokulationskonzentration von 10⁷ Zellen·Platte⁻¹ und einer Inkubationszeit von 48 Stunden auf LB- bzw. LBN-Agar.

<i>P. aeruginosa</i> Stämme	mittlere Zelllänge [µm] ± Standardabweichung [µm]		prozentuale Abweichung (aerob vs. anaerob)
	aerob	anaerob	
ATCC 10145	4,9 ± 1,2	8,7 ± 1,7	44%
PAO1	7,0 ± 1,3	14,3 ± 3,1	51%
FRD1	3,4 ± 0,6	8,2 ± 2,2	59%

Der Vergleich der Zelllängen der unterschiedlichen Bakterienstämme zeigt, dass zwischen den Stämme *P. aeruginosa* ATCC 10145 und FRD1 unter der Berücksichtigung der Standardabweichung bei gleichen Kultivierungsbedingungen (aerob oder anaerob) kein erheblicher Unterschied in der Zelllänge zu beobachten ist. Die Zelllängen des Stammes *P. aeruginosa* PAO1 unterscheiden sich im Gegensatz zu den anderen beiden Stämmen, sowohl unter aeroben als auch unter anaeroben Bedingungen deutlich. Anhand der durchgeführten Analyse scheinen die Bakterienzellen von *P. aeruginosa* PAO1 deutlich länger zu sein als bei den anderen beiden Stämmen. Die Abweichung zum Stamm *P. aeruginosa* ATCC 10145 beträgt 30% und zum Stamm *P. aeruginosa* FRD1 51% unter aeroben Kultivierungsbedingungen. Bei einer Kultivierung unter anaeroben Bedingungen betragen die Abweichung 39% zum Stamm *P. aeruginosa* ATCC 10145 und 43% zum Stamm *P. aeruginosa* FRD1. Weiterhin ist eine Elongation der Zellen aller drei Bakterienstämme bei einer anaeroben Kultivierung im Vergleich zur aeroben Kultivierung zu beobachten. Zum Beispiel konnte für den Referenzstamm *P. aeruginosa* ATCC 10145 eine Elongation von 44 % bestimmt werden. Zellelongationen von *P. aeruginosa* Stämmen wurden bereits in früheren Studien beschrieben und untersucht. Steinberger et al. [141] untersuchten zum Beispiel die Zellelongation von *P. aeruginosa* auf Nährmedien mit unterschiedlichen Energiequellen. Die Autoren dieser Studie fanden heraus, dass die Elongation der *P. aeruginosa* Zellen durch eine Minimierung der Nährstoffe induziert wird. Aus dieser

Erkenntnis schlussfolgerten die Autoren, dass die Zellelongation dazu dient die statistische Wahrscheinlichkeit zu erhöhen Nährstoffe unter den beschriebenen Bedingungen aufzunehmen [141]. Eine Studie, welche die Zelllänge von *P. aeruginosa* zwischen aerober und anaerober Kultivierung vergleicht, wurde im Jahr 2011 von Yoon et al. [140] publiziert. In dieser Studie wurde der Bakterienstamm *P. aeruginosa* PAO1 in Form von Biofilmen untersucht und eine 5-fache Zellelongation bei anaerober Kultivierung festgestellt. Im Vergleich zu der Studie von Yoon et al. konnte bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimenten nur eine Verdopplung der Zelllänge bei dem Bakterium *P. aeruginosa* PAO1 festgestellt werden. Weiterhin sind die bestimmten Zelllängen im Vergleich zu denen von Yoon et al. [140] deutlich größer. Im Gegensatz zu den hier gezeigten Untersuchungen, führten Yoon et al. [140] die Experimente an planktonisch gewachsenen Zellen von *P. aeruginosa* PAO1 durch. Die größeren Zelllängen sowie die geringere Elongation könnten hierauf zurückgeführt werden. Die Zellelongation wurde durch weitergehende Untersuchungen von Yoon et al. [140] auf die Energiegewinnung durch terminale Elektronenakzeptoren bei der anaeroben Atmung zurückgeführt. Hierbei konnten von Yoon et al. [140] die anaerobe Atmosphäre sowie die Energiegewinnung durch die Phosphorylierung von Arginin als Einflussfaktoren ausschließen. Die Autoren stellen aus ihren Ergebnissen die Hypothese auf, dass die Elongation auf die Nitritreduktase unterstützte Reduktion von NO_2^- zu NO zurückzuführen ist, was eine Verschlechterung der Zellteilung zur Folge hat. Des Weiteren ist bekannt, dass das Bakterium *P. aeruginosa* unter anaeroben Bedingungen robustere Biofilme bildet [85], was nach Yoon et al. [140] u.a. auf die Elongation der Bakterienzellen zurückgeführt werden könnte [140]. Untersuchungen der Veränderung der Zelllänge bei aerober und anaerober Kultivierung anderer Bakterienstämme von *P. aeruginosa* wurden bislang nicht publiziert. Im Allgemeinen können die Hypothesen und Erkenntnisse zur Zellelongation von *P. aeruginosa* PAO1 ebenfalls für die Erklärung der Zellelongation der weiteren untersuchten Stämme ATCC 10145 und FRD1 verwendet werden, wobei Phänotyp spezifische Ursachen ebenfalls Einfluss auf die Zellelongation haben könnten.

In diesem Kapitel wurde das *in vitro* Modell vorgestellt, welches eine *in vitro* Kultivierung unter CF-ähnlichen Bedingungen ermöglicht. Weiterhin wurde die Kultivierungsmethode optimiert, so dass eine reproduzierbare Kultivierung von konfluenten und homogenen bakteriellen Biofilmen des Bakteriums *P. aeruginosa* im

Ergebnisse und Diskussion

in vitro Biofilmmodell gewährleistet werden kann. Außerdem wurden die beobachteten Phänomene der Zellelongation unter anaeroben Kultivierungsbedingungen sowie die Aggregation diskutiert. Einschränkend, hinsichtlich *in vitro* Untersuchungen zu bakteriellen Atemwegsinfektionen bei der CF-Erkrankung, ist das zur Entwicklung des Modells und der Methode verwendete Nährmedium. Das verwendete Vollmedium LB-Lennox (aerobe Kultivierung) bzw. LB-Lennox, versetzt mit Kaliumnitrat (anaerobe Kultivierung) entspricht nicht der Nährstoffsituation in der Lunge eines CF-Patienten. Ein Vollmedium enthält alle zum Wachstum notwendigen Nährstoffe im Überschuss. Ein Nährmedium, welches der Nährstoffsituation in der Lunge eines CF-Patienten nachempfunden ist, ist das artifizielle Sputummedium, welches im Kapitel 5.3.4 für die Kultivierung von bakteriellen Biofilmen des Bakteriums *P. aeruginosa* im *in vitro* Biofilmmodell beschrieben wird.

5.2 Entwicklung und Etablierung einer Probenahme- und *suspected-target* Analysemethode für mVOCs aus dem *in vitro* Biofilmmodell

Die frühzeitige Diagnose von Besiedlungen der Lunge eines CF-Patienten korreliert mit der Wahrscheinlichkeit einer frühzeitigen therapeutischen Eradikation des bakteriellen Pathogens sowie der erhöhten Lebenserwartung der Patienten. Neben der frühzeitigen und sicheren Diagnose ist eine Minimierung der Belastung der CF-Patienten, aufgrund der Einschränkungen vor allem bezogen auf die Lungenfunktion, von großer Bedeutung. Eine nicht-invasive Diagnosemethode für verschiedene bakterielle Pathogene und insbesondere auf das für die Mortalität von CF-Patienten verantwortliche Bakterium *P. aeruginosa* ist dementsprechend ein Ziel der CF-Forschung. Eine Möglichkeit hierfür stellt die Analyse des Atemgases der Patienten, hinsichtlich bakterienspezifischer volatiler Metabolite, sogenannter mVOCs oder extrazellulärer volatiler Metabolite, dar. Allerdings sind vor der Entwicklung, Validierung und Implementierung einer solchen Methodik in den klinischen Alltag von CF-Zentren, *in vitro* Studien zum extrazellulären Metabolom von CF-relevanten bakteriellen Pathogenen notwendig. Wie bereits in Kapitel 5.1 erläutert, sind für *in vitro* Untersuchungen unter Bedingungen ähnlich einer CF-Lunge verschiedene Parameter zu beachten. Mit dem vorgestellten *in vitro* Biofilmmodell sowie der Kultivierungsmethode und dem festen ASM ist es möglich, solche *in vitro*

Untersuchungen unter CF-ähnlichen Bedingungen durchzuführen. Allerdings sind neben der Kultivierung ebenfalls eine reproduzierbare und adäquate Probennahme sowie Analysemethode notwendig. In diesem Kapitel soll gezeigt werden, wie die Probennahme der mVOCs realisiert worden ist. Weiterhin soll eine geeignete analytische Methode entwickelt sowie die Analyse von mVOCs von *P. aeruginosa* aus dem *in vitro* Biofilmmodell gezeigt werden.

5.2.1 Probennahme der mVOCs aus dem *in vitro* Biofilmmodell mittels Dünnschichtmikroextraktion

Die Dünnschichtmikroextraktion (engl.: *thin-film microextraction*, TFME) ist eine membranbasierte Extraktions- und Anreicherungsverfahren, welche aufgrund der Kultivierungsmethode besonders gut für die Anreicherung der von den Bakterien im *in vitro* Biofilmmodell emittierten mVOCs geeignet ist. Mikrobiologische Systeme zur Kultivierung von Biofilmen werden über Kopf inkubiert. Hierdurch ist der Deckel der Petrischale des *in vitro* Biofilmmodells bei der Inkubation der Boden, so dass das Sorptionsmaterial ohne zusätzliche Montagehilfen in das System eingebracht werden kann. Dies hat den Vorteil, dass die Oberfläche des Sorptionsmaterials nicht durch etwaige Montagehilfen minimiert wird. Durch die in Kapitel 4.3.3 beschriebene Kultivierungsmethode und das Wachstum der Bakterienstämme als Biofilm, wird eine Kontamination der Sorptionsfilme durch herunter tropfendes Bakterienmaterial verhindert. Für eine Probennahme der mVOCs für eine *suspected-target* Analyse muss zunächst ein geeignetes Sorptionsmaterial ausgewählt und charakterisiert werden, bevor eine Analyse der mVOCs möglich ist.

5.2.1.1 Auswahl und Charakterisierung der Sorptionsfilme

Basierend auf verschiedenen Publikationen zu Metaboliten von unterschiedlichen bakteriellen Pathogenen, welche in dem Übersichtsartikel von Bos et al. [104] zusammengefasst und miteinander verglichen worden sind, ist bekannt, dass *P. aeruginosa* mVOCs verschiedener Substanzklassen emittiert. Zu diesen Substanzklassen gehören Kohlenwasserstoffe, Alkohole, Säuren, Aldehyde, Ketone, cyclische Verbindungen, Ester, Schwefel- und Stickstoffverbindungen [104]. Diese Substanzklassen weisen unterschiedliche chemische und physikalische Eigenschaften, wie zum Beispiel Polaritäten, Dampfdrücke, etc., auf, so dass die Anreicherung aller emittierten mVOCs eine große Herausforderung ist. Neben der

Ergebnisse und Diskussion

Anreicherung aller Zielanalyten sind die Temperaturstabilität der Sorptionsfilme sowie die Herstellung der Sorptionsfilme mit gleichbleibender Qualität, um eine reproduzierbare Analyse zu gewährleisten, von großem Interesse. Aufgrund der Temperaturstabilität und der Eignung zur ausreichenden Sorption der Analyten aller vermuteten Substanzklassen wurde Polydimethylsiloxan (PDMS) als Sorptionsmaterial ausgewählt. PDMS-Filme weisen eine Temperaturstabilität von ca. 300 °C [142] auf, so dass mit Hilfe dieser Filme eine Anreicherung von Analyten mit einem niedrigen Dampfdruck auf den Filmen sowie eine Überführung in ein geeignetes Analysensystem möglich ist. Für einige Substanzklassen ist zum Beispiel Polyoxymethylen (POM) besser geeignet. Allerdings ist POM nur bis maximal 150 °C [143] temperaturstabil, so dass eine Überführung von Analyten mit niedrigen Dampfdrücken nicht möglich ist. Des Weiteren haben Sprunger et al. [144] die Sorptionskoeffizienten von mehr als 100 gasförmigen chemischen Substanzen auf PDMS berechnet. Die Ergebnisse belegen, dass die Verwendung von PDMS für die Anreicherung von Analyten eines breiten Spektrums am besten geeignet ist. Damit eine gleichbleibende Qualität der PDMS-Filme gewährleistet werden kann, wurden kommerzielle PDMS-Filme ausgewählt. Ebenfalls von Relevanz ist die Filmdicke der PDMS-Filme. Aufgrund des großen Gasvolumens oberhalb des Biofilms wurde eine Filmdicke von etwa 0,4 mm gewählt, so dass eine hohe Sorptionskapazität vorhanden ist, um eine reproduzierbare Probennahme zu gewährleisten.

Kommerzielle PDMS-Filme wurden von zwei Herstellern bezogen und direkt nach der Lieferung und ohne vorherige Behandlung mittels einer TG und einer TG-APPI-qMS auf ihre Eignung untersucht. Nair et al. [145] haben bereits Untersuchungen von PDMS sowie PDMS-Mischungen mittels TG durchgeführt. Die Autoren haben in ihrer Publikation gezeigt, dass bei thermischer Einwirkung auf PDMS oder Mischungen mit PDMS zyklische Siloxane mit unterschiedlicher Ringgröße entstehen. Des Weiteren konnten sie zeigen, dass die Ringgröße von Additiven einer PDMS-Mischung abhängig ist [145]. Zur Charakterisierung der PDMS-Filme der beiden Hersteller wurden drei Proben von je 5 mg an drei verschiedenen Stellen des gelieferten festen Materials entnommen. Die aus der im ersten Schritt durchgeführten derivativen Thermogravimetrie (DTG) Analyse der Proben erhaltenen Kurven sind in Abbildung 9 gezeigt.

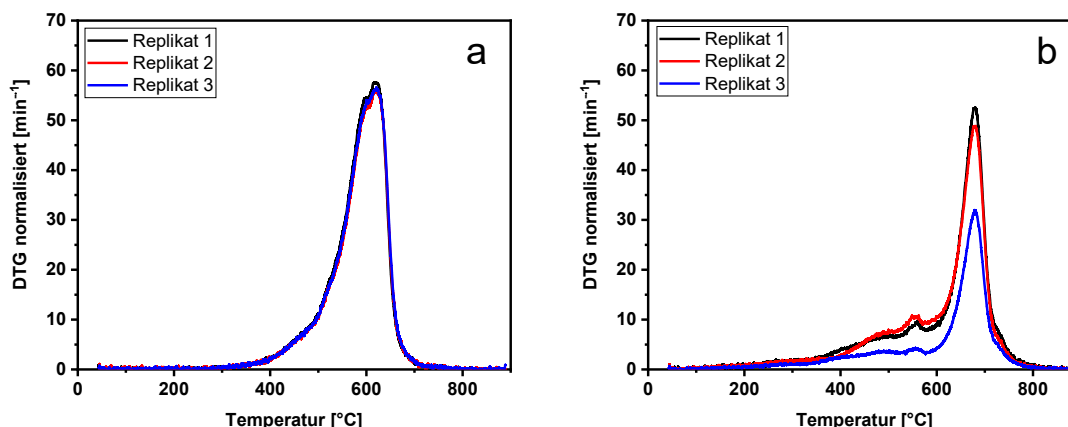


Abbildung 9: DTG-Kurven, normiert auf das Ausgangsgewicht, für alle drei Replikate (Repl. 1 = schwarz; Repl. 2 = rot; Repl. 3 = grün) der PDMS-Filme von Hersteller A (Abb. a) und Hersteller B (Abb. b). Ungefähr 5 mg der ausgewählten Folie wurden in einen Al₂O₃-Tiegel eingewogen und von 30 °C auf 900 °C mit einem Gradienten von 10 °·min⁻¹ erhitzt. Ein Stickstoff Gasstrom von 200 mL·min⁻¹ wurde in die Thermogravimetrie kammer geleitet.

Die in der Abbildung 9 gezeigten DTG Kurven sind auf die Einwaage normierte Kurven. Der Vergleich der DTG Kurven zeigt, dass die Filme des Herstellers B eine deutlich geringere Temperaturstabilität aufweisen als die des Herstellers A. Mittels DTG Analyse konnten erste Zersetzungsprodukte der Filme ab 100 °C beim Hersteller B und bei dem Hersteller A erst ab einer Temperatur von 300 °C detektiert werden. Der Peak Apex der DTG Kurven der Filme des Herstellers B liegt hingegen bei 680 °C und damit 60 °C höher als bei Hersteller A. Eine größere, allgemeine Temperaturstabilität der Filme des Herstellers B könnte vermutet werden. Für die angestrebte Applikation der PDMS-Filme ist aber die Temperatur entscheidend, bis zu welcher keine Elution von Substanzen aus dem Film auftritt. Diese wird hier als obere Desorptionstemperatur definiert und bestimmt dadurch ebenfalls die Temperaturstabilität der PDMS-Filme. Anhand des visuellen Vergleiches der Filme der beiden Hersteller (Abbildung 9) ist zu erkennen, dass die Filme des Herstellers A ein weißliches und undurchsichtiges Erscheinungsbild aufweisen. Die Filme des Herstellers B sind im Vergleich hierzu durchsichtig. Unter Berücksichtigung der Ergebnisse von Nair et al. [145] ist eine Verwendung von Additiven bei der Herstellung der Filme von Hersteller A möglich. Basierend auf der Farbe der Filme sowie den DTG Kurven von Nair et al. [145] könnte Titandioxid dem PDMS zugegeben worden sein. Weiterhin ist zu beobachten, dass die Filme des Herstellers A eine höhere Reproduzierbarkeit aufweisen. Die prozentuale Abweichung des y-Wertes am Peak Apex beim Hersteller A liegt bei 1,7%, wohingegen die prozentuale Abweichung bei Hersteller B 24,7% beträgt. Basierend auf den zu

Ergebnisse und Diskussion

erwartenden Analyten ist eine Temperatur von mindestens 200 °C notwendig, damit eine vollständige und reproduzierbare Desorption der Analyten von den PDMS-Filmen gewährleistet werden kann. Bei dieser Temperatur weisen die Filme des Herstellers A einen Massenverlust von $6 \pm 0 \mu\text{g}$ auf, während bei den Filmen des Herstellers B ein Massenverlust von $26 \pm 5,6 \mu\text{g}$ beobachtet werden kann. Die Werte des Massenverlustes bei einer Temperatur von 200 °C lassen ebenfalls Rückschlüsse auf die Temperaturstabilität zu, so dass die Freisetzung aus den Filmen von Hersteller A bei 200 °C geringer ist. Eine Folge aus der Freisetzung von Substanzen aus den Filmen ist die Detektion dieser während der Analysen der extrazellulären volatilen Metabolite als Artefaktpeaks. Eine geringere Freisetzung von Substanzen aus den Filmen führt zu einem geringeren Hintergrund bei der Analyse, wodurch eine höhere Genauigkeit und niedrigere Nachweisgrenzen erwartet werden können.

Basierend auf den Kenntnissen über die thermische Zersetzung von PDMS sowie den Ergebnissen von Nair et al. ist zu erwarten, dass hauptsächlich zyklische Siloxane aus den Filmen eluieren. Diese Hypothese soll mittels eines *target approach* unter Verwendung der TG-APPI-qMS überprüft werden. Aufgrund fehlender Publikationen hinsichtlich der Ionisierbarkeit von zyklischen Siloxane mittels APPI wurden die zyklischen Siloxane D4, D5 und D6 als analytische Standards direkt mit der TG-APPI-qMS analysiert. Die aus diesen Analysen erhaltenen TICs sind in der Abbildung 10 dargestellt.

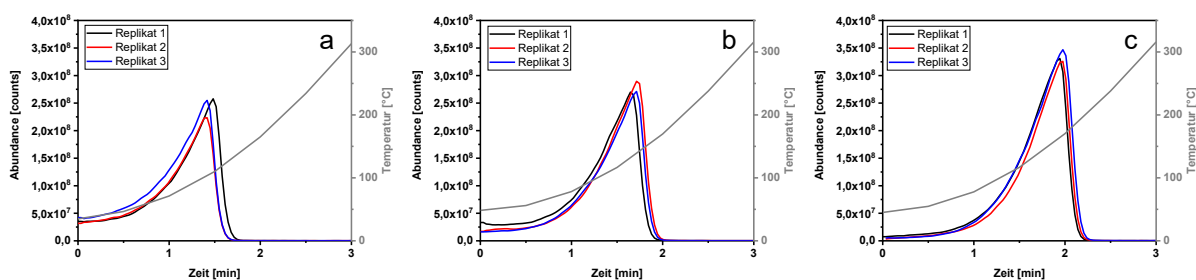


Abbildung 10: TICs einer Analyse von Einzelstandards ($n = 3$), a: D4; b: D5; c: D6, mit TG-APPI-qMS. Für diese Untersuchungen wurden authentische Standards der drei zyklischen Siloxane verwendet. Es wurde eine dreifache Bestimmung jedes zyklischen Siloxans durchgeführt (schwarz = 1. Replikat; rot = 2. Replikat; blau = 3. Replikat) Zusätzlich ist der reale Temperaturgradient im TG-Ofen in grau dargestellt. Die genaue Temperatur wird in Grau auf der rechten y-Achse angezeigt.

Für jedes der ausgewählten zyklischen Siloxane wurde eine dreifache Messung durchgeführt. Anhand der TIC ist ersichtlich, dass die zyklischen Siloxane D4 bis D6 mittels APPI ionisierbar sind. Des Weiteren ist aufgrund der dreifachen Bestimmung

Ergebnisse und Diskussion

die gute Reproduzierbarkeit der Messung mittels TG-APPI-qMS zu erkennen. Eine Trennung der drei zyklischen Siloxane in einem Gemisch ist, aufgrund der geringen Unterschiede im Dampfdruck, nicht zu erwarten. Allerdings ist eine Trennung für die Charakterisierung der PDMS-Filme nicht notwendig. Außerdem kann eine Differenzierung der unterschiedlichen zyklischen Siloxane basierend auf der Molekülmasse erfolgen. In Abbildung 11 sind die EICs von unterschiedlichen Fragmenten für alle drei zyklischen Siloxane gezeigt.

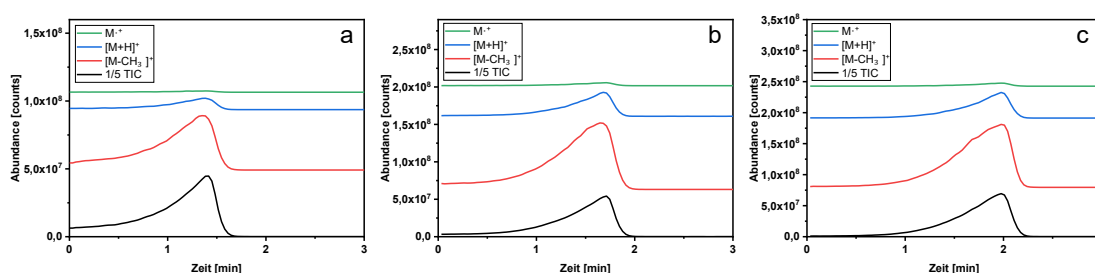


Abbildung 11: Vergleich von drei möglichen Signalen von zyklischen Siloxanen, die in der APPI-Quelle während der TG-APPI-qMS-Analyse gebildet wurden. In jeder der Abbildungen ist das TIC (schwarz; 1/5 der Signalintensität) und die EICs für $[M]^+$ (grün), $[M+H]^+$ (blau) und $[M-CH_3]^+$ (rot) für a) D4 ($m/z [M]^+ = 296 \pm 0,3$; $[M+H]^+ = 297 \pm 0,3$; $[M-CH_3]^+ = 281 \pm 0$ dargestellt. 3) b) D5 ($m/z [M]^+ = 370 \pm 0,3$; $[M+H]^+ = 371 \pm 0,3$; $[M-CH_3]^+ = 355 \pm 0,3$) und c) D6 ($m/z [M]^+ = 444 \pm 0,3$; $[M+H]^+ = 445 \pm 0,3$; $[M-CH_3]^+ = 429 \pm 0,3$) gezeigt.

Basierend auf dem Ionisationsmechanismus der APPI [146,147] ist zu erwarten, dass sich $[M]^+$ und $[M+H]^+$ Fragmente bilden. Das Fragment $[M-CH_3]^+$ weist bei allen untersuchten zyklischen Siloxanen die höchste Intensität auf, so dass es für die Charakterisierung der PDMS-Filme mittels TG-APPI-qMS verwendet wird. In Abbildung 12 sind die EICs der $[M-CH_3]^+$ Fragmente der zyklischen Siloxane D3 bis D7 sowie das TIC für die Materialien beider Hersteller gezeigt.

Ergebnisse und Diskussion

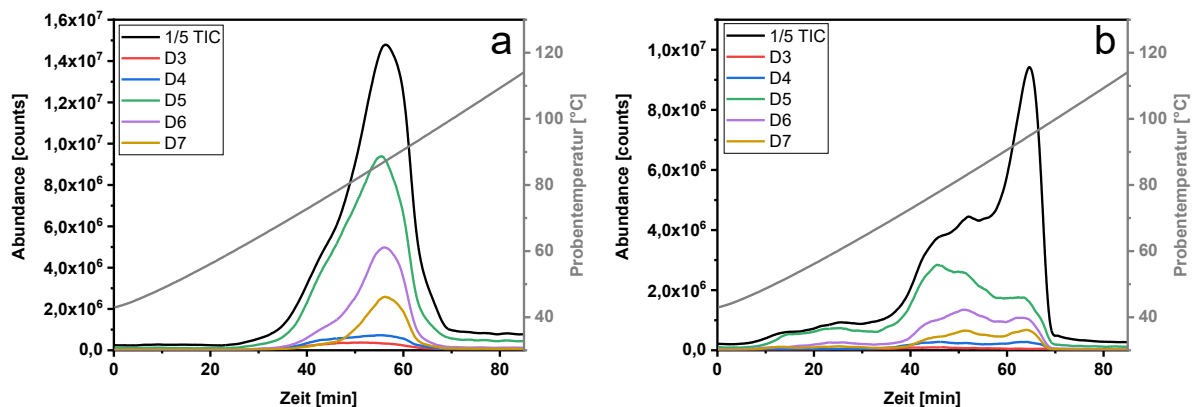


Abbildung 12: TG-APPI-qMS-Daten der Filme von a) Hersteller A und b) Hersteller B. In jedem Chromatogramm ist das TIC in Schwarz (1/5 der Signalintensität) sowie die EICs des Fragments $[M-CH_3]^+$ von D3 ($m/z = 207 \pm 0,3$; rot), D4 ($m/z = 281 \pm 0,3$; blau), D5 ($m/z = 355 \pm 0,3$; grün), D6 ($m/z = 429 \pm 0,3$; magenta) und D7 ($m/z = 503 \pm 0,3$; orange) dargestellt. Die rechte y-Achse und die graue Linie im Diagramm zeigen die gemessene Proben temperatur während der Analyse an. Die Filme wurden als Triplikate analysiert.

Analog zu den DTG Kurven zeigen die TICs eine spätere Elution der Substanzen aus den Filmen des Herstellers B. Vor allem werden zyklische Siloxane mit einer Siliziumatomzahl von drei bis sieben aus den Filmen freigesetzt. Weiterhin ist zu beobachten, dass alle betrachteten zyklischen Siloxane in den Filmen des Herstellers A homogen und in einem nahezu gaußförmigen Peak eluieren. Beim Hersteller B hingegen erfolgt die Elution des zyklischen Siloxans D5 bereits nach 10 min, was einer Temperatur von 126 °C entspricht. Danach erfolgt eine zweistufige Freisetzung von D4 bis D7. Das zyklische Siloxan D3 wird von den Filmen der beiden Hersteller kaum freigesetzt. Weiterhin ist zu beobachten, dass die thermische Zersetzung der Filme von Hersteller B in mindestens vier Schritten erfolgt (Abbildung 12). Die Zersetzungsschritte 1 bis 3 resultieren aus zyklischen Siloxanen, während im letzten Zersetzungsschritt eine weitere Verbindung mit einem m/z von 353 eluiert wird, was in Abbildung 13 gezeigt ist.

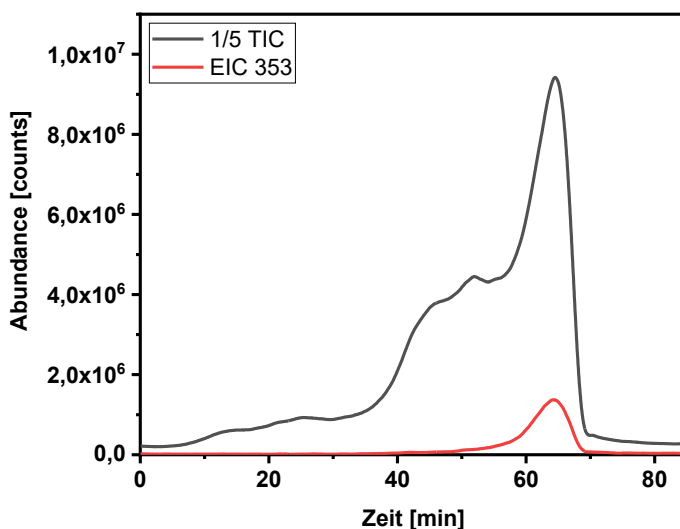


Abbildung 13: Weitere Untersuchungen der PDMS-Folie von Hersteller B. Der höchste Peak der DTG-Kurve und des TIC resultiert hauptsächlich aus einem Molekül mit einem m/z -Verhältnis von 353. Zur Veranschaulichung sind die EIC von $353 \pm 0,3$ im Vergleich zum TIC dargestellt. In grau ist das TIC (1/5 der Signalintensität) und in Rot das EIC gezeigt.

Zusätzlich zu der homogeneren Freisetzung der zyklischen Siloxane, ist analog zu den Ergebnissen der TG Analyse für die Filme der Herstellers A im Vergleich zu den Filmen des Herstellers B eine höhere Temperaturstabilität zu beobachten. Dies könnte, wie bereits von Nair et al. [145] diskutiert, auf eine Stabilisierung des PDMS durch Additive zurückgeführt werden. Die Hypothesen zur Temperaturstabilität und homogenen Freisetzung der zyklischen Siloxane basiert ausschließlich auf den Erkenntnissen von Nair et al. sowie dem optischen Erscheinungsbild der Filme. Eine Verifizierung oder Falsifizierung ist aufgrund begrenzter Informationen zur Zusammensetzung und dem Herstellungsprozess nicht möglich.

Zusammenfassend konnte durch die Charakterisierung der Filme mittels TG und TG-APPI-qMS gezeigt werden, dass die Filme des Herstellers A homogener und temperaturstabiler sind. Basierend auf diesen Erkenntnissen wurden die Filme des Herstellers A für die geplante TFME Anwendung ausgewählt.

Ergebnisse und Diskussion

5.2.1.2 Entwicklung einer Reinigungsmethode für PDMS-Sorptionsfilme

Eine Verwendung der PDMS-Filme ohne vorherige Reinigung ist bezogen auf eine zeiteffiziente Arbeitsweise sowie umweltrelevanter Aspekte, wünschenswert. Eine TD-GC-qMS Analyse des PDMS-Filmes des Herstellers A, direkt im Anschluss an die Lieferung, ist in der Abbildung 14 gezeigt.

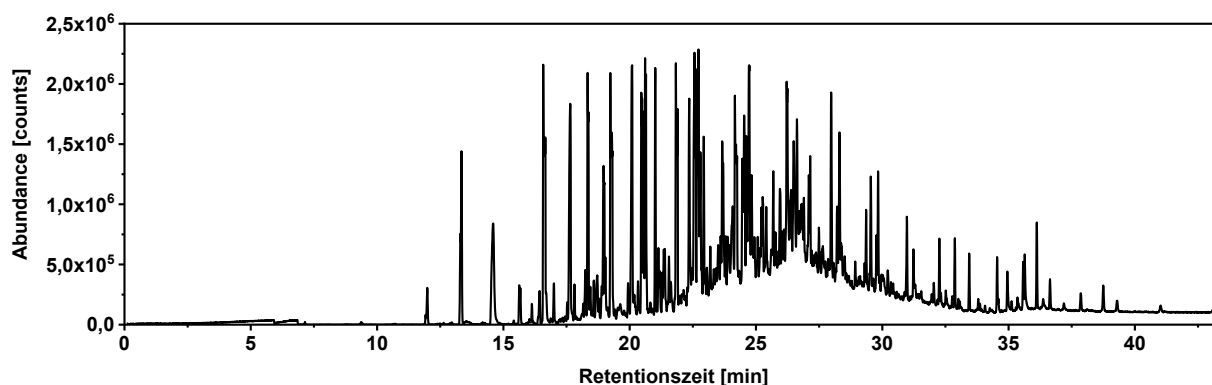


Abbildung 14: TIC der TD-GC-qMS Analyse des TFME Sorptionsmaterials des Herstellers A ohne vorherige Reinigung oder anderweitige Behandlung.

Eine direkte Verwendung der PDMS-Filme ist, wie anhand der Abbildung 14 ersichtlich ist, aufgrund von Kontaminationen, welche vermutlich aus dem Produktionsprozess der Filme stammen, nicht möglich. Aufgrund der Vielzahl an chemischen Substanzen, welche aus dem PDMS-Film desorbiert werden, ist eine Reinigung vor der Anwendung notwendig. Die PDMS-Filme des Herstellers A wurden bereits von anderen Forschungsgruppen als TFME Sorptionsmaterial eingesetzt. Riazanskaia et al. [148] haben eine Reinigungsmethode für diese Filme publiziert, auf deren Basis die Reinigung der PDMS-Filme für die hier beschriebene Anwendung entwickelt worden ist.

Damit Kontaminanten aller Substanzklassen entfernt werden können, ist eine mehrstufige Reinigung notwendig. Zunächst soll eine lösungsmittelbasierte Reinigung Kontaminanten mit unterschiedlicher Polarität entfernen. Hierzu wird zunächst eine Reinigung mit Methanol durchgeführt. Ziel der Reinigung mit Methanol ist die Entfernung von weniger polaren Kontaminanten. Die Filme werden in ein vollständig mit Methanol gefülltes Vial gegeben und anschließend im Schüttler gereinigt. Die Reinigungszeit wurde variiert und so die optimale Reinigungszeit ermittelt. Die Ergebnisse der Variation der Reinigungszeit sind in Abbildung 15 als TIC der TD-GC-qMS Analyse gezeigt.

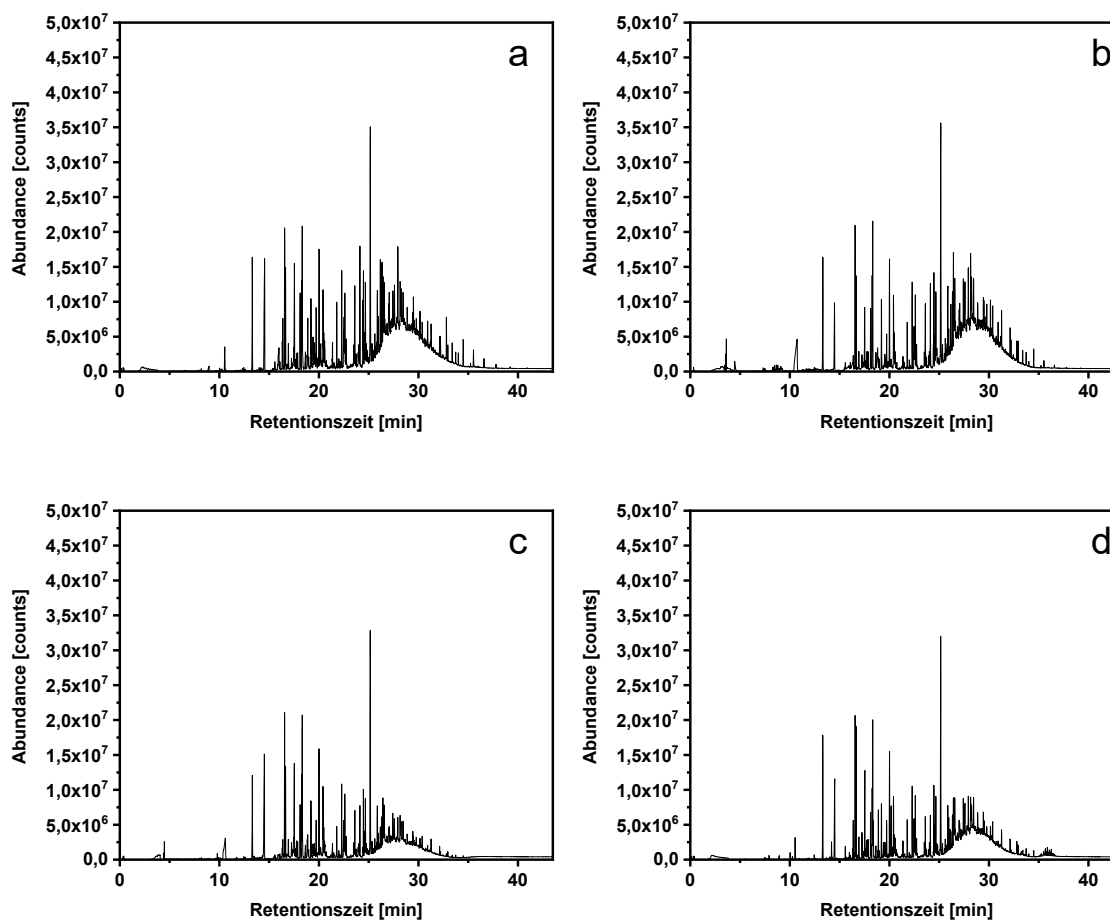


Abbildung 15: Chromatogramme der TD-GC-qMS Analyse der TFME Filme des Herstellers A nach einer vorherigen Behandlung mit LC-MS grade Methanol. a: nach 30-minütiger Behandlung mit Methanol; b: nach 60-minütiger Behandlung mit Methanol; c: nach 90-minütiger Behandlung mit Methanol; d: nach 120-minütiger Behandlung mit Methanol.

In Abbildung 15 ist zu erkennen, dass die Signalintensität der verschiedenen Kontaminanten abhängig von der Reinigungszeit unterschiedlich stark abnehmen. Des Weiteren ist eine Koelution von Kontaminanten in einem Retentionszeitenbereich von 25 min bis 35 min zu beobachten, deren Intensität mit zunehmender Reinigungszeit abnimmt. Allerdings ist ab einer Reinigungszeit von 90 Minuten keine weitere Reduktion der Signalintensität in diesem Retentionszeitenbereich zu beobachten. Unter Berücksichtigung zeitlicher sowie Effizienzaspekte wurde eine Reinigungszeit von 90 Minuten ausgewählt. Allerdings konnte durch die Reinigung mit Methanol keine vollständige Entfernung der Kontaminanten erreicht werden. Deswegen soll anschließend an diesen Reinigungsschritt, zur Entfernung von Kontaminanten, eine Reinigung mittels einer 5% Tensidlösung (Decon 90TM) durchgeführt werden. Dieser Reinigungsschritt ist an die von Riazanskaia et al. [148] publizierte Methode angelehnt,

Ergebnisse und Diskussion

wobei die Reinigung analog zur Reinigung mit Methanol erfolgte. Wiederum wurde die Reinigungszeit variiert und unter Berücksichtigung zeitlicher sowie Effizienz Aspekte evaluiert. Die Ergebnisse sind ebenfalls in Form von TICs der TD-GC-qMS Analysen im Anschluss an diesen zweiten Reinigungsschritt in Abbildung 16 gezeigt.

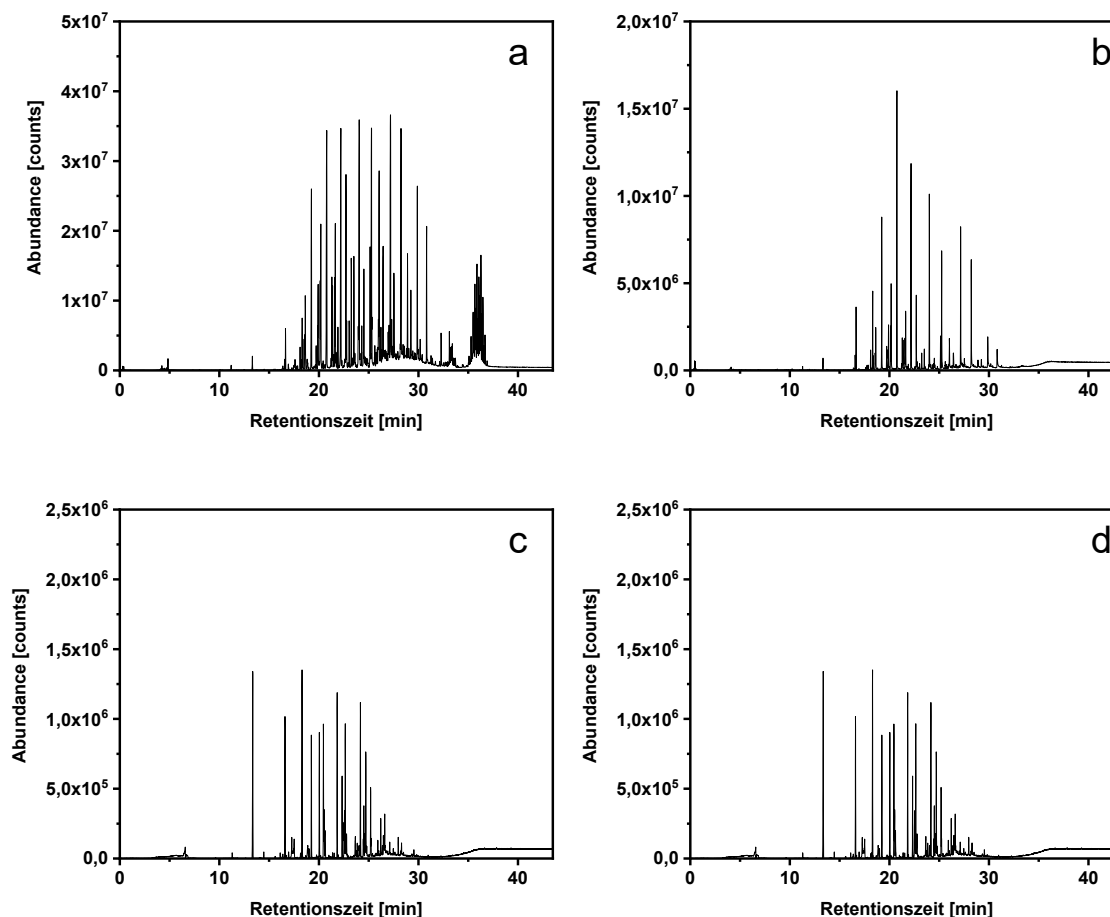


Abbildung 16: Chromatogramme der TD-GC-qMS Analyse der TFME Filme des Herstellers A nach einer vorherigen Behandlung mit LC-MS grade Methanol und 5% wässriger Decon 90 Lösung. a: 90 min Methanol und 30 min Decon 90; b: 90 min Methanol und 60 min Decon 90; c: 90 min Methanol und 90 min Decon 90; d: 90 min Methanol und 120 min Decon 90.

Im Vergleich zu der Reinigung mit Methanol (Abbildung 15) konnte mit Hilfe der 5% wässrigen Decon 90 Lösung weitere Kontaminanten eliminiert werden. Der Vergleich der untersuchten Reinigungszeiten zeigt, dass mit einer Reinigungszeit von 90 Minuten unter Berücksichtigung von zeitlichen und Effizienz Aspekten die beste Reinigung erreicht wird. Ebenfalls ist aus der Abbildung 16 erkennbar, dass eine vollständige Reinigung mit Hilfe von Lösungsmitteln und Tensiden nicht realisiert werden konnte. Allerdings ist für eine Analyse von unterschiedlichsten Substanzklassen sowie für die Beprobung eines großen Volumens, eine

Ergebnisse und Diskussion

größtmögliche Reinigung vorteilhaft. Je mehr Sorptionsplätze auf dem TFME Sorptionsmaterial vorhanden sind, desto mehr und reproduzierbarer ist eine Beprobung möglich. Um dies zu gewährleisten, soll im Anschluss an die lösungsmittelbasierte Reinigung eine thermische Reinigung erfolgen. Für die thermische Reinigung wurde der Tube Conditioner 2 der Firma Gerstel GmbH & Co.KG eingesetzt. Aufgrund der in Kapitel 5.2.1.1 beschriebenen limitierten Temperaturstabilität wurde eine thermische Reinigung bei einer Temperatur von 200 °C durchgeführt. Die Effizienz einer thermischen Reinigung kann hauptsächlich durch die Anzahl der Wiederholungen der thermischen Reinigung, auch Zyklen genannt, gesteigert werden. Deswegen wurde die zweistündige Wärmeexposition der Filme unterschiedlich oft wiederholt. Es wurden Zyklenzahlen von eins, vier und sechs gewählt und miteinander verglichen. Die aus der TD-GC-qMS Analyse nach der thermischen Reinigung erhaltenen TICs sind in Abbildung 17 gezeigt.

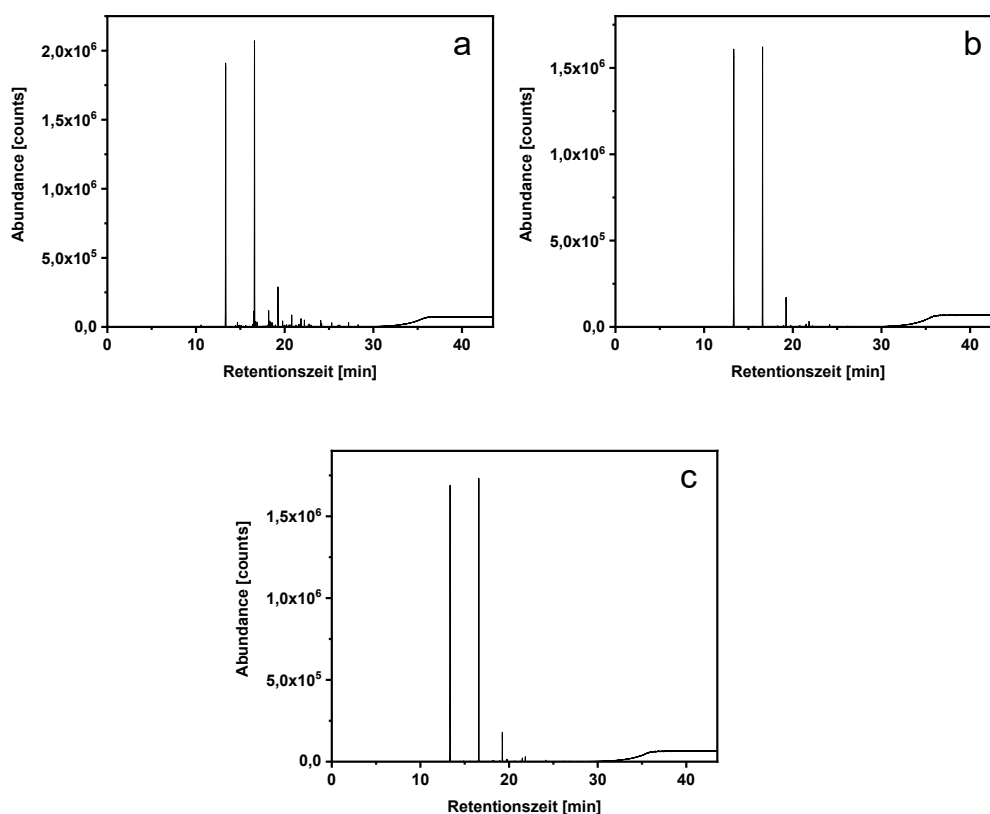


Abbildung 17: Chromatogramme der TD-GC-qMS Analyse der TFME Filme des Herstellers A nach einer vorherigen Behandlung mit LC-MS grade Methanol sowie 5% wässrigen Decon 90 Lösung und a: 1 Heizzyklus (50 °C bis 200 °C; Haltezeit: 120 min), b: 4 Heizzyklen (50 °C bis 200 °C; Haltezeit: jeweils 120 min) und c: 6 Heizzyklen (50 °C bis 200 °C; Haltezeit: jeweils 120 min).

Ergebnisse und Diskussion

Die Ergebnisse zeigen, dass ab einer Zyklenzahl von vier eine nahezu vollständige Reinigung – mit Ausnahme von drei zyklischen Siloxanen – möglich ist. Bei einer Steigerung der Zyklenzahl von vier auf sechs Zyklen konnte keine bedeutsame Reduktion der Kontaminationen mehr festgestellt werden. Trotzdem wurden sechs Zyklen für die Reinigungsmethode ausgewählt, damit eventuelle Schwankungen in der Effizienz der thermischen Desorption der Kontaminanten ausgeglichen werden können. Hierdurch kann ein gleichbleibendes Ergebnis der Reinigung der Filme erzielt werden. In Abbildung 18 ist der gesamte Reinigungsprozess inklusive das nach jedem Reinigungsschritt erhaltene TIC zusammenfassend gezeigt.

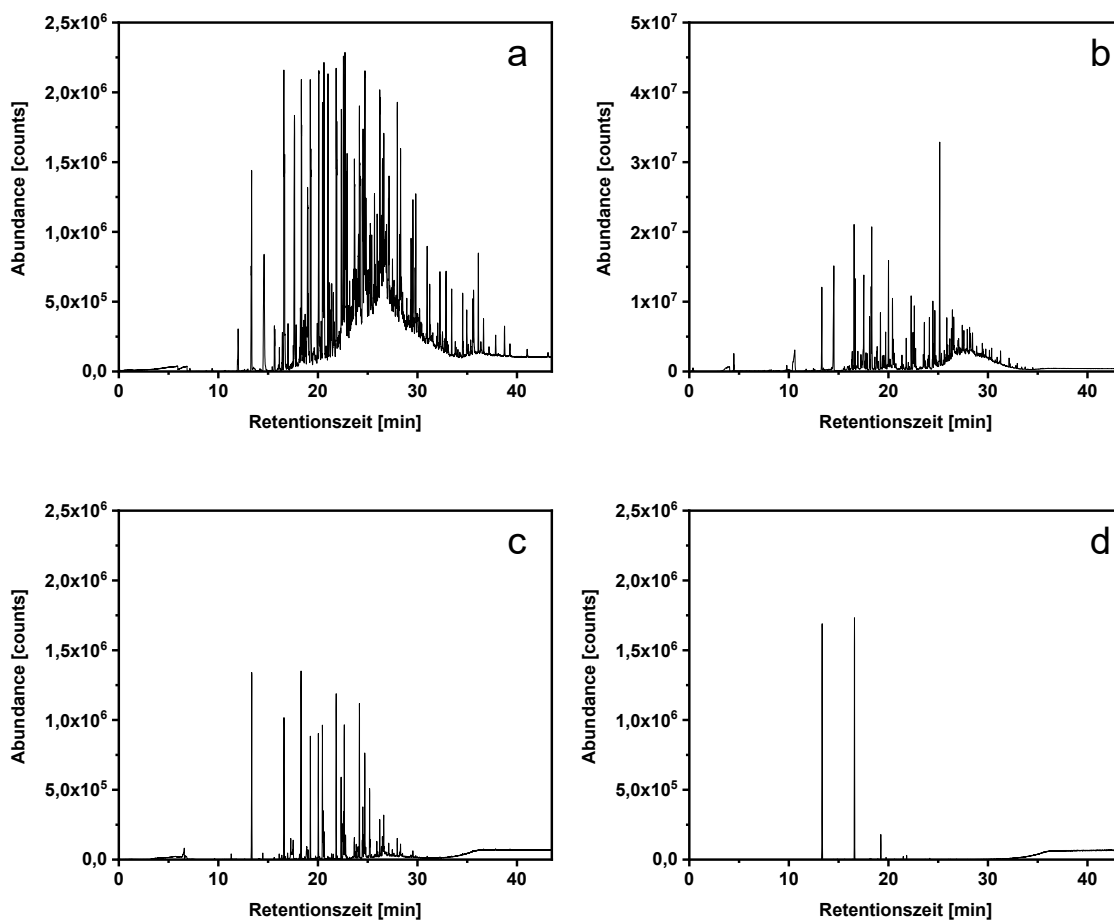


Abbildung 18: TICs der Analyse der TFME-Filme von Hersteller A nach a) Lieferung und ohne Reinigung, b) nach 90 Minuten in Methanol, c) nach 90 Minuten in Methanol und 90 Minuten in 5% wässrige Decon 90 Lösung und d) nach dem gesamten Reinigungsverfahren einschließlich der thermischen Reinigung. Die Filme wurden mit TD-GC-qMS analysiert.

Die lösungsmittelbasierte Reinigung ist für die Reinigung der meisten Kontaminationen geeignet. Allerdings verbleiben im Anschluss an diese Reinigungsschritte noch Kontaminanten im Retentionszeitenbereich zwischen 15 und 30 min (Abbildung 18 c).

Diese Substanzen, welche einen mittleren Siedepunkt aufweisen, können aber mit einer anschließenden thermischen Reinigung entfernt werden (Abbildung 18 d). Eine Reduktion der Kontamination konnte mittels des vorgestellten und optimierten mehrstufigen Reinigungsprozesses erzielt werden. Eine vollständige Reinigung war allerdings nicht möglich, so dass, wie in Abbildung 18 gezeigt, drei Hauptkontaminanten verbleiben. Die drei Peaks lassen sich den zyklischen Siloxanen D3, D4 und D5 zuordnen. Sie stammen aus dem PDMS-Film und können dadurch nicht verhindert oder entfernt werden.

5.2.2 Entwicklung einer Thermodesorption-Gaschromatographie-Massenspektrometrie Methode zur *suspected-target* Analyse von mVOCs aus dem *in vitro* Biofilmmodell

Die Entwicklung einer TD-GC-qMS Methode zur Desorption von beladenen TFME Filmen, wurde für die Anwendung zur *suspected target* Analyse von extrazellulären volatilen Metaboliten des Bakteriums *P. aeruginosa* aus dem *in vitro* Biofilmmodell entwickelt. Die Vielfalt, der von *P. aeruginosa* produzierten Metaboliten stellt bzgl. der Methodenentwicklung eine Herausforderung dar, da ein breites Spektrum von Metaboliten abdeckt werden muss. Bos et al. [104] berichteten über Metaboliten unterschiedlichster Substanzklassen sowie mit verschiedenen physikalischen und chemischen Eigenschaften, die von *P. aeruginosa* stammen. Dimethylsulfid und 1-Undecen sind Beispiele solcher Metabolite. Anhand dieser beiden Metabolite kann die Herausforderung bei der Methodenentwicklung verdeutlicht werden. Dimethylsulfid hat einen Siedepunkt von 37 °C [149], während 1-Undecen einen deutlich höheren Siedepunkt von 192-193 °C [150] aufweist. Daher wurde eine Kryofokussierung der thermodesorbierten Analyten auf den Liner bei -10 °C in Kombination mit einer Ofenkühlung verwendet. Hierdurch werden die Analyten nach dem Transfer vom Liner auf die Säule erneut am Säulenkopf fokussiert und die Analyse von niedrig siedenden Substanzen wie Dimethylsulfid ermöglicht. Außerdem konnte mit der Ofenkühlung eine deutliche Verringerung der Peakbreiten erreicht werden. In Abbildung 19 ist ein Vergleich zwischen der Analyse von Dimethylsulfid sowie von 2-Methylbutanal mit und ohne Ofenraumkühlung gezeigt.

Ergebnisse und Diskussion

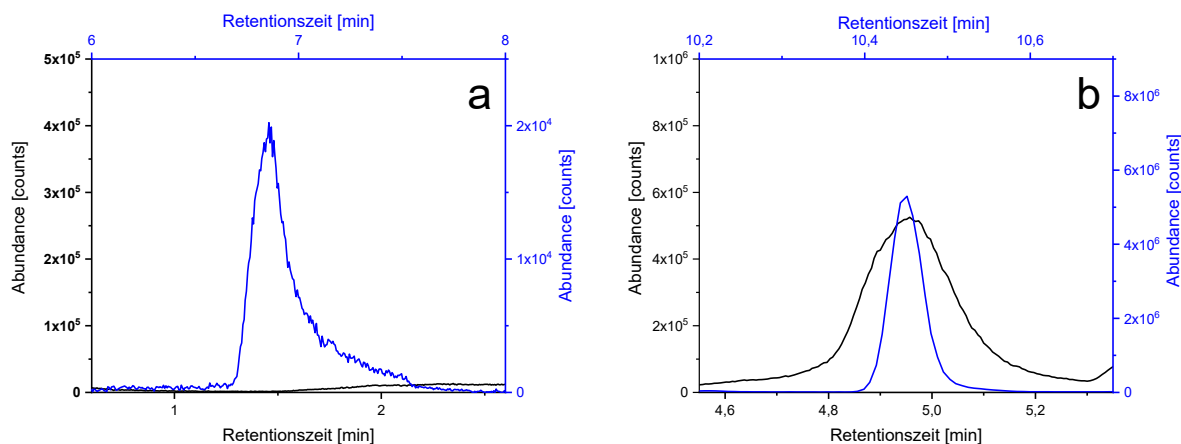


Abbildung 19: Veranschaulichung des Vorteils der Ofenraumkühlung, bzgl. der Detektion von niedrig siedenden Verbindungen und der Peakbreite, am Beispiel von Dimethyldisulfid (a) und 2-Methylbutanal (b). Hierzu wurden die Analyten des Multistandards mit einer Konzentration von 500 μM bzw. 50 μM auf TFME-Filmen sorbiert und mit dem TD-GC-qMS analysiert. Gezeigt sind Auszüge aus den TICs von der Analyse ohne (schwarz) und mit Ofenraumkühlung (blau).

Die Abbildung 19 a verdeutlicht am Beispiel des Dimethyldisulfids, dass eine Analyse von niedrig siedenden Substanzen mit dem Einsatz einer Ofenraumkühlung möglich ist. Zusätzlich bietet die Ofenraumkühlung den Vorteil, dass die Peakbreiten der Analyten deutlich verringert werden konnten. Das Beispiel 2-Methylbutanal (Abbildung 19 b) zeigt, dass bei der Verwendung einer Ofenraumkühlung eine Verringerung der Peakbreite in halber Höhe (*engl.: full width at half maximum, FWHM*) um 9,2 Sekunden erreicht worden ist. Die Tabelle 4 fasst die berechneten FWHM Werte ausgewählter Analyten mit und ohne Anwendung der Ofenraumkühlung zusammen.

Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 4: Übersicht über die ermittelten Peakbreiten in halber Höhe (FWHM) für ausgewählte Modellsubstanzen, mit und ohne Verwendung der Ofenraumkühlung.

Substanz	FWHM [s]	
	ohne Ofenraumkühlung	mit Ofenraumkühlung
2-Methylbutanal	11,9	2,7
Dimethyldisulfid	9,0	4,8
2-Hexanon	7,2	3,0
2-Heptanon	3,6	2,4
1-Octanol	4,2	3,0
2-Nonanon	2,4	1,8
2-Aminoacetophenon	3,0	2,4

Die Anwendung der Ofenraumkühlung bewirkt, dass Peakbreiten <5 Sekunden für alle Analyten über den gesamten Analysenzeitraum erzielt werden. Die Reduktion der Peakbreite nimmt dabei mit steigender Retentionszeit ab. Ein Vorteil der geringeren Peakbreite ist die dadurch erhöhte Peakkapazität. Mit einer erhöhten Peakkapazität können mehr Analyten in der gleichen Zeit getrennt werden, ohne ein mehrdimensionales Chromatographiesystem zu verwenden.

Damit die Detektion aller potenziellen Metabolite der unterschiedlichen Substanzklassen gewährleistet werden kann, wurde eine universelle Methode mit einem linearen Temperaturgradienten verwendet. Abbildung 20 zeigt das resultierende Chromatogramm eines Mischstandards aus zehn flüchtigen Metaboliten von *P. aeruginosa* mit einer TFME aus einer 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$ Lösung unter Verwendung der TD-GC-qMS-Methode.

Ergebnisse und Diskussion

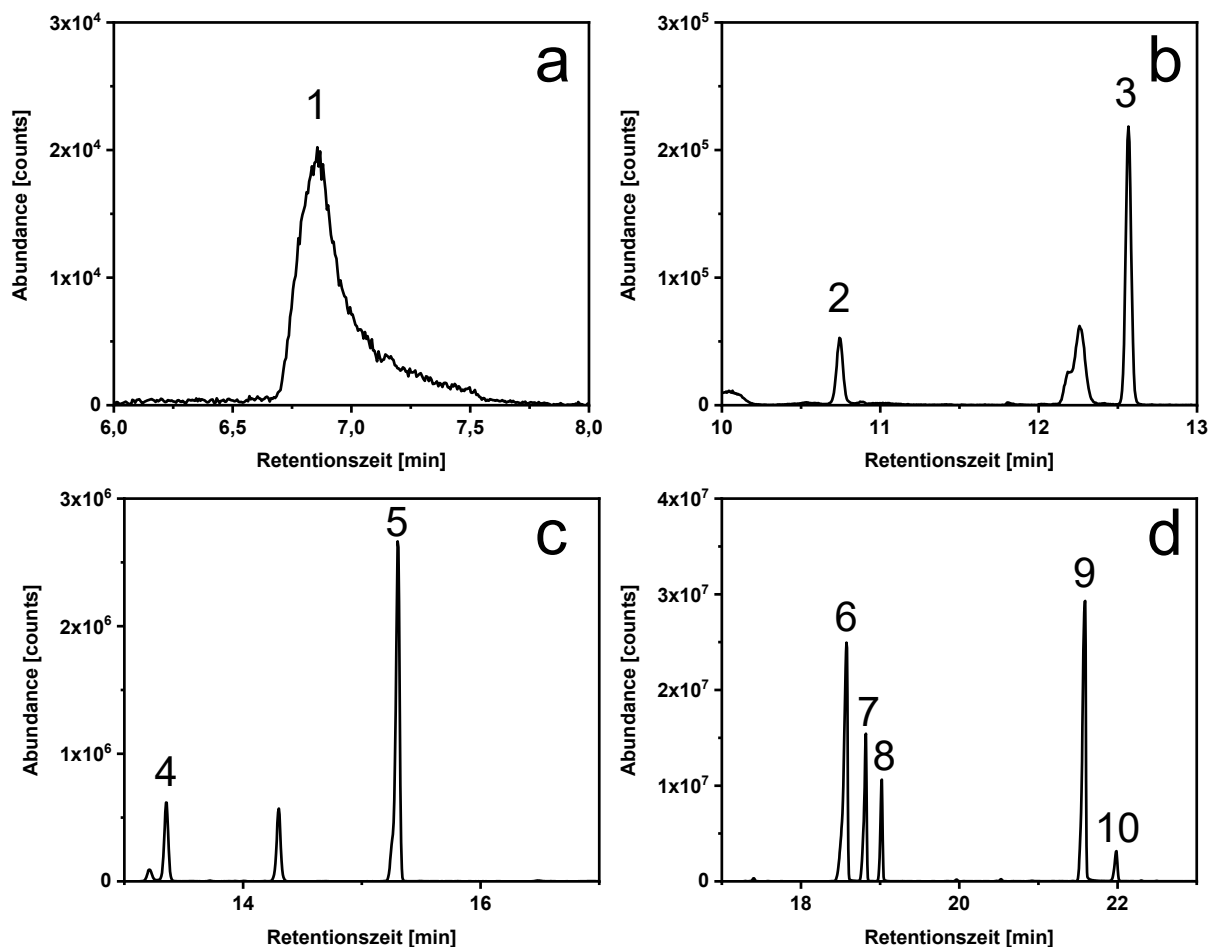


Abbildung 20: Ergebnis der, mit der immersiven Methode, auf dem TFME Film sorbierten Modellsubstanzen. Aus dem TIC sind Vergrößerungen im Retentionszeitbereich von a) 6-8 min, b) 10-13 min, c) 13-17 min und d) 17-23 min gezeigt. Die zugeordneten Modellsubstanzen sind Dimethylsulfid (1, 6,86 min), 2-Methylbutanal (2, 10,75 min), Dimethyldisulfid (3, 12,57 min), 2-Hexanon (4, 13,35 min), 2-Heptanon (5, 15,31 min), 1-Octanol (6, 18,58 min), 2-Nonanon (7, 18,82 min), 1-Undecen (8, 19,02 min), 1-Decanol (9, 21,60 min) und 2-Aminoacetophenon (10, 22,00 min)

Das in der Abbildung 20 gezeigte TIC der Analyse der zehn Metabolite von *P. aeruginosa* veranschaulicht, dass mit Hilfe der gewählten Methode Metabolite unterschiedlicher Substanzklassen analysiert werden können. Hierbei können sowohl Analyten mit einem hohen Dampfdruck wie Dimethylsulfid (1) und 2-Methylbutanal (2) als auch Metabolite mit einem geringen Dampfdruck wie 1-Decanol (9) detektiert werden. Des Weiteren ist anhand der Abbildung 20 zu beobachten, dass alle Analyten, mit Ausnahme von Dimethylsulfid, als schmale, gaußförmige Peaks eluieren. Zscheppank et al. [151] haben bereits eine Methode zur Analyse potenzieller volatiler Metabolite von *P. aeruginosa* publiziert. Die Autoren wiesen dabei auf ein Trennproblem zwischen den Metaboliten 2-Nonanon (7) und 1-Undecen (8) hin [151].

Dieses Trennproblem konnte mit der beschriebenen Methode gelöst werden. Darüber hinaus konnte das mit einer ähnlichen Retentionszeit eluierende 1-Octanol (6) von diesen separiert werden.

Zur weiteren Charakterisierung der TD-GC-qMS Methode wurden die Nachweis- (*engl.: limit of detection*; LOD) und Bestimmungsgrenzen (*engl.: limit of quantification*; LOQ) für eine quantitative Bestimmung der ausgewählten Modellsubstanzen ermittelt. Hierzu wurde eine TFME im immersiven Modus aus dem Multistandard durchgeführt, wobei die Analytkonzentration im Multistandard von 5 fM bis 500 μ M variiert worden ist. Die Bestimmung von LOD und LOQ erfolgte nach der 3σ -Methode von Kaiser und Specker [123]. Bei den aufgeführten LODs und LOQs handelt es sich um instrumentelle Nachweis- und Bestimmungsgrenzen der TD-GC-qMS Analysemethode. Eine Bestimmung von LOD und LOQ aus dem *in vitro* Biofilmmodell ist aufgrund der Kultivierungsmethode nur eingeschränkt möglich. Die auf den Agar aufgebrachte Lösung mit den Modellsubstanzen, muss zunächst antrocknen, damit bei der Inkubation über Kopf keine Flüssigkeit direkt auf den TFME Film tropfen kann, was zu einer ungewollten Erhöhung der Konzentration der Analyten führen könnte. Der Trocknungsschritt ist bei der Inokulation der Zellsuspension ebenfalls notwendig, allerdings erfolgt während der Kultivierung eine Vermehrung der Bakterienzellen sowie eine kontinuierliche Bildung und Emission von Metaboliten, wohingegen die Konzentration der Modellsubstanzen gleichbleibend ist, so dass vor allem die niedrigsiedenden Substanzen bereits teilweise während der Trocknung verdampfen. Dies führt zu falschen Werten für die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen, wodurch eine Anwendung dieser auf die Kultivierungs- und Beprobungsmethode nur sehr eingeschränkt möglich ist. Deswegen wurden ausschließlich instrumentelle LODs und LOQs mittels der immersiven TFME Methode bestimmt. In Tabelle 5 sind die ermittelten Nachweis- und Bestimmungsgrenzen für die ausgewählten Modellsubstanzen aufgeführt.

Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 5: Übersicht über die ermittelten instrumentellen Nachweis- (LOD) und Bestimmungsgrenzen (LOQ) für die ausgewählten Modellsubstanzen. Die Substanzen wurden auf einem TFME Film aus einem Multistandard im immersiven Modus adsorbiert und mit der beschriebenen TD-GC-qMS Methode analysiert. Die Konzentrationen der Modellsubstanzen im Multistandard wurden dabei zwischen 5 fM bis 500 μ M variiert.

Metabolit	Retentionszeit [min]	LOD [nM]	LOQ [nM]
Dimethylsulfid (1)	6,20	150.000	500.000
2-Methylbutanal (2)	9,57	150	500
Dimethyldisulfid (3)	11,42	150	500
2-Hexanon (4)	12,31	5	15
2-Heptanon (5)	14,31	0,5	1,5
1-Octanol (6)	17,52	0,5	1,5
2-Nonanon (7)	17,94	0,5	1,5
1-Undecen (8)	18,15	0,5	1,5
1-Decanol (9)	20,79	0,5	1,5
2-Aminoacetophenon (10)	21,27	0,5	1,5

Mit der entwickelten Methode können mittel- und hochsiedende Metabolite ab 500 fM nachgewiesen und ab 1,5 nM quantifiziert werden. Niedersiedende Metabolite, wie z.B. Dimethyldisulfid und 2-Methylbutanal, weisen mit einem LOD von 150 nM und einem LOQ von 500 nM deutlich größere Nachweis- und Bestimmungsgrenzen auf. Die größten Werte für LOD und LOQ zeigen sehr niedrig siedende Metabolite, wie z.B. Dimethylsulfid. Für die quantitative Bestimmung des Metabolits Dimethylsulfid wurden ein LOD von 150 μ M und ein LOQ von 500 μ M ermittelt.

Ein Vergleich der bestimmten Nachweis- und Bestimmungsgrenzen mit denen von bereits publizierten Methoden [98–100,151–153] zeigt, dass mit dieser Methode geringere Nachweis- und Bestimmungsgrenzen, insbesondere für mittel- und hochsiedende Analyten, erzielt werden. Diese Analyseverfahren ermöglicht somit die Quantifizierung von Metaboliten in nanomolaren Konzentrationen. Eine Quantifizierung von 2-Nonanon war zum Beispiel mit einer *Needle-Trap* GC-MS-Methode nur bis zu einer Konzentration von 7 μ M möglich [151]. Im Vergleich dazu

liegt das LOQ von 2-Nonanon für die hier beschriebene Methode bei 1,5 nM und somit mehr als drei Größenordnungen niedriger. Im Allgemeinen zeigt der Vergleich mit Zscheppank et al. [151], dass mit Ausnahme von Dimethylsulfid alle mittels TD-GC-qMS bestimmten Werte für LOD und LOQ um ein bis drei Größenordnungen niedriger liegen [151]. Die *Needle-Trap* Extraktion ist somit zwar eine geeignete Methode zur Analyse von Dimethylsulfid, aber mit der beschriebenen TD-GC-qMS Methode sind für die weiteren Modellsubstanzen aus anderen Substanzklassen sensitivere Analysen möglich. Hierdurch erscheint die TD-GC-qMS Methode für eine *suspected-target* Analyse von Metaboliten mit unterschiedlichsten Substanzklassen besser geeignet.

In bakteriellen Proben von *P. aeruginosa* konnte Dimethyldisulfid in einem Konzentrationsbereich zwischen 0,58 μM und 890 μM bestimmt werden [98–100,153]. Ähnliche Werte wurden in Realproben für Dimethylsulfid (860 μM) [99], 1-Undecen (0,34 μM) [100] und 2-Aminoacetophenon (1,06 μM) [153] ermittelt. Die Konzentrationen der Metabolite in den Publikationen wurden mittels verschiedener Beprobungs- und Analysenverfahren bestimmt, wie z.B. der Headspacebeprobung mit anschließender GC-MS Analyse oder der direkte Nachweis mit der *Direct-Inlet-Selected-Ion-Flow-Tube-Massenspektrometrie* (SIFT-MS). Im Vergleich der ermittelten LODs und LOQs mit den Konzentrationen in den Realproben, würden sich alle Substanzen mit der TD-GC-qMS Methode nachweisen und quantifizieren lassen. Allerdings ist zu beachten, dass die angegebenen LODs und LOQs aus einem wässrigen Standard bestimmt worden sind und somit die LODs und LOQs bei der Verwendung des *in vitro* Biofilmmodells abweichen können.

Zusammenfassend konnte mit der beschriebenen analytischen Methode eine Trennung von zehn potenziellen volatilen Metaboliten erzielt werden. Weiterhin konnten in der Literatur beschriebene Trennprobleme vermieden [151] und Analyten mit sehr hohen Dampfdrücken, wie dem Dimethylsulfid, detektiert werden. Die beschriebene Methode weist das Potential auf, in Kombination mit dem *in vitro* Biofilmmodell, extrazelluläre volatile Metabolite von *P. aeruginosa*, welche mittels TFME aufkonzentriert worden sind, zu detektieren. Des Weiteren besteht aufgrund der Kopplung von einer GC mit einem EI-qMS die Möglichkeit einer Zuordnung der Metabolite durch eine EI-Spektrendatenbank, wie z.B. der NIST-Datenbank. Allerdings erfolgte die Entwicklung der Methode lediglich mit Standards, welche mittels TFME immersiv beprobt worden sind. Dies entspricht nicht der eigentlichen

Ergebnisse und Diskussion

Beprobungsmethode mit der TFME im *in vitro* Modell. Deswegen ist eine Validierung des Systems, welche in dem Kapitel 5.2.3 beschrieben ist, durchzuführen.

5.2.3 Anwendung der TFME TD-GC-qMS Methode auf das *in vitro* Biofilmmodell

In diesem Kapitel soll die zuvor entwickelte Analysenmethode auf das *in vitro* Biofilmmodell angewendet werden. Eine Validierung der Ergebnisse aus Kapitel 5.2.2 soll zunächst mit Hilfe der Analyse des Multistandards und anschließend der Analyse des Referenzstamms *P. aeruginosa* ATCC 10145 erfolgen. Zur Validierung mit dem Multistandard ($c = 500 \mu\text{M}$) wurden $100 \mu\text{L}$ von diesem auf das LB- bzw. LBN-Agar-Nährmedium im *in vitro* Modell aufgebracht und im Anschluss für 48 Stunden aerob und anaerob kultiviert sowie der Gasraum mittels TFME beprobt. Die TFME Filme wurden danach mit der entwickelten TD-GC-qMS Methode analysiert. Die daraus erhaltenen Chromatogramme einschließlich der Zuordnung der Modellsubstanzen aus dem Multistandard sind in Abbildung 21 dargestellt. Die Zuordnung der Modellsubstanzen erfolgte mit Hilfe der NIST Datenbank.

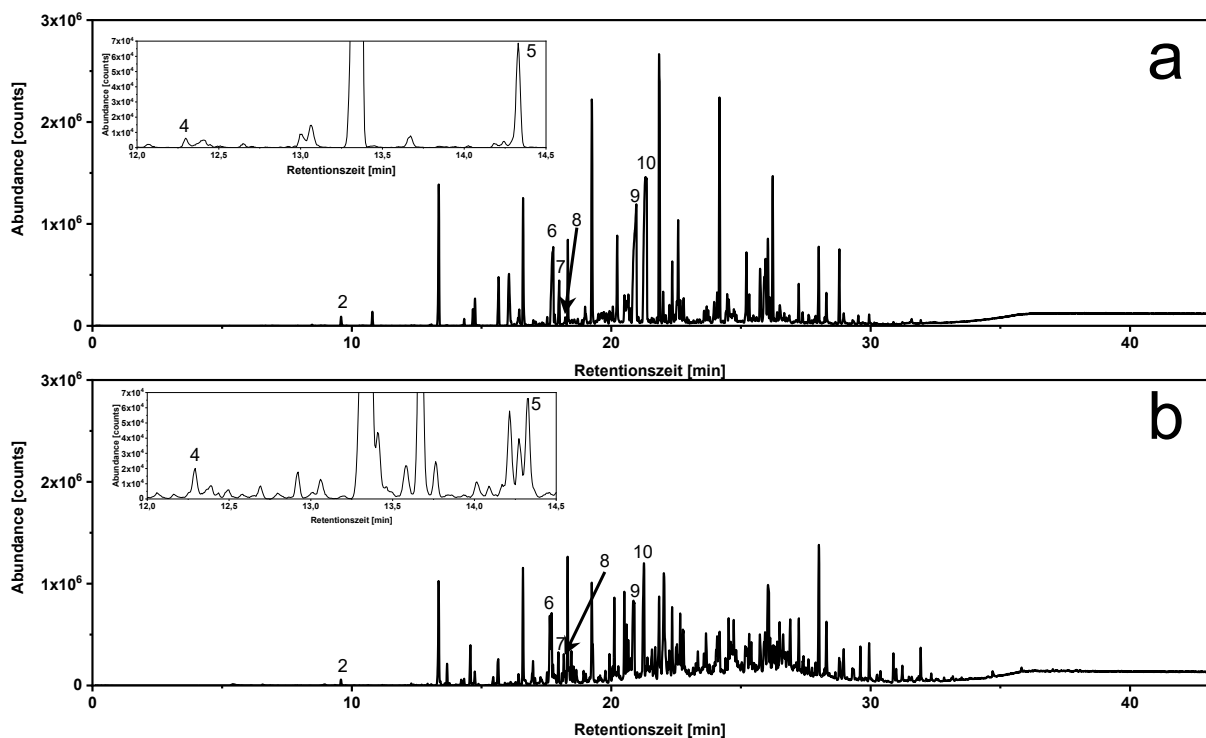


Abbildung 21: TICs der Analyse der volatilen Metabolite des Multistandards unter aeroben (a) und anaeroben (b) Kultivierungsbedingungen. $100 \mu\text{L}$ des Multistandards wurde auf dem LB- bzw. LBN-Agar ausplattiert und anschließend im *in vitro* Biofilmmodell kultiviert. Die Zuordnung der Peaks zu den Metaboliten wurden analog zu der Nummerierung in Tabelle 5 durchgeführt.

Ergebnisse und Diskussion

Mit Hilfe der entwickelten Methode konnten aus dem *in vitro* Biofilmmodell mit Nährmediummatrix unter aeroben und anaeroben Bedingungen acht Modellsubstanzen analysiert werden. Eine Detektion der sulfidischen Analyten Dimethylsulfid und Dimethyldisulfid konnte nicht beobachtet werden. Dieses kann durch die geringen Dampfdrücke der beiden Analyten erklärt werden [149,154]. Der Arbeitsschritt der Inokulation des wässrigen Multistandards wird innerhalb von zehn Minuten durchgeführt. Basierend auf dieser zeitlichen Limitierung kann vermutet werden, dass die Analyten Dimethylsulfid und Dimethyldisulfid bereits während der Inokulation und somit vor dem Einbringen des Sorptionsfilmes verdampfen. Dadurch ist eine Sorption dieser Analyten nicht möglich. Des Weiteren ist anhand der Chromatogramme in Abbildung 21 zu erkennen, dass im Vergleich zu den gereinigten Filmen ein hoher Hintergrund nachgewiesen werden kann. Dieser Hintergrund resultiert aus dem verwendeten Agarmedium (vgl. Anhang B, Abbildung 54). Aufgrund des hohen Hintergrundes ist eine Subtraktion des Blindwertes des verwendeten Nährmediums unerlässlich. Durch diese Subtraktion können bei der Charakterisierung des Metaboloms falsch positive Zuordnungen von Metaboliten verhindert werden.

Nach der erfolgreichen Validierung der Methode mit dem wässrigen Multistandard soll eine weitergehende Evaluierung der Methode durch die Untersuchung der flüchtigen Metabolite des Bakterienstammes *P. aeruginosa* ATCC 10145 erfolgen. Die bakteriellen Biofilme des Stammes wurden auf LB- bzw. LBN-Agar inokuliert und wie beschrieben unter aeroben und anaeroben Bedingungen kultiviert. In Abbildung 22 sind die Chromatogramme der beiden Analysen dargestellt.

Ergebnisse und Diskussion

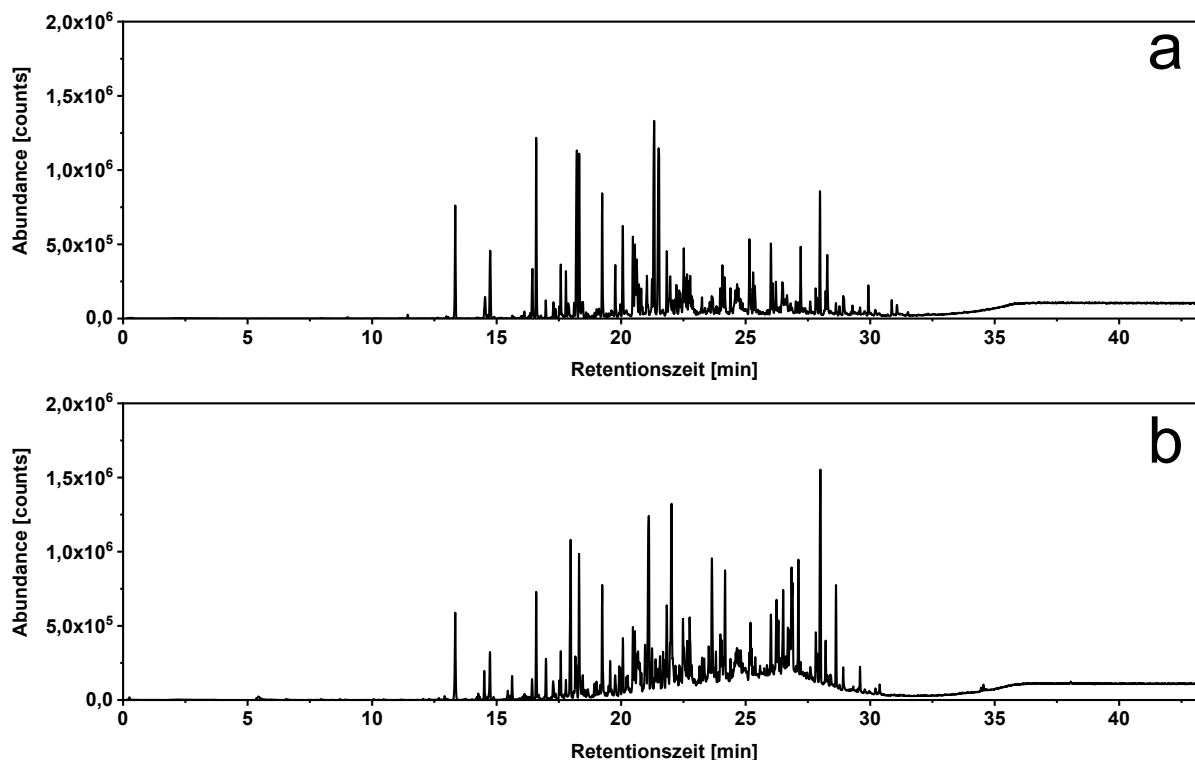


Abbildung 22: TIC der Analysen mit dem *in vitro* Biofilmmodell bei Verwendung des Stammes *P. aeruginosa* ATCC 10145 unter aeroben (a) oder anaeroben Bedingungen (b).

Qualitativ zeigt der Vergleich der beiden Chromatogramme, dass unter anaeroben Bedingungen deutlich mehr Analyten nachgewiesen werden. Allerdings gehören dazu viele Substanzen, welche in einem Retentionszeitenbereich zwischen 20 und 30 Minuten koeluiieren. Die Koelution resultiert aus der Überlagerung von Hintergrundpeaks des Nährmediums sowie den Peaks der Metaboliten. Aufgrund der limitierten Peakkapazität einer eindimensionalen GC können diese koeluiierenden und überlappenden Peaks nicht basisliniengetrengt dargestellt werden. Hierzu ist die Verwendung einer komprehensiven zweidimensionalen GC erforderlich (vgl. Kapitel 5.4). Mit Hilfe der NIST Datenbank sowie einer Subtraktion der Blindwerte konnten dennoch Metabolite den Peaks zugeordnet werden. Eine Zuordnung von Substanzen zu Peaks wurde ausschließlich bei einer Spektrenübereinstimmung von mehr als 80% vorgenommen. Unter Berücksichtigung dieser Bedingung konnten sechs Metabolite zugeordnet werden, die bereits als extrazelluläre volatile Metabolite des Bakteriums *P. aeruginosa* publiziert worden sind. Hierbei handelt es sich um die Metabolite Essigsäure, 1-Undecen, Methylpyrazin, Propansäure, 2-Undecanon und 2-Nonanon [92,99,152,155,156]. Die Metabolite 1-Undecen und 2-Nonanon wurden bereits mit der beschriebenen Methode analysiert, so dass zur Evaluierung ein

Ergebnisse und Diskussion

Retentionszeitenvergleich der korrespondierenden Peaks durchgeführt werden kann. In Tabelle 6 sind die ermittelten Retentionszeiten der Peaks der volatilen Metabolite 2-Nonanon und 1-Undecen der Analyse des Multistandards sowie des Bakteriums *P. aeruginosa* ATCC 10145 aus dem *in vitro* Biofilmmodell zusammengefasst.

Tabelle 6: Übersicht über die Retentionszeiten der Analyten 2-Nonanon und 1-Undecen bei einer Beprobung mittels TFME und anschließender TD-GC-qMS Analyse. Aufgeführt sind die Retentionszeiten der Beprobung des Multistandards aus dem *in vitro* Biofilmmodell und des Bakteriums *P. aeruginosa* ATCC 10145 aus dem *in vitro* Biofilmmodell.

Metabolit	RT (Multistandard) [min]		RT (<i>P. aeruginosa</i> ATCC 10145) [min]		Abweichung der RT (Multistd. vs. ATCC 10145)	
	aerob	anaerob	aerob	anaerob	absolut [s]	relativ [%]
2-Nonanon	17,99	17,96	-	17,95	0,6	0,06
1-Undecen	18,23	18,10	18,22	-	0,6	0,06

Der Vergleich der Retentionszeiten von der Analyse der mVOCs des Multistandards mit denen des Bakteriums *P. aeruginosa* ATCC 10145, jeweils aus dem *in vitro* Biofilmmodell, zeigt, dass die Retentionszeiten der Peaks der Metabolite bei beiden Probenarten um 0,06 % abweichen. Dies entspricht einer absoluten Abweichung von 0,6 s. Zum einen konnte mittels des Retentionszeitenvergleiches die Zuordnung der beiden Analyten durch die Datenbank verifiziert werden. Zum anderen zeigt der Vergleich, dass mit dem *in vitro* Biofilmmodell und der entwickelten Beprobungs- und Analysenmethode eine Charakterisierung des extrazellulären volatilen Metaboloms bakterieller Biofilme von *P. aeruginosa* sowie eine Zuordnung einzelner Peaks zu den Metaboliten möglich ist. Ein weiterer Vergleich der Retentionszeiten, mit denen aus veröffentlichten Arbeiten ist nicht möglich, da die Autoren unterschiedliche Methoden zur Beprobung (z.B.: SPME, TD) und Analyse (z.B.: GC-MS, GCxGC-qMS, GC-FID, SIFT-MS) der Metabolite verwendet haben. Zusätzlich wurden bei den GC Analysen Chromatographiesäulen mit unterschiedlichen stationären Phasen, Längen, Innendurchmessern und Filmdicken verwendet [104]. Außerdem erfolgte die Kultivierung der *P. aeruginosa* Stämme ausschließlich planktonisch und unter aeroben Bedingungen. Aufgrund dieser Abweichungen ist ein Vergleich der Retentionszeiten nicht sinnvoll.

Ergebnisse und Diskussion

Nachteilig bei der analytischen Untersuchung biologischer Systeme, wie der Charakterisierung von Metabolomen, ist die biologische Variabilität. Die biologische Variabilität kann z.B. zu signifikanten Variationen der Analytkonzentration führen. Damit reproduzierbare Analysen des Metaboloms gewährleistet werden können, ist eine Überprüfung der Wiederholbarkeit der Kultivierung inkl. der Analyse des extrazellulären volatilen Metaboloms notwendig. Hierzu wurden an drei verschiedenen Tagen drei technische Replikate des Bakteriums *P. aeruginosa* ATCC 10145 im *in vitro* Biofilmmodell kultiviert sowie das extrazelluläre volatile Metabolom mittels TFME beprobt und anschließend analysiert. Die Kultivierung erfolgte sowohl unter aeroben als auch unter anaeroben Bedingungen. Im Anhang B (Abbildung 48 und Abbildung 49) sind die erhaltenen Chromatogramme der Analyse der extrazellulären volatilen Metabolite unter aeroben und anaeroben Kultivierungsbedingungen gezeigt. Qualitativ sind bei dem Vergleich der Chromatogramme nur geringfügige Unterschiede bei beiden Kultivierungsbedingungen zu beobachten. Für einen quantitativen Vergleich wurden die Retentionszeiten, die Peakflächen und -Höhen sowie der NIST Datenbank *scores* von drei Metabolitpeaks je Kultivierungsbedingung bestimmt. Die ermittelten Werte für die Analyse von extrazellulären volatilen Metaboliten des Bakteriums *P. aeruginosa* ATCC 10145 im *in vitro* Biofilmmodell unter aeroben Kultivierungsbedingungen sind in Tabelle 7 aufgeführt.

Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 7: Zusammenfassung der berechneten Mittelwerte, Standardabweichungen und relativen Standardabweichungen der Retentionszeit, Peakfläche und -höhe sowie des NIST scores für neun Replikate der TD-GC-qMS Analyse von extrazellulären volatilen Metaboliten im in vitro Biofilmmodell unter aeroben Kultivierungsbedingungen. Ausgewertet wurden die Signale von 1-Undecen, Cyclododekan und 2-Methylquinoxalin. Bei den neun Replikaten handelt es sich um je drei technische Replikate von drei biologischen Replikaten des Bakteriums *P. aeruginosa* ATCC 10145.

Metabolit	Retentionszeit		Peakfläche		Peakhöhe		NIST score
	MW ± SD [min]	RSD [%]	MW ± SD [counts·min ⁻¹]	RSD [%]	MW ± SD [counts]	RSD [%]	MW ± SD [%]
1-Undecen	18,20 ± 0,01	0,05	63812,1 ± 4672	7	1281101 ± 140900	11	94 ± 1
Cyclododekan	19,75 ± 0,01	0,04	12986,4 ± 1881	14	330734 ± 46777	14	87 ± 2
2-Methylquinoxalin	21,31 ± 0,01	0,04	83958,8 ± 7129	8	1551301 ± 144842	9	95 ± 1

Mit der Analysenmethode wurden absolute Abweichungen der Retentionszeiten von 0,6 s (rel. Abweichung: 0,04% - 0,05%) beobachtet. Unter Berücksichtigung der in der GC üblichen Peakbreiten von 6 s, kann die beschriebene Analysemethode als reproduzierbar eingestuft werden. Bei den ermittelten Peakflächen und -höhen ist im Vergleich zu den Retentionszeiten eine größere Varianz zu beobachten. Die relative Standardabweichung für die Peakfläche liegt zwischen 7% und 14% für die betrachteten Analyten und die der Peakhöhe zwischen 9% und 14%. Eine Varianz in der Peakfläche kann zum einen durch Integrationsungenauigkeiten erklärt werden. Zum anderen führt die biologische Variabilität des Bakteriums zu einer Varianz im Metabolismus, wodurch die Konzentration der Metabolite variieren kann. Des Weiteren erfolgt die Beprobung der extrazellulären volatilen Metabolite über einen Zeitraum von 48 Stunden, so dass Variationen im Wachstum der Bakterien zu einer früheren oder späteren Emission von Metaboliten sowie unterschiedlichen Konzentrationen führen kann. Weiterhin ist trotz der Variation der Peakflächen und -höhen eine Zuordnung der Peaks zu den Metaboliten mittels der NIST Datenbank möglich. Die Tabelle 7 zeigt, dass bei den untersuchten Metaboliten eine Varianz des NIST score von 2% oder weniger ermittelt wurde. Unter Berücksichtigung der biologischen Variabilität sind die

Ergebnisse und Diskussion

mit dieser Methode erhaltenen Abweichungen gering, so dass reproduzierbare Charakterisierungen des extrazellulären Metaboloms unter aeroben Kultivierungsbedingungen durchgeführt werden können.

Tabelle 8 fasst die berechneten Werte für die Analyse von extrazellulären volatilen Metaboliten des Bakteriums *P. aeruginosa* ATCC 10145 im *in vitro* Biofilmmodell unter anaeroben Kultivierungsbedingungen zusammen.

Tabelle 8: Zusammenfassung der berechneten Mittelwerte, Standardabweichungen und relativen Standardabweichungen der Retentionszeit, Peakfläche und -höhe sowie des NIST scores für neun Replikate der TD-GC-qMS Analyse von extrazellulären volatilen Metaboliten im *in vitro* Biofilmmodell unter anaeroben Kultivierungsbedingungen. Ausgewertet wurden die Signale von 2,5-Dimethyl-pyrazin, 2-Nonanon und 2-Undecanon. Bei den neun Replikaten handelt es sich um je drei technische Replikate von drei biologischen Replikaten des Bakteriums *P. aeruginosa* ATCC 10145.

Metabolit	Retentionszeit		Peakfläche		Peakhöhe		NIST score
	MW \pm SD [min]	RSD [%]	MW \pm SD [counts·min ⁻¹]	RSD [%]	MW \pm SD [counts]	RSD [%]	MW \pm SD [%]
2,5-Dimethyl-pyrazin	14,72 \pm 0,01	0,1	8816,4 \pm 1938	22	217703 \pm 59292	27	86 \pm 0
2-Nonanon	17,94 \pm 0,01	0,1	29028 \pm 8341	29	742064 \pm 191740	26	94 \pm 1
2-Undecanon	21,07 \pm 0,01	0,1	51914,1 \pm 15254	29	1138684 \pm 261261	23	96 \pm 1

Analog zu den Beobachtungen unter aeroben Bedingungen, weisen die Retentionszeiten der Metabolite bei einer anaeroben Kultivierung ebenfalls nur geringfügige Abweichungen auf. Die relative Standardabweichung der Retentionszeiten der betrachteten Peaks der Metabolite liegt bei 0,1% und die absolute Abweichung bei 0,6 s, so dass auch die Analyse von anaerob erzeugten Metaboliten reproduzierbar mittels der entwickelten Analysenmethode detektiert werden können. Die relativen Standardabweichungen der Peakflächen und -höhen sind bei einer anaeroben Kultivierung um ca. 10% größer. Für die Peakflächen wurden relative Standardabweichungen von 22% bis 29% und für die Peakhöhen von 23% bis 27% ermittelt. Generell können die Abweichungen der Peakflächen und -höhen ebenfalls auf Integrationsungenauigkeiten, die Beprobungsmethode sowie die

Ergebnisse und Diskussion

biologische Variabilität zurückgeführt werden. Die biologische Variabilität ist allerdings nicht ursächlich für die erhöhten relativen Standardabweichungen im Vergleich zu den Ergebnissen der aeroben Kultivierung. Dies ist damit zu begründen, dass die biologische Variabilität bei der Betrachtung von neun Replikaten im Mittel zwischen anaerober und aerober Kultivierung nicht deutlich variieren sollte. Allerdings könnten die erhöhten Varianzen bei der Analyse der anaeroben Kulturen durch den Kultivierungsprozess erklärt werden. Zur Erzeugung einer vollständig sauerstofffreien Atmosphäre wird ein Katalysator eingesetzt, welcher den Luftsauerstoff im anaeroben Topf zu CO₂ umsetzt. Im Mittel wird hierfür laut Hersteller eine Dauer von 70 Minuten benötigt. Allerdings ist eine Varianz dieser Zeit in Abhängigkeit von der Katalysatorbeschaffenheit, welche von Batch zu Batch variieren kann, möglich. Hierdurch variieren schließlich die Zeiten, in der die Bakterien anaerob kultiviert werden, wodurch es zu einer größeren Varianz der Metabolitkonzentrationen kommen kann. Die Varianz der Metabolitkonzentrationen hat dabei einen direkten Einfluss auf die Peakflächen und -höhen. Analog zu den Ergebnissen der aeroben Kultivierung weisen auch bei einer anaeroben Kultivierung die NIST scores eine sehr geringe Abweichung auf. Für die Peaks der betrachteten Metabolite betrug die größte Abweichung des NIST scores 1%.

Zusammenfassend konnte in diesem Kapitel gezeigt werden, dass mit der entwickelten Beprobungsmethode in Kombination mit der TD-GC-qMS Methode eine Detektion von extrazellulären volatilen Metaboliten möglich ist. Des Weiteren wurde die Beprobungs- und Analysemethode hinsichtlich der Reproduzierbarkeit überprüft. Trotz der biologischen Variabilität der Bakterienkulturen wurden Abweichungen der Peakflächen und -höhen unterhalb von 30% ermittelt. Weiterhin konnten erste extrazelluläre Metabolite mit einer EI-MS Datenbank und die Metabolite 1-Undecen und 2-Nonanon zusätzlich über einen Vergleich der Retentionszeiten der korrespondierenden Peaks mit Standards zugeordnet werden. Das entwickelte *in vitro* Biofilmmodell sowie die TFME Beprobungsmethode in Kombination mit der TD-GC-qMS Methode stellt ein leistungsfähiges Verfahren zur Charakterisierung von Biofilmen des Bakteriums *P. aeruginosa* dar. Im folgenden Kapitel 5.3 werden die Ergebnisse der Anwendung dieses Verfahren auf die Analyse weiterer Stämme des Bakteriums *P. aeruginosa* präsentiert. Insbesondere werden die Ergebnisse zur Charakterisierung

Ergebnisse und Diskussion

des extrazellulären volatilen Metaboloms von *P. aeruginosa* Stämmen unter CF-ähnlichen Bedingungen in einer *in vitro* Studie dargestellt.

5.3 Charakterisierung des extrazellulären volatilen Metaboloms von *P. aeruginosa* im *in vitro* Biofilmmodell unter CF-ähnlichen Bedingungen

Das entwickelte *in vitro* Biofilmmodell sowie das Beprobungs- und Analysensystem soll in diesem Kapitel für die Charakterisierung des extrazellulären volatilen Metaboloms von drei Stämmen des Bakteriums *P. aeruginosa* eingesetzt werden.

Zunächst sollen Untersuchungen bezüglich verschiedener Einflüsse auf das extrazelluläre volatile Metabolom von *P. aeruginosa* im Kontext von Atemwegsinfektionen bei der CF-Erkrankung durchgeführt werden. Die Notwendigkeit solcher Untersuchungen basiert auf der Variabilität des Metaboloms von Bakterien als Reaktion auf verschiedene Einflüsse, wie z.B. den Nährstoffmangel und die Sauerstoffkonzentration [105,157]. Darüber hinaus ist *P. aeruginosa* ein Bakterium, welches sich besonders gut an unterschiedliche Bedingungen anpasst und in der Lage ist, den Phänotyp des Bakterienstamms während der Besiedlung der Atemwege zu verändern. Diese Veränderung des Phänotyps kann adaptiv oder durch genotypische Veränderungen (Mutationen) erfolgen. Zum Beispiel konnte die Entwicklung von nicht-mukoiden Stämmen des Bakteriums *P. aeruginosa* zu mukoiden Stämmen in besiedelten CF-Lungen nachgewiesen werden [1]. Damit eine Übertragung der aus den *in vitro* Studien erhaltenen Ergebnisse auf *in vivo* Untersuchungen sowie eine Vergleichbarkeit zwischen verschiedenen Studien gewährleistet werden kann, sollten *in vitro* Studien im Kontext einer Erkrankung, wie z.B. Mukoviszidose, unter Bedingungen wie im menschlichen Körper durchgeführt werden. Bos et al. [104] haben bereits die mangelnde Vergleichbarkeit von publizierten Metabolomstudien zu verschiedenen bakteriellen Erregern kritisiert.

Abschließend soll dann eine *in vitro* Charakterisierung des extrazellulären volatilen Metaboloms von den drei Stämmen des Bakteriums *P. aeruginosa* erfolgen, wobei die Kultivierung der Bakterienstämme im *in vitro* Biofilmmodell unter ähnlichen Bedingungen zu einer CF-Lunge durchgeführt wird. Als Bakterienstämme werden zum einen der Typstamm des *P. aeruginosa* ATCC 10145 verwendet [124]. Zum anderen werden zwei klinische Isolate des Bakteriums *P. aeruginosa* eingesetzt. Der Stamm

PAO1 wurde 1955 in Melbourne aus einer infizierten Wunde isoliert [125] und das Genom wurde 2000 von Stover et al. [158] vollständig sequenziert. Das zweite klinische Isolat, der Stamm FRD1, ist ein mukoider, alginatbildender Stamm, der aus dem Lungensputum eines CF-Patienten isoliert worden ist [126]. Das Genom von FRD1 wurde von Silo-Suh et al. [159] vollständig sequenziert. Die Zuordnung der Peaks zu den extrazellulären volatilen Metabolite der drei Bakterienstämme erfolgte im Anschluss an die Analyse mittels TD-GC-qMS. Hierfür wurde eine metabolitenspezifische GC-MS-Datenbank namens MassBank of North America (MONA) von Oliver Fiehn auf den Datensatz angewendet [160]. Ausschließlich Metabolite mit einem *score* $\geq 80\%$ wurden als zugeordnet betrachtet. Bei einer Zuordnung ausschließlich mittels einer EI-MS Datenbank sind verschiedene Limitierungen zu beachten. Zum einen ist für eine eindeutige Zuordnung von Substanzen mit einem EI-qMS die Verifizierung der Datenbankergebnisse mittels authentischer Standards und einem Vergleich der Retentionszeiten oder mittels Kovacs Retentionsindex [161] notwendig. Zum anderen ist bei einer Zuordnung mittels Datenbank zu beachten, dass vor allem bei substituierten Molekülen die Substitutionsposition nicht eindeutig bestimmt werden kann. Außerdem ist mit Hilfe der Datenbank eine genaue Bestimmung der Anzahl an C-Atomen in Kohlenwasserstoffketten, aufgrund ähnlicher Fragmentierungen in der EI-Quelle, limitiert. Durch diese Limitierungen kann es zu Abweichungen bei den angegeben, zugeordneten Moleküle kommen und zusätzlich können unterschiedliche Features demselben Molekül zugeordnet worden sein. Die Zuordnung sowie die angegeben Moleküle in diesem Kapitel müssten durch Retentionszeitenvergleich mit authentischen Standards oder dem Kovacs Retentionsindex [161] verifiziert werden. Allerdings ist mit der Zuordnung eine Einordnung der Substanzklasse sowie der ungefähren Anzahl der C-Atome der Kohlenwasserstoffketten und möglichen Substitutionen, mit Ausnahme der Substitutionsposition, möglich.

Ergebnisse und Diskussion

5.3.1 Vergleich des extrazellulären volatilen Metaboloms von *P. aeruginosa* bei unterschiedlicher Sauerstoffverfügbarkeit

Untersuchungen des Metaboloms von *P. aeruginosa* können unter aeroben oder anaeroben Bedingungen durchgeführt werden. Worlitzsch et al. [7] und Hassett et al. [30] haben bereits beschrieben, dass *P. aeruginosa* hauptsächlich in mikroaerophilen und anaeroben Bereichen des Mukus von CF-Patienten nachgewiesen werden konnte. Basierend auf diesen Erkenntnissen, ist ein überwiegendes Wachstum von *P. aeruginosa* unter anaeroben Bedingungen wahrscheinlich, so dass für Metabolomuntersuchungen unter CF-ähnlichen Bedingungen eine anaerobe Wachstumsatmosphäre gewählt werden sollte. Am Beispiel des Stamms *P. aeruginosa* ATCC 10145 soll zunächst eine Untersuchung des Einflusses der Wachstumsatmosphäre auf das extrazelluläre volatile Metabolom erfolgen. Hierzu wurden je Wachstumsatmosphäre drei biologische sowie von diesen biologischen Replikaten drei technische Replikate des Bakterienstammes im *in vitro* Biofilmmodell kultiviert (vgl. Kapitel 5.2.3). Hierzu wurde für die aerobe Kultivierung LB-Agar und für die anaerobe Kultivierung LBN-Agar verwendet (vgl. Kapitel 4.3.3.1). Die erhaltenen Chromatogramme sind in Abbildung 22 (s. Seite 92) sowie im Anhang B gezeigt.

Zur Analyse des Einflusses der Sauerstoffverfügbarkeit auf das extrazelluläre volatile Metabolom von *P. aeruginosa* ATCC 10145, wurde eine Hauptkomponentenanalyse (engl.: *principal component analysis*; PCA) durchgeführt. Die aus dieser Analyse erhaltenen *scores* und *loadings plot* sind in Abbildung 23 graphisch dargestellt.

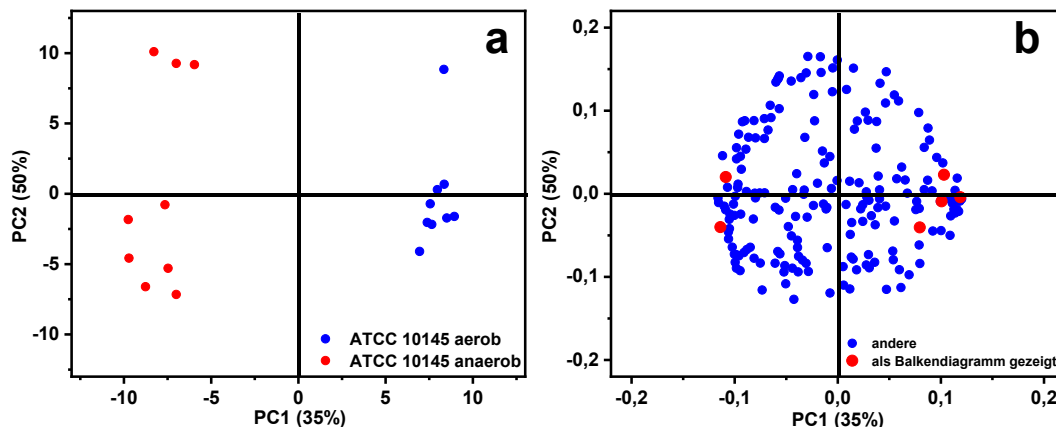


Abbildung 23: Statistischer Vergleich zweier unterschiedlicher Wachstumsatmosphären (aerob und anaerob) bei der Kultivierung von *P. aeruginosa* ATCC 10145 im in vitro Biofilmmmodell mittels einer PCA. Die Abbildung a zeigt den scores plot und die Abbildung b den loadings plot. Im loadings plot sind die Metabolite gekennzeichnet, welche in Abbildung 24 als Balkendiagramm gezeigt sind.

Eine Unterscheidung zwischen der Kultivierung von *P. aeruginosa* ATCC 10145 unter aeroben (blaue Punkte) und anaeroben Bedingungen (rote Punkte) ist mittels zweier Hauptkomponenten möglich (Abbildung 23 a). Die erste Hauptkomponente erklärt die Varianz zwischen den beiden Wachstumsatmosphären und die zweite Hauptkomponente die Varianz innerhalb der beiden Gruppen. In Summe kann mit den ersten beiden Hauptkomponenten eine Varianz zwischen den beiden Bedingungen von 85 % erklärt werden. Mit Hilfe des *scores plot* kann somit ein deutlicher Einfluss der Wachstumsatmosphäre auf das extrazelluläre volatile Metabolom von *P. aeruginosa* ATCC 10145 gezeigt werden. Die Streuung der Messwerte innerhalb einer Gruppe (aerobe oder anaerobe Bedingungen) kann anhand des *scores plot* qualitativ bei der Kultivierung unter aeroben Bedingungen als geringer beschrieben werden als bei einer Kultivierung unter anaeroben Bedingungen. Weiterhin ist visuell unter aeroben Bedingungen ein Ausreißer und bei anaeroben Bedingungen sind drei Ausreißer zu beobachten, die sich deutlich von den anderen Proben unterscheiden und einen stark positiven score auf der PC2 zeigen. Bei den Ausreißern der anaeroben Kultivierung handelt es sich um das dritte technische Replikat des dritten biologischen Replikates sowie um das zweite und dritte technische Replikat des ersten biologischen Replikates. Eine biologische Varianz, kann aufgrund der unterschiedlichen technischen Replikate und der allgemein homogenen Streuung ausgeschlossen werden. Die Abweichung dieser drei Proben könnte auf eine ungleichmäßige

Ergebnisse und Diskussion

Inokulation der Zellsuspension zurückgeführt werden. Dies könnte ein inhomogenes Biofilmwachstum bezogen auf die Dicke des Biofilmes zur Folge haben und somit zu einer inhomogenen Freisetzung von Metaboliten führen. Weiterhin kann im Allgemeinen eine Variation der Zeit zwischen der Öffnung der Anaerobtöpfe und der Entfernung der TFME Filme aus dem *in vitro* Modell sowie dem Einbringen der TFME Filme in das *in vitro* Modell und dem Anaerobtopf zu Abweichungen führen. Das Bakterium *P. aeruginosa* ist in der Lage auf Veränderungen in der Umgebung zu reagieren [1] und in dem beschriebenen Fall z.B. von aerober auf anaerobe Atmung umstellen. Hierdurch würden Metabolite in einer anderen Konzentration freigesetzt und somit Unterschiede in der Signalintensität verursacht. Bei dem abweichenden Replikat der aeroben Kultivierung handelt es sich um das dritte technische Replikat des dritten biologischen Replikates. Diese Abweichung ist visuell bei dem Vergleich der TICs zu beobachten (Abbildung 48 und Abbildung 49 im Anhang A), da die Signalintensität bei diesem Replikat ungefähr eine halbe Zehnerpotenz geringer ist als bei den anderen Replikaten. Hierdurch kann vermutet werden, dass die Abweichung durch das analytische Messsystem verursacht worden ist. Aufgrund der hohen Reproduzierbarkeit des GC-MS Systems wird vermutet, dass bei der Erhitzung der Filme im Thermodesorptionssystem oder bei der Überführung der Analyten mittels einer Transferkapillare von dem Thermodesorptionssystem in den GC-Injektor Analytverluste aufgetreten sind, welches wiederum in einer geringeren Signalintensität resultiert.

Der zugehörige *loadings plot* (Abbildung 23 b) stellt die Varianz der Feature bezogen auf die beiden Hauptkomponenten dar. Unter Berücksichtigung des *scores plot* können anhand des *loadings plot* Feature ermittelt werden, deren Signale eine deutliche Erhöhung der Intensität unter anaeroben (linke Seite im *loadings plot*) bzw. unter aeroben Bedingungen (rechte Seite im *loadings plot*) aufweisen. Die Signifikanz dieser Erhöhung soll mit einer Signifikanzanalyse (t-Test) ermittelt werden. Hierzu werden allerdings nur die Feature verwendet, bei denen eine Zuordnung zu einem Metaboliten mit ausreichender Sicherheit (Übereinstimmungswahrscheinlichkeit $\geq 80\%$) durchgeführt werden kann. Mit der Signifikanzanalyse (t-Test, zweiseitige Verteilung, heteroskedastisch) konnten 50 Metabolite ermittelt werden, deren Signale eine signifikante Abweichung (Bedingung: $p \geq 0,05$) der Intensität aufweisen. Bei neun Metaboliten konnte bei den zu den Metaboliten korrespondierenden Peaks eine

Ergebnisse und Diskussion

Abweichung der Intensität mit einer statistisch signifikanten Wahrscheinlichkeit von 95% ($p \geq 0,05$; *), bei 17 Metaboliten mit einer statistisch signifikanten Wahrscheinlichkeit von 99% ($p \geq 0,01$; **) und bei 24 Metaboliten mit einer statistisch signifikanten Wahrscheinlichkeit von 99,9% ($p \geq 0,001$; ***) festgestellt werden. Diese Metabolite sind im Anhang B in Tabelle 16 aufgeführt. Die Zuordnung der Peaks zu den Metaboliten erfolgte mit der MoNA Datenbank, wobei ausschließlich Metabolite als zugeordnet deklariert worden sind, welche eine Übereinstimmungswahrscheinlichkeit von $\geq 80\%$ aufwiesen. Beispielhaft wurden je Wachstumsatmosphäre vier Metabolite ausgewählt und in Form von Balkendiagrammen in Abbildung 24 dargestellt.

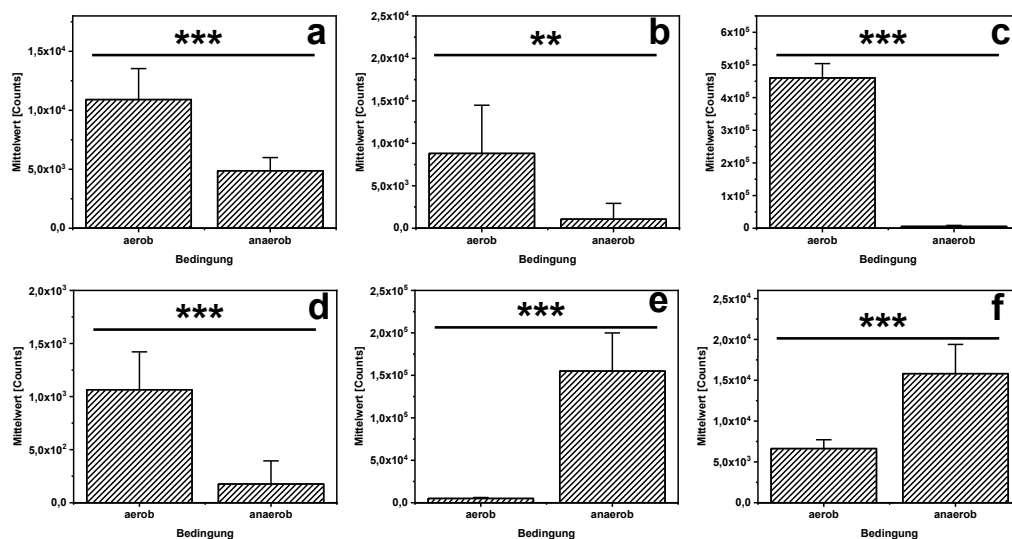


Abbildung 24: Graphische Darstellung des Vergleiches der Signalintensität unter aeroben und anaeroben Kultivierungsbedingungen von acht verschiedenen Metaboliten bei der Kultivierung von *P. aeruginosa* ATCC 10145 im in vitro Biofilmmodell. Die Mittelwerte der Signalintensitäten sowie die zugehörigen Standardabweichungen ($n = 9$) sind als Balkendiagramme dargestellt. Die Signifikanzanalyse der Differenz der Signalintensitäten wurde mit Hilfe eines t-Tests ($n = 9$, zweiseitige Verteilung, heteroskedastisch) durchgeführt. Die gezeigten Metabolite sind: a = 2-Methylpyrazin, b = Dimethyldisulfid, c = 5-Aminoquinolin, d = Methyl Isothiocyanat, e = 2-Nonanon, f = 2-Ethylhexanol. * = 0,05; ** = 0,01; *** = 0,001.

In Abbildung 24 sind die Mittelwerte der Intensitäten von den Peaks der beispielhaft ausgewählten Metabolite mit den zugehörigen Standardabweichungen sowie dem Konfidenzlevel in Form von Balkendiagrammen gezeigt. Der p-Wert lag bei allen gezeigten Metaboliten unterhalb von 0,01, so dass eine signifikante Abweichung der Signalintensität mit einer statistischen Wahrscheinlichkeit von $\geq 99\%$ angegeben werden kann. Unter Berücksichtigung der Standardabweichungen ist dieses bei allen gezeigten Metaboliten bereits visuell zu beobachten.

Ergebnisse und Diskussion

Zusätzlich zu einer Variation der Signalintensität bei einer Kultivierung unter anaeroben bzw. aeroben Bedingungen konnte gezeigt werden, dass zum Beispiel 1-Undecen und 2-Undecanon ausschließlich unter aeroben bzw. anaeroben Bedingungen detektiert werden konnte. In Abbildung 25 ist dieses beispielhaft anhand der beiden TICs gezeigt.

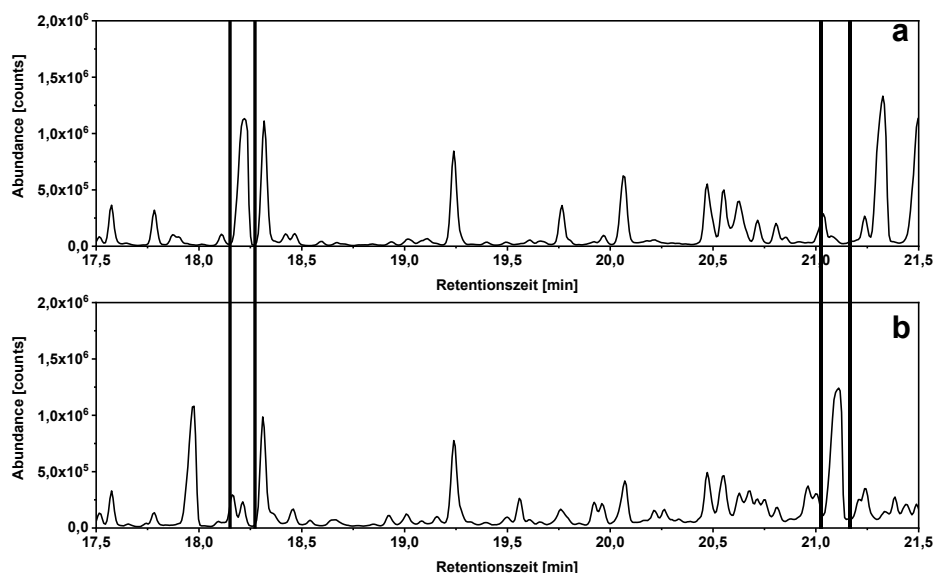


Abbildung 25: Beispiel für die Differenzierung der Kultivierungsbedingungen auf der Grundlage extrazellulärer flüchtiger Metaboliten. Zu diesem Zweck ist ein Ausschnitt der TICs aus der Abbildung 22 der Analyse von *P. aeruginosa* ATCC 10145 im Zeitraum von 17,5 min bis 21,5 min für aerobe (a) und anaerobe (b) Bedingungen dargestellt. Der linke Peak markiert den Metaboliten 1-Undecen, welcher nur unter aeroben Bedingungen gebildet wird. Im Chromatogramm der anaeroben Wachstumsbedingungen kann ein Peak bei gleicher Retentionszeit beobachtet werden. Dieser Peak resultiert jedoch aus dem LBN-Agar und ist auch im Verfahrensblank zu beobachten. Das zweite Beispiel (rechter Peak) zeigt 2-Undecanon, das nur unter anaeroben Bedingungen nachgewiesen werden kann.

1-Undecen (Retentionszeit = 18,21 min), konnte ausschließlich bei einer Kultivierung unter aeroben Bedingungen nachgewiesen werden. Die beiden Peaks, welche im TIC der anaeroben Kultivierung bei einer ähnlichen Retentionszeit zu erkennen sind, konnten ebenfalls in den Blankproben (Abbildung 54 im Anhang B) detektiert werden, so dass diese Substanzen dem Nährmedium zugeordnet werden können. Analog dazu konnte bei einer Retentionszeit von 21,09 min nur bei einer anaeroben Kultivierung 2-Undecanon detektiert werden. Wie in Abbildung 25 zu erkennen ist, wurde bei einer ähnlichen Retentionszeit bei der aeroben Kultivierung kein Peak detektiert.

Der Vergleich des extrazellulären volatilen Metaboloms von *P. aeruginosa* am Beispiel des Referenzstammes *P. aeruginosa* ATCC10145 hat gezeigt, dass die Kultivierung unter aeroben und anaeroben Bedingungen einen deutlichen Einfluss auf das

extrazelluläre volatile Metabolom hat. Die Möglichkeit des Bakterienwachstums unter anaeroben Bedingungen resultiert aus der Umstellung des Bakteriums von Sauerstoff- auf Nitratatmung [7,85]. Durch die Abwesenheit von Sauerstoff kann es dazu kommen, dass verschiedene Stoffwechselwege nicht ablaufen können. Auf der anderen Seite können andere Stoffwechselwege, die auf Denitrifikation basieren, auftreten. Dies könnte eine Variation der Intensitäten der Peaks von verschiedenen Metaboliten zur Folge haben. Weiterhin könnte hierdurch die ausbleibende Detektion der Peaks einiger Metabolite unter aeroben bzw. anaeroben Bedingungen erklärt werden.

Darüber hinaus wurden weitere Untersuchungen hinsichtlich des Einflusses der Sauerstoffverfügbarkeit auf das extrazelluläre volatile Metabolom durchgeführt. Hierzu wurde das extrazelluläre volatile Metabolom der beiden klinischen Isolate *P. aeruginosa* PAO1 und FRD1 unter aeroben Kultivierungsbedingungen mit dem unter anaeroben Bedingungen verglichen. Die TICs der TD-GC-qMS Analysen der extrazellulären volatilen Metabolite der beiden Bakterienstämme sind im Anhang B (Abbildung 50 bis Abbildung 53) gezeigt. Hierzu wurde zunächst, analog zu den Untersuchungen am Bakterienstamm *P. aeruginosa* ATCC 10145, eine PCA und anschließend eine Signifikanzanalyse durchgeführt. Die aus der PCA erhaltenen *scores* und *loadings plots* sind in Abbildung 26 gezeigt.

Ergebnisse und Diskussion

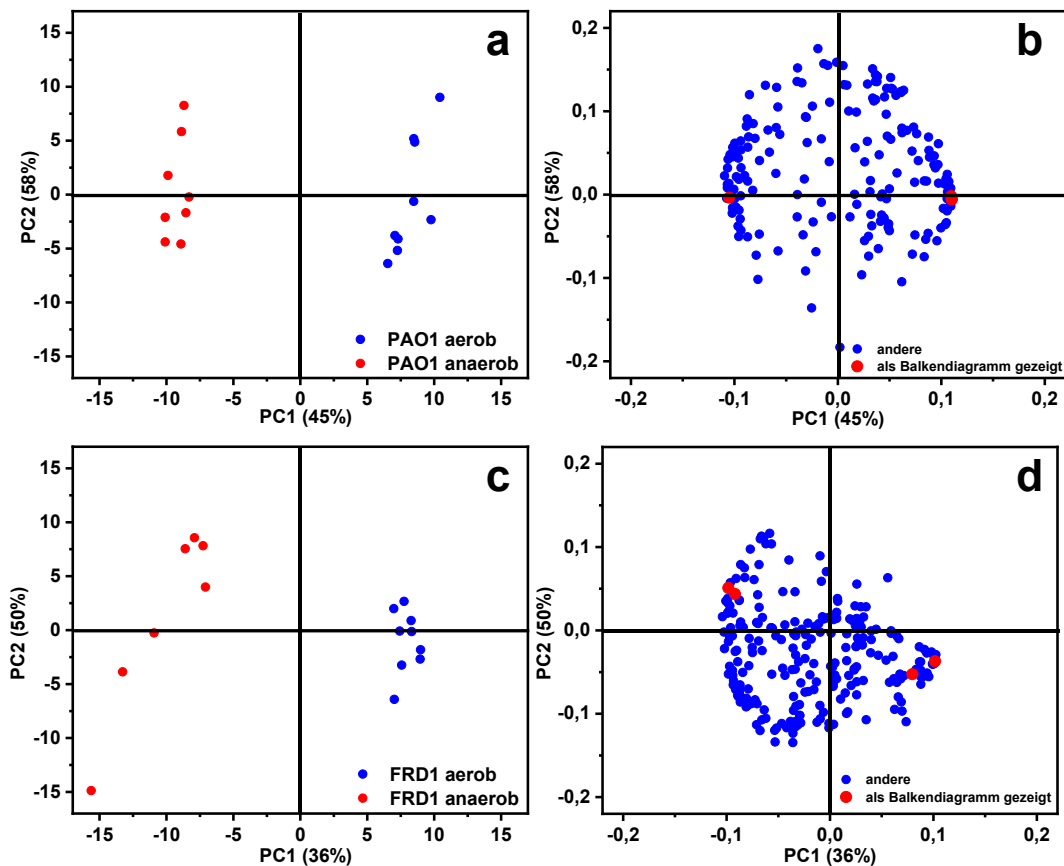


Abbildung 26: Statistischer Vergleich zweier unterschiedlicher Wachstumsatmosphären (aerob und anaerob) bei der Kultivierung von *P. aeruginosa* PAO1 (Abb. a und b) und FRD1 (Abb. c und d) im in vitro Biofilmmmodell mittels einer PCA. Die Abbildungen a und c zeigen die Ergebnisse der PCA als scores plots und die Abbildung b und d als loadings plots. Im loadings plot sind die Metabolite gekennzeichnet, welche in der Abbildung 27 als Balkendiagramm gezeigt sind.

Analog zu dem scores plot der Untersuchung am Bakterienstamm *P. aeruginosa* ATCC 10145, ist bei den scores plots der beiden weiteren Stämmen des Bakteriums *P. aeruginosa* eine Differenzierung zwischen der aeroben und anaeroben Kultivierungsbedingung mittels der ersten Hauptkomponente (PC 1) möglich. Die zweite Hauptkomponente (PC 2) beschreibt die Varianz der Daten innerhalb der beiden Gruppen. Die erste Hauptkomponente bei dem Bakterium *P. aeruginosa* PAO1 erklärt die Varianz zu 45 % und die zweite Hauptkomponente zu 58 %. Mit den beiden Hauptkomponenten wird beim Bakterium *P. aeruginosa* FRD1 eine kumulierte Varianz von 86 % erklärt werden. Qualitativ ist zu beobachten, dass die Streuung innerhalb der Gruppen (aerob und anaerob) größer ist als beim Referenzstamm. Dies könnte hauptsächlich mit der größeren biologischen Varianz der klinischen Stämme erklärt werden. Des Weiteren können, analog zu der PCA des Referenzstammes, auch die

Ergebnisse und Diskussion

ungleichmäßige Inokulation der Zellsuspension sowie die Variation der Zeiten zwischen Einbringen bzw. Entnahme der TFME Filme bei der anaeroben Kultivierung, einen Einfluss auf die Abweichung haben.

Mit Hilfe der beiden *loadings plots* wurden je Bakterienstamm und Kultivierungsbedingung zwei Metabolite (Übereinstimmungswahrscheinlichkeit $\geq 80\%$) beispielhaft ermittelt, deren Peaks eine deutliche Varianz in der Intensität aufweisen. Diese Mittelwerte der Signalintensität, die zugehörigen Standardabweichungen sowie das Konfidenzlevel sind in Form von Balkendiagrammen in Abbildung 27 gezeigt.

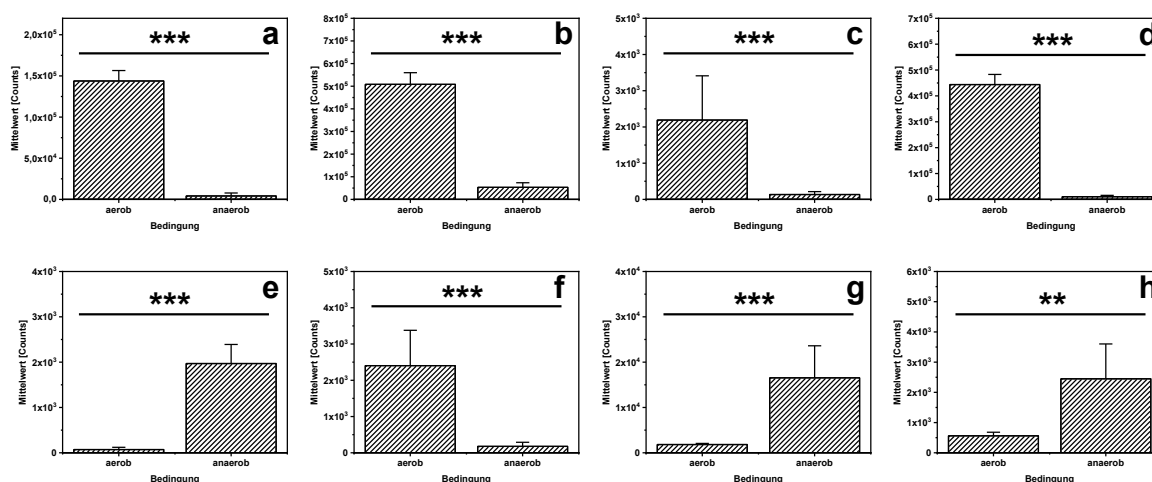


Abbildung 27: Graphische Darstellung des Vergleiches der Signalintensität unter aeroben und anaeroben Kultivierungsbedingungen von acht verschiedenen Metaboliten bei der Kultivierung von *P. aeruginosa* PAO1 (Abb. a, b, e und f) sowie FRD1 (Abb. c, d, g, h) im *in vitro* Biofilmmodell. Die Mittelwerte der Signalintensitäten sowie die zugehörigen Standardabweichungen ($n = 8$) sind als Balkendiagramme dargestellt. Die Signifikanzanalyse der Differenz der Signalintensitäten wurde mit Hilfe eines T-Tests ($n = 8$, zweiseitige Verteilung, heteroskedastisch) durchgeführt. Die gezeigten Metabolite sind: a = 1-Tetradecen (PAO1), b = 3-Aminoquinolin (PAO1), c = Dimethyldisulfid (FRD1), d = 2-Aminoacetophenon (FRD1), e = 2,5-Hexadion (PAO1), f = Dimethyldisulfid (PAO1), g = Benzaldehyd (FRD1), h = 2-Hexanon (FRD1). * = 0,05; ** = 0,01; * = 0,001.**

Der Vergleich der Signalintensitäten unter Berücksichtigung der Standardabweichungen zeigt deutlich die erhöhte Bildung der Metabolite unter aeroben bzw. anaeroben Bedingungen. Zum Beispiel konnte eine signifikante Reduzierung der Signalintensität unter anaeroben Bedingungen bei Dimethyldisulfid beobachtet werden. Diese Reduzierung trat bei allen untersuchten *P. aeruginosa* Stämmen auf (Abbildung 24 b, Abbildung 27 c und f). Dimethyldisulfid wurde zum einen in *in vitro* Metabolomstudien von *P. aeruginosa* [98,99,103] sowie von Goeminne et al. [162] im CF-Sputum nachgewiesen. Die Herstellung von Dimethyldisulfid, welches der Klasse der volatilen organischen Schwefelverbindungen (*engl.: volatile organic sulfur*

Ergebnisse und Diskussion

compounds; VOSC) zuzuordnen ist, kann u.a. durch den mikrobiellen Abbau von schwefelhaltigen Aminosäuren erfolgen [163,164]. Dimethyldisulfid weist eine hohe Toxizität gegenüber Organismen mit eukaryotischen Zellen auf. Diese Toxizität basiert laut Dugravot et al. [165] auf einer mitochondrialen Dysfunktion in Folge der Neurotoxizität. Das trotz der Produktion von toxischem Dimethyldisulfid ein Wachstum von Bakterien, z.B. im CF-Sputum, möglich ist, basiert auf synergetischen Prozessen zwischen verschiedenen bakteriellen Pathogenen. Scott et al. [166] und Briard et al. [167] berichten in ihren Publikationen darüber, dass flüchtige organische, schwefelhaltige Substanzen (*engl.: volatile organic sulfur compounds*; VOSCs) und insbesondere Dimethyldisulfid das Wachstum von *Aspergillus fumigatus* (*A. fumigatus*) stimuliert. Weiterhin haben Scott et al. [166] herausgefunden, dass diese synergetischen Prozesse die Pathogenität erhöhen, so dass Co-Infektionen vorteilhaft sind [166,167]. In Summe konnten beim Stamm *P. aeruginosa* PAO1 50 Metabolite ermittelt werden, deren Peaks eine signifikante Abweichung der Intensität von mindestens $p \geq 0,05$ aufwiesen. Bei dem Stamm *P. aeruginosa* FRD1 konnten 47 Metabolite ermittelt werden, deren p-Wert $\geq 0,05$ betrug. Eine Übersicht über diese Metabolite können dem Anhang B (*P. aeruginosa* FRD1: Tabelle 17; *P. aeruginosa* PAO1: Tabelle 18) entnommen werden.

Die hier vorgestellten Ergebnisse zeigen deutlich den großen Einfluss der Kultivierungsbedingungen (aerob vs. anaerob) auf das extrazelluläre volatile Metabolom der drei Bakterienstämme von *P. aeruginosa*. Aufgrund dieses Einflusses muss bei *in vitro* Untersuchungen des extrazellulären volatilen Metaboloms im Kontext von einer bakteriellen Infektion bei einer humanen Erkrankung die Kultivierungsbedingung an die Erkrankung angepasst werden. Für die *in vitro* Untersuchung des Metaboloms von *P. aeruginosa* bei einer Atemwegsinfektion, im Rahmen der CF-Erkrankung, muss somit eine mikroaerophile oder anaerobe Kultivierung gewählt werden, damit von den *in vitro* generierten Ergebnissen auf die realen Bedingungen in der Lunge eines CF-Patienten geschlossen werden kann.

5.3.2 Untersuchung des extrazellulären volatilen Metaboloms von Bakterienstämmen mit verschiedenen Phänotypen

Neben der An- oder Abwesenheit von Sauerstoff während der Kultivierung ist es möglich, dass der schleimbildende Phänotyp von *P. aeruginosa* einen Einfluss auf das

Ergebnisse und Diskussion

extrazelluläre volatile Metabolom hat. Bei der CF-Erkrankung dominiert bei chronischen Infektionen der mukoide Phänotyp, während bei initialen Infektionen, insbesondere bei jüngeren CF-Patienten, nicht-mukoide Stämme in der Lunge isoliert werden [1]. Die Forschungsfrage, ob der mukoide Phänotyp einen Einfluss auf das extrazelluläre flüchtige Metabolom von *P. aeruginosa* hat, soll durch eine statistische und vergleichende Untersuchung der extrazellulären volatilen Metabolite der Stämme *P. aeruginosa* PAO1 und *P. aeruginosa* FRD1 beantwortet werden. Die Kultivierung im *in vitro* Biofilmmodell erfolgte unter anaeroben Bedingungen und unter Verwendung des Vollmediums LB-Lennox gemischt mit Kaliumnitrat (LBN-Agar). Je Bakterienstamm wurden acht biologische Replikate untersucht.

Zur Analyse des Einflusses des mukoiden Phänotyps auf das extrazelluläre volatile Metabolom von *P. aeruginosa* wurde eine PCA durchgeführt. Die aus dieser Analyse erhaltenen *scores* und *loadings plot* sind in der Abbildung 28 graphisch dargestellt.

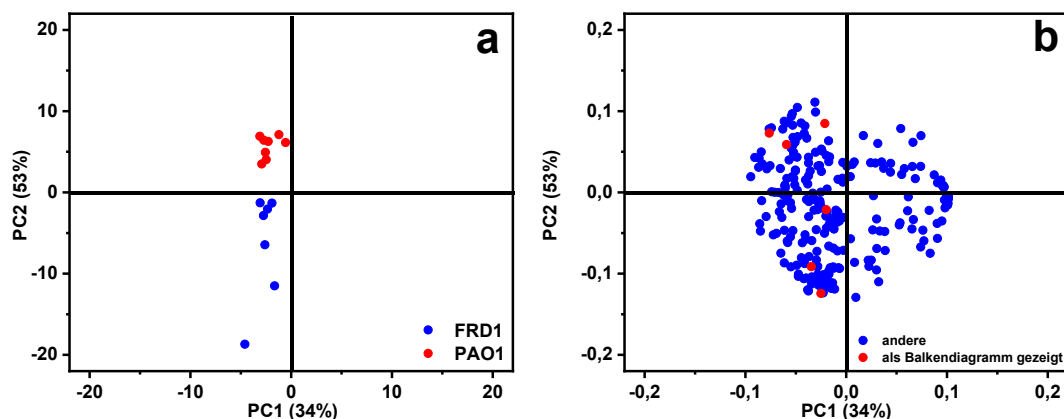


Abbildung 28: Vergleich der beiden Stämme *P. aeruginosa* FRD1 (Abb. a: blau) und PAO1 (Abb. b: rot) mit mukoiden bzw. nicht-mukoiden Phänotyp mittels PCA. Die Kultivierung von *P. aeruginosa* FRD1 und PAO1 erfolgte im *in vitro* Biofilmmodell unter anaeroben Bedingungen auf LBN-Agar. Die Abbildung a zeigt den *scores plot* und die Abbildung b den *loadings plot*. Im *loadings plot* sind die Metabolite gekennzeichnet, welche in der Abbildung 29 als *Balkendiagramm* gezeigt sind.

Die erklärte Varianz mittels der beiden ersten Hauptkomponenten beträgt kumuliert 87 %. Allerdings ist qualitativ im *scores plot* (Abbildung 28 a) zu erkennen, dass die Proben des Stammes *P. aeruginosa* PAO1 von denen des Stammes *P. aeruginosa* FRD1 nah beieinander liegen. Die Unterscheidung der beiden Phänotypen ist lediglich mit der zweiten Hauptkomponente möglich. Allerdings ist der Unterschied zwischen den beiden Phänotypen auch bei dieser Hauptkomponente gering. Des Weiteren ist

Ergebnisse und Diskussion

die Streuung bei den Proben des Stammes *P. aeruginosa* FRD1 deutlich größer als bei dem anderen Stamm. Dies konnte bereits in Kapitel 5.3.1 in Abbildung 26 beobachtet werden. Die größere Streuung kann mit der biologischen Variation begründet werden. Die Ergebnisse der PCA zeigen, dass eine Unterscheidung der beiden Phänotypen mittels zweier Hauptkomponenten nur schwer möglich ist. Ein Einfluss des Phänotyps, z.B. die Bildung von Alginate (mukoider Phänotyp) auf molekularer Ebene kann jedoch nicht ausgeschlossen werden. Dazu wurden die Intensitäten der Peaks von den Metaboliten (Übereinstimmungswahrscheinlichkeit $\geq 80\%$) miteinander verglichen und deren Signifikanz mit dem t-Test ermittelt. Am Beispiel von sechs Metaboliten ist die Differenz der mittleren Signalintensität in Abbildung 29 dargestellt, wobei die Signifikanz der Differenz der Signalintensitäten für die ausgewählten Metaboliten variiert.

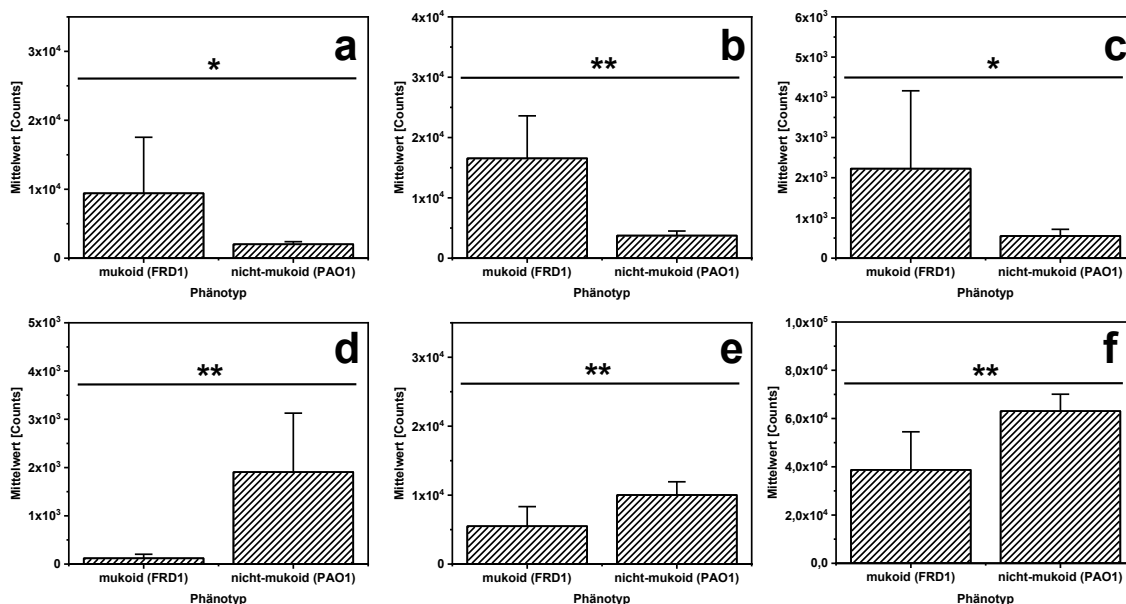


Abbildung 29: Graphische Darstellung des Vergleichs der Signalintensität von sechs Metaboliten bei einer Kultivierung des mukoiden (*P. aeruginosa* FRD1) und nicht-mukoiden Stammes (*P. aeruginosa* PAO1) unter anaeroben Bedingungen auf LBN-Agar und im in vitro Biofilmmmodell. Die Mittelwerte der Signalintensitäten sowie die zugehörigen Standardabweichungen ($n = 8$) sind als Balkendiagramme dargestellt. Die Signifikanzanalyse der Differenz der Signalintensitäten wurde mit Hilfe eines T-Tests ($n = 8$, zweiseitige Verteilung, heteroskedastisch) durchgeführt. Die gezeigten Metabolite sind: a = Octanol, b = Benzaldehyd, c = Propylbenzol, d = Dimethyldisulfid, e = 2-Undecanon, f = 4-Methylquinolin. * = 0,05; ** = 0,01; *** = 0,001.

Die Balkendiagramme zeigen, dass die Intensitäten der Peaks von einigen Metaboliten im mukoiden Phänotyp im Vergleich zum nicht-mukoiden Phänotyp signifikant erhöht sind (Abbildung 29 a – c). Für Peaks anderer Metaboliten ist jedoch auch der

Ergebnisse und Diskussion

entgegengesetzte Trend zu beobachten (Abbildung 29 d – f). Zum Beispiel wurde für Benzaldehyd in mukoiden Stämmen eine 4,12-fach höhere Intensität beobachtet. Das Beispiel des Metaboliten Dimethyldisulfid zeigt, dass auch eine signifikante Reduktion der Signalintensität im mukoiden Phänotyp im Vergleich zum nicht-mukoiden Phänotyp auftreten kann. Die Signalintensität beim mukoiden Phänotyps ist hier um den Faktor 13 reduziert. Insgesamt wurde für die Peaks von 28 Metaboliten ein signifikanter Unterschied in der Intensität beobachtet. Der statistische Vergleich der mVOCs zwischen den beiden Phänotypen ergab, dass der Unterschied in der Signalintensität von drei Metaboliten bei einer Wahrscheinlichkeit von 99,9 %, von elf Metaboliten bei 99 % und von 14 Metaboliten bei 95 % lag. Eine Übersicht über dieser Metabolite ist in Tabelle 19 in Anhang B aufgeführt.

Zusammenfassend zeigte die Untersuchung des Einflusses des mukoiden Phänotyps des Bakteriums *P. aeruginosa* auf seinen Metabolismus, dass auf der Ebene der Substanzklassen sowie zweier Hauptkomponenten, in dieser Studie keine Unterscheidung möglich ist. Allerdings konnten auf molekularer Ebene Unterschiede festgestellt werden. Eine genaue Untersuchung des Einflusses des mukoiden Phänotyps ist nur dann möglich, wenn mVOCs von mukoiden Stämmen mit mVOCs von abgeleiteten isogenen, nicht-mukoiden Mutanten verglichen werden. Dies war in der vorliegenden Arbeit aufgrund der hierzu notwendigen Laborsicherheitsstufe nicht möglich. Es konnte allerdings gezeigt werden, dass neben den Kultivierungsbedingungen (aerob und anaerob) der mukoiden Phänotyp des Bakterienstammes bei Metabolomstudien berücksichtigt werden muss. Bei *in vitro* Untersuchungen des Metaboloms von *P. aeruginosa* im Hinblick auf Atemwegsinfektionen im Rahmen der CF-Erkrankung müssen somit je nach Forschungsziel Bakterienstämme mit und ohne mukoiden Phänotyp berücksichtigt werden.

Ergebnisse und Diskussion

5.3.3 Vergleichsstudie zum extrazellulären volatilen Metabolom von *P. aeruginosa* bei einer Kultivierung auf zwei verschiedenen festen Kulturmedien

Zusätzlich zu den bereits untersuchten und diskutierten Einflussgrößen, könnte das Nährmedium einen Einfluss auf das extrazelluläre volatile Metabolom des Bakteriums *P. aeruginosa* haben. In vielen veröffentlichten Metabolom-Studien zu *P. aeruginosa* wird das Vollmedium LB-Lennox verwendet [85,134,155,168]. Dieses Wachstumsmedium enthält alle für das bakterielle Wachstum notwendigen Nährstoffe sowie andere Substanzen im Überschuss. Neben diesem Vollmedium werden auch Selektivnährmedien verwendet. Selektivnährmedien können ebenfalls Vollmedien sein, enthalten aber zusätzlich Hemmstoffe, welche das Wachstum von unerwünschten Begleitmikroorganismen hemmt. Der *Pseudomonas* Isolationsagar ist ein solches *P. aeruginosa* spezifisches Vollmedium. In diesem Kapitel soll der Einfluss des Nährmediums auf das extrazelluläre volatile Metabolom von *P. aeruginosa* im Zusammenhang mit Atemwegsinfektionen bei der CF-Erkrankung untersucht werden. Die beiden klinischen Stämme *P. aeruginosa* PAO1 und *P. aeruginosa* FRD1 wurden unter anaeroben Bedingungen auf den beiden Nährmedien (LBN- und PIAN-Agar) kultiviert. Im Anhang B, in Abbildung 55 und Abbildung 56 sind die TICs der Analyse der extrazellulären volatilen Metabolite der beiden Bakterienstämme auf dem PIAN-Agar gezeigt. Des Weiteren kann in Abbildung 57 des Anhanges B der Verfahrensblank vom PIAN-Agar eingesehen werden. Beiden Nährböden wurde Kaliumnitrat zugesetzt, um eine anaerobe Kultivierung zu gewährleisten. Um den Einfluss des Kulturmediums auf das extrazelluläre volatile Metabolom zu untersuchen, wurden fünf biologische Replikate des Stammes *P. aeruginosa* FRD1 und drei biologische Replikate des Stammes *P. aeruginosa* PAO1 auf PIAN-Agar kultiviert. Die detektierten Peaks der extrazellulären volatilen Metabolite wurden mit denen von den Replikaten der beiden auf LBN-Agar kultivierten Stämme verglichen. Um den Einfluss des Phänotyps auszuschließen, erfolgte der Vergleich der extrazellulären volatilen Metabolite ausschließlich zwischen Kulturen mit gleichem Phänotyp.

Zunächst wurde erneut eine PCA durchgeführt, die erhaltenen *scores* und *loadings plots* für *P. aeruginosa* FRD1 und PAO1 sind in der Abbildung 30 dargestellt.

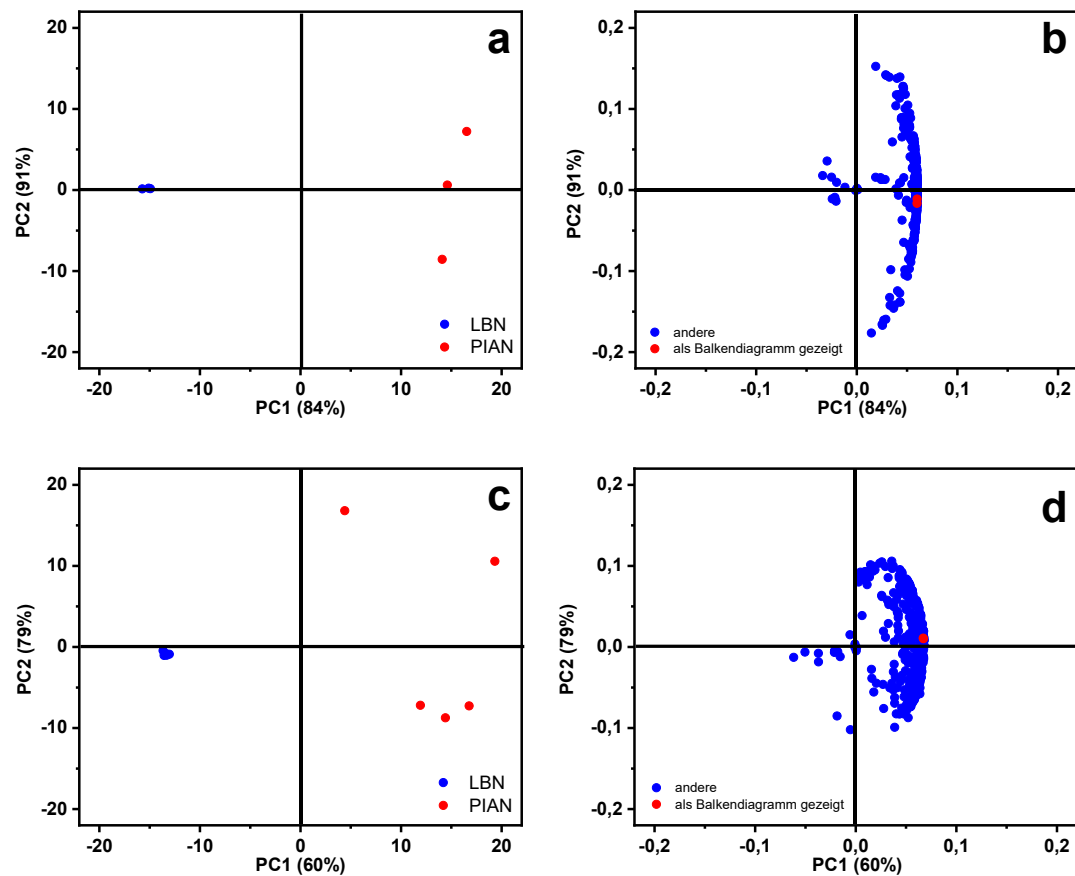


Abbildung 30: Vergleich zweier verschiedener Nährmedien (Abb. A: LBN = blau; PIAN = rot) bei einer Kultivierung der beiden Stämme *P. aeruginosa* PAO1 (a, b) sowie FRD1 (c, d) unter anaeroben Bedingungen im in vitro Biofilmmmodell mittels PCA. Die Abbildung a zeigt den scores plot und die Abbildung b den loadings plot. Im loadings plot sind die Metabolite gekennzeichnet, welche in der Abbildung 31 als Balkendiagramm gezeigt sind.

Mit Hilfe der beiden Hauptkomponenten ist eine Differenzierung zwischen der Kultivierung auf den beiden Nährmedien anhand des extrazellulären volatilen Metaboloms der beiden Stämme möglich. Zur Differenzierung zwischen den beiden Nährmedien ist ausschließlich die erste Hauptkomponente notwendig, welche bei dem Stamm *P. aeruginosa* PAO1 die Varianz zu 84% und beim Stamm *P. aeruginosa* FRD1 zu 60% erklärt. Die zweite Hauptkomponente beschreibt nur noch die Streuung innerhalb der Gruppe. Für den Stamm *P. aeruginosa* PAO1 beschreibt diese Hauptkomponente die Varianz zu 91% und bei dem Stamm *P. aeruginosa* FRD1 zu 79%. Anhand der hohen Werte kann die qualitative Beobachtung der Differenzierung zwischen den beiden Nährmedien mittels der PCA quantitativ bestätigt werden. Der Vergleich der Messwerte der biologischen Replikate zwischen den beiden Nährmedien zeigt, dass bei beiden untersuchten Stämmen die Streuung der Messwerte bei einer

Ergebnisse und Diskussion

Kultivierung auf dem PIAN-Agar deutlich größer ist als bei einer Kultivierung auf LBN-Agar. Unter Zuhilfenahme der zugehörigen *loadings plots* kann eine Zuordnung der detektierten extrazellulären volatilen Metabolite zu dem Nährmedium erfolgen. Aufgrund der deutlichen Trennung ist ebenfalls anhand der *loadings plots* ersichtlich, dass die Signalintensitäten der Metabolite bei einer Kultivierung auf dem PIAN-Agar deutlich größer sind. Dies kann darauf zurückgeführt werden, dass das PIAN-Agar-Nährmedium ein Selektivmedium für *P. aeruginosa* ist. Die enthaltenen Substanzen fördern das Wachstum der Stämme des Bakteriums *P. aeruginosa*. Hierdurch kann deutlich mehr Biofilm im gleichen Zeitraum produziert werden, was mit einer erhöhten Gesamtzellzahl sowie einer erhöhten Emission von Metaboliten und somit einer höheren Signalintensität korreliert. Nachteilig scheint das verbesserte Biofilmwachstum hinsichtlich der Homogenität der Replikate zu sein (Abbildung 30 a und c). Denn das experimentelle Vorgehen wurde im Vergleich zur Kultivierung auf LBN-Agar nicht verändert, so dass das bessere Biofilmwachstum zu einer schlechteren Reproduzierbarkeit führt. Aufgrund des verbesserten Biofilmwachstums könnte es zu einem inhomogenen Biofilm und somit zu einer variablen Emission von extrazellulären volatilen Metaboliten kommen. Des Weiteren könnte bei einer größeren Konzentration an Metaboliten im Gasraum oberhalb des Biofilmes, die Kapazität des Sorptionsmaterials nicht ausreichen. Hierdurch ist zu erwarten, dass Moleküle, welche eine stärkere Bindung mit dem PDMS ausbilden, Moleküle, welche eine schwächere Bindung ausbilden, diskriminieren. Der Sorptions-Resorptions-Prozess ist ein kontinuierlicher Prozess, so dass hierdurch Variationen im analysierten Metabolom möglich sind.

Mit Hilfe der *loadings plots* wurden extrazelluläre volatile Metabolite (Übereinstimmungswahrscheinlichkeit $\geq 80\%$) ermittelt, welche in Abhängigkeit vom verwendeten Nährmedium (LBN- oder PIAN-Agar) eine erhöhte Signalintensitäten aufweisen. Zur Bestimmung der Signifikanz wurde ein t-Test durchgeführt, dessen Ergebnisse am Beispiel von vier Metaboliten in Abbildung 31 gezeigt sind.

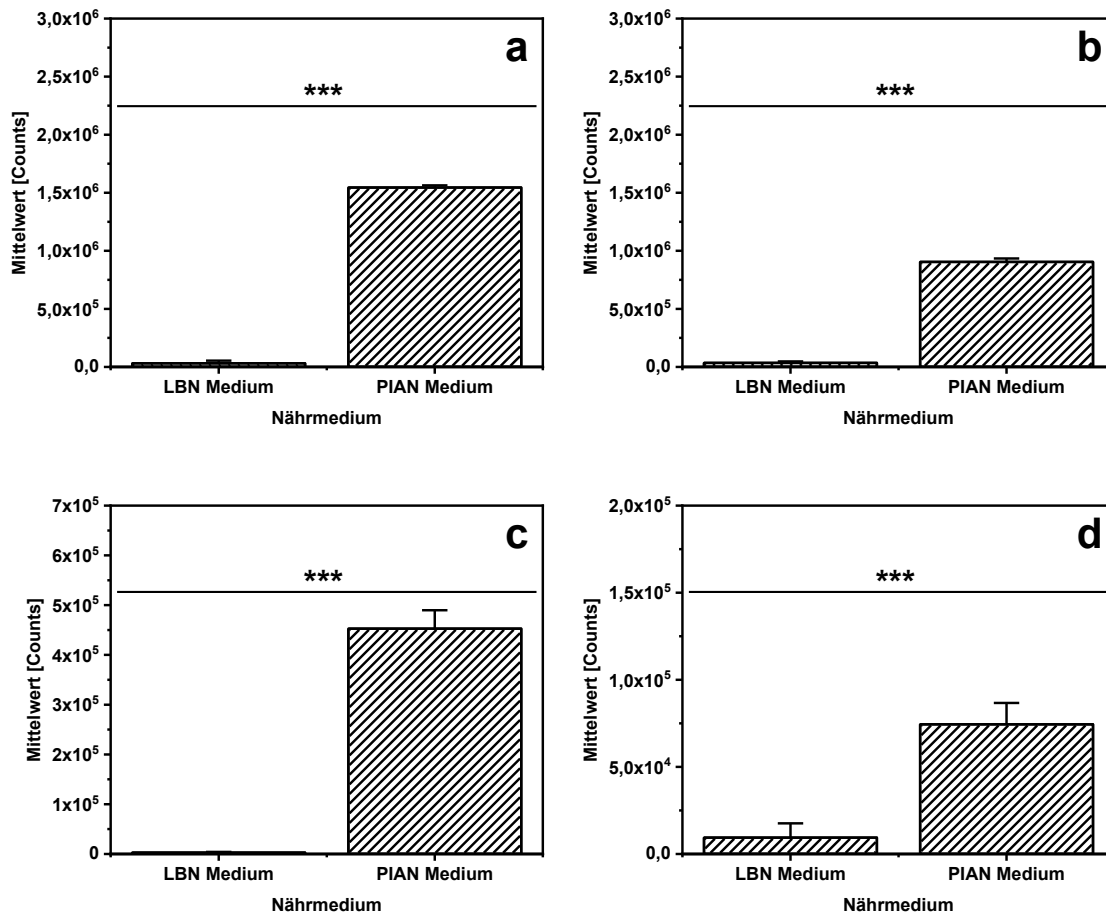


Abbildung 31: Graphische Darstellung des statistischen Vergleichs der Signalintensität von vier Metaboliten bei einer Kultivierung auf LBN- bzw. PIAN-Agar unter anaeroben Bedingungen im in vitro Biofilmmodell. Hierzu wurden die Bakterienstämme *P. aeruginosa* PAO1 (a, b) sowie FRD1 (c, d) verwendet. Verglichen wurden fünf Replikate beider Stämme auf LBN-Agar und drei Replikate (FRD1) bzw. fünf Replikate (PAO1) auf PIAN-Agar. Die Mittelwerte der Signalintensitäten sowie die zugehörigen Standardabweichungen sind als Balkendiagramme dargestellt. Die Signifikanzanalyse der Differenz der Signalintensitäten wurde mit Hilfe eines T-Tests (zweiseitige Verteilung, heteroskedastisch) durchgeführt. Die gezeigten Metabolite sind: a = 1-Hexadecanol, b = Pentadecan, c = 2-Nonanon, d = 1-Octanol (alle *; $p \geq 0,001$).**

Bei der Detektion der Metabolite 2-Nonanon und 1-Octanol wird eine größere Intensität bei der Verwendung von PIAN-Agar beobachtet als bei der Verwendung von LBN-Agar (Kultivierung von *P. aeruginosa* FRD1, mit einer statistischen Signifikanz von 99,9 %) (Abbildung 31, c – d). Analog hierzu konnten mit derselben statistischen Signifikanz größere Signalintensitäten für 1-Hexadecanol und Pentadecan (Kultivierung von *P. aeruginosa* PAO1 auf PIAN-Agar) nachgewiesen werden (Abbildung 31, a – b). Insgesamt ergab die Signifikanzanalyse der Kultivierung von *P. aeruginosa* FRD1 auf LBN- und PIAN-Agar 102 Metaboliten mit einem signifikanten Unterschied in der Signalintensität. Von diesen 102 Metaboliten konnten 21 Metaboliten dem Signifikanzniveau $p = 0,001$, 33 Metaboliten dem Signifikanzniveau $p = 0,01$ und

Ergebnisse und Diskussion

48 Metaboliten dem Signifikanzniveau $p = 0,05$ zugeordnet werden. Die analoge Analyse für den Bakterienstamm *P. aeruginosa* PAO1 ergab 123 Metaboliten mit einem signifikanten Unterschied in der Signalintensität. 25 Metaboliten konnten dem Signifikanzniveau $p = 0,001$, 54 Metaboliten dem Signifikanzniveau $p = 0,01$ und 44 Metaboliten dem Signifikanzniveau $p = 0,05$ zugeordnet werden. Eine Übersicht der ermittelten Metabolite der beiden untersuchten Bakterienstämme ist im Anhang B aufgeführt (*P. aeruginosa* FRD1: Tabelle 20; *P. aeruginosa* PAO1: Tabelle 21). Zum einen zeigt sich durch diese Analyse, dass das Nährmedium einen signifikanten Einfluss auf das extrazelluläre volatile Metabolom, aufgrund der hohen Anzahl an Metaboliten mit signifikant unterschiedlichen Signalintensitäten, hat. Zum anderen konnte, aufgrund der ähnlichen Metabolitenanzahl mit signifikantem Unterschied in der Signalintensität, gezeigt werden, dass der Einfluss des Nährmediums unabhängig vom mukoiden Phänotyp des Bakteriums ist. Analog zu den Ergebnissen der Untersuchung des Einflusses des mukoiden Phänotyps, ist auf molekularem Level ein Unterschied nachzuweisen.

Zusammenfassend wurde festgestellt, dass das gewählte Nährmedium bei *in vitro* Experimenten einen deutlichen Einfluss auf das extrazelluläre volatile Metabolom sowie dessen qualitative Zusammensetzung ausübt. Daraus kann geschlossen werden, dass bei *in vitro* Untersuchungen des extrazellulären volatilen Metaboloms von *P. aeruginosa* im Kontext von Atemwegsinfektionen bei der CF-Erkrankung, neben der Sauerstoffverfügbarkeit auch das Nährmedium an die Bedingungen in der Lunge von CF-Patienten angepasst werden muss.

5.3.4 Entwicklung eines festen artifiziellen Sputummediums

Die Studien zu den Einflussgrößen auf das extrazelluläre volatile Metabolom von *P. aeruginosa* im Kontext der CF-Erkrankung, welche in den Kapiteln 5.3.1 – 0 beschrieben worden sind, haben gezeigt, dass der mukoiden Phänotyp des Bakterienstammes lediglich einen geringen Einfluss hat. Im Gegensatz dazu konnte festgestellt werden, dass die Sauerstoffverfügbarkeit (aerob und anaerob) und die Zusammensetzung des Nährmediums einen Einfluss auf das extrazelluläre volatile Metabolom von *P. aeruginosa*, unabhängig vom mukoiden Phänotyp, hat. Die Erzeugung einer anaeroben Atmosphäre während der Kultivierung konnte bereits realisiert werden (vgl. Kapitel 5.3.1). Allerdings muss, aufgrund des großen Einflusses

des Nährmediums, dieses ebenfalls an die Bedingungen der Lunge eines CF-Patienten angepasst werden.

Ein Nährmedium, welches die Bedingungen in der Lunge eines CF-Patienten realitätsnah simulieren kann, ist ein artifizielles Sputummedium (*engl.: artificial sputum medium; ASM*) [129], welches u.a. Aminosäuren, Muzine und DNA enthält. [130]. Aminosäuren, Muzine und DNA sind wichtige Bestandteile des Sputums von CF-Patienten und verantwortlich für die Möglichkeit der Ausbildung von Biofilmen des Bakteriums *P. aeruginosa* in CF-Mucus [129,130]. Die genaue Zusammensetzung des verwendeten ASM ist in Kapitel 4.1.3.3 beschrieben. Bislang wurde das ASM ausschließlich für die flüssige Kultivierung von *P. aeruginosa* in Mikrotiterplatten Assays, im Kontext der CF-Erkrankung, hergestellt. Zur Kultivierung von *P. aeruginosa* Biofilmen in dem in Kapitel 5.1 entwickelten *in vitro* Biofilmmodell ist die Herstellung eines festen ASM (im Folgenden ASM-Agar genannt) notwendig. Dementsprechend wurde das Herstellungsprotokoll von Kirchner et al. [130] sowie von Sriramulu et al. [129] zur Herstellung von ASM-Agar angepasst. Damit zu den vorherigen Analysen des extrazellulären volatilen Metaboloms (LB- bzw. PIA-Agar) vergleichbare Untersuchungen durchgeführt werden können, wurde der Herstellungsprozess modifiziert.

Nach der Ermittlung der Zusammensetzung des ASM-Agars basierend auf den Publikationen von Sriramulu et al. [129] und Kirchner et al. [130], wurde der Herstellungsprozess des ASM-Agars festgelegt [169]. Auf Grundlage der enthaltenen Substanzen wurde zunächst überprüft, ob eine Herstellung ohne Sterilisation der Inhaltsstoffe möglich ist. Eine Sterilfiltration, welche bei den meisten Publikationen zum flüssigen ASM verwendet wird, wurde nicht eingesetzt. Bei einer Sterilfiltration des ASM-Agars könnten zum einen für das Wachstum relevante Inhaltsstoffe entfernt werden. Zum anderen ist eine Sterilfiltration bereits bei flüssigen ASM sehr zeitaufwendig. Bei einer Sterilfiltration von viskosem ASM-Agar wird somit vermutet, dass ein deutlich größerer Zeitaufwand entstehen würde. Eine Herstellung ohne vorherige Sterilisation durch Autoklavieren, hätte den Vorteil, dass die thermisch labilen Inhaltsstoffe, wie z.B. das Eigelb oder die DNA, vollständig und ohne Verluste im ASM zur Verfügung stehen. Zur Überprüfung wurde das ASM, wie in Kapitel 4.1.3.3 beschrieben, unter Vernachlässigung der Sterilisation hergestellt. Anschließend wurde der ASM-Agar in Petrischalen gegossen und unter aeroben Bedingungen 48 h bei

Ergebnisse und Diskussion

37 °C kultiviert. In Abbildung 32 ist die photographische Aufnahme des Nährmediums vor (Abbildung 32 a) und nach der Kultivierung (Abbildung 32 b) gezeigt.

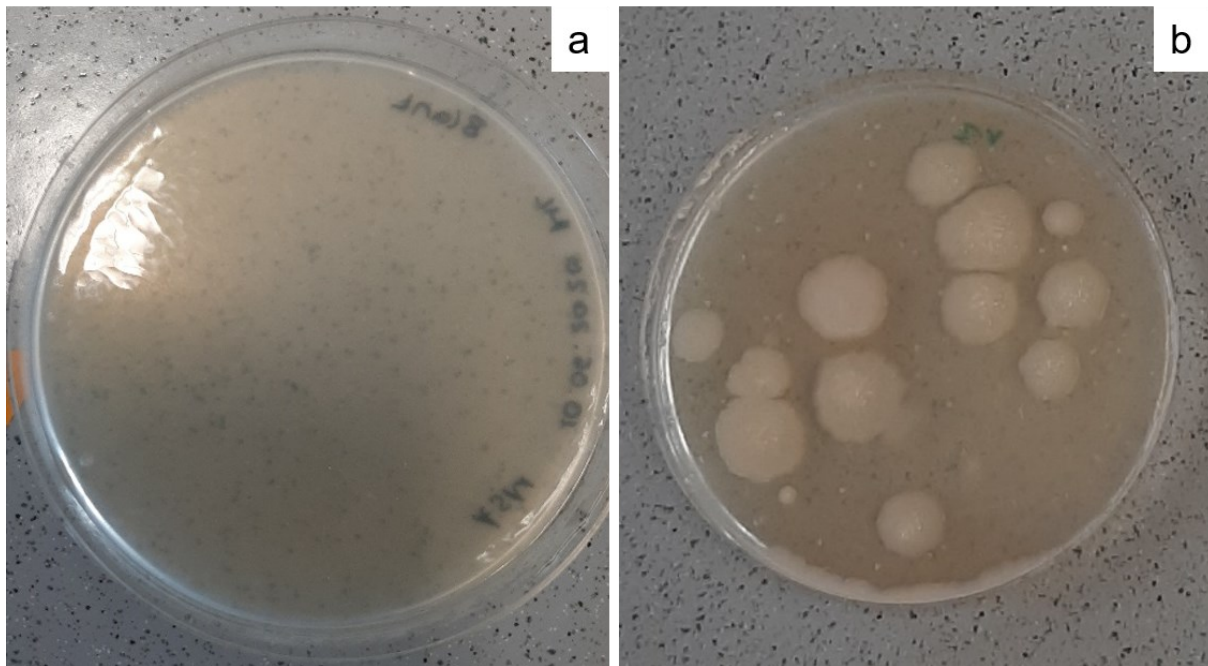


Abbildung 32: Photographische Aufnahmen des ASM-Agars, ohne Sterilisation der Inhaltsstoffe, a: vor und b: nach der 48-stündigen Kultivierung unter aeroben Bedingungen bei 37 °C im *in vitro* Biofilmmodell.

Nach der zweitägigen, aeroben Kultivierung im Brutschrank bei 37 °C, konnten Fremdinfectionen (Abbildung 32 b) visuell festgestellt werden. Ein möglicher Eintragungsweg ist über kontaminierte Inhaltsstoffe des ASM-Agars. Dieses ist aufgrund der ausgebliebenen Sterilisation der Substanzen, der wahrscheinlichste Grund. Dementsprechend muss unbedingt eine Sterilisation der Inhaltsstoffe vor der Herstellung des ASM-Agars erfolgen.

Aufgrund der thermisch labilen Substanzen sollte eine möglichst schonende Sterilisationsmethode gewählt werden. Die zur Sterilisation der Substanzen des LB- bzw. LBN-Agars und PIA- bzw. PIAN-Agars verwendete Methode ist wegen der Temperatur von 120 °C, welche zusätzlich über einen langen Zeitraum angewendet wird, ungeeignet. Hierdurch kann es z.B. zu einer Denaturierung des Eigelbes oder zu einer Zersetzung oder Änderung der chemischen Struktur anderer Inhaltsstoffe kommen. Eine solche Zersetzung oder Änderung der chemischen Struktur könnte zu einem anderen chemischen Verhalten der Substanz und somit des Nährmediums führen. Daraus folgt, dass das Nährmedium nicht mehr vollständig die Bedingungen in einer CF-Lunge repräsentieren könnte. Im Gegensatz hierzu ist die

Ergebnisse und Diskussion

Mikrowellensterilisation, aufgrund der schnellen Aufheiz- und Abkühlraten sowie der zeitlich kurzen Sterilisationsphase, eine schonende Sterilisationsmethode. Hierdurch könnte eine Zersetzung oder Änderung der chemischen Struktur weitestgehend verhindert werden. Damit das Eigelb während der Sterilisation nicht denaturiert, wäre dessen Zugabe nach der Sterilisation der weiteren Inhaltsstoffe vorteilhaft. Damit eine Kontamination des Nährmediums durch nicht nochmals sterilisiertes Eigelb ausgeschlossen werden kann, wurden zwei Versuche durchgeführt. In dem ersten Versuch wurde das Eigelb zusammen mit den weiteren Substanzen im Mikrowellenautoklaven sterilisiert. Bei dem zweiten Versuch wurde das Eigelb nicht sterilisiert und nach der Sterilisation im Mikrowellenautoklaven zu den anderen Substanzen zugegeben. Anschließend wurden beide Varianten des ASM-Agars in Petrischalen gegossen und zwei Tage lang unter aeroben Bedingungen und bei 37 °C im Brutschrank kultiviert. In Abbildung 33 sind die Photographischen Aufnahmen der beiden Varianten des ASM-Agars nach der Kultivierung gezeigt.

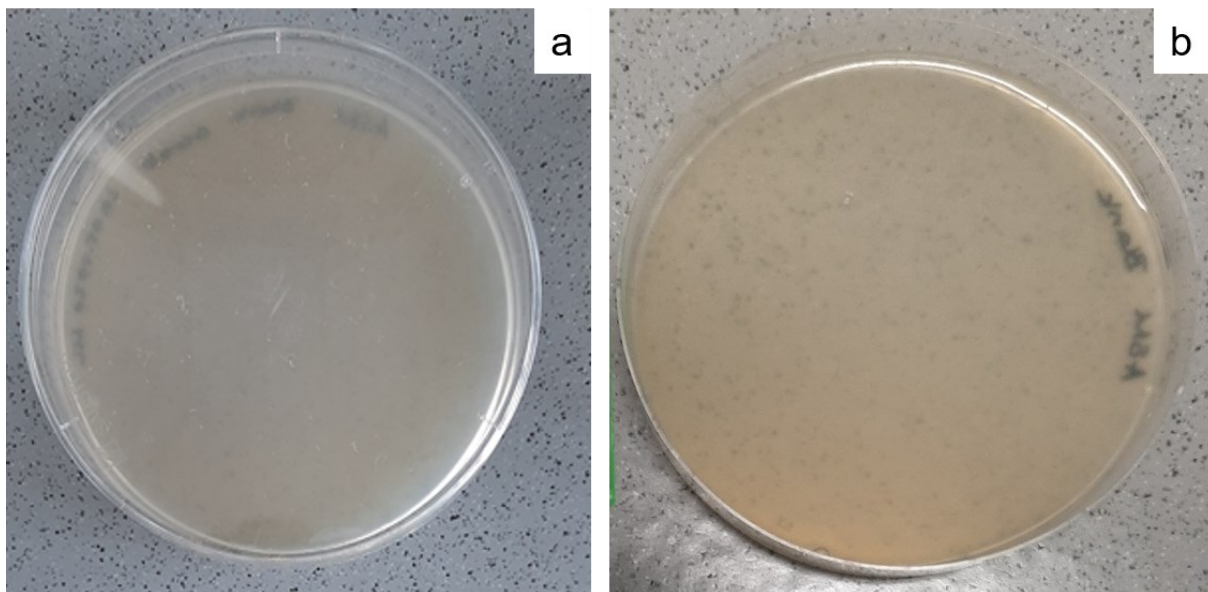


Abbildung 33: Photographische Aufnahmen des ASM-Agars, mit a: Sterilisation aller Inhaltsstoffe und b: Sterilisation aller Inhaltsstoffe, mit Ausnahme des Eigelbes, nach der 48-stündigen Kultivierung unter aeroben Bedingungen bei 37 °C im *in vitro* Biofilmmodell.

Die photographischen Aufnahmen in Abbildung 33 zeigen, dass bei beiden Varianten keine Kultivierung von Bakterien festgestellt werden konnte. Dementsprechend ist davon auszugehen, dass die herstellerseitige Sterilisation des Eigelbs ausreichend ist und auf eine weitere Sterilisation verzichtet werden kann. Dies hat den Vorteil, dass eine teilweise Denaturierung oder Veränderung des Eigelbes vorgebeugt werden kann.

Ergebnisse und Diskussion

Zur anaeroben Kultivierung der Bakterienstämme ist die Zugabe von Kaliumnitrat in das Nährmedium, aufgrund der Umstellung auf Nitrataatmung, notwendig. Line et al. [170] haben in ihrer publizierten Studie über die physiologische Konzentration von Nitrat und dessen unterstützendem Einfluss auf das anoxische Wachstum von *P. aeruginosa* herausgefunden, dass die Wachstumsrate des Bakteriums abhängig von der Nitratkonzentration ist. Dementsprechend wurde die Nitratkonzentration im ASM-Agar zwischen 0,01 mM und 100 mM dekadisch variiert und anhand der Gesamtzellzahl für den Biofilm des mukoiden Stammes *P. aeruginosa* FRD1 evaluiert. In Tabelle 9 sind die ermittelten Gesamtzellzahlen (z) für die anaerobe Kultivierung mit unterschiedlichen Nitratkonzentrationen sowie für die aerobe Kultivierung ohne Nitrat aufgeführt.

Tabelle 9: Übersicht über die Gesamtzellzahlen (z) der Biofilme des Bakteriums *P. aeruginosa* FRD1 bei einer Kultivierung unter aeroben bzw. anaeroben Bedingungen auf ASM-Agar mit variierenden Kaliumnitratkonzentrationen. Es erfolgte eine 48-stündige Kultivierung bei 37 °C im *in vitro* Biofilmmodell.

Nitratkonzentration im ASM-Agar [mM]	z-Masse ⁻¹ [1·g ⁻¹]	z-Fläche ⁻¹ [1·cm ⁻²]
0 (aerob)	7,70·10 ¹¹	9,68·10 ⁸
0,01 (anaerob)	kein Biofilmwachstum	
0,1 (anaerob)	kein Biofilmwachstum	
1 (anaerob)	2,90·10 ¹³	1,46·10 ⁹
10 (anaerob)	5,78·10 ¹²	1,60·10 ⁹
100 (anaerob)	1,31·10 ¹³	1,91·10 ⁹

Bei einer anaeroben Kultivierung des Stammes *P. aeruginosa* FRD1 konnte mit zugesetzten Nitratkonzentrationen von 0,1 mM und 0,01 mM kein Biofilmwachstum nach 48 Stunden beobachtet werden. Anhand der erhaltenen Gesamtzellzahlen ist ersichtlich, dass ab einer Konzentration von 1 mM ein ausreichendes Biofilmwachstum im *in vitro* Modell zu beobachten ist. Die flächenbezogene Zellzahl ist bei einer Nitratkonzentration von 1 mM ähnlich zu der bei aerobem Wachstum. Des Weiteren sind die flächenbezogenen Zellzahlen der höheren Nitratkonzentrationen nur geringfügig größer. Der Vergleich der Zellzahlen bezogen auf die Biomasse hingegen

Ergebnisse und Diskussion

zeigt, dass bei einer Nitratkonzentration von 1 mM die größten Zellzahlen erreicht werden. Physiologische Konzentrationen von Nitrat im CF-Sputum liegen laut den Studien von Grasmann et al. [171], Palmer et al. [172] und Kolpen et al. [173] zwischen 0,4 mM und 1 mM [170]. Trotz dieses physiologischen Bereiches wurde eine Nitratkonzentration von 100 mM gewählt, weil zum einen die Gesamtzellzahlen, mit denen bei einer Nitratkonzentration von 1 mM vergleichbar sind. Zum anderen wurde diese Auswahl getroffen, um innerhalb von 48 Stunden konfluente und reproduzierbare Biofilme der Bakterienstämme zu erhalten. Die Wahl von größeren Nitratkonzentration ist eine Limitierung des *in vitro* Biofilmmodells unter Verwendung von ASM-Agar. Allerdings ist die Wachstumszeit der Bakterien im Nährmedium länger als im *in vitro* Biofilmmodell. Wachstumszeiten analog zu denen im CF-Sputum mit dem beschriebenen Modellsystem zu simulieren, ist zum einen aufgrund der Variabilität der Wachstumszeiten sowie der schwer zu bestimmenden initialen Kultivierung nicht möglich. Zum anderen könnte wegen des limitierten Platzes im Modellsystem bei längeren Kultivierungszeiten Konkurrenzprozesse zwischen den Bakterien auftreten, welche wiederum zu einem nicht reproduzierbaren Biofilm führen kann. Damit eine möglichst genaue Annäherung an die Bedingungen in einer CF-Lunge mit dem *in vitro* Biofilmmodell möglich ist, wurden schließlich eine Kultivierungsdauer von 48 Stunden sowie eine Nitratkonzentration von 100 mM gewählt. Weiterhin wurde überprüft, ob durch die Zugabe von Kaliumnitrat vor der Sterilisation eine Kontamination des ASM-Agars erfolgte. Hierzu wurde der ASM-Agar wie in Kapitel 4.1.3.3 beschrieben mit dem Zusatz der entsprechenden Menge von Kaliumnitrat hergestellt und anschließend 48 Stunden lang, anaerob bei einer Temperatur von 37 °C, kultiviert. In Abbildung 34 ist die photographische Aufnahme des ASM-Agars nach der Kultivierung gezeigt.

Ergebnisse und Diskussion

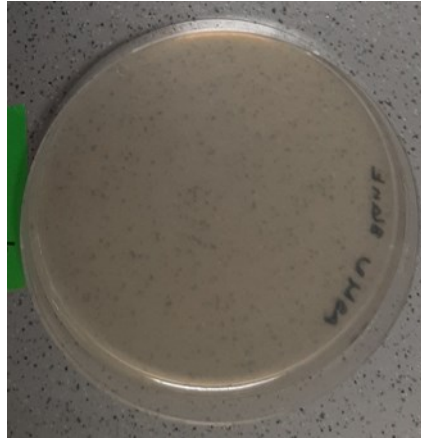


Abbildung 34: Photographische Aufnahme des ASM-Agars, mit hinzugefügtem Kaliumnitrat, nach der 48-stündigen Kultivierung unter anaeroben Bedingungen bei 37 °C im *in vitro* Biofilmmodell.

Die Zugabe von Kaliumnitrat sorgt, wie in Abbildung 34 zu erkennen ist, für keine Kontamination und somit Kultivierung von anderen Bakterien auf dem ASM-Agar. Damit kann der ASM-Agar, wie beschrieben, für die Kultivierung von *P. aeruginosa* Stämmen unter CF-ähnlichen Bedingungen verwendet werden.

Mittels der klinischen Stämme *P. aeruginosa* PAO1 und FRD1 sollten abschließend die Gesamtzellzahl, die koloniebildenden Einheiten (KBE; γ) sowie der Uronsäuregehalt der Biofilme der beiden Stämme, unter Verwendung des ASM-Agars, bestimmt werden. Zur Bestimmung der Koloniebildenden Einheiten (KBE) wurde das Oberflächenplattierungsverfahren verwendet [174]. Die Gesamtzellzahl ist die Zahl aller lebenden und eventuell toten Bakterienzellen im betrachteten System. Im Gegensatz dazu beschreiben die KBE den Anteil der kultivierbaren Bakterienzellen in einem System. Mit diesen beiden Werten kann der prozentuale Anteil an lebenden Zellen berechnet werden, die zum bakteriellen Wachstum beitragen. Die kultivierbaren Bakterienzellen sind diejenigen, welche zum Metabolom beitragen. In Abbildung 35 sind zunächst die photographischen Aufnahmen der Biofilme der beiden Bakterienstämme nach der Kultivierung auf ASM-Agar unter aeroben sowie unter anaeroben Bedingungen gezeigt.

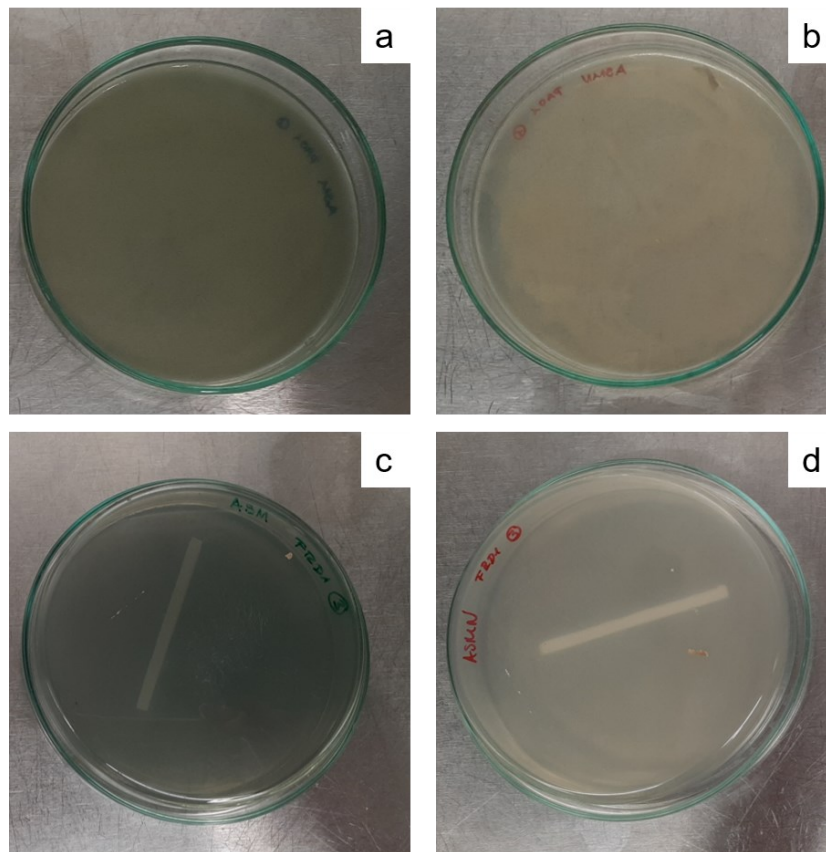


Abbildung 35: Photographische Aufnahmen der Kultivierung von den beiden Stämmen *P. aeruginosa* PAO1 (a: aerob; b: anaerob) und FRD1 (c: aerob; d: anaerob) auf dem ASM-Agar. Es erfolgte eine 48-stündige Kultivierung bei 37 °C im in vitro Biofilmmodell.

Analog zu den Beobachtungen bei der Kultivierung der beiden Bakterienstämme auf LB- bzw. LBN-Agar (vgl. Kapitel 5.1), sind die Biofilme bei einer Kultivierung auf ASM-Agar unter aeroben Bedingungen farbig und unter anaeroben Bedingungen milchig bis farblos. Im Gegensatz zur Kultivierung auf LB- bzw. LBN-Agar, ist allerdings der Unterschied in der Farbe des aeroben Biofilmes zwischen den beiden Stämmen nicht deutlich zu erkennen. Des Weiteren ist die Farbe des Biofilmes nicht gelblich (*P. aeruginosa* PAO1) bzw. rötlich (*P. aeruginosa* FRD1), sondern bei beiden Stämmen grünlich/bräunlich. Dieses ist ein erster visueller Hinweis auf andere Stoffwechselwege bzw. -aktivitäten, welche beim Wachstum auf ASM-Agar möglich sind (vgl. Kapitel 5.3.5). Die Biofilme wurden hinsichtlich ihrer Gesamtzellzahl der KBE sowie des Uronsäuregehalts charakterisiert. Die Methode zur Bestimmung des Uronsäuregehalts ist in Kapitel 4.4.2 erläutert. In Tabelle 10 sind die erhaltenen Werte zusammengefasst.

Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 10: Vergleichende Übersicht über die Gesamtzellzahlen (z), KBE-Werte (y), des Anteiles der lebenden Zellen an der Gesamtzellzahl sowie des Uronsäuregehalts bei den Stämmen *P. aeruginosa* PAO1 und FRD1 bei einer aeroben und anaeroben Kultivierung. Es erfolgte eine 48-stündige Kultivierung bei 37 °C im in vitro Biofilmmodell.

Parameter	aerobe Kultivierung		anaerobe Kultivierung	
	<i>P. aeruginosa</i> PAO1	<i>P. aeruginosa</i> FRD1	<i>P. aeruginosa</i> PAO1	<i>P. aeruginosa</i> FRD1
z-Fläche ⁻¹ [1·cm ⁻²]	1,48·10 ⁹	3,45·10 ⁹	4,01·10 ⁹	2,61·10 ⁹
y-Fläche ⁻¹ [1·cm ⁻²]	5,78·10 ⁸	3,54·10 ⁸	3,05·10 ⁹	1,07·10 ⁹
Anteil y an z (bezogen auf die Fläche) [%]	39	10	76	41
c (Uronsäure) [µg·cm ⁻²]	-	1,47·10 ¹	-	1,14·10 ¹

Bei der Kultivierung der beiden klinischen Stämme *P. aeruginosa* PAO1 und FRD1 konnten Gesamtzellzahlen oberhalb von $1 \cdot 10^9$ Zellen·cm⁻² ermittelt werden. Somit konnten unter den beiden untersuchten Bedingungen „multilayer Biofilme“ angezüchtet werden [136]. Außerdem wurden ähnliche Gesamtzellzahlen unter aeroben sowie anaeroben Bedingungen bestimmt. Eine Reduktion der Gesamtzellzahl bei der Kultivierung unter anaeroben Bedingungen, wie bei der Kultivierung auf LB- bzw. LBN-Agar (vgl. Kapitel 5.1), konnte nicht beobachtet werden. Anhand des Anteiles an kultivierbaren Bakterienzellen, welcher mittels der Gesamtzellzahl sowie den KBE berechnet wird, kann der Anteil an kultivierbaren Zellen bestimmt werden. Bei der Kultivierung unter anaeroben Bedingungen ist der Anteil der kultivierbaren Zellen mit 76 % (*P. aeruginosa* PAO1) bzw. mit 41 % (*P. aeruginosa* FRD1) geringfügig größer als bei der Kultivierung unter aeroben Bedingungen. Unter CF-ähnlichen Bedingungen konnten somit ausreichend lebende Bakterienzellen der beiden Stämme kultiviert werden. Des Weiteren konnte mittels des Uronsäure-Assays der Gehalt an Uronsäuren im Biofilm bestimmt werden. Die Biofilmbildung basiert auf der Bildung von EPS. Die EPS von mukoiden Bakterienstämmen von *P. aeruginosa* besteht zu einem großen Anteil aus dem Polysaccharid Alginat, welches wiederum hauptsächlich aus den Monosacchariden der Uronsäure aufgebaut ist [72,175,176]. Dementsprechend gibt der Uronsäuregehalt Aufschluss über die Bildung von Alginat. Hierüber kann dann der Rückschluss auf den mukoiden Phänotyp des Bakteriums erfolgen. Bei einem

positiven Uronsäuregehalt, ist somit der mukoide Phänotyp während der Kultivierung beibehalten worden. Anhand der ermittelten Uronsäuregehalte, kann belegt werden, dass während der Kultivierung von *P. aeruginosa* FRD1 unter aeroben und anaeroben Bedingungen kein Verlust des mukoiden (alginatbildenden) Phänotyps erfolgt ist. Des Weiteren konnte keine Uronsäure bei der Kultivierung von *P. aeruginosa* PAO1 unter aeroben und anaeroben Bedingungen nachgewiesen werden, so dass während der Kultivierung der nicht-mukoide Phänotyp beibehalten worden ist.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass eine Kultivierung von klinischen *P. aeruginosa* Stämmen unter CF-ähnlichen Bedingungen mit dem entwickelten ASM-Agar möglich ist. Allerdings ist zu beachten, dass die Nitratkonzentration sowie die Kultivierungsdauer nicht denen in einer CF-Lunge entsprechen. Trotz dieser Limitierung ist das entwickelte Modellsystem, inkl. des ASM-Agars, eine Näherung an die Bedingungen in der Lunge eines CF-Patienten, so dass die *in vitro* Untersuchung des extrazellulären volatilen Metaboloms von *P. aeruginosa* Stämmen mittels dieses Systems Rückschlüsse auf *in vivo* Experimente zu lässt.

5.3.5 Charakterisierung des extrazellulären volatilen Metaboloms von *P. aeruginosa* unter CF-ähnlichen Bedingungen im *in vitro* Biofilmmodell

Unter Verwendung des zuvor entwickelten und charakterisierten ASM-Agars, soll nun abschließend das extrazelluläre volatile Metabolom von drei Stämmen des Bakteriums *P. aeruginosa* unter CF-ähnlichen Bedingungen analysiert werden. Die mVOCs jedes Bakterienstamms wurden nach Dekonvolution und Featureanalyse durch die GC-EI-MS spezifische Metabolomics-Datenbank MoNA [160] zugeordnet (Übereinstimmungswahrscheinlichkeit $\geq 80\%$), wobei je Bakterienstamm drei Replikate analysiert worden sind. Im Anschluss an die Datenverarbeitung und Peakzuordnung wurde eine statistische Auswertung der Metabolite durchgeführt. Dazu wurde eine PCA durchgeführt, so dass mit Hilfe der resultierende *scores* und *loadings plot* Metabolite ermittelt werden konnten, die für jeden Bakterienstamm spezifisch sind. Eine Erhöhung der Signalintensitäten der Metabolite konnte bei einem der drei untersuchten Stämme beobachtet werden, wobei die Signifikanz mit Hilfe eines t-Tests ermittelt worden ist. Zunächst sind in Abbildung 36 die TICs von den drei Stämmen gezeigt. Die weiteren TICs können im Anhang B (*P. aeruginosa* ATCC 10145:

Ergebnisse und Diskussion

Abbildung 58, *P. aeruginosa* FRD1: Abbildung 59, *P. aeruginosa* PAO1: Abbildung 60) eingesehen werden. Der Verfahrensblank ist in der Abbildung 61 im Anhang B gezeigt.

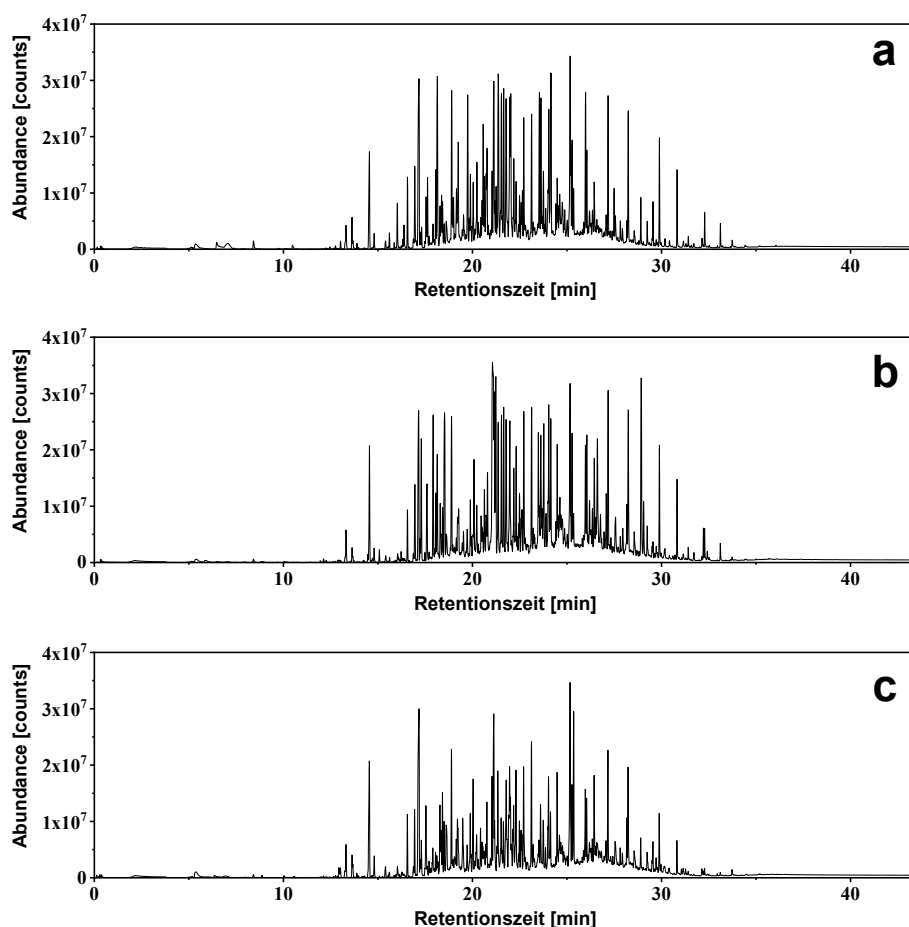


Abbildung 36: Darstellung der Totalionenchromatogramme (TIC) der Analyse der TFME Filme aus der Kultivierung von a: *P. aeruginosa* ATCC 10145, b: *P. aeruginosa* PAO1 und c: *P. aeruginosa* FRD1 unter anaeroben Bedingungen und auf ASM-Agar im in vitro Biofilmmodell.

Qualitativ sind bei dem Vergleich der TICs Unterschiede bei den Intensitäten abundanter Peaks zu beobachten. Neben den Unterschieden in der Intensität bei sehr abundanten Peaks, weisen die drei TICs vor allem die Gemeinsamkeit koelulierender, nicht aufgelöster Peaks im Retentionszeitenbereich zwischen 17 min und 30 min auf. Solche koelulierende, nicht aufgelöste Peaks könnten durch die Verwendung einer comprehensiven zweidimensionalen GC aufgelöst und analysiert werden. Hierzu wurden im Rahmen dieser Arbeit Untersuchungen durchgeführt, welche in Kapitel 5.4 ausführlich beschrieben worden sind. Die Intensitäten von den Peaks der detektierten Metabolite können in Abhängigkeit vom Bakterienstamm erhöht oder erniedrigt sein. Diese Variation der Signalintensität kann zur Differenzierung von Bakterienstämmen von *P. aeruginosa* in CF-Sputum verwendet werden. Zur Ermittlung

Ergebnisse und Diskussion

solcher Bakterienstamm selektiven Markermetabolite, wurde zuerst eine PCA durchgeführt. Die hieraus erhaltenen *scores* und *loadings plots* sind in Abbildung 37 dargestellt.

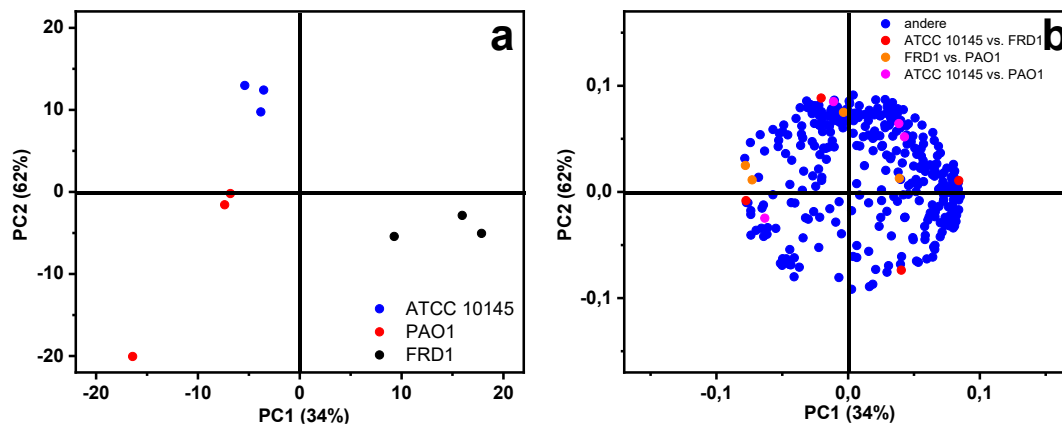


Abbildung 37: Vergleich der zur Verfügung stehenden *P. aeruginosa* Stämme (Abb. a: blau = ATCC 10145; rot = PAO1; schwarz = FRD1) mittels deren extrazellulären volatilen Metabolite. Die Kultivierung der drei Bakterienstämme erfolgte unter anaeroben Bedingungen sowie auf ASM-Agar im in vitro Biofilmmodell. Der Vergleich wurde mittels PCA durchgeführt. In Abbildung a ist der *scores plot* und in Abbildung b der *loadings plot* gezeigt. Im *loadings plot* sind die Metabolite gekennzeichnet, welche in Abbildung 38 und Abbildung 39 als Balkendiagramm gezeigt sind.

Eine Differenzierung zwischen den drei Stämmen des Bakteriums *P. aeruginosa* ist, wie anhand des *scores plot* in der Abbildung 37 a zu erkennen ist, mit Hilfe der ersten beiden Hauptkomponenten möglich. Kumuliert wird mit diesen beiden Hauptkomponenten eine Varianz von 96 % erklärt. Weiterhin ist ersichtlich, dass die erste Hauptkomponente hauptsächlich den Unterschied zwischen den Stämmen *P. aeruginosa* ATCC 10145 sowie PAO1 und dem Stamm *P. aeruginosa* FRD1 erklärt. Der Unterschied zwischen den Stämmen *P. aeruginosa* ATCC 10145 und *P. aeruginosa* PAO1 wird hauptsächlich durch die zweite Hauptkomponente erklärt. Die Varianz zwischen den Replikaten eines Stammes ist, mit Ausnahme der Replikate von *P. aeruginosa* PAO1, im Vergleich zur Kultivierung auf den anderen verwendeten Nährmedien sehr gering. Ein Replikat des Stammes *P. aeruginosa* PAO1 weicht im *scores plot* deutlich von den anderen beiden Replikaten ab. Diese Abweichung könnte zum einen durch Unregelmäßigkeiten in der analytischen Messung (Anhang B) oder zum anderen durch Abweichung in der Probenvorbereitung verursacht werden. Die biologische Varianz ist ebenfalls bei der Diskussion zu berücksichtigen, da allerdings ausschließlich technische Replikate analysiert worden sind, ist diese hier als gering

Ergebnisse und Diskussion

anzunehmen. Trotz dieses Ausreißers ist eine eindeutige Differenzierung zwischen den Bakterienstämmen mit den ersten beiden Hauptkomponenten sowie eine Zuordnung von Metaboliten (Übereinstimmungswahrscheinlichkeit $\geq 80\%$) zu einem der verwendeten Bakterienstämme unter zur Hilfenahme des *loadings plot* (Abbildung 37 b) möglich. Basierend auf dem *scores* und *loadings plot* ist zu vermuten, dass der Unterschied zwischen den Bakterienstämmen *P. aeruginosa* ATCC 10145 und FRD1 sowie zwischen *P. aeruginosa* PAO1 und FRD1 größer ist als zwischen *P. aeruginosa* ATCC 10145 und PAO1. Dieses kann durch die Differenzierung der genannten Stämme bereits in der ersten Hauptkomponente sowie der Anzahl an ermittelten Features, dargestellt im *loadings plot* (Abbildung 37 b), begründet werden. Eine quantitative Bewertung dieser Beobachtung kann mit Hilfe einer Signifikanzanalyse durchgeführt werden. Hierzu wurde die Varianz der Signalintensität bei den Features zwischen allen Stämmen mittels t-Tests (zweiseitige Verteilung, heteroskedastisch) durchgeführt. Die Tabelle 11 fasst die Ergebnisse der Signifikanzanalyse zusammen. Eine detaillierte Übersicht über die Metabolite ist der Tabelle 22 (*P. aeruginosa* FRD1 vs. ATCC 10145), Tabelle 23 (*P. aeruginosa* FRD1 vs. PAO1) sowie Tabelle 24 (*P. aeruginosa* ATCC 10145 vs. PAO1) im Anhang B zu entnehmen.

Tabelle 11: Übersicht über die Anzahl der ermittelten Metabolite mit einer signifikanten Abweichung der Signalintensität sowie der Zuordnung zu den verschiedenen Signifikanzlevel.

	<i>P. aeruginosa</i> FRD1 vs. ATCC 10145	<i>P. aeruginosa</i> FRD1 vs. PAO1	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 10145 vs. PAO1
*** (99,9 %)	8	5	1
** (99 %)	27	7	3
* (95 %)	35	24	24
Gesamt	70	36	28

Mittels Signifikanzanalyse konnten in Summe 70 Metabolite ermittelt werden, deren Peaks eine signifikante Abweichung (mind. 95%) der Intensitäten zwischen den Stämmen *P. aeruginosa* FRD1 und ATCC 10145 aufweisen. Analog zu der qualitativen Beobachtung aus dem *scores* und *loadings plot* nimmt die Anzahl an Metaboliten mit einem signifikanten Unterschied in der Signalintensität bei dem Vergleich der Bakterienstämme *P. aeruginosa* FRD1 und PAO1 (36 Metabolite) sowie *P. aeruginosa*

Ergebnisse und Diskussion

ATCC 10145 und PAO1 (28 Metabolite) signifikant ab. Neben der Abnahme der Summe der Metabolite nimmt auch der Anteil der Metabolite mit der größten Signifikanz ($p = 0,001$; 99,9%) an der Gesamtzahl ab. Sowohl dieser quantitative als auch der qualitative Vergleich mittels *scores* und *loadings plot* zeigt, dass die Stämme *P. aeruginosa* ATCC 10145 und PAO1 in ihrem extrazellulären volatilen Metabolom ähnlicher zueinander sind als der Stamm *P. aeruginosa* FRD1. Dieses kann auf den unterschiedlichen Phänotyp, welcher wie in Kapitel 5.3.2 erläutert, einen großen Einfluss auf das extrazelluläre volatile Metabolom hat, zurückgeführt werden. Des Weiteren ist zu beobachten, dass der Unterschied von *P. aeruginosa* FRD1 zum Stamm *P. aeruginosa* ATCC 10145 größer ist als zum Stamm *P. aeruginosa* PAO1. Dieses könnte darauf zurückzuführen sein, dass der Stamm *P. aeruginosa* ATCC 10145 der Neotypstamm von *P. aeruginosa* ist und der Stamm *P. aeruginosa* PAO1 ursprünglich ein klinisches Isolat ist. Diese Hypothese kann nur durch Untersuchungen mit einer großen Anzahl von Stämmen bzw. Isolaten des Bakteriums *P. aeruginosa*, mit stark unterschiedlichen Phäno- und Genotypen verifiziert oder falsifiziert werden. Die Hypothese stammt aus theoretischen Überlegungen, da *P. aeruginosa* PAO1 ursprünglich aus einer Brandwunde eines Patienten isoliert wurde und somit Umwelteinflüssen ausgesetzt war. Diese Umwelteinflüsse könnten zu Mutationen geführt haben, welche den Stamm *P. aeruginosa* PAO1 resistent gegenüber solchen Einflüssen gemacht haben, wodurch trotz gleichem mukoiden Phänotyp andere Gene vorhanden sind und dadurch die Phänotypen zwischen den beiden Bakterienstämme divergieren. *P. aeruginosa* ATCC 10145 wurde 1947 zum ersten Mal von Kavanagh [177] verwendet. Kavanagh machte allerdings keine Angaben zum Herkunftsdatum sowie dem Ursprung des Bakterienstammes [66,177]. Aufgrund dieser fehlenden Informationen bzgl. der ursprünglichen Isolierung von *P. aeruginosa* ATCC 10145 und den fehlenden Daten einer Vielzahl von Stämmen bzw. Isolaten des Bakteriums *P. aeruginosa* ist eine eindeutige Aussage nicht möglich.

Im Folgenden ist ein Vergleich zwischen den verwendeten Bakterienstämmen gezeigt. Verglichen wurde die Intensität der detektierten Peaks von ausgewählten extrazellulären volatilen Metaboliten. Die Auswahl der Metabolite erfolgte unter zur Hilfenahme des *loadings plot*, in welchem die ausgewählten Metabolite markiert worden sind (Abbildung 37 b). Die Signalintensitäten sind als Mittelwert, mit der

Ergebnisse und Diskussion

zugehörigen Standardabweichung in Form von Balkendiagrammen in Abbildung 38 dargestellt.

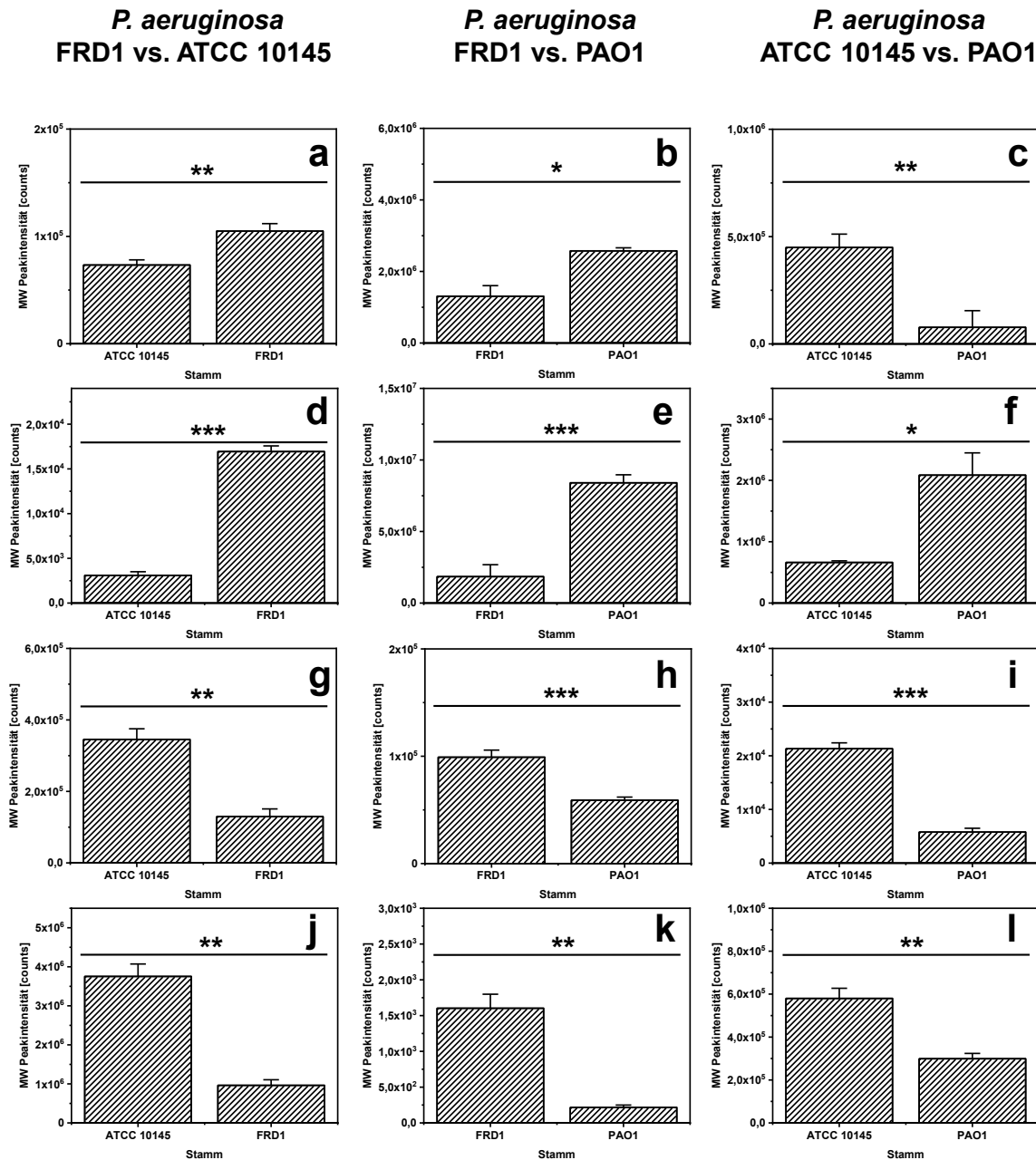


Abbildung 38: Graphische Darstellung des statistischen Vergleiches der Signalintensität von zwölf Metaboliten bei einer Kultivierung auf ASM-Agar unter anaeroben Bedingungen im in vitro Biofilmmmodell. Hierzu wurde der Bakterienstamm *P. aeruginosa* FRD1 mit dem Stamm *P. aeruginosa* ATCC 10145 (a, d, g, j), der Stamm *P. aeruginosa* FRD1 mit dem Stamm *P. aeruginosa* PAO1 (b, e, h, k) sowie der Stamm *P. aeruginosa* ATCC 10145 mit dem Stamm *P. aeruginosa* PAO1 (c, f, i, l) verglichen. Je Bakterienstamm wurden drei Replikate analysiert. Die Mittelwerte der Signalintensitäten sowie die zugehörigen Standardabweichungen sind als Balkendiagramme dargestellt. Die Signifikanzanalyse der Differenz der Signalintensitäten wurde mit Hilfe eines T-Tests ($n = 3$; zweiseitige Verteilung, heteroskedastisch) durchgeführt. Die gezeigten Metabolite sind: a = Benzophenon, b = Tetradecan, c = Toluol, d = 2-Ethylhexanal, e = 3-Methoxypropylamin, f = Trans-2-Dodecenylnacetat, g = 1-Hexadecanol, h = Pentadecan, i = Methylbenzoat, j = 2-Octanon, k = Isopren, l = 1-Decanol. * = 0,05; ** = 0,01; *** = 0,001.

Ergebnisse und Diskussion

Anhand der ausgewählten Beispiele ist zu erkennen, dass mittels Datenanalyse des extrazellulären volatilen Metaboloms von drei verschiedenen *P. aeruginosa* Stämmen, selektive Markermetabolite zugeordnet werden konnten. Die Peaks dieser Metabolite weisen signifikant unterschiedliche Intensitäten in Abhängigkeit von untersuchten *P. aeruginosa* Stamm auf. Mit Hilfe dieser Metabolite ist somit eine Differenzierung zwischen den drei Stämmen anhand der Signalintensitäten möglich. Von großer Bedeutung bei Atemwegsinfektionen im Rahmen der CF-Erkrankung ist aufgrund des mukoiden Phänotyps der Bakterienstamm *P. aeruginosa* FRD1. Mukoide Bakterienstämme von *P. aeruginosa* werden häufiger bei chronischen Infektionen der Lunge isoliert, wobei die Antibiotikaresistenz der Biofilme von mukoiden *P. aeruginosa* Stämmen gegenüber planktonischen Zellen deutlich erhöht ist. Damit eine Eradikation von mukoiden Bakterienstämmen möglich ist, ist eine frühzeitige Identifizierung von *P. aeruginosa* notwendig. In Abbildung 39 sind deswegen exemplarisch die mittleren Intensitäten der detektierten Peaks von den Metaboliten Dibutylamin und 2-Hexanon vergleichend dargestellt, welche das Potenzial aufweisen selektiv die Anwesenheit von *P. aeruginosa* FRD1 anzuzeigen.

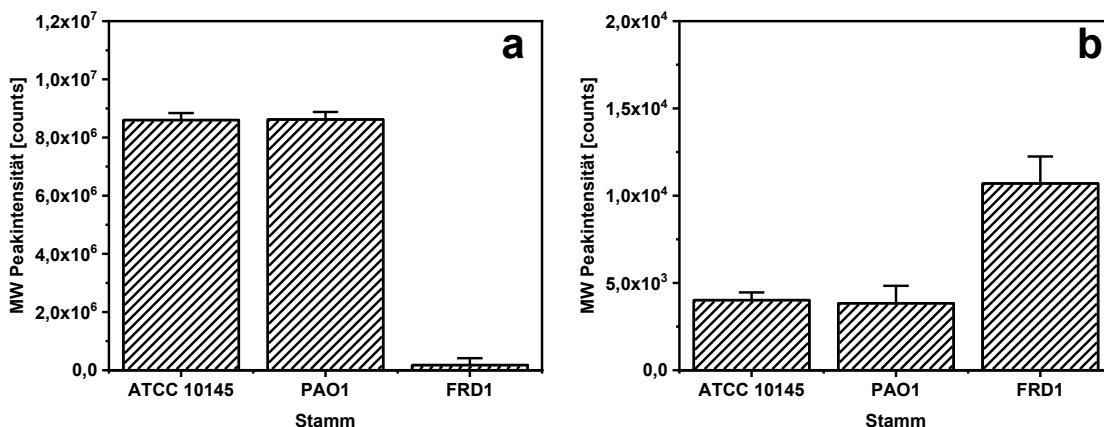


Abbildung 39: Vergleich der mittleren Signalintensitäten ($n = 3$) von zwei extrazellulären volatilen Metaboliten zwischen den Bakterienstämmen *P. aeruginosa* ATCC 10145, PAO1 und FRD1. Die Bakterienstämme wurden unter anaeroben Bedingungen auf ASM-Agar im in vitro Biofilmmodell kultiviert. Die Mittelwerte der Signalintensitäten sowie die zugehörigen Standardabweichungen ($n = 3$) sind als Balkendiagramme dargestellt. Die Abbildung a zeigt die Signalintensitäten des Metabolits Dibutylamin und die Abbildung b die Signalintensitäten des Metabolite 2-Hexanon.

Die Peaks der Metabolite Dibutylamin und 2-Hexanon weisen, unter Berücksichtigung der Standardabweichung, ähnliche Intensitäten bei den Stämmen *P. aeruginosa* ATCC 10145 und PAO1 auf. Im Gegensatz dazu ist die Signalintensität der beiden Metabolite bei dem Stamm *P. aeruginosa* FRD1 für Dibutylamin (Abbildung 39 a)

Ergebnisse und Diskussion

signifikant reduziert und für 2-Hexanon signifikant erhöht (Abbildung 39 b). Mit Hilfe dieser beiden extrazellulären volatilen Metabolite ist somit eine Differenzierung zwischen den nicht-mukoiden Stämmen *P. aeruginosa* ATCC 10145 sowie PAO1 und dem mukoiden Stamm *P. aeruginosa* FRD1, ausschließlich durch die Signalintensität möglich.

Dibutylamin gehört zu der Substanzklasse der nicht-zyklischen Amine und kann als sekundäres Amin typisiert werden. In der Literatur wurde bereits ausführlich beschrieben, dass Mikroorganismen, wie z.B. Bakterien, in der Lage sind, sekundäre Amine katalytisch in Nitrosamine umzusetzen. Die Bakterien katalysieren die N-Nitrosierung insofern, dass diese Reaktion bei physiologischen pH-Werten (ca. 7,25 [178]) stattfinden kann [179–181]. Calmels et al. [178] konnten die katalytische Wirkung von Mikroorganismen auf die N-Nitrosierung bei 38 Stämmen von Mikroorganismen, u.a. isoliert aus der menschlichen Trachea, nachweisen. Die Autoren untersuchten auch verschiedene Stämme des Bakteriums *P. aeruginosa* und konnten für einige der untersuchten Stämme eine katalytische Aktivität nachweisen [178]. N-Nitrosamine sind karzinogen und Rowland et al. [182] haben in ihrer Studie gezeigt, dass viele Bakterien solche N-Nitrosamine wieder abbauen und in mehrere Produkte umwandeln können. Zum einen werden durch die Bakterien das Ausgangsamin sowie das Nitrition gebildet. Zum anderen entstehen flüchtige Substanzen, welche von den Bakterien aus Dimethylnitrosamin gebildet werden. Untersucht wurde von den Autoren auch ein Stamm des Bakteriums *P. aeruginosa*, allerdings zieht die Studie ausschließlich Rückschlüsse auf Vorgänge im humanen Intestinaltrakt [182]. Solche Untersuchungen bezogen auf die humane Lunge und Atemwegsinfektionen im Kontext der CF-Erkrankung wurden bislang noch nicht publiziert. Allerdings kann vermutet werden, dass sowohl die N-Nitrosierung als auch der Abbau von N-Nitrosamine durch Bakterien in der menschlichen Trachea vorkommen kann. Wie die verschiedenen Autoren belegt haben, können beide Prozesse durch das Bakterium *P. aeruginosa* ablaufen, so dass das gefundene Dibutylamin ein Produkt des Abbaus von N-Nitrosaminen sowie ein Edukt der N-Nitrosierung sein kann. Dementsprechend könnte die Intensität des detektierten Metabolitsignals zum einen, wie in Abbildung 39 a gezeigt, von dem Bakterienstamm aber zum anderen auch von dem Zeitpunkt der Probenahme abhängig sein. Der Probenahmezeitpunkt könnte eine Variation der Signalintensität hervorrufen, da die N-

Ergebnisse und Diskussion

Nitrosierung sowie der Abbau der dadurch gebildeten N-Nitrosaminen dauerhaft abläuft und somit Schwankungen erwartet werden können.

2-Hexanon kann der Substanzklasse der Methylketone zugeordnet werden. Forney et al. [183] haben in ihrem Übersichtsartikel bereits im Jahr 1971 Studien zur Biologie der Methylketone untersucht und zusammengefasst. Bereits zu diesem Zeitpunkt konnte nachgewiesen werden, dass einige Bakterien Methylketone durch Oxidationsprozesse aus aliphatischen Kohlenwasserstoffen produzieren. Weiterhin haben Thijsse et al. [184] herausgefunden, dass *P. aeruginosa* Stämme Methylketone, wie z.B. 2-Hexanon, akkumulieren, wenn die β -Oxidation von Alkanen inhibiert ist. Die biologische Synthese der Methylketone erfolgt unter diesen Umständen dann durch die Decarboxylierung von (instabilen) β -Ketosäuren. [185] Die Ergebnisse von Thijsse et al. [184] wurden durch die Forschungsergebnisse von Robinson et al. [186] bestätigt. Forney et al. [187,188] haben in zwei Publikationen die Bildung von Methylketonen aus n-Alkanen bei Bakterien nachgewiesen. Außerdem haben Yan et al. [189] in ihrer im Jahr 2020 veröffentlichten Publikation die Produktion von Methylketonen, wie z.B. 2-Nonanon, in *Escherichia coli* (*E. coli*) Bakterien durch metabolisches Engineering der β -Oxidation unter Verwendung von Thioesterasen beschrieben. 2-Hexanon sowie weitere Methylketone wurden bereits bei mehreren Untersuchungen des Metaboloms von *P. aeruginosa* als volatile Metabolite identifiziert [92,100,104,190,191]. Auch im CF-Sputum konnten Methylketone, wie z.B. 2-Nonanon [102] nachgewiesen werden. Allerdings können Methylketone, wie Bos et al. [104] berichten, ebenfalls von anderen Bakterien wie z.B. *S. aureus* produziert werden. Da *S. aureus* ebenfalls ein CF-relevantes Pathogen ist, muss bei der Analyse des extrazellulären volatilen Metaboloms von *P. aeruginosa* im Kontext von Atemwegsinfektionen bei der CF-Erkrankung ebenfalls der Einfluss anderer CF-relevanter Pathogene berücksichtigt werden.

Dies ist die größte Limitierung dieser Untersuchungen, da ausschließlich Monokulturen verschiedener Stämme des Bakteriums *P. aeruginosa* verwendet worden sind. In dieser *in vitro* Studie konnte eine große Anzahl an Metaboliten zugeordnet werden, welche selektiv von einem der drei Bakterienstämme emittiert worden sind. Diese Metabolite können in weitergehenden Studien zum extrazellulären Metabolom von *P. aeruginosa* im CF-Sputum oder der Ausatemluft von CF-Patienten verwendet werden, allerdings sind vorhergehend weitergehende *in vitro* Studien mit Co-Kulturen von CF-

Ergebnisse und Diskussion

relevanten Bakterien notwendig. Diese Notwendigkeit ergibt sich aus synergetischen und antagonistischen Effekten zwischen den Bakterien, welche einen Einfluss auf das extrazelluläre volatile Metabolom haben können, als auch auf der metabolischen Synthese von Substanzen durch mehrere Metabolite [192]. Hierdurch können zum einen Bakterien spezifische Metabolite identifiziert werden und zum anderen Bakterienstamm selektive Metabolite ausgeschlossen werden, weil sie ebenfalls von anderen Bakterien metabolisiert werden. Da auch *in vitro* Co-Kulturen mit CF-relevanten Bakterien die Bedingungen in einer CF-Lunge widerspiegeln können, müssen die Markermetabolite unbedingt durch Studien an CF-Sputum verifiziert bzw. falsifiziert werden. Eine weitere Limitierung der gezeigten Studien zum extrazellulären volatilen Metabolom ist die Zuordnung der Moleküle. Diese wurde in dieser Studie mit einer metabolomspezifischen EI-MS Datenbank durchgeführt. Allerdings ist der Vergleich der EI-Massenspektren limitiert, da z.B. Spektren von Molekülen, welche an zwei verschiedenen Positionen substituiert sind, meistens sehr ähnlich und kaum unterscheidbar sind. Für eine genaue Identifizierung der Moleküle sind Vergleiche der Retentionszeiten mit authentischen Standards oder mit dem Retentionsindex sowie komplementäre Analysenmethoden notwendig.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass trotz den diskutierten Limitierungen Bakterienstamm selektive Metabolite für drei verschiedene *P. aeruginosa* Stämme zugeordnet werden konnten. Dies erfolgte in einem *in vitro* Biofilmmodell und unter Bedingungen, welche zuvor denen in einer CF-Lunge angepasst worden sind. Aufgrund der Analyse des extrazellulären volatilen Metaboloms unter CF-ähnlichen Bedingungen in dieser *in vitro* Studie, ist eine Verwendung dieser Metabolite, mit den zuvor diskutierten Einschränkungen, in komplexeren *in vitro* Studien zu Atemwegsinfektionen im Rahmen der CF-Erkrankung sowie in *in vivo* Studien an CF-Patienten bzw. CF-Sputum möglich. Weitere Metabolite könnten zugeordnet werden, sollte es gelingen mittels einer geeigneten Technik die koelutierenden und nichtaufgelösten Peaks im Retentionszeitenbereich zwischen 17 min und 30 min chromatographisch zu trennen.

5.4 Entwicklung und Anwendung einer Flüssigextraktionsmethode für TFME Sorptionsfilme zur Analyse von mVOCs mittels GCxGC-qMS

5.4.1 Optimierung einer GCxGC-qMS Methode zur Analyse von mVOCs

Die Notwendigkeit der Verwendung der zweidimensionalen komprehensiven GC (GCxGC) ergibt sich aus der Betrachtung der Analysen des extrazellulären volatilen Metaboloms von *P. aeruginosa* im *in vitro* Biofilmmodell (vgl. z.B. Kapitel 5.3.5) unter anaeroben Bedingungen. In allen TICs konnten in einem Retentionszeitenbereich von 17 – 30 Minuten koeluirende Analyten festgestellt werden, welche mit Hilfe der verwendeten TD-GC-qMS nicht basisliniengetrennt dargestellt werden konnten (Abbildung 36). In diesem Retentionszeitenbereich sind allerdings mittelpolare Substanzen zu erwarten, welche auf Basis der Publikation von Bos et al. [104] für die Metabolomuntersuchung von *P. aeruginosa* von besonderem Interesse sind. Deswegen soll in diesem Kapitel eine GCxGC-qMS Methode für die Analyse sowie eine Flüssigextraktionsmethode für die TFME Filme entwickelt und auf das *in vitro* Biofilmmodell angewendet werden. Eine Flüssigextraktion ist notwendig, da kein TD-System für die GCxGC-MS im Labor zur Verfügung stand.

Die initiale Methode basiert auf einer etablierten Methode, welche in der Publikation von Li et al. [193] beschrieben worden ist. Die Optimierung dieser GCxGC-EI-qMS Methode erfolgte mit Hilfe von acht Metaboliten: Dimethylsulfid (1), 2-Methylbutanal (2), Dimethyldisulfid (3), 2-Hexanon (4), 2-Heptanon (5), 1-Octanol (6), 2-Nonanon (7) und 2-Aminoacetophenon (8), welche auf Basis der von Bos et al. [104] publizierten Metabolite von *P. aeruginosa* ausgewählt worden sind. Aufgrund der Dampfdrücke der Modellsubstanzen wurde die publizierte Methode hinsichtlich der initialen Temperatur sowie der Injektionstemperatur verändert. Als initiale Ofenraumtemperatur wurde 40 °C und 250 °C als Injektionstemperatur gewählt. Weiterhin wurde initial ein Temperaturgradient von 10 °C·min⁻¹ gewählt, um eine möglichst schnelle Analyse zu gewährleisten.

Anfänglich wurde ein Mixstandard, bei dem jede Modellsubstanz eine Konzentration von 100 µM aufwies, mit der initialen Methode analysiert. Mit dieser Methode konnten sechs der acht Substanzen basisliniengetrennt dargestellt werden. In Abbildung 40 ist der *Contour-Plot* der GCxGC-qMS Analyse gezeigt.

Ergebnisse und Diskussion

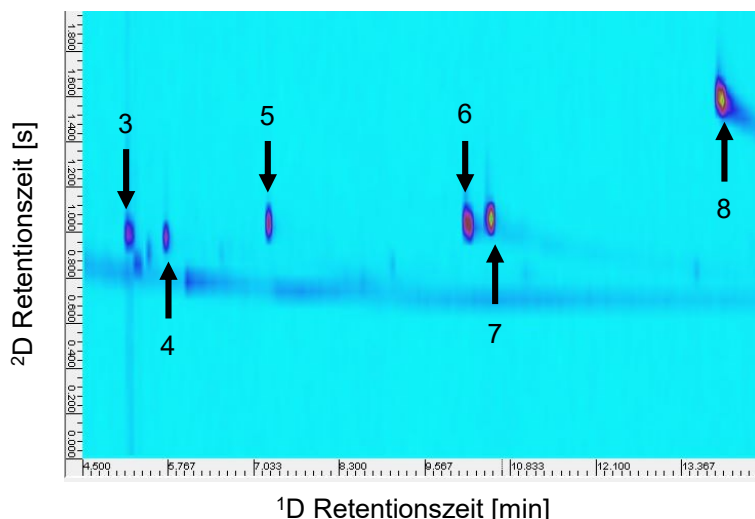


Abbildung 40: Contour-Plot der GCxGC-qMS Analyse des Mixstandards ($c = 100 \mu\text{M}$) mit der initialen Methode. Mittels NIST-Datenbank konnten die Metabolite Dimethyldisulfid (3), 2-Hexanon (4), 2-Heptanon (5), 1-Octanol (6), 2-Nonanon (7) und 2-Aminoacetophenon (8), zugeordnet werden.

Der *Contour-Plot* stellt das 2D-Chromatogramm der GCxGC-qMS Analyse graphisch dar. Auf der x-Achse ist die Retentionszeit der ersten und auf der y-Achse die Retentionszeit der zweiten Dimension aufgetragen. In Abbildung 40 sind die zugeordneten Substanzen markiert. Die Zuordnung erfolgt über einen Vergleich der EI-Massenspektren mit der Spektrendatenbank NIST. Die qualitative Auswertung des *Contour-Plots* ergab, dass alle detektierten Substanzen basisliniengetrennt dargestellt werden können. Allerdings ist zu bemerken, dass die Substanzen Dimethylsulfid und 2-Methylbutanal mit der verwendeten Methode nicht analysiert werden können. Auf Grundlage der Dampfdrücke und Polaritäten der beiden Substanzen [149,194], ist davon auszugehen, dass beide früher eluieren als das Dimethyldisulfid. Dadurch kann vermutet werden, dass beide Substanzen in der Zeit der Lösungsmittelausblendung eluieren.

Die Methodenoptimierung wurde im Folgenden mit dem Ziel der Detektion der Substanzen Dimethylsulfid und 2-Methylbutanal sowie der Erzeugung schmaler, symmetrischer Peaks durchgeführt. Hierzu wurde die Haltezeit der initialen Temperatur und die Heizrate optimiert. Zur Optimierung der Haltezeit der initialen Temperatur, wurden die Haltezeiten 0,2 min (initiale Methode) mit den Einstellungen 4,5 min und 6 min miteinander verglichen. Die weiteren Methodeneinstellungen wurden nicht verändert. In der Abbildung 41 sind die drei resultierenden *Contour-Plots* gegenübergestellt.

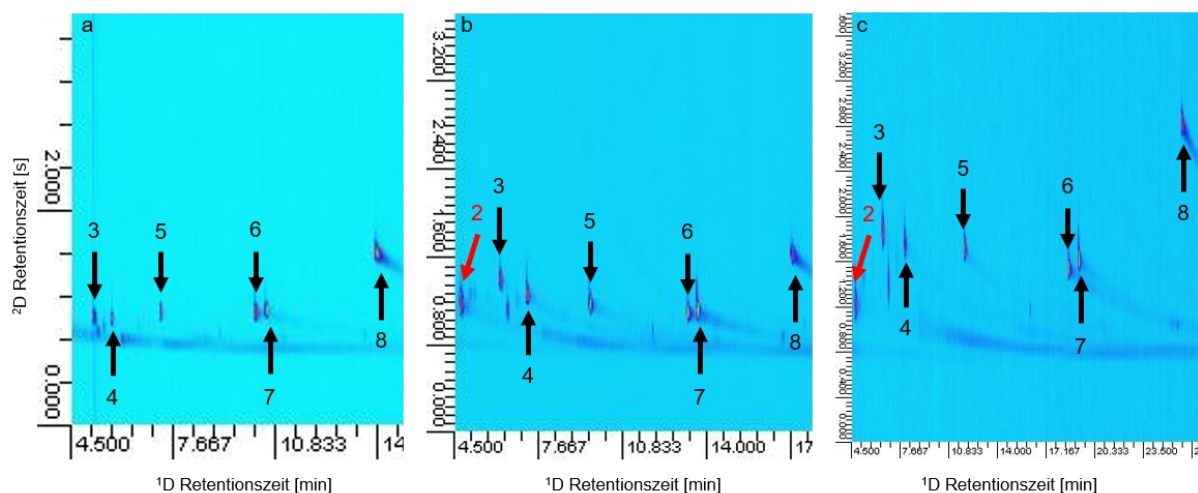


Abbildung 41: Contour-Plot der GCxGC-qMS Analysen des Mixstandards ($c = 100 \mu\text{M}$) mit variierender initialer Haltezeit (a: 0,2 min; b: 4,5 min; c: 6 min). Mittels NIST-Datenbank konnten die Metabolite 2-Methylbutanal (2), Dimethyldisulfid (3), 2-Hexanon (4), 2-Heptanon (5), 1-Octanol (6), 2-Nonanon (7) und 2-Aminoacetophenon (8) zugeordnet werden.

Die Verlängerung der initialen Haltezeit hat zur Folge, dass das 2-Methylbutanal detektiert werden kann. Anhand der *Contour-Plots* ist zu erkennen, dass die zuletzt eluierende Substanz ein Peak tailing aufweist. Außerdem wird die Halbwertsbreite bei einer Verlängerung der initialen Haltezeit von 0,2 s (Haltezeit: 0,2 min) auf 0,3 s (Haltezeit: 6 min) vergrößert. Im Gegensatz dazu, kann qualitativ anhand der *Contour-Plots* beobachtet werden, dass sich die Peakbreite der Signale für die detektierten weiteren Analyte mit steigender initialer Haltezeit verringert. Deswegen wurde eine initiale Haltezeit von sechs Minuten ausgewählt und die Heizrate optimiert, um das Peak tailing von 2-Aminoacetophenon zu reduzieren. Hierzu wurden der Mischstandard mit der optimierten initialen Haltezeit und einer Heizrate von $10 \text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$, $6 \text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$, $5 \text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ und $4 \text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ analysiert. In Abbildung 42 sind die resultierenden *Contour-Plots* gezeigt.

Ergebnisse und Diskussion

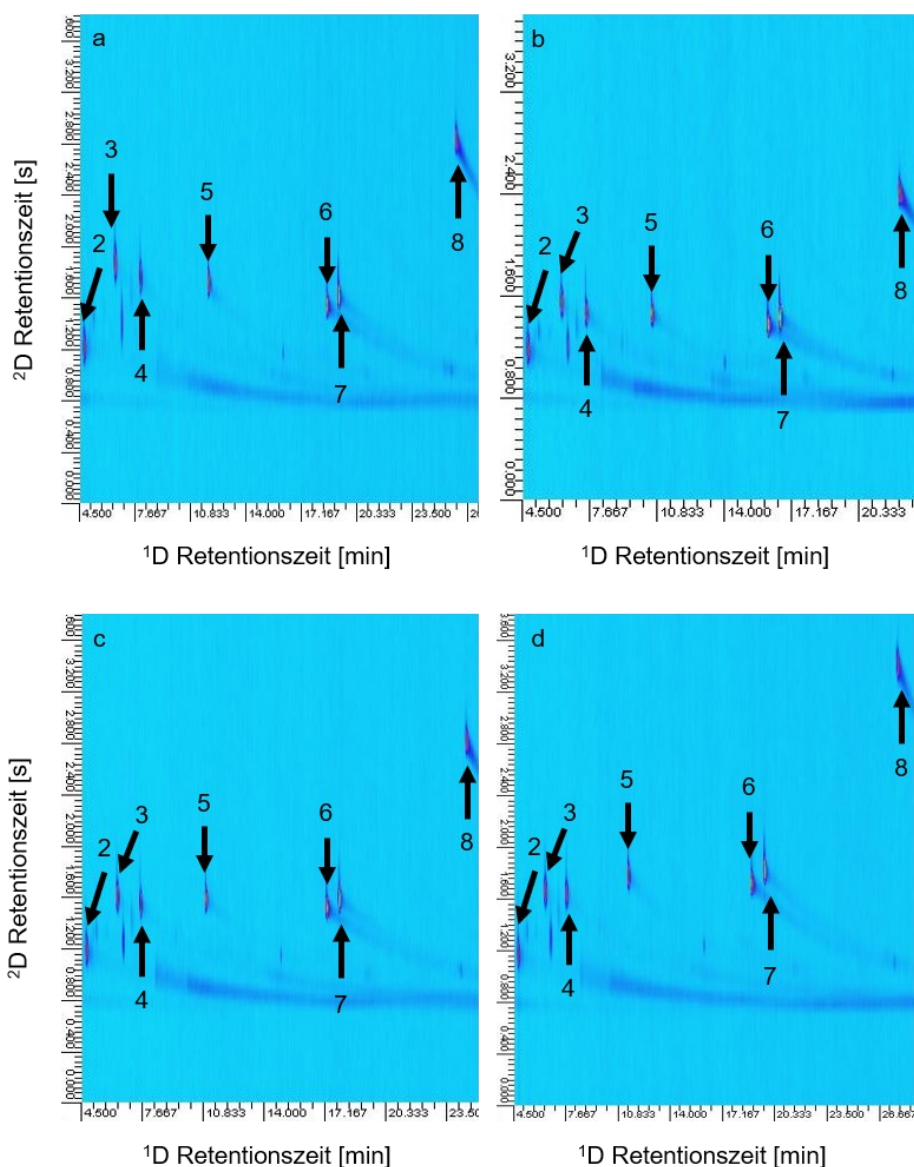


Abbildung 42: Contour-Plot der GCxGC-qMS Analysen des Mixstandards ($c = 100 \mu\text{M}$) mit der optimierten Haltezeit sowie variierender Heizraten (a: $10 \text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$; b: $6 \text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$; c: $5 \text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$; d: $4 \text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$). Mittels NIST-Datenbank konnten die Metabolite 2-Methylbutanal (2), Dimethyldisulfid (3), 2-Hexanon (4), 2-Heptanon (5), 1-Octanol (6), 2-Nonanon (7) und 2-Aminoacetophenon (8) zugeordnet werden.

Erwartungsgemäß erhöht sich mit der Erniedrigung der Heizrate die Halbwertsbreite des Signals für den Analyten 2-Aminoacetophenon von $0,24 \text{ s}$ ($10 \text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$) auf $0,36 \text{ s}$ ($6 \text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ und $5 \text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$) bzw. $0,42 \text{ s}$ ($4 \text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$). Allerdings konnte das Peaktailing mit der Erniedrigung der Heizrate reduziert werden. Für 2-Aminoacetophenon wurde ein Tailingfaktor von zwei bei einer Heizrate von $10 \text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ berechnet. Im Vergleich hierzu sank mit abnehmender Heizrate der Tailingfaktor auf $1,0$ ($6 \text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ und $5 \text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$) bzw. $0,7$ ($4 \text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$). Unter Berücksichtigung der Peakbreiten, der

Tailingfaktoren sowie der Analysenzeit wurde eine Heizrate von $6\text{ °C}\cdot\text{min}^{-1}$ für die optimierte Methode ausgewählt.

Die Methodenoptimierung zeigt, dass mit Hilfe der comprehensiven zweidimensionalen GC eine Analyse der mVOCs möglich ist. Allerdings konnte auch nach Methodenoptimierung keine Analyse aller mVOCs erreicht werden, so dass vor allem Substanzen mit einem niedrigen Siedepunkt bzw. einem hohen Dampfdruck, wie z.B. Dimethylsulfid, nicht detektierbar waren. Hierfür ist eine tiefere initiale Ofenraumtemperatur notwendig (vgl. Kapitel 5.2.2). Im Gegensatz zu der eindimensionalen GC weist diese Methode den Vorteil einer deutlich höheren Peakkapazität auf, so dass koeluirende Peaks aufgelöst und damit zuordenbar sind.

5.4.2 Entwicklung und Optimierung einer Flüssigextraktion von TFME Filmen für die Analyse mittels GCxGC-qMS

Die Desorption von Analyten von TFME Filme erfolgt nach Jiang und Pawliszyn [116] hauptsächlich mit Hilfe der direkten thermischen Desorption. Flüssigextraktionen von TFME Filmen sind zwar publiziert worden, allerdings handelt es sich bei den Studien um *target* Analysen [121,122]. *Suspected-target* Analysen mittels TFME als Aufkonzentrierungs- oder Beprobungsmethode sind ausschließlich mit einer Thermodesorptionseinheit direkt gekoppelt mit einem GC-MS veröffentlicht worden [116]. Im Vergleich zu der Flüssigextraktion der TFME Filme, weist die direkte thermische Desorption den Vorteil auf, dass hierbei die Analyten diskriminierungsfrei und ohne zusätzliche Arbeitsschritte der Analyse zugeführt werden [116]. Eine direkte thermische Desorption kann an dem zur Verfügung stehenden GCxGC-qMS nicht durchgeführt werden, so dass eine Flüssigextraktion für die *suspected-target* Analyse von mVOCs, unter Verwendung der in Kapitel 5.4.1 optimierten GCxGC-qMS Methode, entwickelt werden muss.

Zur Entwicklung einer Flüssigextraktion für einen *suspected-target* Ansatz sind verschiedene Methodenparameter zu berücksichtigen. Zum einen ist eine vollständige Extraktion von polaren und unpolaren Analyten notwendig. Zum anderen ist für die Analyse von leichtflüchtigen mVOCs eine schnelle Extraktion mit einer hohen Effizienz erforderlich. Eine vollständige Flüssigextraktion kann nur gewährleistet werden, wenn verschiedene Solventien mit unterschiedlicher Polarität verwendet werden. Allerdings ist durch Forschungsarbeiten von Lee et al. [120] bekannt, dass unpolare

Ergebnisse und Diskussion

Lösungsmittel wie z.B. Chloroform, Tetrahydrofuran (THF), Hexan oder Toluol einen starken negativen Einfluss auf die Stabilität von PDMS haben. Des Weiteren führt die Verwendung solch unpolarer Lösungsmittel zu einer Schwellung des PDMS-Films. Lee et al. [120] konnten die Schwellung der PDMS-Filme in Zusammenhang mit einer erhöhten Konzentration von PDMS im Lösungsmittel bringen. Eine erhöhte PDMS-Konzentration in dem Lösungsmittel kann bei der Analyse durch Überlagerungseffekte störend sein. Dementsprechend wurden ausschließlich polare Lösungsmittel wie Acetonitril, Aceton, Methanol und Wasser hinsichtlich ihrer Eignung als Extraktionsmittel untersucht. Um eine schnelle und sensible Extraktion zu gewährleisten, wurden keine mehrstufigen Extraktionsprozesse mit verschiedenen Lösungsmitteln untersucht, sondern nur eine Aufkonzentrierung durch eine Lösungsmittelveaporation an den Extraktionsprozess angeschlossen.

Die Auswahl des Lösungsmittels erfolgte mit Hilfe eines Multistandards bestehend aus zehn möglichen Metaboliten von *P. aeruginosa*. Die Sorption des Multistandard (Konzentration je Analyt: 500 µM; Lösungsmittel Wasser), bestehend aus Dimethylsulfid (1; DMS), 2-Methylbutanal (2), Dimethyldisulfid (3; DMDS), 2-Hexanon (4), 2-Heptanon (5), 1-Octanol (6), 1-Undecen (9), 2-Nonanon (7), 2-Aminoacetophenon (8; 2-AA) und 1-Decanol (10), erfolgte mit halbierten TFME Filmen. Die Sorption erfolgte 48 h lang bei Raumtemperatur. Es erfolgte zum einen ein Vergleich der verschiedenen Lösungsmittel mit einer 18-stündigen Extraktion bei Raumtemperatur und ohne Konvektion des Lösungsmittels. Nach der Extraktion wurde der Film entfernt und die Flüssiginjektion in das 2D-GC-MS erfolgte direkt aus dem Extraktionsvial. Zum anderen wurde anschließend an die Extraktion eine Aufkonzentrierung, mittels einer vollständigen Evaporation des Lösungsmittels und anschließender Resuspendierung in 100 µL Methanol, durchgeführt. Für beide Methoden und allen Lösungsmitteln wurde eine Zweifachbestimmung durchgeführt und die Analyse erfolgte mit der in Kapitel 5.4.1 optimierten Methode. Tabelle 12 fasst die zuordenbaren Analyten mit den verschiedenen Extraktionsmethoden und verwendeten Lösungsmitteln zusammen.

Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 12: Zusammenfassung der Ergebnisse zur Flüssigextraktion der mit Modellsubstanzen beladenen TFME Filme mit verschiedenen Lösungsmitteln. Zusätzlich wurde bei einigen Lösungsmitteln eine Verdampfung mit anschließender Resuspendierung in Methanol durchgeführt.

	Aceton		ACN		MeOH		Aceton + Verdampf.		ACN + Verdampf.		MeOH + Verdampf.		Wasser + Verdampf.	
	1.	2.	1.	2.	1.	2.	1.	2.	1.	2.	1.	2.	1.	2.
DMS (1)	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
2-Methylbutanal (2)	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
DMDS (3)	X	X	X	X	✓	X	X	X	X	X	X	X	X	X
2-Hexanon (4)	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
2-Heptanon (5)	✓	✓	X	X	✓	✓	X	X	X	X	X	X	X	X
1-Octanol (6)	X	X	X	X	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	X	X
1-Undcen (9)	✓	✓	X	✓	✓	✓	X	X	X	X	X	X	X	X
2-Nonanon (7)	✓	X	X	✓	✓	X	✓	X	✓	✓	✓	✓	X	X
2-AA (8)	✓	✓	X	X	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	X	X
1-Decanol (10)	✓	✓	X	X	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	X	X

Analyten, die in der Tabelle 12 als zugeordnet markiert worden sind, wiesen in der EI-Spektrendatenbank des NIST eine Übereinstimmung von 80 % oder mehr auf. Direkte Injektionen des Extraktes in dem Lösungsmittel Wasser konnten aufgrund der ansonsten stattfinden Hydrolyse der stationären Phase [195], nicht durchgeführt werden. Der Vergleich der Lösungsmittel ohne anschließender Aufkonzentrierung zeigt, dass unter Verwendung von Acetonitril lediglich zwei Analyten nachweisbar

Ergebnisse und Diskussion

waren. Hingegen konnten bei der Verwendung von Methanol und Aceton sechs bzw. fünf Analyten nachgewiesen werden. Die geringe Anzahl an nachweisbaren Analyten bei der Verwendung von Acetonitril weist daraufhin, dass Acetonitril für die betrachtete Anwendung ein nicht geeignetes Extraktionsmittel ist. Generell kann beobachtet werden, dass die sehr leichtflüchtigen Substanzen, wie z.B. Dimethylsulfid und 2-Methylbutanal, mit keinem der verwendeten Lösungsmittel extrahiert werden konnte. Dieses könnte darauf zurückgeführt werden, dass diese Substanzen nur schwache Sorptionskräfte ausbilden und dadurch bei der Sorption schneller durch stärker sorbierende Substanzen substituiert werden. Der Vergleich der Ergebnisse der Versuche ohne und mit Aufkonzentrierung im Anschluss an die Extraktion zeigt, dass bei der Extraktion mit Acetonitril und anschließender Aufkonzentrierung deutlich mehr Analyten nachweisbar sind. Weiterhin ist allerdings zu beobachten, dass durch die Verwendung der Aufkonzentrierung weitere Analyten, unabhängig vom verwendeten Extraktionsmittel, nicht analysiert werden können. Zum Beispiel konnte 2-Heptanon ohne Aufkonzentrierung mit Aceton und Methanol als Extraktionsmittel nachgewiesen werden, mit Aufkonzentrierung allerdings nicht. Dies kann auf den Verdampfungsprozess zur Aufkonzentrierung zurückgeführt werden. Hierbei kann es neben der Verdampfung des Lösungsmittels auch zu einer Verdampfung leichtflüchtiger Analyten kommen. Auf Basis dieser Erkenntnisse wurde zur Anwendung des Flüssigextraktionsverfahrens zur Extraktion der TFME Filme für mVOCs von *P. aeruginosa* und weiteren Optimierung Methanol als Extraktionsmittel gewählt. Dieses wurde ausgewählt, da es sowohl mit als auch ohne Aufkonzentrierung vergleichbare Extraktionsergebnisse aufwies. Des Weiteren werden vor allem polare und mittelpolare Analyten erwartet. Die Polarität der Lösungsmittel kann anhand des von Reichardt [99,100] eingeführten empirischen Lösungsmittelpolaritätsparameter $E_T(30)$ abgeschätzt werden. Anhand der von Cerón-Carrasco et al. [196] publizierten $E_T(30)$ Werte ist zu erkennen, dass Methanol eine größere Polarität aufweist als Aceton, so dass mit Methanol eine größere Extraktionseffizienz von polaren bis mittelpolaren Analyten erzielt werden kann.

Im Folgenden soll die an Modellsubstanzen entwickelte Methode auf die Extraktion von TFME Filmen aus dem *in vitro* Biofilmmodell angewendet und anhand der Ergebnisse optimiert werden. Für die erstmalige Anwendung und Optimierung wird der Typstamm *P. aeruginosa* ATCC 10145 verwendet. Zunächst wurde ein Vergleich der

Ergebnisse und Diskussion

methanolischen Extraktion mit und ohne anschließender Aufkonzentrierung durchgeführt. Die erhaltenen *Contour-Plots* der GCxGC-qMS Analyse der Extrakte sind in Abbildung 43 gezeigt.

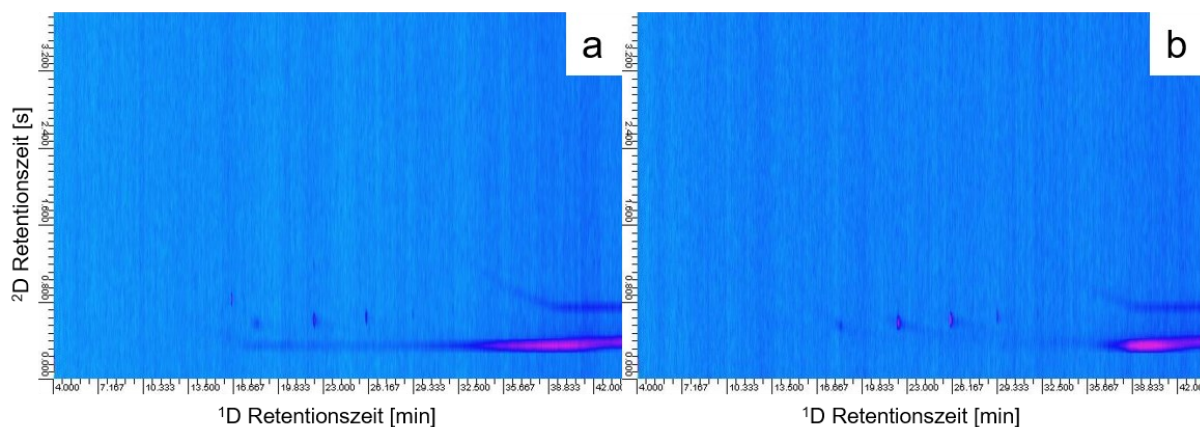


Abbildung 43: *Contour-Plots* der GCxGC-qMS Analyse der methanolischen Extrakte der TFME Filme von *P. aeruginosa* ATCC 10145. *Abbildung a* zeigt die Ergebnisse der Flüssiginjektion des ursprünglichen methanolischen Extraktes. In *Abbildung b* sind die Ergebnisse der Flüssiginjektion des methanolischen Extraktes nach der Aufkonzentrierung, mittels Verdampfung und Resuspension in Methanol, gezeigt.

Der Vergleich der beiden *Contour-Plots* zeigt, dass mit beiden Methoden nur vier Analyten detektiert werden konnten, wovon aber keine Analyten mittels Datenbank zugeordnet werden konnten. Allerdings ist zu erkennen, dass die Intensität der Analyten bei Verwendung der Aufkonzentrierung größer ist. Deswegen ist eine weitere Optimierung der Extraktionsmethode notwendig. Zur weiteren Optimierung wurde eine Konzentrationserhöhung der Analyten durch eine Verringerung des Splitverhältnisses herbeigeführt. Hierfür wurde eine Splitverhältnis von 1:10 (optimierte Methode), 1:5 sowie eine *splitless* Injektion verwendet. Die Ergebnisse dieser Reduzierung sind in Form von *Contour-Plots* in Abbildung 44 gezeigt.

Ergebnisse und Diskussion

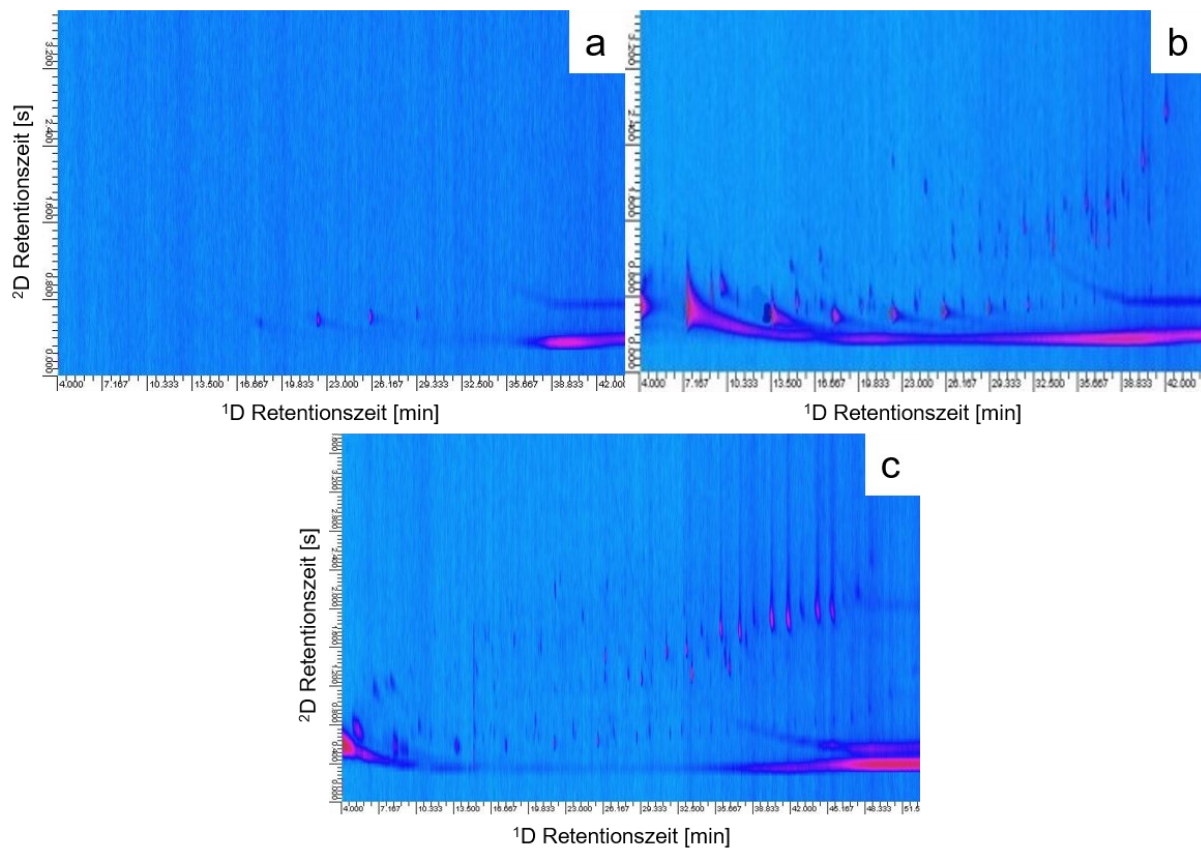


Abbildung 44: Darstellung der Ergebnisse der methanolischen Extrakte der TFME Filme der extrazellulären volatilen Metabolite von *P. aeruginosa* ATCC 10145 in Contour-Plots. In diesen Versuchen wurde das Splitverhältnis bei der GCxGC-qMS Analyse variiert. In Abbildung a bis c sind die Ergebnisse mit einem Splitverhältnis von 1:10, 1:5 und im splitless Modus gezeigt.

Der Vergleich der *Contour-Plots* zeigt, dass sowohl die Anzahl der detektierbaren Analyten als auch die Intensität der Analyten mit einer Reduzierung des Splitverhältnisses gesteigert werden konnte. Unter Verwendung der NIST Datenbank konnten bei einem Splitverhältnis von 1:5 drei Analyten zugeordnet werden. Im Gegensatz dazu konnten im *splitless* Modus weitere drei, damit sechs Analyten, zugeordnet werden. Aufgrund der höheren Anzahl an detektierbaren und mittels der Datenbank zuordenbaren Analyten sowie der Intensitätssteigerung, wurde die *splitless* Methode übernommen. Trotzdem ist, auf Basis der Ergebnisse der TD-GC-MS Analysen (vgl. Kapitel 5.3), zu erwarten, dass mehr als sechs Analyten aus dem Gasraum oberhalb des bakteriellen Biofilms extrahiert worden sind. Dementsprechend wurde eine weitere Optimierung der Flüssigextraktionsmethode vorgenommen. Zur Erhöhung der Extraktionseffizienz wurden vier weitere Methoden mit der ursprünglichen Flüssigextraktionsmethode (Methode A) verglichen. Zur Erhöhung der Extraktionseffizienz wurde eine konvektive Strömung in das Extraktionsmittel, unter zu Hilfenahme einer Schüttelplatte, eingebracht (Methode B). Des Weiteren wurde die

Ergebnisse und Diskussion

Extraktionszeit auf sechs Stunden minimiert und nach zwei Stunden das Extraktionsmittel gewechselt (Methode C). Weiterhin wurde diese Methode ergänzt um ein Schütteln der Probe während der Extraktionszeit (Methode D) sowie einer 15-minütigen Ultraschallbehandlung der Probe nach jedem der zweistündigen Extraktionszyklen (Methode E). Die resultierenden *Contour-Plots* dieser fünf Methoden sind in Abbildung 45 einander gegenübergestellt.

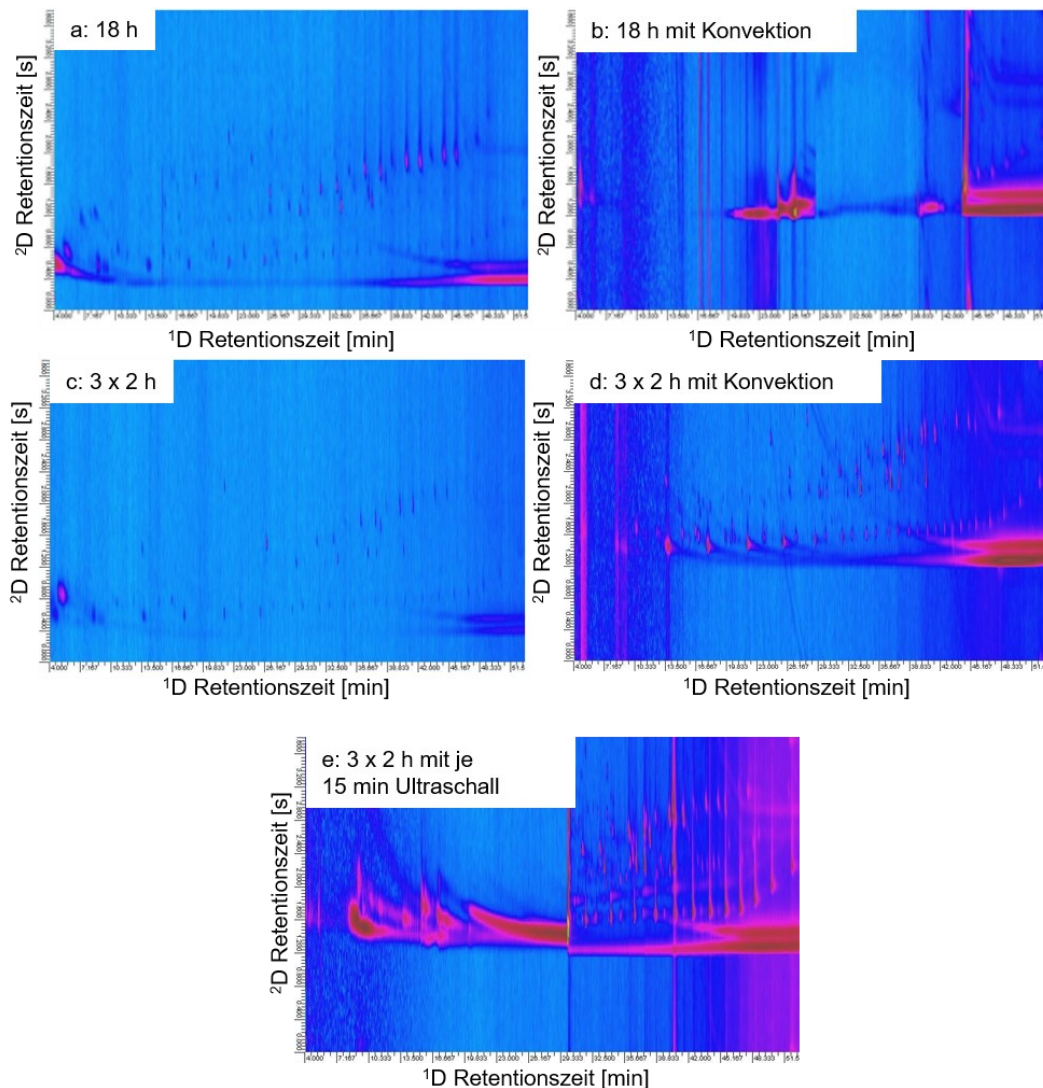


Abbildung 45: *Contour-Plots* der GCxGC-qMS Analysen verschiedener Extraktionsmethoden von TFME Filmen, welche mit extrazellulären volatilen Metaboliten von *P. aeruginosa* ATCC 10145 im *in vitro* Biofilmmodell beladen worden sind. **Abbildung a:** 18-stündige methanolische Extraktion ohne Konvektion; **b:** 18-stündige methanolische Extraktion mit Konvektion; **c:** 3 x 2-stündige methanolische Extraktion ohne Konvektion; **d:** 3 x 2-stündige methanolische Extraktion mit Konvektion; **e:** 3 x 2-stündige methanolische Extraktion ohne Konvektion und im Anschluss jeder 2-stündigen Extraktion eine 15-minütige Behandlung im Ultraschallbad.

Visuell ist beim Vergleich der *Contour-Plots* zu erkennen, dass das Einbringen einer Konvektion in das Extraktionsmittel durch Schütteln der Probe sowie die

Ergebnisse und Diskussion

Ultraschallbehandlung zu einem erhöhten Hintergrund bei der Analyse führt. Allerdings zeigt der Vergleich des *Contour-Plots* der Methode E mit dem der Methode A auch, dass visuell die Anzahl der detektierten Peaks sowie deren Signalintensität deutlich erhöht ist. Die Anzahl der zuordbaren Analyten (Übereinstimmungswahrscheinlichkeit $\geq 80\%$) ist dagegen aber deutlich geringer als bei der Methode A (vgl. Anhang C; Tabelle 25 und Tabelle 29). Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass durch die Behandlung im Ultraschallbad die Bildung von Siloxanen begünstigt wurde. Diese Siloxane können mit der GCxGC-qMS Methode als Peaks detektiert werden. Aufgrund der hohen Konzentration der zyklischen Siloxane im Extraktionsmittel, kann eine teilweise oder vollständige Überlagerung dieser mit den Peaks der Analyten erfolgen. Bei einer vollständigen Überlagerung wäre eine Zuordnung nicht möglich. Im Gegensatz dazu reduzieren sich die Übereinstimmungswahrscheinlichkeiten bei einer teilweisen Überlagerung z.B. durch Peaktailing des Siloxanpeaks in den Metabolitpeak, so dass eine Zuordnung mit ausreichender Sicherheit ($>80\%$) nicht möglich ist. Die erhöhte Konzentration an Siloxanen ist ebenfalls bei den *Contour-Plots* der Methoden B und D zu erkennen. Bei diesen beiden Methoden konnten ebenfalls weniger Analyten zugeordnet werden (Übereinstimmungswahrscheinlichkeit $\geq 80\%$) als bei der Methode A (vgl. Anhang C; Tabelle 25, Tabelle 26 und Tabelle 28). Zum einen kann dies auch auf die vermehrte Bildung der Siloxane zurückgeführt werden. Zum anderen ist augenscheinlich die Steigerung der Extraktionseffizienz durch Konvektion, im Vergleich zur Ultraschallbehandlung, deutlich geringer. Die Intensitätsminimierung bei der Methode C ist wahrscheinlich auf die Verkürzung der Extraktionszeit zurückzuführen.

Zusammenfassend erwies sich die Methode A als beste Methode hinsichtlich der Intensität der Analyten sowie der Anzahl an detektierbaren und zuordenbaren Analyten. Allerdings weist diese Methode gleichzeitig Nachteile bzgl. der Anzahl an zuordenbaren Analyten im Gegensatz zu der direkten thermischen Desorption auf, so dass die direkte thermische Desorption der Flüssigextraktion vorzuziehen ist. Da eine direkte thermische Desorption in die 2D-GC systemseitig nicht durchführbar war, ist eine Flüssigextraktion mit der Methode A, diejenige Methode mit der höchsten Wahrscheinlichkeit zur Zuordnung einiger Metabolite mit der Datenbank. Deswegen wird diese optimierte Methodik zur Analyse der mVOCs der weiteren *P. aeruginosa*

Stämme, sowie der Analyse der mVOCs unter anaeroben Bedingungen aller *P. aeruginosa* Stämme im Folgenden verwendet.

5.4.3 Anwendung der Flüssigextraktionsmethode zur Untersuchung der mVOCs aus dem Biofilm von *P. aeruginosa* unter Verwendung des *in vitro* Biofilmmodells

Die Metabolomanalyse und der Vergleich der drei verwendeten *P. aeruginosa* Bakterienstämme erfolgte mit den in Kapitel 5.4.1 und 5.4.2 entwickelten und optimierten Extraktions- und Analysenmethoden. Verglichen werden die Ergebnisse der Kultivierung der Bakterienstämme *P. aeruginosa* ATCC 10145, PAO1 und FRD1 auf LB-Agar unter aeroben und auf LBN-Agar unter anaeroben Bedingungen. In Abbildung 46 sind die *Contour-Plots* der Analyse des Stammes *P. aeruginosa* ATCC 10145 gezeigt.

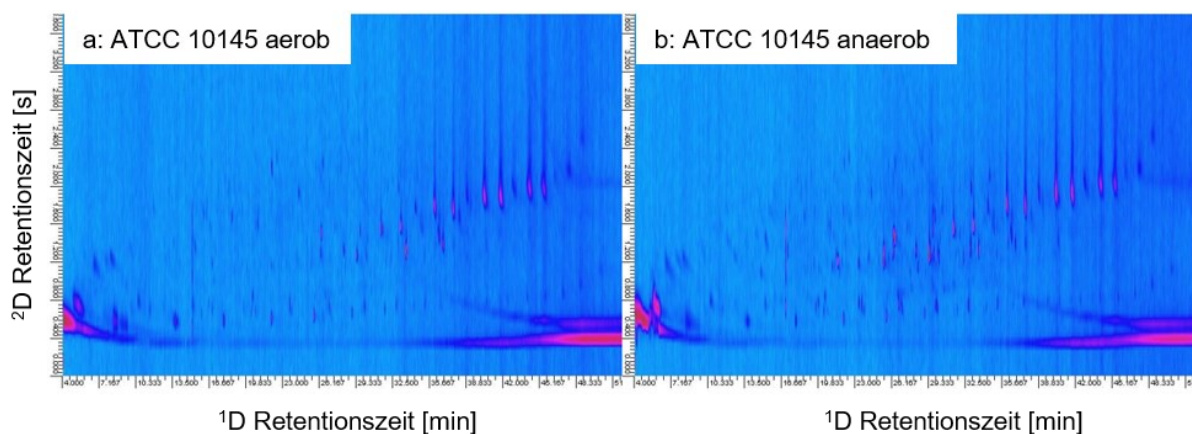


Abbildung 46: *Contour-Plots* der GCxGC-qMS Analyse von aufkonzentrierten, methanolischen Extrakten der extrazellulären volatilen Metabolite von *P. aeruginosa* ATCC 10145. Die Biofilme des Bakteriums wurden unter aeroben (Abb. a) und anaeroben (Abb. b) Bedingungen im *in vitro* Biofilmmodell auf LB-Agar bzw. LBN-Agar bei 37 °C kultiviert.

Ein Vergleich der beiden *Contour-Plots* zeigt, dass überwiegend die gleichen Peaks detektiert worden sind. Unterschiede treten hauptsächlich im Retentionszeitenbereich von 16 bis 35 min in der ersten und 0,8 bis 2,4 min in der zweiten Dimension auf. Eine Zuordnung der detektierten Substanzen erfolgte wiederum händisch unter Verwendung der NIST Datenbank. Als zugeordnet wurden lediglich solche Substanzen klassifiziert, deren Massenspektrum eine Übereinstimmung von mehr als 80% mit dem NIST Spektrum aufwiesen. Dadurch konnten nur sechs Metabolite unter aeroben und sechs Metabolite unter anaeroben Bedingungen zugeordnet werden. Diese Metabolite

Ergebnisse und Diskussion

sind in Tabelle 13 zusammen mit den zugehörigen Retentionszeiten ihrer Peaks und den NIST Scores aufgeführt.

Tabelle 13: Ergebnisse der Zuordnung von extrazellulären volatilen Metaboliten des Bakteriums *P. aeruginosa* ATCC 10145. Die Zuordnung wurde mittels der NIST Datenbank durchgeführt, wobei Metabolite mit einem NIST Score von mehr als 80% als zugeordnet charakterisiert worden sind. In dieser Tabelle sind die zugeordneten Metabolite mit der zugehörigen Retentionszeit sowie dem NIST Score aufgeführt.

ATCC 10145 aerob			ATCC 10145 anaerob		
Metabolit	Retentionszeit [min]	Score [%]	Metabolit	Retentionszeit [min]	Score [%]
3,5-Dimethylphenol	18,594	87	2-Undecanone	21,532	85
2-Methylquinazoline	22,086	83	2,4-Bis-(1,1-dimethyl)-phenol	26,319	87
Methyl-3,5-dichlorbenzoat	24,425	79	Isopropylaurat	28,402	83
2,4-Bis-(1,1-dimethyl)-phenol	26,318	89	2-(Icosyloxy)-ethanol	28,279	82
2-(Tetradecyloxy)-ethanol	28,278	87	1-Hexadecanol	29,355	94
Methyl-(7Z)-7-hexadecenoat	36,451	83			

Anhand der Tabelle 13 ist ersichtlich, dass unter aeroben Bedingungen hauptsächlich aromatische Verbindungen, wie phenolische Verbindungen oder Quinazoline, und Fettsäuremethylester nachgewiesen werden konnten. Fettsäuremethylester sind auch unter anaeroben Bedingungen nachweisbar. Unter diesen Bedingungen wurden hauptsächlich noch alkoholische Verbindungen detektiert. Die Auswertung der Analysen der beiden weiteren Bakterienstämme *P. aeruginosa* PAO1 und FRD1 unter beiden betrachteten Bedingungen erfolgte analog. Die erhaltenen *Contour-Plots* sind in Abbildung 47 dargestellt und die zugeordneten Metabolite in der Tabelle 14 (*P. aeruginosa* PAO1) und Tabelle 15 (*P. aeruginosa* FRD1) zusammengefasst.

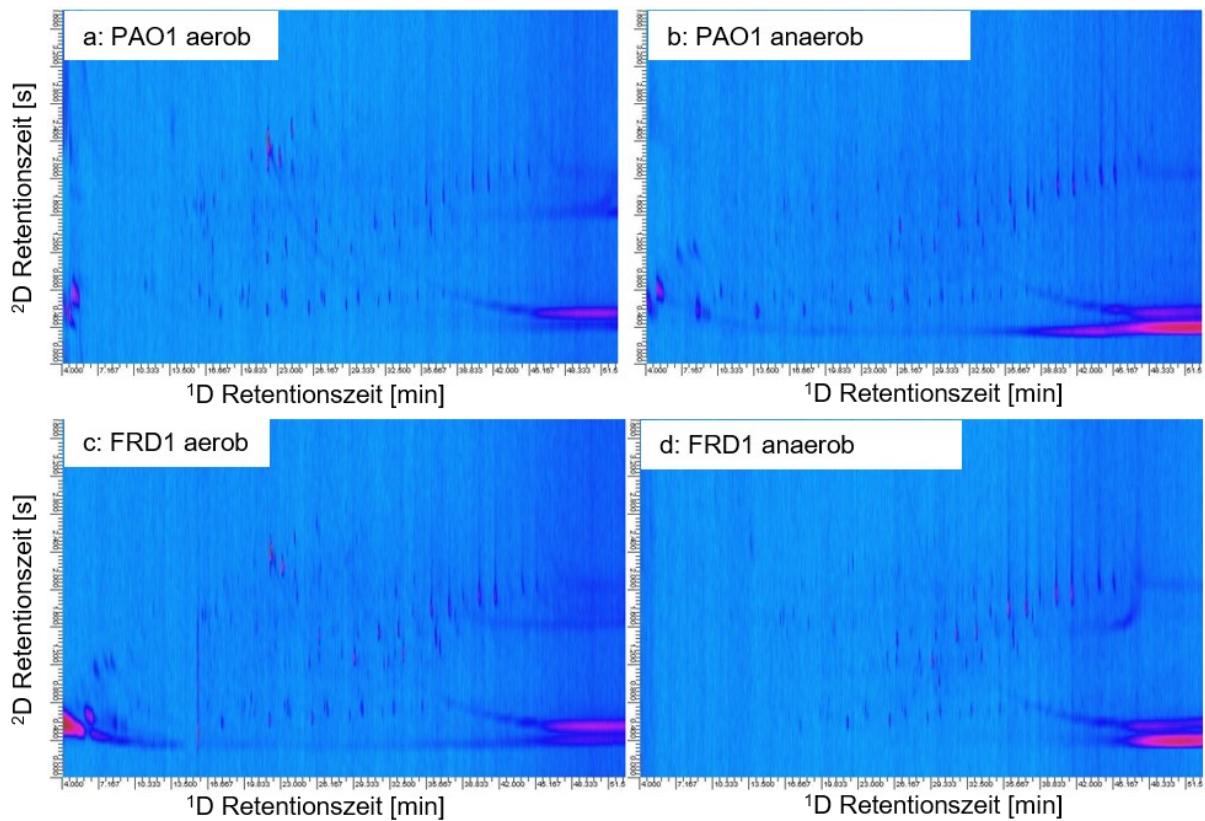


Abbildung 47: Contour-Plots der GCxGC-qMS Analyse von aufkonzentrierten, methanolischen Extrakten der extrazellulären volatilen Metabolite von *P. aeruginosa* PAO1 (a, b) und FRD1 (c, d). Die Biofilme der beiden Bakterien wurden unter aeroben (a bzw. c) und anaeroben (b bzw. d) Bedingungen im in vitro Biofilmmodell auf LB-Agar bzw. LBN-Agar bei 37 °C kultiviert.

Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 14: Ergebnisse der Zuordnung von extrazellulären volatilen Metaboliten des Bakteriums *P. aeruginosa* PAO1. Die Zuordnung wurde mittels der NIST Datenbank durchgeführt, wobei Metabolite mit einem NIST Score von mehr als 80% als zugeordnet charakterisiert worden sind. In dieser Tabelle sind die zugeordneten Metabolite mit der zugehörigen Retentionszeit sowie dem NIST Score aufgeführt.

PAO1 aerob			PAO1 anaerob		
Metabolit	Retentionszeit [min]	Score [%]	Metabolit	Retentionszeit [min]	Score [%]
2-Aminoacetophenon	22,097	93	3,5-Dimethylphenol	18,640	88
4-Methylquinazoline	23,154	88	1-Dodecanol	23,309	82
2-Nitroacetophenon	24,209	91	2-(Tetradecyloxy)-ethanol	25,705	82
2,4-Bis-(1,1-dimethylethyl)-phenol	26,322	85	2,4-Bis-(1,1-dimethyl)-phenol	26,321	84
2-(Icosyloxy)-ethanol	28,288	84	2-(Icosyloxy)-ethanol	26,421	88

Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 15: Ergebnisse der Zuordnung von extrazellulären volatilen Metaboliten des Bakteriums *P. aeruginosa* FRD1. Die Zuordnung wurde mittels der NIST Datenbank durchgeführt, wobei Metabolite mit einem NIST Score von mehr als 80% als zugeordnet charakterisiert worden sind. In dieser Tabelle sind die zugeordneten Metabolite mit der zugehörigen Retentionszeit sowie dem NIST Score aufgeführt.

FRD1 aerob			FRD1 anaerob		
Metabolit	Retentionszeit [min]	Score [%]	Metabolit	Retentionszeit [min]	Score [%]
2-Aminoacetophenon	22,089	94	2,5-Dimethylphenol	18,657	81
4-Methylquinazoline	23,122	86	2,4-Bis-(1,1-dimethyl)-phenol	26,318	85
2-Nitroacetophenon	24,182	82			
2,4-Bis-(1,1-dimethyl)-phenol	26,320	87			
2-(Hexadecyloxy)-ethanol	28,256	86			

Der Vergleich der *Contour-Plots* zeigt analog zu dem Vergleich bei *P. aeruginosa* ATCC 10145, dass im frühen Retentionszeitenbereich (bis ca. RT^{1D}: 26 min) Unterschiede zwischen den beiden betrachteten Bedingungen (aerob und anaerob) zu beobachten sind. Die Peaks der zuordenbaren Metabolite liegen, wie bei *P. aeruginosa* ATCC 10145 auch, in diesem Retentionszeitenbereich. Wiederum konnten bei der manuellen Auswertung der erhaltenen Daten von beiden Bakterienstämmen nur wenige Metabolite mit ausreichender Genauigkeit zugeordnet werden (Tabelle 14 und Tabelle 15). Auffällig ist, dass dem Peak bei einer Retentionszeit von 26,32 min bei allen Analysen – mit Ausnahme von *P. aeruginosa* PAO1 aerob (Tabelle 14) – der Analyt 2,4-Bis-(1,1-dimethyl)-phenol mit der größten Übereinstimmungswahrscheinlichkeit zugeordnet worden ist. Bei der Analyse des aerob kultivierten Stammes *P. aeruginosa* PAO1 wies hingegen der Analyt 2,4-Bis-(1,1-dimethylethyl)-phenol die größte Übereinstimmungswahrscheinlichkeit auf. Dies ist ein Beispiel für den zu Beginn des Kapitels 5.3 erläuterten Fall, dass trotz nahezu identischer Retentionszeit abweichende Zuordnung auftreten können. Die Abweichung bei den genannten Analyten ist mit einem sehr ähnlichen

Ergebnisse und Diskussion

Fragmentierungsmuster bei einer Elektronenstoßionisation zu erklären, da der Unterschied zwischen den beiden Analyten lediglich in einer Ethylgruppe (C₂H₅) besteht. Eine eindeutige Zuordnung bzw. Identifizierung ist ausschließlich durch die Verwendung von authentischen Standards und einem Retentionszeitenvergleiches oder durch die Ermittlung von Retentionsindices möglich.

Neben diesem mehrfach substituierten Phenol konnten bei dem Bakterium *P. aeruginosa* PAO1 bei einer aeroben Kultivierung eine Zuordnung der Metabolite 2-Aminoacetophenon, 4-Methylquinazoline, 2-Nitroacetophenon und 2-(Icosyloxy)-ethanol erfolgen. Bei der anaeroben Kultivierung konnten mit Hilfe der Datenbank die Metabolite 3,5-Dimethylphenol, 1-Dodecanol, 2-(Tetradecyloxy)-ethanol und 2-(Icosyloxy)-ethanol zugeordnet werden. Bei *P. aeruginosa* FRD1 wurden unter aeroben und anaeroben Bedingungen die Metabolite 2-Aminoacetophenon, 4-Methylquinazoline, 2-Nitroacetophenon und 2-(Hexadecyloxy)-ethanol sowie 2,5-Dimethylphenol zugeordnet. Im Vergleich zu den zugeordneten Metaboliten beim Bakterienstamm *P. aeruginosa* ATCC 10145, konnten bei den beiden Stämmen *P. aeruginosa* PAO1 und FRD1 keine Fettsäuremethylester detektiert werden. Das nicht-mukoide klinische Isolat *P. aeruginosa* PAO1 wies unter aeroben Bedingungen vor allem stickstoffhaltige aromatische Verbindungen auf. Die phenolischen Verbindungen, konnten auch unter anaeroben Bedingungen beobachtet werden. Zusätzlich wurden unter anaeroben Bedingungen auch Alkohole zugeordnet. Auffällig bei der Betrachtung der alkoholischen Verbindungen ist, dass ausschließlich substituierte Verbindung von Ethanol nachgewiesen werden konnten. Generell wurden viele der für die verschiedenen Bakterienstämme detektierten Substanzen bereits durch die Metabolomuntersuchungen mittels TD-GC-qMS analysiert (vgl. Kapitel 5.3). Hierzu zählen zum Beispiel 2-Aminoacetophenon und die Quinazoline, 2-Methylquinazolin und 4-Methylquinazolin. Das 2-Methylquinazolin konnte sowohl mittels der TD-GC-qMS, als auch mit der GCxGC-qMS Analyse ausschließlich bei dem Bakterienstamm ATCC 10145 und nur unter aeroben Bedingungen nachgewiesen werden. Hingegen wurde das 4-Methylquinazolin sowohl bei der Analyse mittels TD-GC-MS als auch mit der GCxGC-MS, bei den beiden klinischen Stämmen *P. aeruginosa* PAO1 und FRD1 ausschließlich unter aeroben Bedingungen nachgewiesen. Allerdings ist einschränkend zu bemerken, dass eine Unterscheidung der Substitutionsposition mit Hilfe eines EI-qMS ausschließlich auf Basis der

Massenspektren schwer möglich ist. Die substituierten Quinazoline weisen beide einen Basispeak mit einem m/z-Verhältnis von 144 auf. Lediglich bezogen auf das m/z-Verhältnis und der Intensität der Peaks mit der zweit- und drittgrößten Intensität sind die beiden Substanzen zu unterscheiden. Trotzdem ist zu erwarten, dass ein Datenbankvergleich der gemessenen Massenspektren, ähnliche Werte für die prozentuale Übereinstimmung mit dem Referenzspektrum ergibt. Obwohl die genaue Position der Methylgruppe mit den verwendeten Methoden nicht zu bestimmen ist, konnte nachgewiesen werden, dass methylsubstituierte Quinazoline Metabolite von *P. aeruginosa* sind. Des Weiteren zeigt der Vergleich der *P. aeruginosa* Stämme, dass die methylsubstituierten Quinazoline nicht durch einen speziellen metabolischen *Pathway* gebildet werden, sondern zum „*core pathway*“ des Bakteriums zählen. Mann [197] postulierte 1967, dass 4-Methylquinazolin durch N-Formylaminoacetophenon im Tryptophanbiosyntheseweg von *P. aeruginosa* gebildet wird. Er bezeichnete diesen Abbauweg im Tryptophan Stoffwechselweg als Quinazolin Stoffwechselweg [197]. Cox et al. [91] wiesen 1979 die Synthese von 4-Methylquinazolin im Tryptophan Stoffwechselweg von *P. aeruginosa* zusammen mit 2-Aminoacetophenon und 2,4-Dimethylquinazolin nach. Dabei fanden Cox et al. heraus, dass 2-Aminoacetophenon bereits in log-Phase der Wuchskurve nachweisbare Konzentrationen aufweist. 4-Methylquinazolin wurde allerdings erst in der stationären Phase nach ungefähr 40 Stunden detektiert. Gleichzeitig war auch das 2-Aminoacetophenon nachweisbar [91]. Aufgrund der gewählten Inkubationszeit von 48 h sind die erhaltenen Ergebnisse mit denen von Cox et al. [91] vergleichbar, so dass es naheliegend ist, dass die zugeordneten Metabolite, Stoffwechselprodukte aus dem tryptischen Stoffwechselweg von *P. aeruginosa* sein werden.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass durch die Anwendung der Flüssigextraktion in Kombination mit einer GCxGC-qMS Analyse, Metabolite von verschiedenen *P. aeruginosa* Stämmen zugeordnet werden konnten. Allerdings konnte keine ausreichende Sensitivität durch die Flüssigextraktion in Kombination mit der GCxGC-qMS Analyse erzielt werden, so dass nur wenige Metabolite zugeordnet werden konnten. Des Weiteren konnte der Großteil der Metabolite bereits mittels der TD-GC-qMS ermittelt werden. Aufgrund der höheren Sensitivität, des geringeren Arbeitsaufwandes und der geringeren Fehleranfälligkeit ist, wie von Jiang und

Ergebnisse und Diskussion

Pawliszyn [116] postuliert, die direkte Thermodesorption, der Flüssigextraktion vorzuziehen.

6 Zusammenfassung und Ausblick

In dieser Arbeit konnte erfolgreich ein *in vitro* Modell für die Kultivierung von Biofilmen des Bakteriums *P. aeruginosa* unter CF-ähnlichen Bedingungen sowie eine Beprobungs- und Analysenmethode für extrazelluläre volatile Metabolite aus diesem Modellsystem entwickelt und etabliert werden. Außerdem wurde das extrazelluläre volatile Metabolom von drei *P. aeruginosa* Stämmen unter CF-ähnlichen Bedingungen charakterisiert.

Hierzu wurde zunächst ein *in vitro* Modell zur Kultivierung von Biofilmen des Bakteriums *P. aeruginosa* entwickelt und etabliert. Das *in vitro* Biofilmmodell wurde biochemisch mit Hilfe der Stämme *P. aeruginosa* ATCC 10145, PAO1 und FRD1 charakterisiert. Hierfür wurden die Bakterienstämme auf LB- bzw. LBN-Agar unter aeroben bzw. anaeroben Bedingungen kultiviert und die Gesamtzellzahl und der KBE-Wert bestimmt. Sowohl unter aeroben als auch unter anaeroben Bedingungen konnten Gesamtzellzahlen von über $1 \cdot 10^9$ Zellen·Platte⁻¹ bestimmt werden, so dass die Bildung von „*multilayer* Biofilmen“ beobachtet werden konnte [136]. Anschließend wurden die Inokulationskonzentration und die Kultivierungsdauer variiert und optimiert. Bei einer Inokulationskonzentration von 10^5 Zellen·cm⁻² konnten unter beiden Bedingungen optimale Ergebnisse hinsichtlich der Zellzahl erreicht werden. Die Variation der Kultivierungsdauer zeigte, dass bereits nach 24 Stunden die stationäre Wachstumsphase bei beiden untersuchten Bedingungen erreicht worden ist. Damit eine zu erwartende biologische Varianz in der Wachstumsgeschwindigkeit Berücksichtigung findet und eine reproduzierbare Beprobung in der stationären Wachstumsphase erfolgt, wurde für die weiteren Metabolomuntersuchungen eine Kultivierungsdauer von 48 Stunden gewählt.

Damit eine Beprobung der extrazellulären volatilen Metabolite erfolgen konnte, wurde eine Dünnschichtmikroextraktionstechnik angewendet sowie für die *suspected target* Analyse der mVOCs aus dem *in vitro* Modell optimiert. Die Auswahl des Sorptionsmaterials erfolgte auf Basis der zu erwartenden Substanzklassen. Die Charakterisierung von PDMS-Sorptionsfilmen zweier Hersteller erfolgte mittels eines TG-APPI-qMS Systems. Die Filme von der Goodfellow GmbH wiesen mit 300 °C eine größere Temperaturstabilität auf. Des Weiteren konnte eine homogenere thermische Zersetzung und eine reproduzierbarere Herstellung der Filme dieses Herstellers (relative Standardabweichung Peakapex beträgt 1,7%) beobachtet werden. Die

Zusammenfassung und Ausblick

Entwicklung einer zweistufigen, lösungsmittelbasierten und thermischen Reinigung war notwendig, um die Kontaminanten zu entfernen. Eine Analyse der auf den Filmen angereicherten mVOCs wurde mit einer TD-GC-qMS Methode, welche in dieser Arbeit mit Hilfe von Standards von potenziellen Metaboliten des Bakteriums *P. aeruginosa* entwickelt wurde, durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass die Verwendung einer Ofenkühlung hinsichtlich der Detektion von Substanzen mit einem hohen Dampfdruck vorteilhaft ist. Des Weiteren konnte durch die Ofenkühlung eine Reduktion der Peakbreiten um ca. drei Sekunden und somit eine Erhöhung der Peakkapazität erzielt werden. Mit dieser Methode wurden Nachweis- und Bestimmungsgrenzen für mittel- und weniger polare Verbindungen im niedrigen nanomolaren Bereich (0,5 nM und 1,5 nM) bestimmt.

Anschließend wurde das Biofilmodell sowie die entwickelte Beprobungs- und Analyseverfahren zu *in vitro* Studien zu unterschiedlichen Einflussgrößen auf das extrazelluläre volatile Metabolom eingesetzt. In dieser Untersuchung wurden verschiedene Eigenschaften der Kultivierung sowie des Bakteriums *P. aeruginosa* variiert, um deren Einfluss auf das extrazelluläre volatile Metabolom bei Atemwegsinfektionen im Kontext der CF-Erkrankung zu erforschen. Ein deutlicher Einfluss auf das Metabolom konnte für das Nährmedium sowie die Atmosphäre während der Kultivierung (aerob bzw. anaerob) nachgewiesen werden. Des Weiteren hat der gewählte mukoide Phänotyp des Bakteriums auf molekularer Ebene einen Einfluss. Basierend auf der Erkenntnis, dass das Nährmedium einen Einfluss auf das Metabolom hat, wurde ein festes Nährmedium entwickelt, welches die Nährstoffbedingungen in der Lunge eines CF-Patienten simuliert. Dieses artifizielle Sputummedium (ASM) wurde durch die Ermittlung der Gesamtzellzahl, des KBE-Wertes sowie des Uronsäuregehalts mikrobiologisch charakterisiert. Außerdem wurde die Kultivierungsdauer überprüft, damit analog zu den vorherigen Untersuchungen „*multilayer* Biofilme“ der Bakterienstämme unter aeroben und anaeroben Bedingungen kultiviert werden können. Die Versuche zur Charakterisierung des ASM zeigten, dass mittels ASM unter aeroben und anaeroben Bedingungen nach 48 Stunden Gesamtzellzahlen von über $1 \cdot 10^9$ Zellen-Platte⁻¹ erreicht wurden und somit „*multilayer* Biofilme“ entstanden sind [136]. Des Weiteren konnte die Kultivierung des Stammes *P. aeruginosa* FRD1 ohne Verlust des mukoiden Phänotyps erfolgen, was durch die erhöhten Uronsäuregehalte belegt werden konnte. Nach der Entwicklung und

Zusammenfassung und Ausblick

Charakterisierung des ASM wurde das extrazelluläre volatile Metabolom des Bakterienstämme *P. aeruginosa* ATCC10145, PAO1 und FRD1 unter CF-ähnlichen Bedingungen im *in vitro* Biofilmmodell charakterisiert. In dieser Studie konnten Bakterienstamm selektive Metabolite ermittelt werden. Außerdem wiesen bei einem Vergleich der klinischen Isolate *P. aeruginosa* PAO1 und FRD1 Peaks von 36 Metaboliten signifikante Abweichungen der Intensitäten auf. Bei einem Vergleich der klinischen Isolate mit dem Referenzstamm konnten 28 Metabolite (*P. aeruginosa* PAO1) bzw. 70 Metabolite (*P. aeruginosa* FRD1) ermittelt werden, deren Peaks eine signifikante Abweichung ($p > 95\%$) in der Intensität aufweisen. Weiterhin konnten die Bakterienstämme mittels zweier Hauptkomponenten voneinander differenziert werden. Die Varianz der ersten Hauptkomponente lag dabei bei 33% und die der zweiten Hauptkomponente bei 58%.

Zukünftig können mit dem Biofilmmodell sowie der entwickelten Beprobungs- und Analyseverfahren *in vitro* Studien zum extrazellulären volatilen Metabolom von klinischen Stämmen des Bakteriums *P. aeruginosa* sowie weiterer CF-relevanter Bakterien durchgeführt werden. Hierzu eignen sich zum Beispiel die aufgrund Ihrer Prävalenz besonders bedeutsamen Bakterien *S. aureus* und *S. maltophilia* [4]. Des Weiteren könnte das Bakterium *M. abscessus*, welches einen besonders negativen Einfluss auf den Krankheitsverlauf der CF-Patienten hat [198], untersucht werden [4]. Weiterhin kann die Methode eingesetzt werden, um die ermittelten mVOCs der CF-relevanten Bakterien aus Mischkulturen sowie CF-Sputum zu analysieren sowie die Bakterienstämme zu differenzieren. Die gewonnenen Erkenntnisse aus den in dieser Arbeit gezeigten Untersuchungen sowie zukünftigen *in vitro* Studien zu mVOCs von CF-relevanten Bakterien können zur Entwicklung und Etablierung einer klinischen, nicht invasiven Atemgasanalytik von CF-Patienten genutzt werden.

Bei den Analysen der mVOCs mit Hilfe der TD-GC-qMS Methode konnte in einem Retentionszeitenbereich von 17 – 30 Minuten eine Koelution von nicht aufgelösten Peaks beobachtet werden. Unterhalb dieser Peaks könnten niedrig abundante aber für das bakterielle Pathogen relevante Peaks liegen, so dass eine Auflösung dieser koelutierenden Peak notwendig erscheint. Die Auflösung solcher koelutierender Peaks ist durch die Verwendung einer komprehensiven zweidimensionalen GC, direkt gekoppelt mit einem MS, möglich [199]. Deswegen wurde eine GCxGC-qMS Methode sowie eine Flüssigextraktionsmethode für die TFME Filme entwickelt und auf das *in*

Zusammenfassung und Ausblick

in vitro Biofilmmodell angewendet. Die Entwicklung und Optimierung der Analyse- sowie Flüssigextraktionsmethode erfolgte mit Hilfe von Standards potenzieller Metabolite des Bakteriums *P. aeruginosa*. Abschließend erfolgte die Analyse von den extrazellulären volatilen Metaboliten der Stämme *P. aeruginosa* ATCC 10145, PAO1 und FRD1 im *in vitro* Biofilmmodell (LB- und LBN-Agar) unter Verwendung der entwickelten Flüssigextraktions- und Analyseverfahren. Insgesamt konnten unter anaeroben Bedingungen sechs (*P. aeruginosa* ATCC 10145), fünf (*P. aeruginosa* PAO1) und zwei Metabolite (*P. aeruginosa* FRD1) für die drei untersuchten Stämme ermittelt werden. Ein Vergleich der Metabolite mit denen, welche mittels TD-GC-qMS Methode ermittelt werden konnten, zeigte, dass diese größtenteils übereinstimmen. Aufgrund der höheren Sensitivität, des geringeren Arbeitsaufwandes und der geringeren Fehleranfälligkeit ist die direkte Thermodesorption, wie von Jiang und Pawliszyn [116] postuliert, der Flüssigextraktion vorzuziehen ist.

Basierend auf den Ergebnissen, welche mit der 2D-GC-MS und dem TD-GC-MS erhalten worden sind, kann erwartet werden, dass die direkte Kopplung einer Thermodesorption mit einem GCxGC-qMS System vorteilhaft bzgl. der Detektion weiterer Bakterienstamm selektiver Metabolite ist. Diese Kopplung würde eine erhöhte Peakkapazität sowie die Trennung koeluierender Peaks durch die Verwendung einer komprehensiven 2D-GC ermöglichen. Des Weiteren könnten die auf dem TFME Film angereicherten Analyten durch thermische Desorption direkt in die GC übertragen werden, so dass Diskriminierungseffekte basierend auf unterschiedlichen Polaritäten bei einer Flüssigextraktion vermieden werden. Hierdurch könnten erfolgreich weitere niedrig abundante und selektive Metabolite ermittelt werden, welche eine Zuordnung und Differenzierung von Bakterien aus CF-Sputum oder dem Atemgas von CF-Patienten ermöglicht.

7 Literatur

- [1] A. Folkesson, L. Jelsbak, L. Yang, H.K. Johansen, O. Ciofu, N. Høiby, S. Molin, Adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* to the cystic fibrosis airway: an evolutionary perspective, *Nat. Rev. Microbiol.* 10 (2012) 841–851. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2907>.
- [2] J.S. Talwalkar, T.S. Murray, The Approach to *Pseudomonas aeruginosa* in Cystic Fibrosis, *Clin. Chest Med.* 37 (2016) 69–81. <https://doi.org/10.1016/j.ccm.2015.10.004>.
- [3] S. Malhotra, D. Hayes, D.J. Wozniak, Cystic Fibrosis and *Pseudomonas aeruginosa*: the Host-Microbe Interface, *Clin. Microbiol. Rev.* 32 (2019). <https://doi.org/10.1128/CMR.00138-18>.
- [4] L. Nährlich, M. Burkhart, J. Wosniok, Deutsches Mukoviszidose-Register: Berichtsband 2018, Bonn, 2019.
- [5] N. Høiby, O. Ciofu, T. Bjarnsholt, *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in cystic fibrosis, *Future Microbiol.* 5 (2010) 1663–1674. <https://doi.org/10.2217/fmb.10.125>.
- [6] D.J. Hassett, M.D. Sutton, M.J. Schurr, A.B. Herr, C.C. Caldwell, J.O. Matu, *Pseudomonas aeruginosa* hypoxic or anaerobic biofilm infections within cystic fibrosis airways, *Trends Microbiol.* 17 (2009) 130–138. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2008.12.003>.
- [7] D. Worlitzsch, R. Tarran, M. Ulrich, U. Schwab, A. Cekici, K.C. Meyer, P. Birrer, G. Bellon, J. Berger, T. Weiss, K. Botzenhart, J.R. Yankaskas, S. Randell, R.C. Boucher, G. Döring, Effects of reduced mucus oxygen concentration in airway *Pseudomonas* infections of cystic fibrosis patients, *J. Clin. Invest.* 109 (2002) 317–325. <https://doi.org/10.1172/JCI13870>.
- [8] C. Ruzal-Shapiro, Cystic fibrosis: an overview, *Radiologic Clinics of North America* 36 (1998) 143–161.
- [9] N.L. Turcios, Cystic fibrosis: an overview, *Journal of clinical gastroenterology* 39 (2005) 307–317.

Literatur

- [10] B. Tümmler, Mukoviszidose, *Monatsschr Kinderheilkd* 161 (2013) 399–405. <https://doi.org/10.1007/s00112-012-2797-z>.
- [11] S. Naehrig, C.-M. Chao, L. Naehrlich, Cystic Fibrosis, *Dtsch. Arztebl. Int.* 114 (2017) 564–574. <https://doi.org/10.3238/arztebl.2017.0564>.
- [12] D.H. Andersen, Cystic fibrosis of the pancreas and its relation to celiac disease, *Am J Dis Child* 56 (1938) 344. <https://doi.org/10.1001/archpedi.1938.01980140114013>.
- [13] P.B. Davis, Cystic fibrosis since 1938, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 173 (2006) 475–482. <https://doi.org/10.1164/rccm.200505-840OE>.
- [14] J.S. Elborn, Cystic fibrosis, *The Lancet* 388 (2016) 2519–2531. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)00576-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)00576-6).
- [15] D.J. Mantle, A.P. Norman, Life-table for cystic fibrosis, *British medical journal* 2 (1966) 1238.
- [16] CFF Patient Registry, 2012 Annual Data Report to the Center Directors, Maryland, 2013.
- [17] B. Sens, M. Stern, Qualitätssicherung Mukoviszidose 2012, Zentrum für Qualität und Management im Gesundheitswesen, Mukoviszidose eV und Mukoviszidose Institut gGmbH, editors. Bad Honnef: Hippocampus Verlag (2013).
- [18] UK Cystic Fibrosis Registry, Annual Data Report 2013, 2014.
- [19] D.R. VanDevanter, J.S. Kahle, A.K. O'Sullivan, S. Sikirica, P.S. Hodgkins, Cystic fibrosis in young children: A review of disease manifestation, progression, and response to early treatment, *J. Cyst. Fibros.* 15 (2016) 147–157. <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2015.09.008>.
- [20] L. Nährlich, M. Burkhart, J. Wosniok, Deutsches Mukoviszidose-Register: Berichtsband 2018, Bonn, 2019.
- [21] I. Doull, Cystic fibrosis 2019: Year in review, *Paediatr. Respir. Rev.* (2020). <https://doi.org/10.1016/j.prrv.2020.04.001>.

- [22] O. Sommerburg, J. Hammermann, M. Lindner, M. Stahl, M. Muckenthaler, D. Kohlmüller, M. Happich, A.E. Kulozik, M. Stopsack, M. Gahr, G.F. Hoffmann, M.A. Mall, Five years of experience with biochemical cystic fibrosis newborn screening based on IRT/PAP in Germany, *Pediatr. Pulmonol.* 50 (2015) 655–664. <https://doi.org/10.1002/ppul.23190>.
- [23] M.J. Welsh, B.W. Ramsey, F. Accurso, G. Cutting, Cystic fibrosis. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, *The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Diseases* (2001) 5121–5188.
- [24] O. Ciofu, T. Tolker-Nielsen, P.Ø. Jensen, H. Wang, N. Høiby, Antimicrobial resistance, respiratory tract infections and role of biofilms in lung infections in cystic fibrosis patients, *Advanced Drug Delivery Reviews* 85 (2015) 7–23. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2014.11.017>.
- [25] E.N. Sutanto, A. Scaffidi, L.W. Garratt, K. Looi, C.J. Foo, M.A. Tessari, R.A. Janssen, D.F. Fischer, S.M. Stick, A. Kicic, Assessment of p.Phe508del-CFTR functional restoration in pediatric primary cystic fibrosis airway epithelial cells, *PLoS ONE* 13 (2018) e0191618. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191618>.
- [26] M. Wilschanski, J. Zielenski, D. Markiewicz, L.-C. Tsui, M. Corey, H. Levison, P.R. Durie, Correlation of sweat chloride concentration with classes of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene mutations, *J. Pediatr.* 127 (1995) 705–710. [https://doi.org/10.1016/S0022-3476\(95\)70157-5](https://doi.org/10.1016/S0022-3476(95)70157-5).
- [27] M.A. Mall, D. Hartl, *CFTR: cystic fibrosis and beyond*, Eur Respiratory Soc, 2014.
- [28] H. Heijerman, Infection and inflammation in cystic fibrosis: a short review, *J. Cyst. Fibros.* 4 Suppl 2 (2005) 3–5. <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2005.05.005>.
- [29] T. Bjarnsholt, P.Ø. Jensen, M. Burmølle, M. Hentzer, J.A.J. Haagensen, H.P. Hougen, H. Calum, K.G. Madsen, C. Moser, S. Molin, N. Høiby, M. Givskov, *Pseudomonas aeruginosa* tolerance to tobramycin, hydrogen peroxide and polymorphonuclear leukocytes is quorum-sensing dependent, *Microbiology* 151 (2005) 373–383. <https://doi.org/10.1099/mic.0.27463-0>.

Literatur

- [30] D.J. Hassett, J. Cuppoletti, B. Trapnell, S.V. Lymer, J.J. Rowe, S. Sun Yoon, G.M. Hilliard, K. Parvatiyar, M.C. Kamani, D.J. Wozniak, S.-H. Hwang, T.R. McDermott, U.A. Ochsner, Anaerobic metabolism and quorum sensing by *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in chronically infected cystic fibrosis airways: rethinking antibiotic treatment strategies and drug targets, *Advanced Drug Delivery Reviews* 54 (2002) 1425–1443. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(02\)00152-7](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(02)00152-7).
- [31] M.J. Hoegger, A.J. Fischer, J.D. McMenimen, L.S. Ostedgaard, A.J. Tucker, M.A. Awadalla, T.O. Moninger, A.S. Michalski, E.A. Hoffman, J. Zabner, D.A. Stoltz, M.J. Welsh, Impaired mucus detachment disrupts mucociliary transport in a piglet model of cystic fibrosis, *Science* 345 (2014) 818–822. <https://doi.org/10.1126/science.1255825>.
- [32] N.W. Keiser, S.E. Birket, I.A. Evans, S.R. Tyler, A.K. Crooke, X. Sun, W. Zhou, J.R. Nellis, E.K. Stroebele, K.K. Chu, G.J. Tearney, M.J. Stevens, J.K. Harris, S.M. Rowe, J.F. Engelhardt, Defective innate immunity and hyperinflammation in newborn cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-knockout ferret lungs, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 52 (2015) 683–694. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2014-0250OC>.
- [33] A.G. Henderson, C. Ehre, B. Button, L.H. Abdullah, L.-H. Cai, M.W. Leigh, G.C. DeMaria, H. Matsui, S.H. Donaldson, C.W. Davis, J.K. Sheehan, R.C. Boucher, M. Kesimer, Cystic fibrosis airway secretions exhibit mucin hyperconcentration and increased osmotic pressure, *J. Clin. Invest.* 124 (2014) 3047–3060. <https://doi.org/10.1172/JCI73469>.
- [34] B. Button, L.-H. Cai, C. Ehre, M. Kesimer, D.B. Hill, J.K. Sheehan, R.C. Boucher, M. Rubinstein, A periciliary brush promotes the lung health by separating the mucus layer from airway epithelia, *Science* 337 (2012) 937–941. <https://doi.org/10.1126/science.1223012>.
- [35] R.C. Boucher, Bronchiectasis: a continuum of ion transport dysfunction or multiple hits?, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 181 (2010) 1017–1019. <https://doi.org/10.1164/rccm.201002-0284ED>.
- [36] J.F. Collawn, S. Matalon, CFTR and lung homeostasis, *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 307 (2014) L917-23. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00326.2014>.

- [37] P.M. Quinton, Role of epithelial HCO₃⁻ transport in mucin secretion: lessons from cystic fibrosis, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 299 (2010) C1222-33. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00362.2010>.
- [38] P.M. Quinton, Cystic fibrosis: impaired bicarbonate secretion and mucoviscidosis, *The Lancet* 372 (2008) 415–417. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(08\)61162-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(08)61162-9).
- [39] P.D. Sly, S. Brennan, C. Gangell, N. de Klerk, C. Murray, L. Mott, S.M. Stick, P.J. Robinson, C.F. Robertson, S.C. Ranganathan, Lung disease at diagnosis in infants with cystic fibrosis detected by newborn screening, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 180 (2009) 146–152. <https://doi.org/10.1164/rccm.200901-0069OC>.
- [40] D. Armstrong, K. Grimwood, J.B. Carlin, R. Carzino, J. Hull, A. Olinsky, P.D. Phelan, Severe viral respiratory infections in infants with cystic fibrosis, *Pediatr. Pulmonol.* 26 (1998) 371–379. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-0496\(199812\)26:6<371:AID-PPUL1>3.0.CO;2-N](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-0496(199812)26:6<371:AID-PPUL1>3.0.CO;2-N).
- [41] P.H. Gilligan, Infections in patients with cystic fibrosis: diagnostic microbiology update, *Clin. Lab. Med.* 34 (2014) 197–217. <https://doi.org/10.1016/j.cll.2014.02.001>.
- [42] T.S. Cohen, A. Prince, Cystic fibrosis: a mucosal immunodeficiency syndrome, *Nat. Med.* 18 (2012) 509–519. <https://doi.org/10.1038/nm.2715>.
- [43] M.D. Parkins, R.A. Floto, Emerging bacterial pathogens and changing concepts of bacterial pathogenesis in cystic fibrosis, *J. Cyst. Fibros.* 14 (2015) 293–304. <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2015.03.012>.
- [44] F. Ratjen, A. Munck, P. Kho, G. Angyalosi, Treatment of early *Pseudomonas aeruginosa* infection in patients with cystic fibrosis: the ELITE trial, *Thorax* 65 (2010) 286–291. <https://doi.org/10.1136/thx.2009.121657>.
- [45] G. Taccetti, E. Bianchini, L. Cariani, R. Buzzetti, D. Costantini, F. Trevisan, L. Zavataro, S. Campana, Early antibiotic treatment for *Pseudomonas aeruginosa* eradication in patients with cystic fibrosis: a randomised multicentre study comparing two different protocols, *Thorax* 67 (2012) 853–859. <https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2011-200832>.

Literatur

- [46] M. Proesmans, F. Vermeulen, L. Boulanger, J. Verhaegen, K. de Boeck, Comparison of two treatment regimens for eradication of *Pseudomonas aeruginosa* infection in children with cystic fibrosis, *J. Cyst. Fibros.* 12 (2013) 29–34. <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2012.06.001>.
- [47] H.K. Johansen, N. Høiby, Seasonal onset of initial colonisation and chronic infection with *Pseudomonas aeruginosa* in patients with cystic fibrosis in Denmark, *Thorax* 47 (1992) 109–111. <https://doi.org/10.1136/thx.47.2.109>.
- [48] G. Döring, G. Taccetti, S. Campana, F. Festini, M. Mascherini, Eradication of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis patients, *Eur. Respir. J.* 27 (2006) 653. <https://doi.org/10.1183/09031936.06.00132105>.
- [49] R.L. Gibson, J. Emerson, S. McNamara, J.L. Burns, M. Rosenfeld, A. Yunker, N. Hamblett, F. Accurso, M. Dovey, P. Hiatt, M.W. Konstan, R. Moss, G. Retsch-Bogart, J. Wagener, D. Waltz, R. Wilmott, P.L. Zeitlin, B. Ramsey, Significant microbiological effect of inhaled tobramycin in young children with cystic fibrosis, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 167 (2003) 841–849. <https://doi.org/10.1164/rccm.200208-855OC>.
- [50] A. Munck, S. Bonacorsi, P. Mariani-Kurkdjian, M. Lebourgeois, M. Gérardin, N. Brahimi, J. Navarro, E. Bingen, Genotypic characterization of *Pseudomonas aeruginosa* strains recovered from patients with cystic fibrosis after initial and subsequent colonization, *Pediatr. Pulmonol.* 32 (2001) 288–292. <https://doi.org/10.1002/ppul.1121>.
- [51] L. Jelsbak, H.K. Johansen, A.-L. Frost, R. Thøgersen, L.E. Thomsen, O. Ciofu, L. Yang, J.A.J. Haagensen, N. Høiby, S. Molin, Molecular epidemiology and dynamics of *Pseudomonas aeruginosa* populations in lungs of cystic fibrosis patients, *Infection and Immunity* 75 (2007) 2214–2224. <https://doi.org/10.1128/IAI.01282-06>.
- [52] K. Aanaes, L.F. Rickelt, H.K. Johansen, C. von Buchwald, T. Pressler, N. Høiby, P.Ø. Jensen, Decreased mucosal oxygen tension in the maxillary sinuses in patients with cystic fibrosis, *J. Cyst. Fibros.* 10 (2011) 114–120. <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2010.12.002>.

- [53] I. Nakamura, T. Yamaguchi, A. Tsukimori, A. Sato, S. Fukushima, Y. Mizuno, T. Matsumoto, Effectiveness of antibiotic combination therapy as evaluated by the Break-point Checkerboard Plate method for multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in clinical use, *J. Infect. Chemother.* 20 (2014) 266–269. <https://doi.org/10.1016/j.jiac.2013.12.005>.
- [54] M. Hartert, O. Senbaklavacin, B. Gohrbandt, B.M. Fischer, R. Buhl, C.-F. Vahld, Lung transplantation: a treatment option in end-stage lung disease, *Dtsch. Arztebl. Int.* 111 (2014) 107–116. <https://doi.org/10.3238/arztebl.2014.0107>.
- [55] A.R. Smyth, S.C. Bell, S. Bojcin, M. Bryon, A. Duff, P. Flume, N. Kashirskaya, A. Munck, F. Ratjen, S.J. Schwarzenberg, I. Sermet-Gaudelus, K.W. Southern, G. Taccetti, G. Ullrich, S. Wolfe, European Cystic Fibrosis Society Standards of Care: Best Practice guidelines, *J. Cyst. Fibros.* 13 Suppl 1 (2014) S23-42. <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2014.03.010>.
- [56] J.W. Woestenenk, R.K. Stellato, S.W. Terheggen-Lagro, C.K. van der Ent, R.H.J. Houwen, The relationship between body growth and pulmonary function in children with cystic fibrosis, *Acta Paediatr.* 103 (2014) 162–167. <https://doi.org/10.1111/apa.12462>.
- [57] E.J. Sims, J. McCormick, G. Mehta, A. Mehta, Neonatal screening for cystic fibrosis is beneficial even in the context of modern treatment, *J. Pediatr.* 147 (2005) S42-6. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2005.08.002>.
- [58] D.L. Waters, B. Wilcken, L. Irwig, P. van Asperen, C. Mellis, J.M. Simpson, J. Brown, K.J. Gaskin, Clinical outcomes of newborn screening for cystic fibrosis, *Archives of Disease in Childhood - Fetal and Neonatal Edition* 80 (1999) F1-F7. <https://doi.org/10.1136/fn.80.1.F1>.
- [59] J.E. Dankert-Roelse, G.J. te Meerman, Long term prognosis of patients with cystic fibrosis in relation to early detection by neonatal screening and treatment in a cystic fibrosis centre, *Thorax* 50 (1995) 712–718. <https://doi.org/10.1136/thx.50.7.712>.

Literatur

- [60] B. Martin, M.S. Schechter, A. Jaffe, P. Cooper, S.C. Bell, S. Ranganathan, Comparison of the US and Australian cystic fibrosis registries: the impact of newborn screening, *Pediatrics* 129 (2012) e348-55. <https://doi.org/10.1542/peds.2011-0567>.
- [61] F.J. Accurso, M.K. Sontag, J.S. Wagener, Complications associated with symptomatic diagnosis in infants with cystic fibrosis, *J. Pediatr.* 147 (2005) S37-41. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2005.08.034>.
- [62] D. Siret, G. Bretaudeau, B. Branger, A. Dabadie, M. Dagonne, V. David, M. de Braekeleer, V. Moisan-Petit, G. Picherot, G. Rault, V. Storni, M. Roussey, Comparing the clinical evolution of cystic fibrosis screened neonatally to that of cystic fibrosis diagnosed from clinical symptoms: a 10-year retrospective study in a French region (Brittany), *Pediatr. Pulmonol.* 35 (2003) 342–349. <https://doi.org/10.1002/ppul.10259>.
- [63] G. Mastella, L. Zanolla, C. Castellani, S. Altieri, M. Furnari, L. Giglio, M. Lombardo, A. Miano, C. Sciuto, F. Pardo, Neonatal screening for cystic fibrosis: long-term clinical balance, *Pancreatology* 1 (2001) 531–537.
- [64] H.J. Lai, Y. Cheng, P.M. Farrell, The survival advantage of patients with cystic fibrosis diagnosed through neonatal screening: evidence from the United States Cystic Fibrosis Foundation registry data, *J. Pediatr.* 147 (2005) S57-63. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2005.08.014>.
- [65] E.H. Yen, H. Quinton, D. Borowitz, Better nutritional status in early childhood is associated with improved clinical outcomes and survival in patients with cystic fibrosis, *J. Pediatr.* 162 (2013) 530-535.e1. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2012.08.040>.
- [66] R. Hugh, E. Leifson, The proposed Neotype Strains of *Pseudomonas Aeruginosa* (Schroeter 1872) Migula 1900, *International Bulletin of Bacteriological Nomenclature and Taxonomy* 14 (1964) 69–84. <https://doi.org/10.1099/0096266X-14-2-69>.
- [67] V.E. Wagner, B.H. Iglewski, *P. aeruginosa* Biofilms in CF Infection, *Clin. Rev. Allergy Immunol.* 35 (2008) 124–134. <https://doi.org/10.1007/s12016-008-8079-9>.

- [68] I. Feuerpfeil, K. Botzenhart, Hygienisch-mikrobiologische Wasseruntersuchung in der Praxis: Nachweismethoden, Bewertungskriterien, Qualitätssicherung, Normen, Wiley-VCH, Weinheim, 2008.
- [69] T. Ikeno, K. Fukuda, M. Ogawa, M. Honda, T. Tanabe, H. Taniguchi, Small and rough colony *Pseudomonas aeruginosa* with elevated biofilm formation ability isolated in hospitalized patients, *Microbiology and immunology* 51 (2007) 929–938.
- [70] M. Vert, Y. Doi, K.-H. Hellwich, M. Hess, P. Hodge, P. Kubisa, M. Rinaudo, F. Schué, Terminology for biorelated polymers and applications (IUPAC Recommendations 2012), *Pure and Applied Chemistry* 84 (2012) 377–410. <https://doi.org/10.1351/PAC-REC-10-12-04>.
- [71] H.-C. Flemming, P. Baveye, T.R. Neu, P. Stoodley, U. Szewzyk, J. Wingender, S. Wuertz, Who put the film in biofilm? The migration of a term from wastewater engineering to medicine and beyond, *NPJ Biofilms Microbiomes* 7 (2021) 10. <https://doi.org/10.1038/s41522-020-00183-3>.
- [72] H.-C. Flemming, J. Wingender, The biofilm matrix, *Nat. Rev. Microbiol.* 8 (2010) 623–633. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2415>.
- [73] J.W. Costerton, P.S. Stewart, E.P. Greenberg, Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections, *Science* 284 (1999) 1318–1322. <https://doi.org/10.1126/science.284.5418.1318>.
- [74] M. Hentzer, L. Eberl, M. Givskov, Transcriptome analysis of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development: anaerobic respiration and iron limitation, *Biofilms* 2 (2005) 37–61. <https://doi.org/10.1017/S1479050505001699>.
- [75] P. Tielen, M. Strathmann, K.-E. Jaeger, H.-C. Flemming, J. Wingender, Alginate acetylation influences initial surface colonization by mucoid *Pseudomonas aeruginosa*, *Microbiol. Res.* 160 (2005) 165–176. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2004.11.003>.
- [76] M.J. Franklin, D.E. Ohman, Identification of algF in the alginate biosynthetic gene cluster of *Pseudomonas aeruginosa* which is required for alginate acetylation, *J. Bacteriol.* 175 (1993) 5057–5065. <https://doi.org/10.1128/jb.175.16.5057-5065.1993>.

Literatur

- [77] M. Hentzer, G.M. Teitzel, G.J. Balzer, A. Heydorn, S. Molin, M. Givskov, M.R. Parsek, Alginate overproduction affects *Pseudomonas aeruginosa* biofilm structure and function, *J. Bacteriol.* 183 (2001) 5395–5401. <https://doi.org/10.1128/JB.183.18.5395-5401.2001>.
- [78] C. Ryder, M. Byrd, D.J. Wozniak, Role of polysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development, *Curr. Opin. Microbiol.* 10 (2007) 644–648. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2007.09.010>.
- [79] S.M. Kirov, J.S. Webb, C.Y. O'May, D.W. Reid, J.K.K. Woo, S.A. Rice, S. Kjelleberg, Biofilm differentiation and dispersal in mucoid *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients with cystic fibrosis, *Microbiology* 153 (2007) 3264–3274. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2007/009092-0>.
- [80] K.D. Xu, P.S. Stewart, F. Xia, C.T. Huang, G.A. McFeters, Spatial physiological heterogeneity in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm is determined by oxygen availability, *Appl. Environ. Microbiol.* 64 (1998) 4035–4039. <https://doi.org/10.1128/AEM.64.10.4035-4039.1998>.
- [81] J.R. Govan, V. Deretic, Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*, *Microbiological Reviews* 60 (1996) 539–574.
- [82] D.J. Hassett, Anaerobic production of alginate by *Pseudomonas aeruginosa*: alginate restricts diffusion of oxygen, *J. Bacteriol.* 178 (1996) 7322–7325. <https://doi.org/10.1128/jb.178.24.7322-7325.1996>.
- [83] S.J. Linnane, V.M. Keatings, C.M. Costello, J.B. Moynihan, C.M. O'Connor, M.X. Fitzgerald, P. McLoughlin, Total sputum nitrate plus nitrite is raised during acute pulmonary infection in cystic fibrosis, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 158 (1998) 207–212. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.158.1.9707096>.
- [84] H. Grasemann, Total sputum nitrate plus nitrite is raised during acute pulmonary infection in cystic fibrosis, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 159 (1999) 684–685.
- [85] S.S. Yoon, R.F. Hennigan, G.M. Hilliard, U.A. Ochsner, K. Parvatiyar, M.C. Kamani, H.L. Allen, T.R. DeKievit, P.R. Gardner, U. Schwab, *Pseudomonas aeruginosa* anaerobic respiration in biofilms: relationships to cystic fibrosis pathogenesis, *Developmental cell* 3 (2002) 593–603.

- [86] C.Y. O'May, D.W. Reid, S.M. Kirov, Anaerobic culture conditions favor biofilm-like phenotypes in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients with cystic fibrosis, *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 48 (2006) 373–380. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2006.00157.x>.
- [87] J.S. Elborn, S.C. Bell, S.L. Madge, P.-R. Burgel, C. Castellani, S. Conway, K. de Rijcke, B. Dembski, P. Drevinek, H.G.M. Heijerman, J.A. Innes, A. Lindblad, B. Marshall, H.V. Olesen, A.L. Reimann, A. Solé, L. Viviani, T.O.F. Wagner, T. Welte, F. Blasi, Report of the European Respiratory Society/European Cystic Fibrosis Society task force on the care of adults with cystic fibrosis, *Eur. Respir. J.* 47 (2016) 420–428. <https://doi.org/10.1183/13993003.00592-2015>.
- [88] K.A. Mielko, S.J. Jabłoński, J. Milczewska, D. Sands, M. Łukaszewicz, P. Młynarz, Metabolomic studies of *Pseudomonas aeruginosa*, *World J. Microbiol. Biotechnol.* 35 (2019) 178. <https://doi.org/10.1007/s11274-019-2739-1>.
- [89] X. Han, K. Yang, R.W. Gross, Multi-dimensional mass spectrometry-based shotgun lipidomics and novel strategies for lipidomic analyses, *Mass Spectrom. Rev.* 31 (2012) 134–178. <https://doi.org/10.1002/mas.20342>.
- [90] S. Mann, Über den Geruchsstoff von *Pseudomonas aeruginosa*, *Archiv für Mikrobiologie* 54 (1966) 184–190.
- [91] C.D. Cox, J. Parker, Use of 2-aminoacetophenone production in identification of *Pseudomonas aeruginosa*, *Journal of Clinical Microbiology* 9 (1979) 479–484.
- [92] J.N. Labows, K.J. McGINLEY, G.F. Webster, J.J. Leyden, Headspace analysis of volatile metabolites of *Pseudomonas aeruginosa* and related species by gas chromatography-mass spectrometry, *Journal of Clinical Microbiology* 12 (1980) 521–526.
- [93] A.J. Scott-Thomas, M. Syhre, P.K. Pattemore, M. Epton, R. Laing, J. Pearson, S.T. Chambers, 2-Aminoacetophenone as a potential breath biomarker for *Pseudomonas aeruginosa* in the cystic fibrosis lung, *BMC Pulm. Med.* 10 (2010) 56. <https://doi.org/10.1186/1471-2466-10-56>.

Literatur

- [94] A. Scott-Thomas, J. Pearson, S. Chambers, Potential sources of 2-aminoacetophenone to confound the *Pseudomonas aeruginosa* breath test, including analysis of a food challenge study, *J. Breath Res.* 5 (2011) 46002. <https://doi.org/10.1088/1752-7155/5/4/046002>.
- [95] M. Kesarwani, R. Hazan, J. He, Y.-A. Que, Y. Que, Y. Apidianakis, B. Lesic, G. Xiao, V. Dekimpe, S. Milot, E. Deziel, F. Lépine, L.G. Rahme, A quorum sensing regulated small volatile molecule reduces acute virulence and promotes chronic infection phenotypes, *PLoS Pathog.* 7 (2011) e1002192. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002192>.
- [96] V. Righi, C. Constantinou, M. Kesarwani, L.G. Rahme, A.A. Tzika, Live-cell high resolution magic angle spinning magnetic resonance spectroscopy for in vivo analysis of *Pseudomonas aeruginosa* metabolomics, *Biomed. Rep.* 1 (2013) 707–712. <https://doi.org/10.3892/br.2013.148>.
- [97] V. Righi, C. Constantinou, M. Kesarwani, L.G. Rahme, A.A. Tzika, Effects of a small, volatile bacterial molecule on *Pseudomonas aeruginosa* bacteria using whole cell high-resolution magic angle spinning nuclear magnetic resonance spectroscopy and genomics, *Int. J. Mol. Med.* 42 (2018) 2129–2136. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2018.3760>.
- [98] W. Carroll, W. Lenney, T. Wang, P. Spanel, A. Alcock, D. Smith, Detection of volatile compounds emitted by *Pseudomonas aeruginosa* using selected ion flow tube mass spectrometry, *Pediatr. Pulmonol.* 39 (2005) 452–456. <https://doi.org/10.1002/ppul.20170>.
- [99] R.A. Allardyce, V.S. Langford, A.L. Hill, D.R. Murdoch, Detection of volatile metabolites produced by bacterial growth in blood culture media by selected ion flow tube mass spectrometry (SIFT-MS), *J. Microbiol. Methods* 65 (2006) 361–365. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2005.09.003>.
- [100] W. Filipiak, A. Sponring, M.M. Baur, A. Filipiak, C. Ager, H. Wiesenhofer, M. Nagl, J. Troppmair, A. Amann, Molecular analysis of volatile metabolites released specifically by *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*, *BMC Microbiol.* 12 (2012) 113. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-12-113>.

- [101] N. Kunze, J. Göpel, M. Kuhns, M. Jünger, M. Quintel, T. Perl, Detection and validation of volatile metabolic patterns over different strains of two human pathogenic bacteria during their growth in a complex medium using multi-capillary column-ion mobility spectrometry (MCC-IMS), *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97 (2013) 3665–3676. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-4762-8>.
- [102] S.U. Savelev, J.D. Perry, S.J. Bourke, H. Jary, R. Taylor, A.J. Fisher, P.A. Corris, M. Petrie, A. de Soyza, Volatile biomarkers of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis and noncystic fibrosis bronchiectasis, *Lett. Appl. Microbiol.* 52 (2011) 610–613. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2011.03049.x>.
- [103] O. Lawal, H. Knobel, H. Weda, T.M.E. Nijssen, R. Goodacre, S.J. Fowler, TD/GC-MS analysis of volatile markers emitted from mono- and co-cultures of *Enterobacter cloacae* and *Pseudomonas aeruginosa* in artificial sputum, *Metabolomics* 14 (2018) 66. <https://doi.org/10.1007/s11306-018-1357-5>.
- [104] L.D.J. Bos, P.J. Sterk, M.J. Schultz, Volatile metabolites of pathogens: a systematic review, *PLoS Pathog.* 9 (2013) e1003311. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003311>.
- [105] E. Frimmersdorf, S. Horatzek, A. Pelnikevich, L. Wiehlmann, D. Schomburg, How *Pseudomonas aeruginosa* adapts to various environments: a metabolomic approach, *Environ. Microbiol.* 12 (2010) 1734–1747. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2010.02253.x>.
- [106] D.D. Nguyen, A.V. Melnik, N. Koyama, X. Lu, M. Schorn, J. Fang, K. Aguinaldo, T.L. Lincecum, M.G.K. Ghequire, V.J. Carrion, T.L. Cheng, B.M. Duggan, J.G. Malone, T.H. Mauchline, L.M. Sanchez, A.M. Kilpatrick, J.M. Raaijmakers, R. de Mot, B.S. Moore, M.H. Medema, P.C. Dorrestein, Indexing the *Pseudomonas* specialized metabolome enabled the discovery of poaeamide B and the bananamides, *Nat. Microbiol.* 2 (2016) 16197. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.197>.
- [107] O. Joensen, T. Paff, E.G. Haarman, I.M. Skovgaard, P.Ø. Jensen, T. Bjarnsholt, K.G. Nielsen, Exhaled breath analysis using electronic nose in cystic fibrosis and primary ciliary dyskinesia patients with chronic pulmonary infections, *PLoS ONE* 9 (2014) e115584. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0115584>.

Literatur

- [108] C.M.H.H.T. Robroeks, J.J.B.N. van Berkel, J.W. Dallinga, Q. Jöbsis, L.J.I. Zimmermann, H.J.E. Hendriks, M.F.M. Wouters, C.P.M. van der Grinten, K.D.G. van de Kant, F.-J. van Schooten, E. Dompeling, Metabolomics of volatile organic compounds in cystic fibrosis patients and controls, *Pediatr. Res.* 68 (2010) 75–80. <https://doi.org/10.1203/PDR.0b013e3181df4ea0>.
- [109] M. Maniscalco, S. Fuschillo, D. Paris, A. Cutignano, A. Sanduzzi, A. Motta, Clinical metabolomics of exhaled breath condensate in chronic respiratory diseases, *Adv. Clin. Chem.* 88 (2019) 121–149. <https://doi.org/10.1016/bs.acc.2018.10.002>.
- [110] P. Montuschi, D. Paris, D. Melck, V. Lucidi, G. Ciabattini, V. Raia, C. Calabrese, A. Bush, P.J. Barnes, A. Motta, NMR spectroscopy metabolomic profiling of exhaled breath condensate in patients with stable and unstable cystic fibrosis, *Thorax* 67 (2012) 222–228. <https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2011-200072>.
- [111] T. Rabis, U. Sommerwerck, O. Anhenn, K. Darwiche, L. Freitag, H. Teschler, B. Bödeker, S. Maddula, J.I. Baumbach, Detection of infectious agents in the airways by ion mobility spectrometry of exhaled breath, *Int. J. Ion Mobil. Spec.* 14 (2011) 187–195. <https://doi.org/10.1007/s12127-011-0077-6>.
- [112] J. Taucher, A. Hansel, A. Jordan, R. Fall, J.H. Futrell, W. Lindinger, Detection of isoprene in expired air from human subjects using proton-transfer-reaction mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 11 (1997) 1230–1234. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0231\(199707\)11:11<1230:AID-RCM3>3.0.CO;2-Z](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0231(199707)11:11<1230:AID-RCM3>3.0.CO;2-Z).
- [113] J.M. Scotter, R.A. Allardyce, V.S. Langford, A. Hill, D.R. Murdoch, The rapid evaluation of bacterial growth in blood cultures by selected ion flow tube-mass spectrometry (SIFT-MS) and comparison with the BacT/ALERT automated blood culture system, *J. Microbiol. Methods* 65 (2006) 628–631. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2005.09.016>.
- [114] K.D. Nizio, K.A. Perrault, A.N. Troobnikoff, M. Ueland, S. Shoma, J.R. Iredell, P.G. Middleton, S.L. Forbes, In vitro volatile organic compound profiling using GC×GC-TOFMS to differentiate bacteria associated with lung infections: a proof-of-concept study, *J. Breath Res.* 10 (2016) 26008. <https://doi.org/10.1088/1752-7155/10/2/026008>.

- [115] I. Bruheim, X. Liu, J. Pawliszyn, Thin-film microextraction, *Anal. Chem.* 75 (2003) 1002–1010. <https://doi.org/10.1021/ac026162q>.
- [116] R. Jiang, J. Pawliszyn, Thin-film microextraction offers another geometry for solid-phase microextraction, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 39 (2012) 245–253. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2012.07.005>.
- [117] E. Carasek, J. Merib, Membrane-based microextraction techniques in analytical chemistry: A review, *Anal. Chim. Acta* 880 (2015) 8–25. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.02.049>.
- [118] Y. Hu, Y. Zheng, F. Zhu, G. Li, Sol-gel coated polydimethylsiloxane/beta-cyclodextrin as novel stationary phase for stir bar sorptive extraction and its application to analysis of estrogens and bisphenol A, *J. Chromatogr. A* 1148 (2007) 16–22. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.02.101>.
- [119] L. Vernarelli, J. Whitecavage, J. Stuff, Analysis of Food Samples using Thin Film Solid Phase Microextraction (TF-SPME) and Thermal Desorption GC/MS, GERSTEL Application Note No. 202 (2019).
- [120] J.N. Lee, C. Park, G.M. Whitesides, Solvent compatibility of poly(dimethylsiloxane)-based microfluidic devices, *Anal. Chem.* 75 (2003) 6544–6554. <https://doi.org/10.1021/ac0346712>.
- [121] A. Jahnke, P. Mayer, D. Broman, M.S. McLachlan, Possibilities and limitations of equilibrium sampling using polydimethylsiloxane in fish tissue, *Chemosphere* 77 (2009) 764–770. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.08.025>.
- [122] Y. Goto, S. Takeda, T. Araki, T. Fuchigami, Method of simultaneous stir bar sorptive extraction of phenethylamines and THC metabolite from urine, *The Journal of Toxicological Sciences* 36 (2011) 523–529. <https://doi.org/10.2131/jts.36.523>.
- [123] H. Kaiser, H. Specker, Bewertung und Vergleich von Analysenverfahren, *Z. Anal. Chem.* 149 (1956) 46–66. <https://doi.org/10.1007/BF00454145>.

Literatur

- [124] Judicial Commission of the International Committee on Nomenclature of Bacteria, OPINION 36: Designation of Strain ATCC 10145 as the Neotype Strain of *Pseudomonas aeruginosa* (Schroeter) Migula, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 20 (1970) 15–16. <https://doi.org/10.1099/00207713-20-1-15>.
- [125] B.W. Holloway, Genetic Recombination in *Pseudomonas aeruginosa*, *Microbiology* 13 (1955) 572–581. <https://doi.org/10.1099/00221287-13-3-572>.
- [126] D.E. Ohman, A.M. Chakrabarty, Genetic mapping of chromosomal determinants for the production of the exopolysaccharide alginate in a *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis isolate, *Infection and Immunity* 33 (1981) 142–148.
- [127] D. Brecht, F. Uteschil, O.J. Schmitz, Thermogravimetry coupled to an atmospheric pressure photo ionization quadrupole mass spectrometry for the product control of pharmaceutical formulations and the analysis of plasticizers in polymers, *Talanta* 198 (2019) 440–446. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.01.118>.
- [128] E. Bast, *Mikrobiologische Methoden: Eine Einführung in grundlegende Arbeitstechniken*, first. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, 1999.
- [129] D.D. Sriramulu, H. Lünsdorf, J.S. Lam, U. Römling, Microcolony formation: a novel biofilm model of *Pseudomonas aeruginosa* for the cystic fibrosis lung, *J. Med. Microbiol.* 54 (2005) 667–676. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.45969-0>.
- [130] S. Kirchner, J.L. Fothergill, E.A. Wright, C.E. James, E. Mowat, C. Winstanley, Use of artificial sputum medium to test antibiotic efficacy against *Pseudomonas aeruginosa* in conditions more relevant to the cystic fibrosis lung, *J. Vis. Exp.* (2012) e3857. <https://doi.org/10.3791/3857>.
- [131] T.M. Filisetti-Cozzi, N.C. Carpita, Measurement of uronic acids without interference from neutral sugars, *Analytical biochemistry* 197 (1991) 157–162.
- [132] M. Whiteley, M.G. Banger, R.E. Bumgarner, M.R. Parsek, G.M. Teitzel, S. Lory, E.P. Greenberg, Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms, *Nature* 413 (2001) 860–864. <https://doi.org/10.1038/35101627>.

- [133] A.J. Park, K. Murphy, J.R. Krieger, D. Brewer, P. Taylor, M. Habash, C.M. Khursigara, A temporal examination of the planktonic and biofilm proteome of whole cell *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 using quantitative mass spectrometry, *Mol. Cell. Proteomics* 13 (2014) 1095–1105. <https://doi.org/10.1074/mcp.M113.033985>.
- [134] E.L. Gjersing, J.L. Herberg, J. Horn, C.M. Schaldach, R.S. Maxwell, NMR metabolomics of planktonic and biofilm modes of growth in *Pseudomonas aeruginosa*, *Anal. Chem.* 79 (2007) 8037–8045. <https://doi.org/10.1021/ac070800t>.
- [135] T. Koehler, I. Ackermann, D. Brecht, F. Uteschil, J. Wingender, U. Telgheder, O.J. Schmitz, Analysis of volatile metabolites from in vitro biofilms of *Pseudomonas aeruginosa* with thin-film microextraction by thermal desorption gas chromatography-mass spectrometry, *Anal. Bioanal. Chem.* 412 (2020) 2881–2892. <https://doi.org/10.1007/s00216-020-02529-4>.
- [136] T. Griebe, H.-C. Flemming, Rotating annular reactors for controlled growth of biofilms, *Biofilms—investigative methods & applications*. Lancaster, PA: Technomic Publishing Company, Inc (2000) 23–40.
- [137] C. Diederich, M. Leybold, R. Breinbauer, W. Blankenfeldt, Biosynthese der Phenazine, *Nachr. Chem.* 62 (2014) 975–980. <https://doi.org/10.1002/nadc.201490357>.
- [138] J.M. Meyer, Pyoverdines: pigments, siderophores and potential taxonomic markers of fluorescent *Pseudomonas* species, *Archiv. Mikrobiol.* 174 (2000) 135–142. <https://doi.org/10.1007/s002030000188>.
- [139] I.J. Schalk, L. Guillon, Pyoverdine biosynthesis and secretion in *Pseudomonas aeruginosa*: implications for metal homeostasis, *Environ. Microbiol.* 15 (2013) 1661–1673. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12013>.
- [140] M.Y. Yoon, K.-M. Lee, Y. Park, S.S. Yoon, Contribution of cell elongation to the biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa* during anaerobic respiration, *PLoS ONE* 6 (2011) e16105. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016105>.

Literatur

- [141] R.E. Steinberger, A.R. Allen, H.G. Hansa, P.A. Holden, Elongation correlates with nutrient deprivation in *Pseudomonas aeruginosa*-unsaturated biofilms, *Microb. Ecol.* 43 (2002) 416–423. <https://doi.org/10.1007/s00248-001-1063-z>.
- [142] W. Kaiser, *Kunststoffchemie für Ingenieure: Von der Synthese bis zur Anwendung*, fourth., neu bearbeitete und erweiterte Auflage, Hanser, München, 2016.
- [143] KUNDERT AG Kunststofftechnik, POM H natur: Werkstoff-Datenblatt, 2019.
- [144] L. Sprunger, A. Proctor, W.E. Acree, M.H. Abraham, Characterization of the sorption of gaseous and organic solutes onto polydimethyl siloxane solid-phase microextraction surfaces using the Abraham model, *J. Chromatogr. A* 1175 (2007) 162–173. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.10.058>.
- [145] S. Nair, U.V. Aswathy, A. Mathew, R. Raghavan, Studies on the thermal properties of silicone polymer based thermal protection systems for space applications, *J Therm Anal Calorim* 128 (2017) 1731–1741. <https://doi.org/10.1007/s10973-016-6025-2>.
- [146] T.J. Kauppila, H. Kersten, T. Benter, The ionization mechanisms in direct and dopant-assisted atmospheric pressure photoionization and atmospheric pressure laser ionization, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 25 (2014) 1870–1881. <https://doi.org/10.1007/s13361-014-0988-7>.
- [147] J.A. Syage, Mechanism of $M + H^+$ formation in photoionization mass spectrometry, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 15 (2004) 1521–1533. <https://doi.org/10.1016/j.jasms.2004.07.006>.
- [148] S. Riazanskaia, G. Blackburn, M. Harker, D. Taylor, C.L.P. Thomas, The analytical utility of thermally desorbed polydimethylsilicone membranes for in-vivo sampling of volatile organic compounds in and on human skin, *Analyst* 133 (2008) 1020–1027. <https://doi.org/10.1039/b802515k>.
- [149] Institut für Arbeitsschutz der Deutschen Gesetzlichen Unfallversicherung, Dimethylsulfid, 2019. http://gestis.itrust.de/nxt/gateway.dll/gestis_de/000000.xml?f=templates&fn=default.htm&vid=gestisdeu:sdbdeu (accessed 9 August 2019).

- [150] Institut für Arbeitsschutz der Deutschen Gesetzlichen Unfallversicherung, 1-Undecen, 2019. http://gestis.itrust.de/nxt/gateway.dll/gestis_de/000000.xml?f=templates&fn=default.htm&vid=gestisde:sdbdeu (accessed 9 August 2019).
- [151] C. Zscheppank, H.L. Wiegand, C. Lenzen, J. Wingender, U. Telgheder, Investigation of volatile metabolites during growth of *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* by needle trap-GC-MS, *Anal. Bioanal. Chem.* 406 (2014) 6617–6628. <https://doi.org/10.1007/s00216-014-8111-2>.
- [152] C. Schöller, S. Molin, K. Wilkins, Volatile metabolites from some gram-negative bacteria, *Chemosphere* 35 (1997) 1487–1495. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(97\)00209-9](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(97)00209-9).
- [153] R.M.S. Thorn, D.M. Reynolds, J. Greenman, Multivariate analysis of bacterial volatile compound profiles for discrimination between selected species and strains in vitro, *J. Microbiol. Methods* 84 (2011) 258–264. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2010.12.001>.
- [154] Institut für Arbeitsschutz der Deutschen Gesetzlichen Unfallversicherung, Dimethyldisulfid, 2019. http://gestis.itrust.de/nxt/gateway.dll/gestis_de/000000.xml?f=templates&fn=default.htm&vid=gestisde:sdbdeu (accessed 9 August 2019).
- [155] H.D. Bean, J.-M.D. Dimandja, J.E. Hill, Bacterial volatile discovery using solid phase microextraction and comprehensive two-dimensional gas chromatography-time-of-flight mass spectrometry, *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 901 (2012) 41–46. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2012.05.038>.
- [156] G. Preti, E. Thaler, C.W. Hanson, M. Troy, J. Eades, A. Gelperin, Volatile compounds characteristic of sinus-related bacteria and infected sinus mucus: analysis by solid-phase microextraction and gas chromatography–mass spectrometry, *Journal of Chromatography B* 877 (2009) 2011–2018.
- [157] H. Nazik, G. Sass, E. Déziel, D.A. Stevens, *Aspergillus* Is Inhibited by *Pseudomonas aeruginosa* Volatiles, *J. Fungi (Basel)* 6 (2020). <https://doi.org/10.3390/jof6030118>.

Literatur

- [158] C.K. Stover, X.Q. Pham, A.L. Erwin, S.D. Mizoguchi, P. Warrenner, M.J. Hickey, F.S. Brinkman, W.O. Hufnagle, D.J. Kowalik, M. Lagrou, R.L. Garber, L. Goltry, E. Tolentino, S. Westbrook-Wadman, Y. Yuan, L.L. Brody, S.N. Coulter, K.R. Folger, A. Kas, K. Larbig, R. Lim, K. Smith, D. Spencer, G.K. Wong, Z. Wu, I.T. Paulsen, J. Reizer, M.H. Saier, R.E. Hancock, S. Lory, M.V. Olson, Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen, *Nature* 406 (2000) 959–964. <https://doi.org/10.1038/35023079>.
- [159] L.A. Silo-Suh, S.-J. Suh, D.E. Ohman, D.J. Wozniak, J.W. Pridgeon, Complete Genome Sequence of *Pseudomonas aeruginosa* Mucoid Strain FRD1, Isolated from a Cystic Fibrosis Patient, *Genome Announc.* 3 (2015). <https://doi.org/10.1128/genomea.00153-15>.
- [160] O. Fiehn, MassBank of North America (MoNA) 30.09.2019.
- [161] v.E. Kovats, Gas-chromatographische charakterisierung organischer verbindungen. Teil 1: retentionsindices aliphatischer halogenide, alkohole, aldehyde und ketone, *Helvetica Chimica Acta* 41 (1958) 1915–1932.
- [162] P.C. Goeminne, T. Vandendriessche, J. van Eldere, B.M. Nicolai, M.L.A.T.M. Hertog, L.J. Dupont, Detection of *Pseudomonas aeruginosa* in sputum headspace through volatile organic compound analysis, *Respir. Res.* 13 (2012) 87. <https://doi.org/10.1186/1465-9921-13-87>.
- [163] T. Ito, T. Miyaji, T. Nakagawa, N. Tomizuka, Degradation of dimethyl disulfide by *pseudomonas fluorescens* strain 76, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 71 (2007) 366–370. <https://doi.org/10.1271/bbb.60295>.
- [164] P. Buzzini, C. Gasparetti, B. Turchetti, M.R. Cramarossa, A. Vaughan-Martini, A. Martini, U.M. Pagnoni, L. Forti, Production of volatile organic compounds (VOCs) by yeasts isolated from the ascocarps of black (*Tuber melanosporum* Vitt.) and white (*Tuber magnatum* Pico) truffles, *Archiv. Mikrobiol.* 184 (2005) 187–193.
- [165] S. Dugravot, F. Grolleau, D. Macherel, A. Rochetaing, B. Hue, M. Stankiewicz, J. Huignard, B. Lapied, Dimethyl disulfide exerts insecticidal neurotoxicity through mitochondrial dysfunction and activation of insect K(ATP) channels, *J. Neurophysiol.* 90 (2003) 259–270. <https://doi.org/10.1152/jn.01096.2002>.

- [166] J. Scott, M. Sueiro-Olivares, W. Ahmed, C. Heddergott, C. Zhao, R. Thomas, M. Bromley, J.-P. Latgé, S. Krappmann, S. Fowler, E. Bignell, J. Amich, Pseudomonas aeruginosa-Derived Volatile Sulfur Compounds Promote Distal Aspergillus fumigatus Growth and a Synergistic Pathogen-Pathogen Interaction That Increases Pathogenicity in Co-infection, *Front. Microbiol.* 10 (2019) 2311. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02311>.
- [167] B. Briard, C. Heddergott, J.-P. Latgé, Volatile Compounds Emitted by Pseudomonas aeruginosa Stimulate Growth of the Fungal Pathogen Aspergillus fumigatus, *mBio* 7 (2016) e00219. <https://doi.org/10.1128/mBio.00219-16>.
- [168] H.D. Bean, C.A. Rees, J.E. Hill, Comparative analysis of the volatile metabolomes of Pseudomonas aeruginosa clinical isolates, *J. Breath Res.* 10 (2016) 47102. <https://doi.org/10.1088/1752-7155/10/4/047102>.
- [169] J. Wingender, Herstellungsprozess des festen ASM-Agars zur Kultivierung von Biofilmen des Bakteriums P. aeruginosa. Persönliches Gespräch, Essen, 2020.
- [170] L. Line, M. Alhede, M. Kolpen, M. Kühl, O. Ciofu, T. Bjarnsholt, C. Moser, M. Toyofuku, N. Nomura, N. Høiby, P.Ø. Jensen, Physiological levels of nitrate support anoxic growth by denitrification of Pseudomonas aeruginosa at growth rates reported in cystic fibrosis lungs and sputum, *Front. Microbiol.* 5 (2014) 554. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00554>.
- [171] H. Grasemann, I. Ioannidis, R.P. Tomkiewicz, H. de Groot, B.K. Rubin, F. Ratjen, Nitric oxide metabolites in cystic fibrosis lung disease, *Arch. Dis. Child.* 78 (1998) 49–53. <https://doi.org/10.1136/adc.78.1.49>.
- [172] K.L. Palmer, S.A. Brown, M. Whiteley, Membrane-bound nitrate reductase is required for anaerobic growth in cystic fibrosis sputum, *J. Bacteriol.* 189 (2007) 4449–4455. <https://doi.org/10.1128/JB.00162-07>.
- [173] M. Kolpen, T. Bjarnsholt, C. Moser, C.R. Hansen, L.F. Rickelt, M. Kühl, C. Hempel, T. Pressler, N. Høiby, P.Ø. Jensen, Nitric oxide production by polymorphonuclear leucocytes in infected cystic fibrosis sputum consumes oxygen, *Clin. Exp. Immunol.* 177 (2014) 310–319. <https://doi.org/10.1111/cei.12318>.

Literatur

- [174] M.T. Madigan, J.M. Martinko, T.D. Brock, T. Lazar, M. Thomm, Brock Mikrobiologie, eleventh., überarb. Aufl., Pearson Studium, München, 2009.
- [175] H.-C. Flemming, Biofouling in water systems—cases, causes and countermeasures, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 59 (2002) 629–640. <https://doi.org/10.1007/s00253-002-1066-9>.
- [176] I. Sutherland, Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework, *Microbiology* 147 (2001) 3–9. <https://doi.org/10.1099/00221287-147-1-3>.
- [177] F. Kavanagh, Activities of Twenty-two Antibacterial Substances against Nine Species of Bacteria, *J. Bacteriol.* 54 (1947) 761–766.
- [178] S. Calmels, H. Ohshima, P. Vincent, A.M. Gounot, H. Bartsch, Screening of microorganisms for nitrosation catalysis at pH 7 and kinetic studies on nitrosamine formation from secondary amines by *E. coli* strains, *Carcinogenesis* 6 (1985) 911–915. <https://doi.org/10.1093/carcin/6.6.911>.
- [179] J. Sander, Nitrosaminsynthese durch Bakterien, *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie* 349 (1968) 429–432. <https://doi.org/10.1515/bchm2.1968.349.1.429>.
- [180] G.M. Hawksworth, M.J. Hill, Bacteria and the N-nitrosation of secondary amines, *Br. J. Cancer* 25 (1971) 520–526. <https://doi.org/10.1038/bjc.1971.66>.
- [181] A.L. Mills, M. Alexander, N-Nitrosamine formation by cultures of several microorganisms, *Appl. Environ. Microbiol.* 31 (1976) 892–895.
- [182] I.R. Rowland, P. Grasso, Degradation of *N*-Nitrosamines by Intestinal Bacteria, *Applied Microbiology* 29 (1975) 7–12.
- [183] F.W. Forney, A.J. Markovetz, The biology of methyl ketones, *Journal of Lipid Research* 12 (1971) 383–395.
- [184] G.J.E. Thijsse, Fatty-acid accumulation by acrylate inhibition of β -oxidation in an alkane-oxidizing *Pseudomonas*, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Specialized Section on Lipids and Related Subjects* 84 (1964) 195–197.
- [185] A. Kornberg, S. Ochoa, A.H. Mehler, Spectrophotometric studies on the decarboxylation of β -keto acids, *J. Biol. Chem.* 174 (1948) 159–172.

- [186] J.D. Robinson, R.O. Brady, R.M. Bradley, Biosynthesis of fatty acids: IV. Studies with inhibitors, *Journal of Lipid Research* 4 (1963) 144–150.
- [187] F.W. Forney, A.J. Markovetz, An enzyme system for aliphatic methyl ketone oxidation, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 37 (1969) 31–38. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(69\)90876-6](https://doi.org/10.1016/0006-291X(69)90876-6).
- [188] F.W. Forney, A.J. Markovetz, Subterminal Oxidation of Aliphatic Hydrocarbons, *J. Bacteriol.* 102 (1970) 281–282.
- [189] Q. Yan, T.R. Simmons, W.T. Cordell, N.J. Hernández Lozada, C.J. Breckner, X. Chen, M.A. Jindra, B.F. Pflieger, Metabolic engineering of β -oxidation to leverage thioesterases for production of 2-heptanone, 2-nonanone and 2-undecanone, *Metab. Eng.* 61 (2020) 335–343. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2020.05.008>.
- [190] J.M. Zechman, S. Aldinger, J.N. Labows, Characterization of pathogenic bacteria by automated headspace concentration—gas chromatography, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 377 (1986) 49–57. [https://doi.org/10.1016/S0378-4347\(00\)80760-4](https://doi.org/10.1016/S0378-4347(00)80760-4).
- [191] J.M. Zechman, J.N. Labows, Volatiles of *Pseudomonas aeruginosa* and related species by automated headspace concentration—gas chromatography, *Can. J. Microbiol.* 31 (1985) 232–237. <https://doi.org/10.1139/m85-045>.
- [192] A.H. Neerincx, B.P. Geurts, M.F.J. Habets, J.A. Booij, J. van Loon, J.J. Jansen, L.M.C. Buydens, J. van Ingen, J.W. Mouton, F.J.M. Harren, R.A. Wevers, P.J.F.M. Merkus, S.M. Cristescu, L.A.J. Kluijtmans, Identification of *Pseudomonas aeruginosa* and *Aspergillus fumigatus* mono- and co-cultures based on volatile biomarker combinations, *J. Breath Res.* 10 (2016) 16002. <https://doi.org/10.1088/1752-7155/10/1/016002>.
- [193] J. Li, C. Rumancev, H.V. Lutze, T.C. Schmidt, A. Rosenhahn, O.J. Schmitz, Effect of ozone stress on the intracellular metabolites from *Cobetia marina*, *Anal. Bioanal. Chem.* 412 (2020) 5853–5861. <https://doi.org/10.1007/s00216-020-02810-6>.

Literatur

- [194] Institut für Arbeitsschutz der Deutschen Gesetzlichen Unfallversicherung, 2-Methylbutyraldehyd, 2019. <https://gestis.dguv.de/data?name=492560> (accessed 28 December 2020).
- [195] K. Dettmer-Wilde, W. Engewald, Practical Gas Chromatography, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2014.
- [196] J.P. Cerón-Carrasco, D. Jacquemin, C. Laurence, A. Planchat, C. Reichardt, K. Sraïdi, Solvent polarity scales: determination of new ET (30) values for 84 organic solvents, *J. Phys. Org. Chem.* 27 (2014) 512–518. <https://doi.org/10.1002/poc.3293>.
- [197] S. Mann, Chinazolinderivate bei Pseudomonaden, *Archiv. Mikrobiol.* 56 (1967) 324–329. <https://doi.org/10.1007/BF00425207>.
- [198] T. Qvist, D. Taylor-Robinson, E. Waldmann, H.V. Olesen, C.R. Hansen, I.H. Mathiesen, N. Høiby, T.L. Katzenstein, R.L. Smyth, P.J. Diggle, T. Pressler, Comparing the harmful effects of nontuberculous mycobacteria and Gram negative bacteria on lung function in patients with cystic fibrosis, *J. Cyst. Fibros.* 15 (2016) 380–385. <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2015.09.007>.
- [199] L. Mondello, P.Q. Tranchida, P. Dugo, G. Dugo, Comprehensive two-dimensional gas chromatography-mass spectrometry: a review, *Mass Spectrom. Rev.* 27 (2008) 101–124. <https://doi.org/10.1002/mas.20158>.

Anhang A Entwicklung und Etablierung eines Probennahmesystems für mVOCs aus dem *in vitro* Biofilmmodell

Ergänzung zum Kapitel 5.2.3:

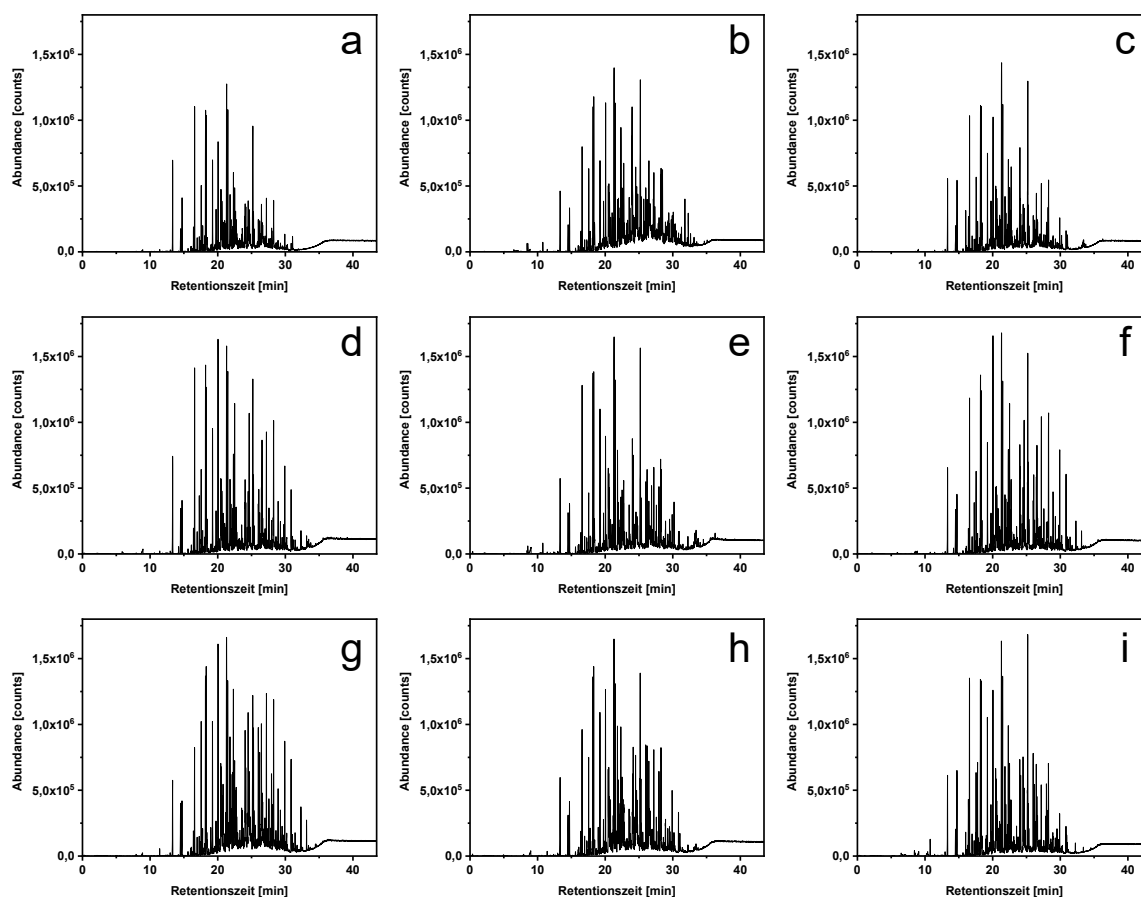


Abbildung 48: TICs der Analyse des extrazellulären volatilen Metaboloms von *P. aeruginosa* ATCC 10145 unter aeroben Bedingungen bei 37 °C auf LB-Agar im *in vitro* Biofilmmodell. Es wurden neun Replikate mittels TFME beprobt und mit der TD-GC-qMS Methode analysiert.

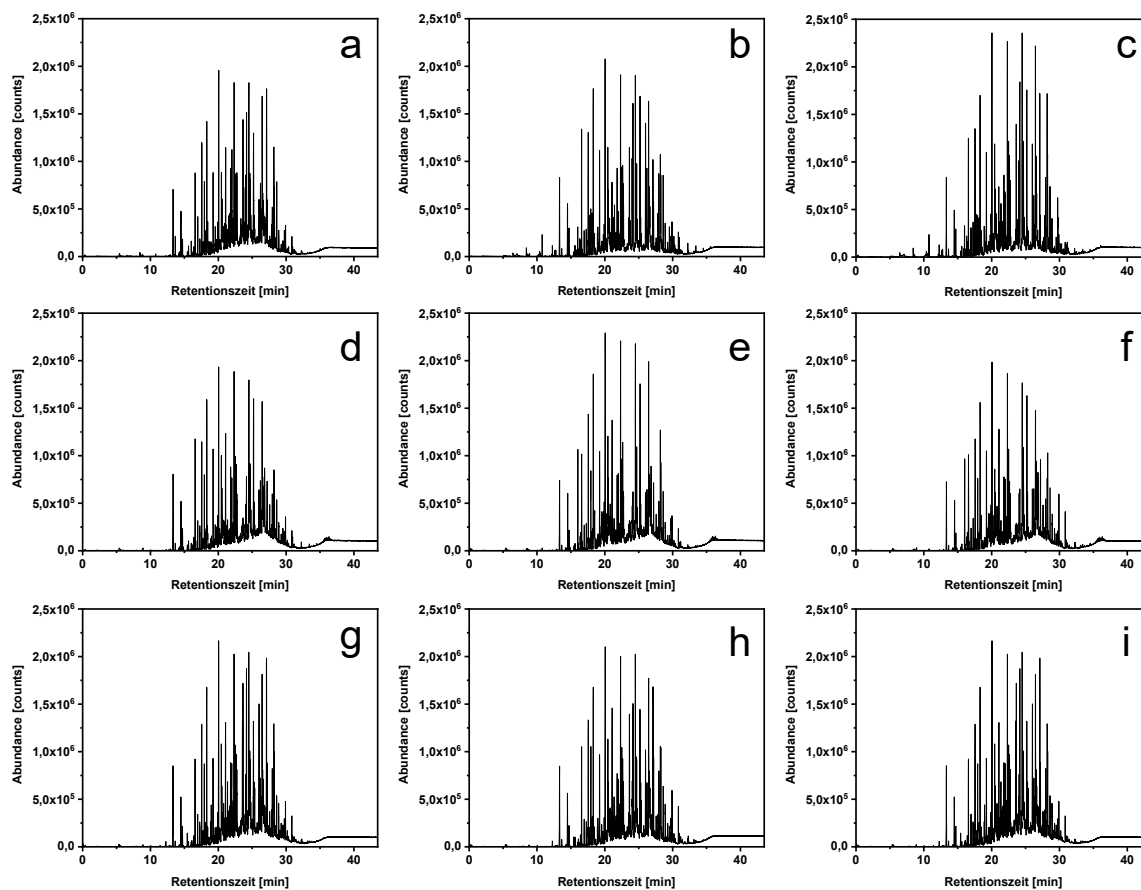


Abbildung 49: TICs der Analyse des extrazellulären volatilen Metaboloms von *P. aeruginosa* ATCC 10145 unter anaeroben Bedingungen bei 37 °C auf LBN-Agar im in vitro Biofilmmmodell. Es wurden neun Replikate mittels TFME beprobt und mit der TD-GC-qMS Methode analysiert.

Anhang B Charakterisierung des extrazellulären Metaboloms von *P. aeruginosa* im *in vitro* Biofilmmodell

Ergänzung zum Kapitel 5.3.1:

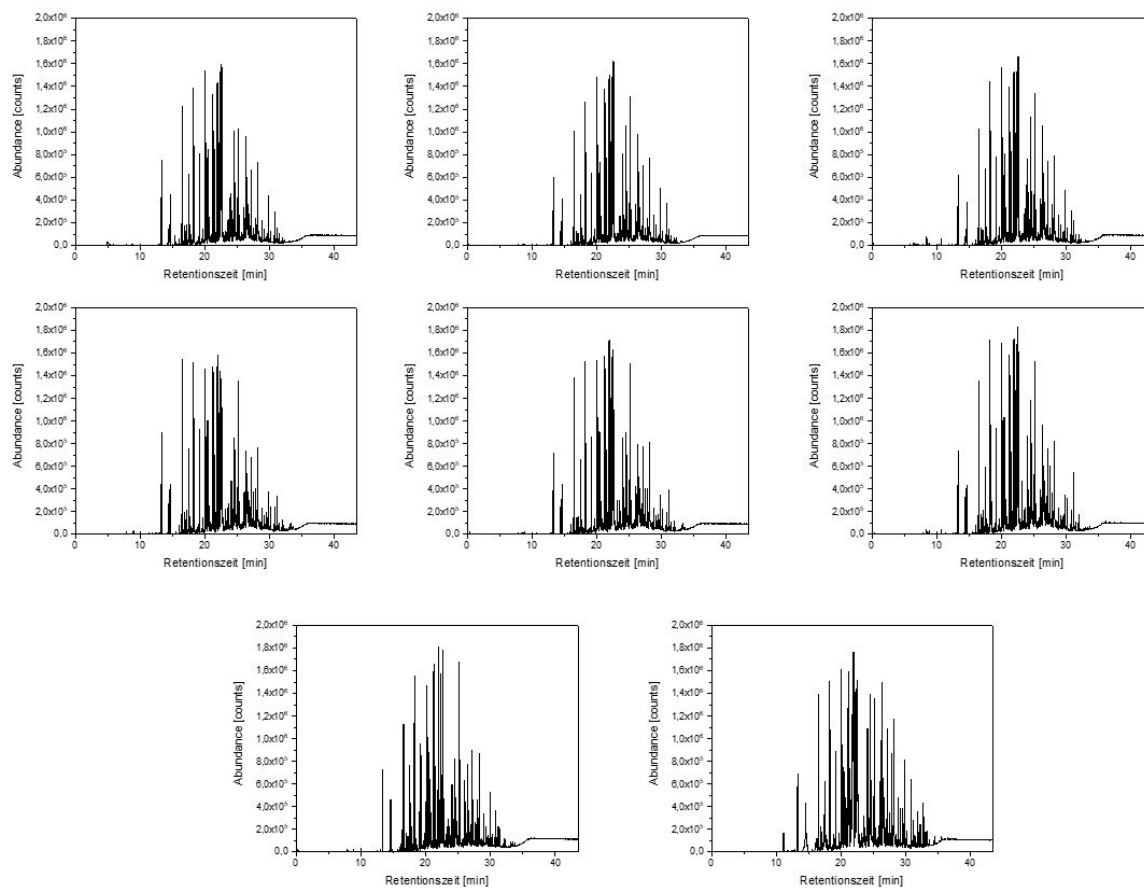


Abbildung 50: TICs der Analyse des extrazellulären volatilen Metaboloms von *P. aeruginosa* FRD1 mittels TD-GC-qMS. Die Kultivierung erfolgte im *in vitro* Modell auf LB-Agar unter aeroben Bedingungen bei 37 °C.

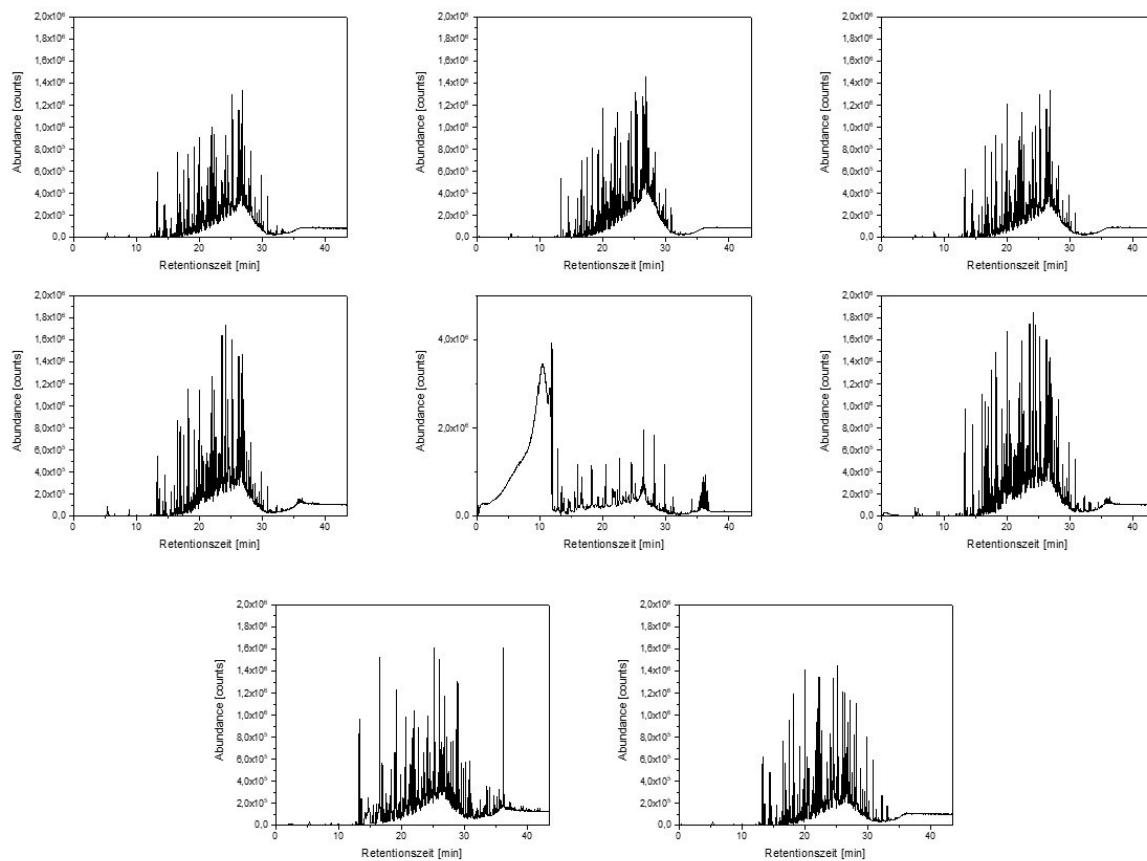


Abbildung 51: TICs der Analyse des extrazellulären volatilen Metaboloms von *P. aeruginosa* FRD1 mittels TD-GC-qMS. Die Kultivierung erfolgte im in vitro Modell auf LBN-Agar unter anaeroben Bedingungen bei 37 °C.

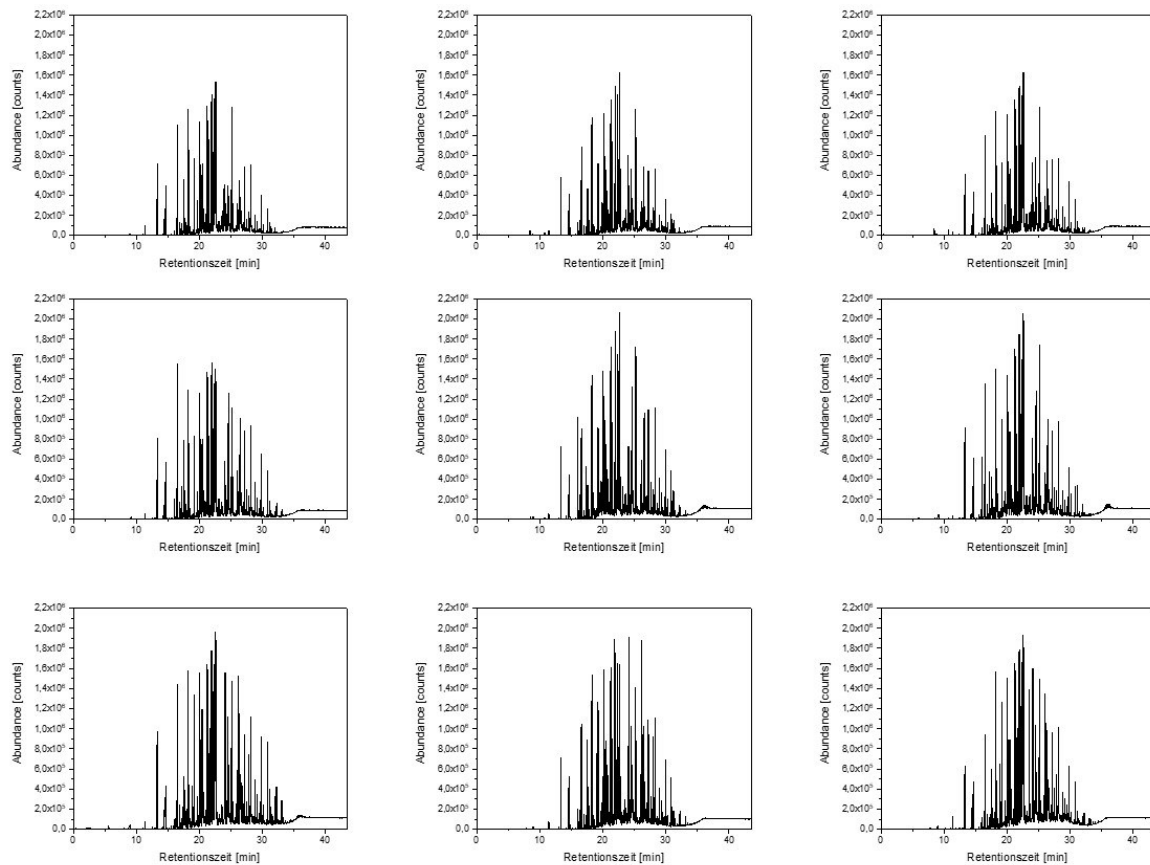


Abbildung 52: TICs der Analyse des extrazellulären volatilen Metaboloms von *P. aeruginosa* PAO1 mittels TD-GC-qMS. Die Kultivierung erfolgte im in vitro Modell auf LB-Agar unter aeroben Bedingungen bei 37 °C.

Anhang

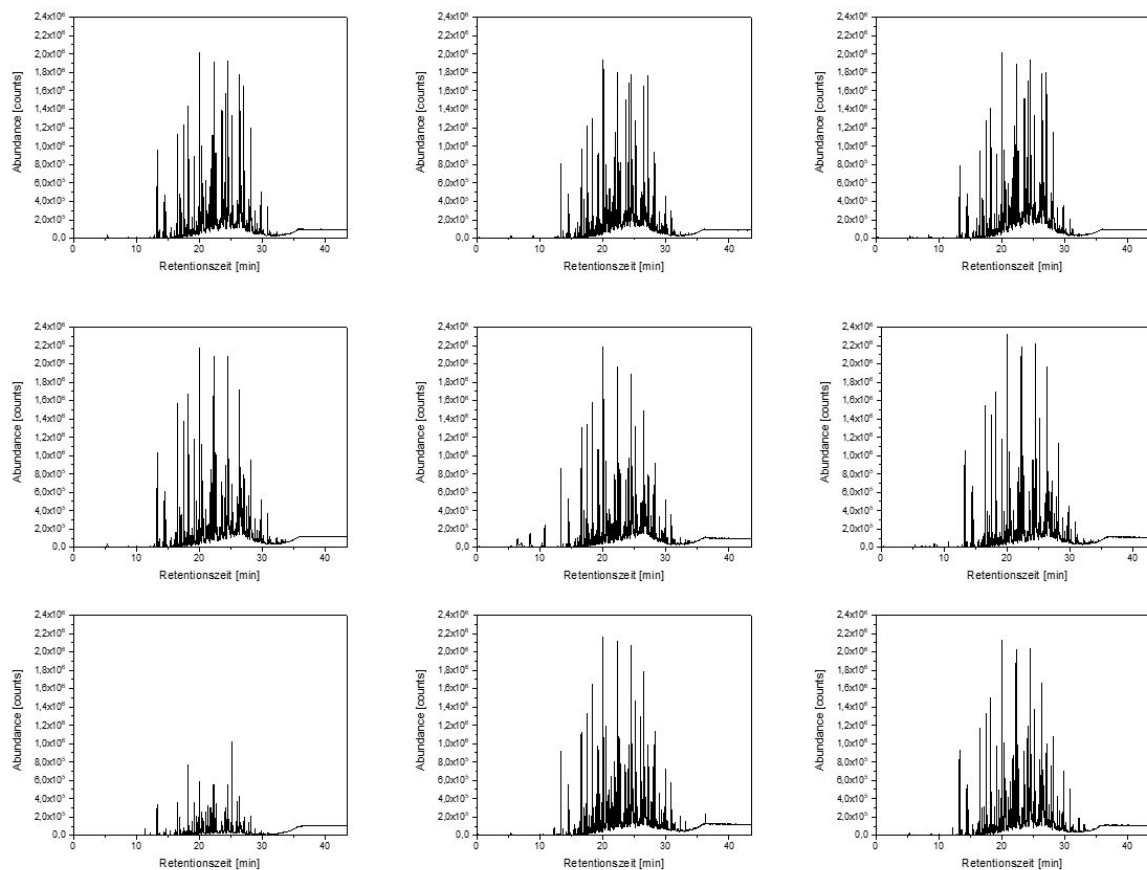


Abbildung 53: TICs der Analyse des extrazellulären volatilen Metaboloms von *P. aeruginosa* PAO1 mittels TD-GC-qMS. Die Kultivierung erfolgte im in vitro Modell auf LBN-Agar unter anaeroben Bedingungen bei 37 °C.

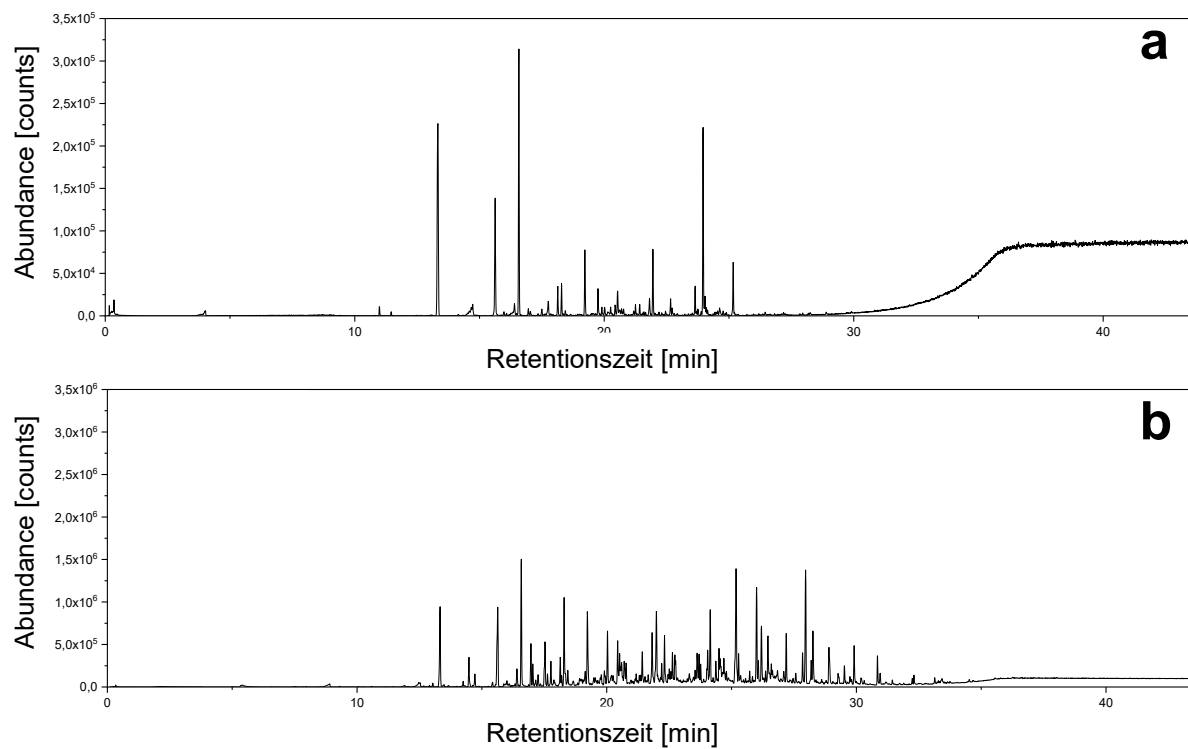


Abbildung 54: Verfahrensblank des in vitro CF-Biofilmmodells. Der Verfahrensblank wurde dem in vitro CF-Biofilmmodell entnommen, welches nur das Nährmedium LB- bzw. LBN enthält. Dargestellt ist der TIC des prozeduralen Blanks von a) der aeroben Kultur (LB-Agar) und b) der anaeroben Kultur (LBN-Agar).

Anhang

Tabelle 16: Ergebnisse der Featureanalyse des Experimentes zur Untersuchung des extrazellulären volatilen Metaboloms von *P. aeruginosa* ATCC 10145 bei unterschiedlichen Wachstumsatmosphären (aerob und anaerob) im in vitro Biofilmmmodell. Außerdem wurden die Metabolite mittels der MoNA Datenbank.

Align- ment ID	RT [min]	Metabolitname	Summen- formel	Score [%]	p-Wert	Level	MW ATCC 10145 aerob	SD ATCC 10145 aerob	RSD ATCC 10145 aerob	MW ATCC 10145 anaerob	SD ATCC 10145 anaerob	RSD ATCC 10145 anaerob
512	21,48 5	3-METHYL-1,5-PENTANEDIOL	C6H14O2	87,7	1,60E- 12	***	1,24E+0 5	7,64E+0 3	6,16	3,57E+0 3	2,45E+0 3	68,66
294	18,19	1-TETRADECENE	C14H28	95,3	9,94E- 10	***	1,00E+0 5	1,08E+0 4	10,79	2,34E+0 4	9,97E+0 3	42,57
511	21,47 9	1,10-DECANEDIOL	C10H22O2	82,3	1,24E- 08	***	1,63E+0 4	2,08E+0 3	12,82	9,11E+0 2	2,84E+0 2	31,12
496	21,29	5-AMINOQUINOLINE	C9H8N2	84,4	1,28E- 08	***	4,60E+0 5	4,40E+0 4	9,57	5,51E+0 3	3,10E+0 3	56,25
605	22,86 7	1,2-EPOXY-DECANE	C10H20O	89,3	3,91E- 08	***	5,42E+0 3	9,44E+0 2	17,41	1,30E+0 3	8,22E+0 2	63,03
151	15,09 5	GAMMA-VALEROLACTONE	C5H8O2	86,1	9,71E- 08	***	1,06E+0 3	1,64E+0 2	15,54	3,82E+0 2	9,48E+0 1	24,82
107	13,04 4	FURFURAL	C5H4O2	80	3,76E- 07	***	4,43E+0 3	5,98E+0 2	13,49	2,28E+0 3	4,60E+0 2	20,15
1030	28,61 2	METHYL PALMITATE	C17H34O2	80,4	8,17E- 07	***	2,55E+0 3	1,01E+0 3	39,59	1,50E+0 4	3,19E+0 3	21,23
217	16,76 4	PHENYL ISOCYANATE	C7H5NO	87,6	4,22E- 06	***	7,00E+0 3	1,77E+0 3	25,23	5,99E+0 2	1,37E+0 2	22,80
279	17,93 4	2-NONANONE	C9H18O	80,1	8,30E- 06	***	5,01E+0 3	1,18E+0 3	23,49	1,55E+0 5	4,49E+0 4	28,97
56	10,20 4	METHYL ISOTHIOCYANATE	C2H3NS	82	3,13E- 05	***	1,06E+0 3	3,57E+0 2	33,55	1,76E+0 2	2,18E+0 2	123,57
228	16,96 4	2-ETHYLHEXANOL	C8H18O	86,4	3,27E- 05	***	6,64E+0 3	1,08E+0 3	16,25	1,58E+0 4	3,58E+0 3	22,61
301	18,30 2	synephrine	C9H13NO2	81,3	5,02E- 05	***	4,55E+0 5	5,72E+0 4	12,57	5,96E+0 5	5,18E+0 4	8,68
104	12,90 3	OCTANE	C8H18	91,6	5,25E- 05	***	8,91E+0 1	3,56E+0 1	40,01	2,87E+0 3	1,07E+0 3	37,34

Anhang

144	14,72 1	4-(2 AMINOETHYL)-PHENOL	C8H11NO	84,3	5,45E- 05	***	2,56E+0 5	5,98E+0 4	23,39	1,19E+0 5	3,14E+0 4	26,36
106	12,98	2-METHYLPYRAZINE	C5H6N2	92,4	5,87E- 05	***	1,09E+0 4	2,62E+0 3	24,05	4,87E+0 3	1,12E+0 3	23,02
189	16,12 2	5-METHYL-3-HEPTANONE	C8H16O	80	7,11E- 05	***	3,55E+0 2	7,47E+0 1	21,04	1,25E+0 3	3,72E+0 2	29,76
478	21,02 1	(Z)-10-PENTADECENE-1-OL	C15H30O	90,3	8,10E- 05	***	1,47E+0 4	3,31E+0 3	22,45	6,11E+0 3	3,65E+0 3	59,64
541	21,94 6	3-AMINOQUINOLINE	C9H8N2	81,7	1,46E- 04	***	2,31E+0 4	4,62E+0 3	20,00	1,32E+0 4	1,32E+0 3	10,00
52	10,05 7	2-PENTANONE	C5H10O	83,9	3,03E- 04	***	5,62E+0 2	3,22E+0 2	57,35	3,63E+0 3	1,56E+0 3	42,92
256	17,50 4	ACETOPHENONE	C8H8O	94,3	6,06E- 04	***	3,67E+0 4	1,10E+0 4	29,83	5,90E+0 4	1,13E+0 4	19,07
116	13,65 1	CHLOROBENZENE	C6H5Cl	96,2	7,10E- 04	***	1,71E+0 2	8,66E+0 1	50,59	3,36E+0 4	1,89E+0 4	56,09
356	19,26 4	1-NONANOL	C9H20O	83,5	8,15E- 04	***	8,41E+0 3	2,63E+0 3	31,28	1,30E+0 4	2,05E+0 3	15,69
97	12,56 8	N,N-DIMETHYLACETAMIDE	C4H9NO	85,4	8,38E- 04	***	1,40E+0 3	2,34E+0 2	16,69	8,66E+0 2	3,05E+0 2	35,25
127	14,25 2	3-HEPTANONE	C7H14O	91,1	1,29E- 03	**	2,42E+0 2	7,87E+0 1	32,47	7,42E+0 3	4,45E+0 3	59,97
150	14,89	2,3-DIMETHYLPYRAZINE	C6H8N2	85,1	1,47E- 03	**	2,14E+0 3	7,08E+0 2	33,06	1,06E+0 3	3,36E+0 2	31,80
630	23,13 4	2-VINYLNAPHTHALENE	C12H10	81,4	1,61E- 03	**	3,86E+0 3	1,81E+0 3	46,99	1,07E+0 3	3,29E+0 2	30,85
509	21,46 7	PARA-DIISOPROPYLBENZENE	C12H18	89,2	1,63E- 03	**	9,32E+0 2	1,30E+0 2	13,95	4,50E+0 3	2,30E+0 3	51,15
421	20,20 1	BENZOTHIAZOLE	C7H5NS	84	1,85E- 03	**	2,45E+0 4	1,03E+0 4	42,03	4,14E+0 4	8,74E+0 3	21,12
203	16,40 8	4-DIMETHYLAMINOPYRIDINE	C7H10N2	93,3	2,15E- 03	**	4,87E+0 4	1,75E+0 4	36,03	2,33E+0 4	6,85E+0 3	29,44
145	14,81 3	2-ETHYLPYRAZINE	C6H8N2	87,9	2,19E- 03	**	1,46E+0 3	4,35E+0 2	29,77	8,14E+0 2	2,76E+0 2	33,84
72	11,07 9	PYRAZINE	C4H4N2	83,9	2,81E- 03	**	1,96E+0 3	6,19E+0 2	31,53	1,08E+0 3	3,73E+0 2	34,57
139	14,62 9	2-ACETYLFURAN	C6H6O2	89,9	3,13E- 03	**	1,53E+0 4	1,64E+0 3	10,75	1,08E+0 4	3,22E+0 3	29,67

Anhang

78	11,42	DIMETHYL DISULFIDE	C2H6S2	94,5	3,20E-03	**	8,81E+03	5,68E+03	64,46	1,07E+03	1,86E+03	174,66
387	19,738	1-HEXADECANOL	C16H34O	86,2	3,81E-03	**	3,23E+03	5,22E+02	16,17	1,63E+04	9,76E+03	59,82
93	12,403	CROTONIC ACID	C4H6O2	82,8	4,03E-03	**	1,78E+03	5,75E+02	32,26	1,01E+03	3,34E+02	33,09
79	11,424	PYRIDINE	C5H5N	84,8	4,15E-03	**	4,36E+03	2,72E+03	62,54	7,92E+02	7,47E+02	94,32
249	17,353	2-ISOPROPYL-3-METHYLPYRAZINE	C8H12N2	84,8	7,10E-03	**	1,42E+04	6,78E+03	47,68	6,05E+03	3,18E+03	52,60
193	16,259	2,3,5-TRIMETHYLPYRIDINE	C8H11N	91,7	8,79E-03	**	1,43E+03	6,21E+02	43,31	7,12E+02	2,89E+02	40,63
168	15,628	BENZALDEHYDE	C7H6O	87,7	8,93E-03	**	2,22E+03	3,70E+02	16,70	3,00E+03	6,61E+02	22,06
115	13,626	2-METHYLBUTYRIC ACID	C5H10O2	80,7	9,91E-03	**	4,44E+02	3,40E+02	76,43	1,96E+03	1,36E+03	69,16
123	14,146	HEXANOIC ACID	C6H12O2	81,9	1,25E-02	*	6,13E+02	3,30E+02	53,89	2,60E+02	7,88E+01	30,28
599	22,734	DOCOSANE	C22H46	84	1,71E-02	*	5,43E+04	2,05E+04	37,70	7,74E+04	1,59E+04	20,59
583	22,464	4-METHYLQUINOLINE	C10H9N	85,4	1,72E-02	*	6,36E+04	6,81E+03	10,71	5,42E+04	8,13E+03	15,01
914	27,063	ACRYLOYLAMINOMETHYL (3,5-DI-TERT-BUTYL-4-HYDROXY)BENZYL ETHER	C19H29NO3	84	2,40E-02	*	2,50E+02	7,11E+01	28,45	1,84E+04	1,95E+04	106,50
103	12,781	PROPYL PROPIONATE	C6H12O2	93,7	3,44E-02	*	1,03E+02	2,99E+01	29,05	1,64E+03	1,81E+03	110,40
102	12,78	DIBUTYL ETHER	C8H18O	87,5	4,01E-02	*	8,45E+02	4,16E+02	49,31	1,12E+04	1,27E+04	113,34
89	12,138	4-METHYL-2-PENTANONE	C6H12O	94,7	4,33E-02	*	2,84E+02	5,48E+01	19,30	2,98E+03	3,37E+03	113,16
132	14,357	ALLYLHYDRAZINE	C3H8N2	81,5	4,47E-02	*	3,81E+02	1,09E+02	28,73	1,10E+03	8,30E+02	75,61
49	9,017	ACETIC ACID	C2H4O2	95,2	4,49E-02	*	4,28E+03	5,30E+03	123,81	8,50E+01	1,67E+01	19,69

Tabelle 17: Ergebnisse der Featureanalyse des Experimentes zur Untersuchung des extrazellulären volatilen Metaboloms von *P. aeruginosa* FRD1 bei unterschiedlichen Wachstumsatmosphären (aerob und anaerob) im in vitro Biofilmmmodell. Außerdem wurden die Metabolite mittels der MoNA Datenbank.

Alignme nt ID	RT [min]	Metabolitname	Summenform el	Scor e [%]	p-Wert	Leve l	MW FRD1 aerob	SD FRD1 aerob	RSD FRD1 aerob	MW FRD1 anaero b	SD FRD1 anaero b	RSD FRD1 anaero b
631	20,28 7	2-TOLYL ISOCYANATE	C8H7NO	89,8	9,48E- 11	***	2,68E+0 5	1,87E+0 4	6,98	1,71E+0 3	7,08E+0 2	41,37
447	18,17 9	1-TETRADECENE	C14H28	94,2	1,91E- 10	***	2,90E+0 4	3,21E+0 3	11,08	2,89E+0 3	1,32E+0 3	45,81
750	21,47 7	1,2-EPOXY-DECANE	C10H20O	93,3	3,60E- 10	***	4,91E+0 4	5,35E+0 3	10,90	1,58E+0 3	1,56E+0 3	98,37
729	21,22 1	O- AMINOACETOPHENONE	C8H9NO	86,6	4,06E- 10	***	4,44E+0 5	3,91E+0 4	8,82	1,02E+0 4	5,35E+0 3	52,43
798	22,00 1	8-AMINOQUINOLINE	C9H8N2	82,9	8,94E- 10	***	4,91E+0 5	5,08E+0 4	10,34	3,69E+0 3	8,61E+0 3	233,55
347	16,77	PHENYL ISOCYANATE	C7H5NO	90,4	2,78E- 09	***	1,28E+0 4	1,38E+0 3	10,75	4,32E+0 2	1,48E+0 2	34,22
824	22,31 8	META- NITROACETOPHENONE	C8H7NO3	86,7	3,40E- 09	***	2,92E+0 5	3,18E+0 4	10,92	9,09E+0 2	3,00E+0 2	33,04
1221	27,00 1	1,10-Phenanthroline	C12H8N2	84,8	6,90E- 09	***	7,64E+0 3	1,11E+0 3	14,59	2,00E+0 3	8,54E+0 2	42,62
705	21,02 6	(Z)-10-PENTADECENE-1- OL	C15H30O	81,6	3,60E- 08	***	7,22E+0 3	1,11E+0 3	15,45	1,58E+0 3	4,30E+0 2	27,26
726	21,2	ORTHO- METHOXYACETOPHENO NE	C9H10O2	86,3	4,11E- 08	***	2,05E+0 5	2,31E+0 4	11,26	4,48E+0 3	1,84E+0 3	41,08
135	12,49 6	MESITYL OXIDE	C6H10O	81,4	3,55E- 06	***	3,09E+0 3	7,70E+0 2	24,88	3,03E+0 2	1,06E+0 2	34,88
370	17,14 2	3-CYANOPYRIDINE	C6H4N2	97,4	5,83E- 06	***	5,41E+0 3	1,51E+0 3	27,89	4,42E+0 2	3,11E+0 2	70,45
390	17,44 4	DL-ALPHA- PHENYLETHANOL	C8H10O	81,4	1,19E- 05	***	1,98E+0 3	5,92E+0 2	29,92	3,45E+0 2	2,37E+0 2	68,70
629	20,27 1	2- METHYLBENZOXAZOLE	C8H7NO	80,5	2,31E- 05	***	2,42E+0 3	7,84E+0 2	32,45	1,72E+0 2	9,00E+0 1	52,20

Anhang

797	21,99 8	PENTADECANE	C15H32	81,1	1,38E- 04	***	3,38E+ 3	1,51E+ 3	44,73	2,62E+ 5	9,78E+ 4	37,27
228	14,72 1	4-(2 AMINOETHYL)- PHENOL	C8H11NO	84,5	1,83E- 04	***	2,22E+ 5	7,41E+ 4	33,33	7,28E+ 4	2,92E+ 4	40,11
260	15,43 3	3- METHYLCYCLOHEXANO NE	C7H12O	93,1	1,87E- 04	***	1,11E+ 2	3,60E+ 1	32,60	3,21E+ 3	1,23E+ 3	38,28
736	21,30 8	2,4,6- TRIMETHYLANILINE	C9H13N	82	2,23E- 04	***	3,39E+ 5	1,38E+ 5	40,67	6,59E+ 2	2,42E+ 2	36,72
271	15,63 1	BENZALDEHYDE	C7H6O	86,8	6,05E- 04	***	1,83E+ 3	2,46E+ 2	13,49	1,65E+ 4	7,07E+ 3	42,75
103	11,42 1	DIMETHYL DISULFIDE	C2H6S2	95	9,82E- 04	***	2,19E+ 3	1,22E+ 3	55,85	1,34E+ 2	8,04E+ 1	59,99
154	12,90 3	OCTANE	C8H18	90,4	1,23E- 03	**	2,35E+ 2	4,54E+ 2	193,15	1,83E+ 3	9,15E+ 2	50,04
342	16,68 6	1,4-DICHLOROBENZENE	C6H4Cl2	82,8	1,54E- 03	**	2,03E+ 3	4,53E+ 2	22,34	1,12E+ 3	5,00E+ 2	44,71
43	7,944	ETHYL VINYL ETHER	C4H8O	88,1	1,59E- 03	**	7,43E+ 3	3,66E+ 3	49,30	1,83E+ 3	1,84E+ 3	100,32
127	12,27 5	2-HEXANONE	C6H12O	89,9	2,35E- 03	**	5,62E+ 2	1,18E+ 2	21,05	2,45E+ 3	1,15E+ 3	47,09
362	17,04 6	META TOLUALDEHYDE	C8H8O	81,6	2,66E- 03	**	1,39E+ 2	7,11E+ 1	51,06	8,16E+ 3	4,99E+ 3	61,20
267	15,59 9	2-ETHYLHEXANAL	C8H16O	92,7	3,08E- 03	**	1,29E+ 2	2,80E+ 1	21,74	1,04E+ 4	6,60E+ 3	63,20
156	12,98 5	2-METHYLPYRAZINE	C5H6N2	91,7	3,74E- 03	**	6,83E+ 3	2,84E+ 3	41,52	2,97E+ 3	1,51E+ 3	50,69
1030	24,63	DOCOSANE	C22H46	83,8	3,81E- 03	**	1,40E+ 4	1,13E+ 4	80,91	3,64E+ 4	1,46E+ 4	40,13
459	18,30 4	synephrine	C9H13NO2	81,7	3,97E- 03	**	5,41E+ 5	5,64E+ 4	10,43	2,78E+ 5	1,80E+ 5	64,76
26	5,424	ACETONE	C3H6O	89,2	6,12E- 03	**	3,03E+ 2	1,68E+ 2	55,40	1,90E+ 4	1,52E+ 4	79,99
395	17,50 8	ACETOPHENONE	C8H8O	94,6	7,64E- 03	**	1,20E+ 5	1,13E+ 4	9,41	7,55E+ 4	3,42E+ 4	45,24
914	23,31 4	4-vinylphenol	C8H8O	81,1	7,78E- 03	**	4,95E+ 2	4,40E+ 1	8,89	1,66E+ 4	1,24E+ 4	74,41

Anhang

175	13,65 9	CHLOROBENZENE	C6H5Cl	95	7,90E- 03	**	1,17E+0 2	4,32E+0 1	36,83	4,70E+0 4	3,61E+0 4	76,74
97	11,08 3	PYRAZINE	C4H4N2	81,7	8,38E- 03	**	1,57E+0 3	6,82E+0 2	43,47	7,76E+0 2	2,59E+0 2	33,33
145	12,78 3	DIBUTYL ETHER	C8H18O	82,6	1,09E- 02	*	8,63E+0 2	5,67E+0 2	65,73	6,49E+0 3	4,64E+0 3	71,45
235	14,86 8	NONANE	C9H20	81,9	1,15E- 02	*	3,33E+0 2	9,44E+0 1	28,34	6,33E+0 3	5,00E+0 3	78,93
74	10,04 9	2-PENTANONE	C5H10O	86,1	1,41E- 02	*	8,47E+0 3	4,45E+0 3	52,57	3,78E+0 3	1,55E+0 3	41,02
749	21,47	PARA- DIISOPROPYLBENZENE	C12H18	88,7	1,71E- 02	*	7,93E+0 2	3,27E+0 2	41,28	5,88E+0 4	5,28E+0 4	89,78
924	23,45	BETA-IONONE	C13H20O	80,7	1,81E- 02	*	1,92E+0 2	7,02E+0 1	36,66	1,65E+0 4	1,50E+0 4	91,09
707	21,04 2	ANETHOLE	C10H12O	80,5	2,21E- 02	*	1,63E+0 3	2,22E+0 3	136,17	5,06E+0 3	3,07E+0 3	60,63
323	16,42 2	4- DIMETHYLAMINOPYRIDI NE	C7H10N2	94,2	2,34E- 02	*	5,58E+0 4	1,95E+0 4	34,95	3,75E+0 4	4,17E+0 3	11,10
539	19,26 6	NONANOL	C9H20O	82,7	2,36E- 02	*	8,12E+0 3	2,30E+0 3	28,34	2,28E+0 4	1,44E+0 4	63,17
158	13,04 6	FURFURAL	C5H4O2	86,7	2,68E- 02	*	4,98E+0 3	1,73E+0 3	34,82	3,37E+0 3	7,01E+0 2	20,81
579	19,76 5	DODECYL FORMATE	C13H26O2	81,7	3,36E- 02	*	6,29E+0 3	9,45E+0 2	15,02	1,93E+0 4	1,40E+0 4	72,29
210	14,31 1	2-HEPTANONE	C7H14O	86,7	3,45E- 02	*	2,67E+0 3	5,30E+0 2	19,86	4,87E+0 3	2,37E+0 3	48,59
65	9,329	ISOVALERALDEHYDE	C5H10O	87	3,54E- 02	*	1,06E+0 2	3,80E+0 1	35,73	4,86E+0 2	3,71E+0 2	76,45
624	20,20 6	BENZOTHAZOLE	C7H5NS	86,6	4,48E- 02	*	2,16E+0 4	8,90E+0 3	41,12	4,02E+0 4	2,10E+0 4	52,23

Anhang

Tabelle 18: Ergebnisse der Featureanalyse des Experimentes zur Untersuchung des extrazellulären volatilen Metaboloms von PAO1 bei unterschiedlichen Wachstumsatmosphären (aerob und anaerob) im in vitro Biofilmmmodell. Außerdem wurden die Metabolite mittels der MoNA Datenbank.

Alignme nt ID	RT [min]	Metabolitname	Summenform el	Scor e [%]	p-Wert	Lev el	MW PAO1 aerob	SD PAO1 aerob	RSD PAO1 aerob	MW PAO1 anaerob	SD PAO1 anaerob	RSD PAO1 anaero b
299	18,19 3	1-TETRADECENE	C14H28	94,4	8,57E- 11	***	143827,8 67	12700,77 29	8,83	4165,576 58	3627,218 13	87,08
558	21,97	3-AMINOQUINOLINE	C9H8N2	80,8	1,40E- 10	***	508232,2 78	51564,78 2	10,15	53169,03 17	20330,93 6	38,24
319	18,58	2-METHYLBENZOXAZOLE	C8H7NO	84,4	1,60E- 10	***	5379,756 67	416,2082 73	7,74	100,8677 23	50,53364 33	50,10
498	21,23 9	O-AMINOACETOPHENONE	C8H9NO	91	3,34E- 09	***	438748,7 89	47904,30 75	10,92	436,375	278,3373 56	63,78
99	12,56 9	N,N-DIMETHYLACETAMIDE	C4H9NO	80,8	2,80E- 07	***	1579,063 46	276,9062 7	17,54	564,1111	194,5595 87	34,49
589	22,35 5	META-NITROACETOPHENONE	C8H7NO3	87,6	3,29E- 07	***	61685,00 56	11522,01 99	18,68	4838,280 33	1483,493 36	30,66
267	17,56 6	N-NONYL CYANIDE	C10H19N	85,8	4,79E- 07	***	5676,687 89	1118,681 19	19,71	481,0105 78	172,2186 09	35,80
284	17,85 1	3-NONANONE	C9H18O	87,2	7,50E- 07	***	8621,089 22	1709,240 69	19,83	1963,000 11	573,1198 09	29,20
899	27,00 1	1,10-Phenanthroline	C12H8N2	87,9	1,03E- 06	***	39455,59 67	8632,180 18	21,88	2106,021 17	833,4964 57	39,58
279	17,73 3	TRICOSANE	C23H48	84,1	1,14E- 06	***	395,0529 11	150,8981 32	38,20	7825,719 78	1734,339 45	22,16
151	14,72 4	4-(2 AMINOETHYL)-PHENOL	C8H11NO	84,6	1,23E- 06	***	277088,1 11	38929,03 24	14,05	140014,4 21	38410,89 96	27,43
150	14,67 6	2,5-HEXADIONE	C6H10O2	80,4	3,60E- 06	***	71,49404 63	48,99636 64	68,53	1968,892 63	421,8154 88	21,42
384	19,76 1	DODECYL FORMATE	C13H26O2	92,7	4,55E- 06	***	21437,25 89	4703,040 58	21,94	5642,497 33	1125,484 18	19,95
563	22,02 7	DOCOSANE	C22H46	84,1	8,26E- 06	***	2439,682 56	1296,051 91	53,12	33445,03 78	9503,014 67	28,41
334	18,91 1	2-ETHYLHEXYL ACETATE	C10H20O2	95,7	1,21E- 05	***	644,9682 89	455,1969 88	70,58	11224,02 66	3405,994 64	30,35

Anhang

122	13,65 4	CHLOROBENZENE	C6H5Cl	95,4	3,03E- 05	***	160,6719 67	121,7775 62	75,79	25738,27	9119,407 53	35,43
515	21,48 1	1,2-EPOXY-DECANE	C10H20O	93,3	4,09E- 05	***	44604,93 67	2736,674 84	6,14	21970,96 89	9066,040 07	41,26
395	19,91 1	HEXADECANE	C16H34	85,1	4,22E- 05	***	16233,92 08	12034,50 69	74,13	46872,35 33	11251,06 94	24,00
294	18,07 7	1-HEPTADECENE	C17H34	82,5	9,36E- 05	***	3275,968 22	517,8719 4	15,81	7654,989 56	1926,560 17	25,17
253	17,23 3	3-METHYL-2-CYCLOHEXEN-1-ONE	C7H10O	85,4	1,09E- 04	***	666,0612 87	561,1759 86	84,25	43153,35 44	18132,30 46	42,02
73	11,10 8	DIMETHYL DISULFIDE	C2H6S2	88,8	1,19E- 04	***	2404,047 52	973,6034 47	40,50	176,6507 86	113,6277 78	64,32
604	22,60 1	1-HEPTADECENE	C17H34	82,4	1,24E- 04	***	1162,481 34	259,6069 24	22,33	3969,317 44	1258,923 55	31,72
78	11,42 2	DIMETHYL DISULFIDE	C2H6S2	95,7	1,88E- 04	***	27470,23 22	11941,65 86	43,47	1789,460 33	1195,680 3	66,82
107	12,90 7	OCTANE	C8H18	90,7	4,22E- 04	***	82,71956 89	39,91806 09	48,26	4365,730 18	2229,265 65	51,06
103	12,67 7	OCTANOL	C8H18O	86,3	4,34E- 04	***	77,70068 57	59,00049 76	75,93	1433,846 48	712,5657 51	49,70
748	24,62 8	DOCOSANE	C22H46	80,5	5,27E- 04	***	8096,841 33	3424,003 57	42,29	20782,31 26	7216,218 87	34,72
62	10,19 9	METHYL ISOTHIOCYANATE	C2H3NS	84,7	5,64E- 04	***	1736,941 81	838,7975 96	48,29	205,6802 49	83,17573 02	40,44
611	22,73 7	PENTACOSANE	C25H52	82,6	7,83E- 04	***	17541,77 22	5998,977 14	34,20	33775,25 44	9567,964 28	28,33
638	23,14 1	2-VINYLNAPHTHALENE	C12H10	80,3	8,14E- 04	***	7254,984 44	3513,117 81	48,42	1213,783 2	505,6087 63	41,66
135	14,25 4	3-HEPTANONE	C7H14O	84,1	8,83E- 04	***	639,3227 89	184,9497 7	28,93	12125,93 68	6704,053 77	55,29
134	14,25 2	GAMMA-BUTYROLACTONE	C4H6O2	88,4	8,96E- 04	***	2961,724 89	1113,334 29	37,59	1126,211 61	397,2198 36	35,27
259	17,35 4	2-ISOPROPYL-3-METHYLPYRAZINE	C8H12N2	84,7	9,93E- 04	***	14277,95 1	5240,753 78	36,71	5669,550 22	1363,058 79	24,04
559	21,99 7	2,2,4,6,6-PENTAMETHYLHEPTANE	C12H26	85,4	1,01E- 03	**	5211,497 56	1089,227 85	20,90	213080,3 14	123885,3 4	58,14
263	17,44 6	DL-ALPHA-PHENYLETHANOL	C8H10O	87	1,13E- 03	**	2119,428 33	386,9892 12	18,26	1288,746	488,2677 39	37,89

Anhang

177	15,62 9	BENZALDEHYDE	C7H6O	82,8	2,05E- 03	**	1894,222 22	549,8371 02	29,03	3237,878 33	900,0387 12	27,80
370	19,51 1	HEXANOIC ACID BUTYL ESTER	C10H20O2	93,7	2,13E- 03	**	2786,629 78	2086,609 04	74,88	14598,93 48	8084,880 34	55,38
110	13,04 7	FURFURAL	C5H4O2	88,1	2,77E- 03	**	3701,677 33	601,4539 32	16,25	2449,211 63	851,9616 88	34,79
1005	28,90 2	DIISOBUTYL PHTHALATE	C16H22O4	84,1	3,24E- 03	**	71027,70 11	32297,26 49	45,47	141406,5 86	49772,77 15	35,20
264	17,50 5	ACETOPHENONE	C8H8O	94,6	3,71E- 03	**	102413,4 13	21549,59 58	21,04	69490,14 89	19491,81 84	28,05
420	20,20 2	BENZOTHAZOLE	C7H5NS	84,8	3,77E- 03	**	21248,16 89	7414,647 32	34,90	45841,86 22	18504,13 86	40,37
514	21,46 5	1,4-DIACETYL BENZENE	C10H10O2	82,5	4,09E- 03	**	790,2275 22	74,55590 06	9,43	4531,804 11	2824,803 29	62,33
109	12,98	2-METHYLPYRAZINE	C5H6N2	93,1	7,73E- 03	**	7543,762 11	1711,915 66	22,69	4926,216 86	1922,710 57	39,03
27	6,548	2,3-DIMETHYL-2,3- BUTANEDIOL	C6H14O2	85,1	7,95E- 03	**	54,63095 38	29,16019 82	53,38	2219,541 79	1667,975 32	75,15
104	12,79	ETHYLENE GLYCOL MONO-TERT-BUTYL ETHER	C6H14O2	82,1	1,19E- 02	*	677,5536 25	418,0044 33	61,69	2207,275 36	1413,720 15	64,05
91	12,27 6	4-METHYL-2- PENTANONE	C6H12O	94,4	2,83E- 02	*	163,3862 4	42,83926 33	26,22	7406,953 11	8133,184 8	109,80
252	17,22 9	1-METHYL-4- ISOPROPENYLCYCLOHE XENE	C10H16	86,5	3,29E- 02	*	505,1745 89	610,5242 72	120,85	1093,386 29	431,6502 47	39,48
595	22,47 3	4-METHYLQUINOLINE	C10H9N	84,1	3,33E- 02	*	74470,93 11	8636,395 85	11,60	56765,89 26	20030,14 17	35,29
88	12,04 7	TOLUENE	C7H8	81,1	3,63E- 02	*	546,7512 89	298,6297 63	54,62	1083,153 43	611,2752 19	56,43
1222	33,51 4	1,3-DIMETHYL-5- PYLAZOLYL-2,4- DICHLORO BENZOATE	C12H10Cl2N2 O2	82,8	4,43E- 02	*	840,1957 11	848,3762 81	100,97	165,9047 38	44,18796 62	26,63
52	8,968	ACETIC ACID	C2H4O2	93,7	4,65E- 02	*	6466,265 11	3791,031 18	58,63	2417,714 27	3412,720 76	141,15

Ergänzung zum Kapitel 5.3.2:

Tabelle 19: Ergebnisse der Featureanalyse des Experimentes zur Untersuchung des extrazellulären volatilen Metaboloms von *P. aeruginosa* Stämmen mit mukoidem und nicht-mukoidem Phänotyp. Die Kultivierung der Stämme *P. aeruginosa* PAO1 (nicht-mukoid) und FRD1 (mukoid) erfolgten im in vitro Biofilmmmodell. Für die Kultivierung wurde eine Temperatur von 37 °C sowie anaerobe Bedingungen und LBN als Nährmedium gewählt. Außerdem wurden die Metabolite mittels der MoNA Datenbank.

Alignmen t ID	RT [min]	Metabolitname	Scor e [%]	p-Wert	Leve l	MW FRD1	SD FRD1	RSD FRD1	MW PAO1	SD PAO1	RSD PAO1
631	22,50 3	Gentistic acid	82,3	1,44E-09	***	2,15E+04	1,49E+04	69,38	1,39E+05	1,78E+04	12,83
181	14,72 2	4-(2 AMINOETHYL)-PHENOL	84,1	6,17E-05	***	7,28E+04	2,92E+04	40,11	1,52E+05	9,33E+03	6,12
283	16,96 4	BENZYL ALCOHOL	92	5,33E-04	***	8,44E+03	3,52E+03	41,70	1,38E+03	1,17E+03	84,41
219	15,63 1	BENZALDEHYDE	86,4	1,30E-03	**	1,65E+04	7,05E+03	42,60	3,75E+03	7,52E+02	20,09
126	12,98 8	2-METHYLPYRAZINE	88,6	1,61E-03	**	2,97E+03	1,51E+03	50,69	5,51E+03	8,60E+02	15,60
256	16,42 3	4-DIMETHYLAMINOPYRIDINE	82,2	1,90E-03	**	3,29E+04	1,37E+04	41,83	5,56E+04	4,22E+03	7,60
143	13,66 8	FURFURYL ALCOHOL	80,8	2,63E-03	**	1,47E+03	8,40E+02	57,17	1,19E+02	3,58E+01	30,24
629	22,46 8	4-METHYLQUINOLINE	84,7	2,75E-03	**	3,87E+04	1,58E+04	40,75	6,31E+04	7,00E+03	11,10
538	21,07 3	2-UNDECANONE	89,9	2,78E-03	**	5,49E+03	2,84E+03	51,81	1,00E+04	1,93E+03	19,24
177	14,63	2-ACETYLFURAN	84,9	3,08E-03	**	9,42E+03	3,96E+03	42,09	1,54E+04	1,85E+03	11,97
359	18,30 1	synephrine	80,4	3,10E-03	**	2,78E+05	1,80E+05	64,76	5,52E+05	5,68E+04	10,29
88	11,41 7	DIMETHYL DISULFIDE	97,1	4,36E-03	**	1,20E+02	8,38E+01	69,62	1,91E+03	1,22E+03	64,15
372	18,53	PENTADECANE	80,5	4,72E-03	**	8,23E+03	3,66E+03	44,43	1,36E+04	2,51E+03	18,45
391	18,91 2	2-ETHYLHEXYL ACETATE	80,3	6,27E-03	**	1,28E+04	5,54E+03	43,43	2,24E+04	6,42E+03	28,63
270	16,67 8	DECANE	82,5	1,42E-02	*	2,04E+04	1,43E+04	70,32	3,95E+03	5,01E+02	12,68

Anhang

81	11,00 8	FORMIC ACID BUTYL ESTER	87,2	2,02E-02	*	7,91E+02	7,07E+02	89,37	4,32E+01	3,38E+01	78,26
33	7,411	PROPYL ALCOHOL	97,7	2,16E-02	*	9,00E+02	8,65E+02	96,11	0,00E+00	0,00E+00	
247	16,26 4	1,2,3-TRIMETHYLBENZENE	82,5	2,23E-02	*	8,30E+02	1,36E+03	163,74	2,34E+03	9,01E+02	38,56
83	11,09	PYRAZINE	82,2	2,47E-02	*	7,84E+02	2,58E+02	32,97	1,23E+03	4,17E+02	33,86
57	9,329	ISOVALERALDEHYDE	87	2,79E-02	*	4,25E+02	3,84E+02	90,43	4,92E+01	2,89E+01	58,81
212	15,43 4	3-METHYLCYCLOHEXANONE	92,6	3,54E-02	*	1,44E+04	5,89E+03	40,97	8,68E+03	3,17E+03	36,52
243	16,18 4	METHYL HEXYL KETONE	85	3,68E-02	*	2,24E+03	1,11E+03	49,42	1,23E+03	2,87E+02	23,35
317	17,63 6	OCTANOL	80,8	3,69E-02	*	9,41E+03	8,13E+03	86,36	2,02E+03	3,76E+02	18,58
361	18,35 5	UNDECANE	84,8	3,81E-02	*	3,55E+04	2,92E+04	82,46	9,10E+03	1,01E+03	11,12
119	12,78 2	PROPYL PROPIONATE	87,1	4,35E-02	*	6,49E+03	4,64E+03	71,45	2,41E+03	1,34E+03	55,58
224	15,78 8	PROPYL BENZENE	85,4	4,42E-02	*	2,23E+03	1,94E+03	86,89	5,51E+02	1,67E+02	30,31
107	12,32 8	BUTYRIC ACID	90,3	4,72E-02	*	3,18E+03	2,40E+03	75,49	1,08E+03	9,90E+02	91,59
987	28,61 5	METHYL PALMITATE	84,2	4,99E-02	*	2,09E+03	7,61E+02	36,39	1,41E+03	4,46E+02	31,75

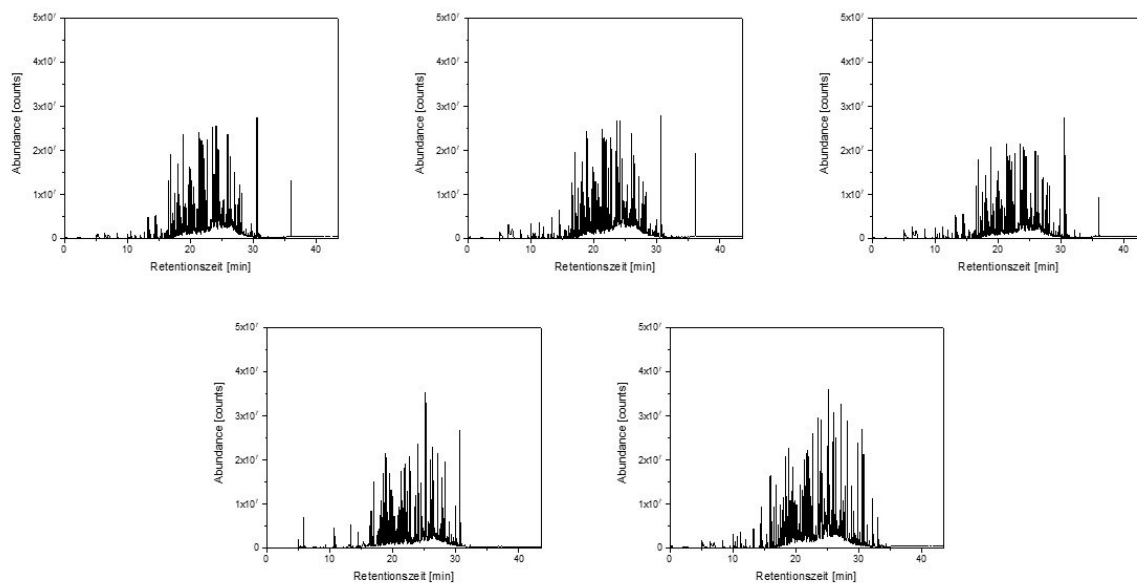
Ergänzung zum Kapitel 5.3.3:

Abbildung 55: TICs der Analyse des extrazellulären volatilen Metaboloms von *P. aeruginosa* FRD1 mittels TD-GC-qMS. Die Kultivierung erfolgte im in vitro Modell auf PIAN-Agar unter anaeroben Bedingungen bei 37 °C.

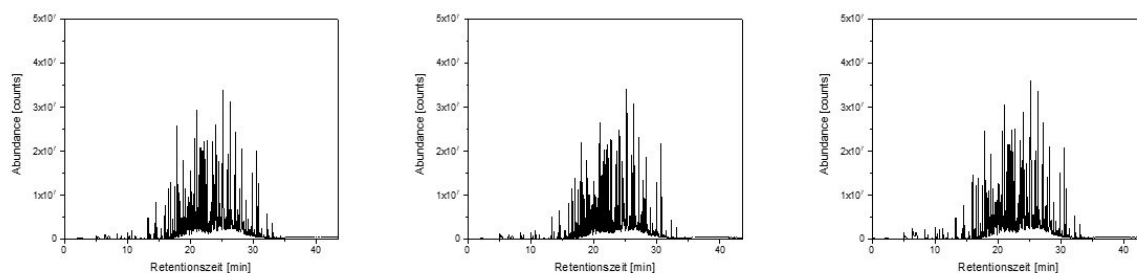


Abbildung 56: TICs der Analyse des extrazellulären volatilen Metaboloms von *P. aeruginosa* PAO1 mittels TD-GC-qMS. Die Kultivierung erfolgte im in vitro Modell auf PIAN-Agar unter anaeroben Bedingungen bei 37 °C.

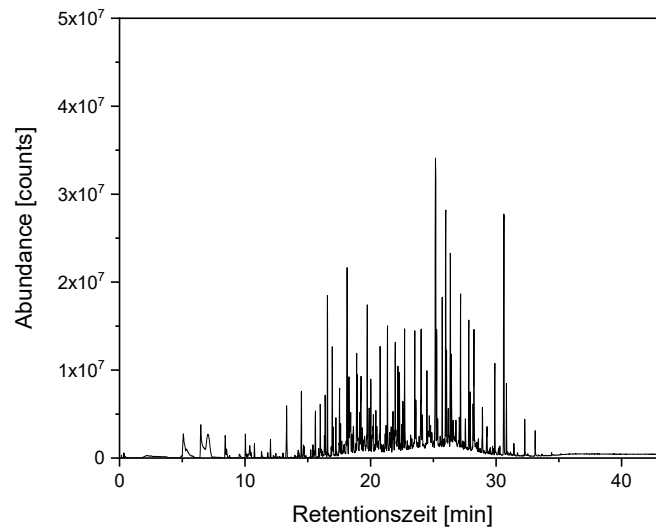


Abbildung 57: Verfahrensblank des *in vitro* CF-Biofilmmodells bei einer Kultivierung auf PIAN-Agar unter anaeroben Bedingungen. Der Verfahrensblank wurde dem *in vitro* Biofilmmodell entnommen, welches nur das Nährmedium PIAN enthält.

Tabelle 20: Ergebnisse der Featureanalyse des Experimentes zur Untersuchung des extrazellulären volatilen Metaboloms von *P. aeruginosa* FRD1 bei einer anaeroben Kultivierung im in vitro Biofilmmodell auf LBN- und PIAN-Agar. Außerdem wurden die Metabolite mittels der MoNA Datenbank.

Alignme nt ID	RT [min]	Metabolitname	Summenform el	Scor e [%]	p-Wert	Leve l	MW PIAN	SD PIAN	RSD PIAN	MW LBN	SD LBN	RSD LBN
550	18,89 9	ISOPENTYL ACETATE	C7H14O2	82,8	3,22E- 06	***	4,35E+0 6	2,64E+0 5	6,06	7,77E+0 3	6,05E+0 3	77,81
551	18,90 8	2-ETHYLHEXYL ACETATE	C10H20O2	83,3	5,04E- 06	***	4,53E+0 5	3,06E+0 4	6,76	1,58E+0 3	6,04E+0 2	38,27
480	17,92 9	2-NONANONE	C9H18O	81,2	1,07E- 05	***	4,53E+0 5	3,69E+0 4	8,15	2,82E+0 3	1,26E+0 3	44,65
860	22,72 9	TETRADECANE	C14H30	86	1,27E- 05	***	3,91E+0 6	3,35E+0 5	8,56	7,80E+0 4	3,16E+0 4	40,54
1347	28,89 5	DIBUTYL PHTHALATE	C16H22O4	85,5	1,95E- 05	***	7,74E+0 5	9,10E+0 4	11,76	1,18E+0 5	4,24E+0 4	36,03
798	21,98 9	PENTADECANE	C15H32	81,1	2,30E- 05	***	9,99E+0 5	9,82E+0 4	9,83	4,54E+0 4	1,28E+0 4	28,10
461	17,62 7	1-OCTANOL	C8H18O	87,6	3,32E- 05	***	7,44E+0 4	1,23E+0 4	16,47	9,37E+0 3	8,20E+0 3	87,44
698	20,63 7	2,6- DICHLOROBENZALDEHY DE	C7H4Cl2O	87,7	5,15E- 05	***	1,28E+0 5	2,04E+0 4	15,89	1,69E+0 4	1,12E+0 4	66,37
756	21,36 2	TRIDECANE	C13H28	88,3	7,14E- 05	***	4,25E+0 6	5,57E+0 5	13,10	5,51E+0 4	2,86E+0 4	51,82
788	21,79 8	DOCOSANE	C22H46	81,1	7,15E- 05	***	2,18E+0 6	2,86E+0 5	13,10	2,53E+0 4	1,13E+0 4	44,42
460	17,61 2	HEPTANOIC ACID	C7H14O2	80,7	1,03E- 04	***	5,03E+0 3	8,28E+0 2	16,45	3,17E+0 2	2,95E+0 2	93,14
415	16,96 7	2-ETHYLHEXANOL	C8H18O	90,1	1,05E- 04	***	4,89E+0 6	7,08E+0 5	14,48	1,17E+0 5	7,10E+0 4	60,44
1159	26,36 9	HEPTADECANE	C17H36	80	1,10E- 04	***	3,57E+0 6	5,22E+0 5	14,63	2,49E+0 4	9,03E+0 3	36,23
1147	26,20 1	2-PENTADECANONE	C15H30O	82,8	1,23E- 04	***	4,75E+0 5	7,14E+0 4	15,03	6,57E+0 3	3,68E+0 3	56,03
456	17,56	PELARGONALDEHYDE	C9H18O	84,5	1,76E- 04	***	1,01E+0 5	1,70E+0 4	16,78	1,21E+0 3	1,97E+0 3	162,53
1109	25,74 9	HEPTADECANE	C17H36	81,4	2,00E- 04	***	5,13E+0 3	1,01E+0 3	19,66	7,89E+0 2	5,29E+0 2	66,98

Anhang

968	24,09 5	DOCOSANE	C22H46	84,8	2,68E- 04	***	4,83E+0 5	8,65E+0 4	17,91	3,87E+0 4	1,64E+0 4	42,33
495	18,13 9	PELARGONALDEHYDE	C9H18O	91,5	4,21E- 04	***	1,39E+0 6	2,84E+0 5	20,48	1,93E+0 4	7,32E+0 3	37,96
1132	25,99 8	1-HEXADECANOL	C16H34O	88,4	5,05E- 04	***	1,95E+0 6	4,21E+0 5	21,59	3,83E+0 4	4,05E+0 4	105,76
263	14,30 5	2-HEPTANONE	C7H14O	86,7	5,44E- 04	***	2,16E+0 5	4,69E+0 4	21,75	4,87E+0 3	2,36E+0 3	48,55
642	19,90 6	HEXADECANE	C16H34	82,3	8,79E- 04	***	1,99E+0 6	4,91E+0 5	24,71	3,43E+0 4	1,72E+0 4	50,14
577	19,16 2	CARANE	C10H18	82,1	1,13E- 03	**	8,70E+0 5	2,32E+0 5	26,68	3,52E+0 3	1,63E+0 3	46,34
363	16,17 7	METHYL HEXYL KETONE	C8H16O	92,4	1,22E- 03	**	2,96E+0 5	7,92E+0 4	26,72	7,89E+0 3	4,90E+0 3	62,11
1097	25,56 6	BENZOPHENONE	C13H10O	84,5	1,27E- 03	**	3,79E+0 5	1,01E+0 5	26,79	1,75E+0 4	1,24E+0 4	71,01
509	18,29 6	synephrine	C9H13NO2	81,1	1,30E- 03	**	2,35E+0 6	6,23E+0 5	26,54	2,78E+0 5	1,80E+0 5	64,76
664	20,19 7	BENZOTHIAZOLE	C7H5NS	80,2	1,32E- 03	**	2,66E+0 5	6,87E+0 4	25,83	4,02E+0 4	2,10E+0 4	52,23
932	23,64 5	2,6-DI-TERT-BUTYL-1,4-BENZOQUINONE	C14H20O2	86,2	1,61E- 03	**	2,32E+0 5	6,56E+0 4	28,24	1,19E+0 4	7,21E+0 3	60,42
1106	25,71 2	(Z)-9-HEXADECENAL	C16H30O	83,8	2,17E- 03	**	1,40E+0 5	4,41E+0 4	31,58	1,28E+0 3	5,62E+0 2	43,74
733	21,05 2	2-UNDECANONE	C11H22O	80,6	2,19E- 03	**	5,75E+0 5	1,80E+0 5	31,23	1,39E+0 4	9,37E+0 3	67,27
1234	27,35	HEXACOSANE	C26H54	86,4	2,27E- 03	**	4,20E+0 4	1,34E+0 4	32,02	4,18E+0 3	4,85E+0 3	116,19
271	14,51 8	HEPTANAL	C7H14O	80,6	2,31E- 03	**	4,18E+0 3	1,24E+0 3	29,72	4,22E+0 2	1,88E+0 2	44,53
536	18,66 4	1-NONANOL	C9H20O	80,9	2,45E- 03	**	2,25E+0 5	7,18E+0 4	31,91	1,21E+0 4	1,21E+0 4	100,48
38	5,446	TRIMETHYLAMINE	C3H9N	80,6	2,61E- 03	**	3,16E+0 3	1,00E+0 3	31,63	7,31E+0 2	6,80E+0 2	93,08
830	22,32 2	3,4-dihydroxymandelic acid	C8H8O5	80,4	3,17E- 03	**	7,05E+0 5	2,31E+0 5	32,73	6,31E+0 4	3,58E+0 4	56,63
717	20,84 1	UNDECANE	C11H24	83,4	3,45E- 03	**	1,43E+0 5	5,02E+0 4	35,22	3,78E+0 3	2,66E+0 3	70,35

Anhang

1051	25,00 7	TRIACONTANE	C30H62	82,4	3,56E- 03	**	1,86E+0 5	6,58E+0 4	35,40	5,44E+0 3	3,13E+0 3	57,59
582	19,18 3	DODECANAL	C12H24O	90,1	4,12E- 03	**	5,14E+0 4	1,93E+0 4	37,60	3,88E+0 2	8,56E+0 1	22,08
928	23,57 3	PENTACOSANE	C25H52	82,4	4,13E- 03	**	1,24E+0 6	4,64E+0 5	37,51	1,31E+0 4	4,71E+0 3	35,93
327	15,62 3	BENZALDEHYDE	C7H6O	95,8	4,43E- 03	**	5,38E+0 4	1,60E+0 4	29,73	1,65E+0 4	7,05E+0 3	42,60
548	18,84 4	10-METHYL-1- DODECANOL	C13H28O	84,7	4,45E- 03	**	5,89E+0 4	2,13E+0 4	36,25	9,37E+0 3	9,60E+0 3	102,55
589	19,28 2	GAMMA-TERPINENE	C10H16	81,4	4,70E- 03	**	6,83E+0 4	2,66E+0 4	38,95	5,63E+0 2	1,26E+0 2	22,40
1454	30,49	PYRENE	C16H10	85,4	4,92E- 03	**	1,54E+0 4	5,81E+0 3	37,69	8,58E+0 2	4,24E+0 2	49,47
204	12,9	OCTANE	C8H18	90,4	5,14E- 03	**	1,27E+0 4	4,02E+0 3	31,59	4,09E+0 3	2,46E+0 3	60,20
587	19,25 4	1-NONANOL	C9H20O	88,5	5,33E- 03	**	3,64E+0 5	1,41E+0 5	38,68	1,98E+0 4	1,29E+0 4	65,24
953	23,87 3	ISOPULEGYL ACETATE(EQUATORIAL)	C12H20O2	85	5,82E- 03	**	3,28E+0 5	1,34E+0 5	40,99	5,37E+0 3	2,06E+0 3	38,30
974	24,15 7	2,6-BIS(TERT-BUTYL)-4- METHYLPHENOL	C15H24O	93,3	5,85E- 03	**	5,17E+0 6	2,08E+0 6	40,17	2,29E+0 5	2,20E+0 5	96,14
1388	29,44 8	PENTACOSANE	C25H52	91,1	6,89E- 03	**	5,36E+0 4	2,25E+0 4	42,07	2,16E+0 3	1,69E+0 3	78,21
776	21,66 1	1-HEPTADECENE	C17H34	80,9	7,27E- 03	**	1,13E+0 6	4,98E+0 5	43,91	1,12E+0 4	4,19E+0 3	37,51
718	20,85 2	TRIDECANAL	C13H26O	89	7,63E- 03	**	4,80E+0 4	2,10E+0 4	43,83	1,23E+0 3	5,84E+0 2	47,51
567	19,06 3	3-BUTYLPYRIDINE	C9H13N	81,9	8,08E- 03	**	1,01E+0 5	4,43E+0 4	43,76	5,03E+0 3	5,18E+0 3	103,11
196	12,67	OCTANOL	C8H18O	89,8	9,37E- 03	**	1,05E+0 4	4,35E+0 3	41,34	1,71E+0 3	1,17E+0 3	68,14
325	15,58 6	2-ETHYLHEXANAL	C8H16O	92,7	9,53E- 03	**	6,41E+0 4	2,65E+0 4	41,34	1,04E+0 4	6,60E+0 3	63,20
432	17,19 2	DODECANE	C12H26	82,7	9,87E- 03	**	3,49E+0 4	1,46E+0 4	41,73	5,50E+0 3	3,14E+0 3	57,22
420	17,04	META TOLUALDEHYDE	C8H8O	81,6	9,90E- 03	**	4,84E+0 4	2,01E+0 4	41,50	8,15E+0 3	4,99E+0 3	61,20

Anhang

47	6,001	ISOPROPYL ALCOHOL	C3H8O	84,7	1,12E-02	*	1,74E+04	6,97E+03	40,15	4,57E+03	7,03E+03	154,02
709	20,78	DECANOL	C10H22O	92,5	1,15E-02	*	7,11E+05	3,50E+05	49,16	2,10E+04	1,18E+04	56,07
452	17,49 9	ACETOPHENONE	C8H8O	92,7	1,16E-02	*	7,11E+05	3,40E+05	47,89	4,11E+04	1,91E+04	46,39
1273	27,81 2	2-METHYLPROPYL BENZOATE	C11H14O2	80,3	1,19E-02	*	1,61E+04	7,71E+03	48,05	9,50E+02	1,66E+02	17,46
1491	31,28 5	TRICOSANE	C23H48	84,2	1,22E-02	*	2,33E+04	1,15E+04	49,43	9,61E+02	7,46E+02	77,59
183	12,27 3	2-HEXANONE	C6H12O	93	1,48E-02	*	5,36E+04	2,79E+04	52,01	2,45E+03	1,15E+03	47,09
371	16,29 2	BUTYL BUTYRATE	C8H16O2	98,2	1,69E-02	*	4,24E+05	2,40E+05	56,64	7,51E+02	8,47E+02	112,69
84	8,547	ETHYL ACETATE	C4H8O2	83,2	1,76E-02	*	1,20E+05	6,73E+04	55,90	3,27E+03	4,71E+03	143,87
261	14,24 8	3-HEPTANONE	C7H14O	92	1,79E-02	*	2,43E+05	1,29E+05	53,08	2,02E+04	1,13E+04	55,93
1321	28,47 6	TRICOSANE	C23H48	91,4	1,85E-02	*	7,86E+04	4,49E+04	57,07	1,67E+03	7,50E+02	44,96
279	14,66 9	2,5-HEXADIONE	C6H10O2	83,5	1,97E-02	*	3,66E+05	2,15E+05	58,65	4,72E+03	2,93E+03	62,05
220	13,35 4	CYCLOHEXANONE	C6H10O	80,1	1,98E-02	*	2,93E+05	1,71E+05	58,24	6,08E+03	3,03E+03	49,74
318	15,42 6	3-METHYLCYCLOHEXANONE	C7H12O	93,1	2,02E-02	*	4,11E+05	2,38E+05	57,81	1,44E+04	5,89E+03	40,97
794	21,93	TRICOSANE	C23H48	91,9	2,09E-02	*	6,18E+05	3,61E+05	58,51	1,99E+04	7,21E+03	36,15
125	10,35 4	N-METHYLACETAMIDE	C3H7NO	85,7	2,21E-02	*	1,10E+03	6,62E+02	60,04	3,48E+01	9,83E+01	282,84
80	8,43	HEXANE	C6H14	98,3	2,22E-02	*	3,70E+05	2,27E+05	61,29	2,29E+03	5,14E+03	224,27
179	12,14	2-HEXANONE	C6H12O	88,7	2,28E-02	*	9,93E+03	5,95E+03	59,98	3,44E+02	1,46E+02	42,44
342	15,88	HEPTANOL	C7H16O	83,3	2,28E-02	*	1,17E+04	6,75E+03	57,47	8,92E+02	3,70E+02	41,46

Anhang

150	11,29 3	ISOAMYL ALCOHOL	C5H12O	89,9	2,29E- 02	*	2,46E+0 4	1,47E+0 4	59,71	9,99E+0 2	6,53E+0 2	65,34
208	12,98 3	2-METHYLPYRAZINE	C5H6N2	82,6	2,41E- 02	*	2,73E+0 4	1,55E+0 4	56,53	2,97E+0 3	1,50E+0 3	50,61
817	22,20 4	HEXADECANOL	C16H34O	80,1	2,51E- 02	*	6,78E+0 5	4,23E+0 5	62,37	1,76E+0 4	1,19E+0 4	67,45
478	17,88	3-ETHYL-5- METHYLPHENOL	C9H12O	80,1	2,52E- 02	*	4,45E+0 4	2,48E+0 4	55,79	5,96E+0 3	2,88E+0 3	48,39
32	5,112	ACETONITRILE	C2H3N	90	2,55E- 02	*	6,45E+0 5	4,15E+0 5	64,30	7,61E+0 2	1,34E+0 3	176,12
323	15,55 3	5-METHYL-2-FURFURAL	C6H6O2	80,4	2,56E- 02	*	1,36E+0 4	6,98E+0 3	51,24	2,88E+0 3	1,16E+0 3	40,41
200	12,78 2	PROPYL PROPIONATE	C6H12O2	91,6	2,58E- 02	*	3,72E+0 5	2,36E+0 5	63,48	6,48E+0 3	4,63E+0 3	71,47
275	14,62 6	2-ACETYLFURAN	C6H6O2	82,1	2,62E- 02	*	7,78E+0 4	4,45E+0 4	57,19	9,42E+0 3	3,96E+0 3	42,08
792	21,87 6	PARA- DIISOPROPYLBENZENE	C12H18	87,3	2,66E- 02	*	2,66E+0 5	1,52E+0 5	57,31	3,54E+0 4	3,30E+0 4	93,32
763	21,46	PARA- DIISOPROPYLBENZENE	C12H18	88,7	2,67E- 02	*	5,41E+0 4	3,13E+0 4	57,91	6,62E+0 3	5,80E+0 3	87,58
1432	30,18 2	OCTADECANOL	C18H38O	90	2,74E- 02	*	7,28E+0 4	4,45E+0 4	61,16	5,80E+0 3	7,66E+0 3	132,09
194	12,56 6	HEXANAL	C6H12O	87,7	2,78E- 02	*	7,23E+0 3	4,71E+0 3	65,09	1,22E+0 2	1,26E+0 2	103,62
121	10,24	PENTANAL	C5H10O	86,4	2,88E- 02	*	5,38E+0 3	3,46E+0 3	64,20	2,23E+0 2	1,26E+0 2	56,33
1477	31,02 3	PYRENE	C16H10	87,7	2,92E- 02	*	1,16E+0 4	7,34E+0 3	63,38	6,78E+0 2	5,90E+0 2	87,01
115	10,05	2-PENTANONE	C5H10O	84,4	3,06E- 02	*	1,25E+0 6	8,49E+0 5	68,01	3,78E+0 3	1,55E+0 3	41,02
57	7,037	HEXANE	C6H14	93,5	3,12E- 02	*	1,42E+0 5	9,76E+0 4	68,56	2,79E+0 2	4,58E+0 2	163,92
209	13,04 5	FURFURAL	C5H4O2	83,1	3,40E- 02	*	1,38E+0 4	7,36E+0 3	53,48	3,37E+0 3	7,01E+0 2	20,81
71	7,952	ETHYL VINYL ETHER	C4H8O	83,2	3,46E- 02	*	2,29E+0 4	1,49E+0 4	65,38	1,91E+0 3	2,04E+0 3	106,80
172	12,00 5	TOLUENE	C7H8	92,7	3,52E- 02	*	3,60E+0 5	2,57E+0 5	71,38	2,26E+0 2	4,64E+0 2	205,11

Anhang

287	14,86 3	NONANE	C9H20	81,9	3,59E-02	*	4,48E+04	3,04E+04	68,00	2,46E+03	1,79E+03	72,93
280	14,71 8	4-(2 AMINOETHYL)-PHENOL	C8H11NO	84,1	3,79E-02	*	6,65E+05	4,34E+05	65,30	7,28E+04	2,92E+04	40,11
608	19,52 1	HEXANOIC ACID BUTYL ESTER	C10H20O2	98,6	3,82E-02	*	8,24E+05	6,02E+05	73,03	4,77E+03	3,66E+03	76,74
37	5,413	ACETONE	C3H6O	89,2	3,99E-02	*	2,28E+05	1,54E+05	67,67	2,13E+04	1,44E+04	67,40
151	11,29 6	PYRIDINE	C5H5N	94,8	4,18E-02	*	7,12E+05	5,39E+05	75,68	1,74E+02	2,74E+02	157,57
50	6,466	HEXANE	C6H14	98,4	4,24E-02	*	3,89E+05	2,96E+05	75,96	3,71E+02	5,62E+02	151,64
510	18,32 8	2-PHENYLETHANOL	C8H10O	80,8	4,49E-02	*	6,33E+04	3,75E+04	59,27	1,53E+04	8,21E+03	53,48
18	3,784	ETHYLENE-OXIDE	C2H4O	81,8	4,74E-02	*	3,29E+04	2,53E+04	77,10	8,23E+02	7,13E+02	86,69
1464	30,63 8	CIS-9-OCTADECENOIC ACID BUTYL ESTER	C22H42O2	81,6	4,81E-02	*	4,62E+03	2,88E+03	62,31	1,02E+03	2,19E+03	215,59
83	8,534	CHLOROFORM	CHCl3	95,9	4,85E-02	*	6,44E+03	5,06E+03	78,65	8,50E+01	2,40E+02	282,84
182	12,23 2	ISOAMYL BUTYRATE	C9H18O2	80,1	4,90E-02	*	4,30E+03	3,23E+03	75,01	2,67E+02	1,26E+02	47,27

Tabelle 21: Ergebnisse der Featureanalyse des Experimentes zur Untersuchung des extrazellulären volatilen Metaboloms von *P. aeruginosa* PAO1 bei einer anaeroben Kultivierung im in vitro Biofilmmodell auf LBN- und PIAN-Agar. Außerdem wurden die Metabolite mittels der MoNA Datenbank.

Alignme nt ID	RT [min]	Metabolitname	Summenform el	Scor e [%]	p-Wert	Leve l	MW PIAN	SD PIAN	RSD PIAN	MW LBN	SD LBN	RSD LBN
45	5,9	2-PROPANOL	C3H8O	89,5	2,69E-14	***	4,09E+04	2,65E+02	0,65	1,57E+03	1,46E+03	93,26
325	15,58 6	2-ETHYLHEXANAL	C8H16O	92,7	1,04E-11	***	1,02E+04	1,18E+02	1,16	1,04E+03	6,54E+02	63,02
830	22,32 2	3,4-dihydroxymandelic acid	C8H8O5	80,4	1,93E-11	***	8,08E+05	1,67E+04	2,07	1,42E+05	3,88E+04	27,36
1132	25,99 8	1-HEXADECANOL	C16H34O	88,4	9,09E-09	***	1,54E+06	1,88E+04	1,22	3,16E+04	2,30E+04	72,73

Anhang

1347	28,89 5	DIBUTYL PHTHALATE	C16H22O4	85,5	4,67E- 07	***	5,67E+0 5	2,74E+0 4	4,83	1,48E+0 5	5,15E+0 4	34,78
905	23,30 9	4-vinylphenol	C8H8O	81,1	1,95E- 05	***	3,13E+0 4	2,82E+0 3	9,00	7,95E+0 3	6,58E+0 3	82,76
509	18,29 6	synephrine	C9H13NO2	81,1	2,34E- 05	***	3,02E+0 6	1,14E+0 5	3,76	5,22E+0 5	1,04E+0 5	19,91
607	19,49 5	L-MENTHOL	C10H20O	93,2	2,67E- 05	***	1,30E+0 4	6,37E+0 2	4,89	1,97E+0 3	6,49E+0 2	32,88
510	18,32 8	2-PHENYLETHANOL	C8H10O	80,8	4,21E- 05	***	3,55E+0 4	3,01E+0 3	8,50	1,29E+0 4	5,62E+0 3	43,54
52	6,538	2-METHYL-3-PENTANOL	C6H14O	89,1	9,07E- 05	***	7,60E+0 3	8,49E+0 2	11,17	1,80E+0 3	1,70E+0 3	94,51
664	20,19 7	BENZOTHAZOLE	C7H5NS	80,2	1,58E- 04	***	3,43E+0 5	2,09E+0 4	6,10	4,68E+0 4	1,77E+0 4	37,85
1432	30,18 2	OCTADECANOL	C18H38O	90	1,66E- 04	***	9,29E+0 4	3,32E+0 3	3,57	2,77E+0 3	1,58E+0 3	56,93
798	21,98 9	PENTADECANE	C15H32	81,1	1,74E- 04	***	9,04E+0 5	2,98E+0 4	3,30	3,49E+0 4	1,28E+0 4	36,68
415	16,96 7	2-ETHYLHEXANOL	C8H18O	90,1	2,26E- 04	***	3,76E+0 6	1,05E+0 5	2,79	8,68E+0 4	2,13E+0 4	24,59
1109	25,74 9	HEPTADECANE	C17H36	81,4	2,39E- 04	***	9,24E+0 3	4,52E+0 2	4,90	5,33E+0 2	2,64E+0 2	49,47
179	12,14	2-HEXANONE	C6H12O	88,7	3,22E- 04	***	4,25E+0 3	5,75E+0 2	13,53	1,14E+0 3	1,05E+0 3	92,03
794	21,93	TRICOSANE	C23H48	91,9	3,79E- 04	***	4,60E+0 5	1,79E+0 4	3,89	1,96E+0 4	5,82E+0 3	29,62
776	21,66 1	1-HEPTADECENE	C17H34	80,9	4,36E- 04	***	1,29E+0 6	4,75E+0 4	3,67	1,15E+0 4	4,85E+0 3	42,05
1388	29,44 8	PENTACOSANE	C25H52	91,1	4,64E- 04	***	8,18E+0 4	3,26E+0 3	3,98	1,94E+0 3	6,63E+0 2	34,19
1234	27,35	HEXACOSANE	C26H54	86,4	4,74E- 04	***	6,89E+0 4	2,81E+0 3	4,08	1,70E+0 3	6,46E+0 2	37,94
551	18,90 8	2-ETHYLHEXYL ACETATE	C10H20O2	83,3	5,22E- 04	***	3,52E+0 5	1,39E+0 4	3,95	2,64E+0 3	8,13E+0 2	30,83
323	15,55 3	5-METHYL-2-FURFURAL	C6H6O2	80,4	5,43E- 04	***	7,35E+0 3	5,79E+0 2	7,88	1,14E+0 3	4,42E+0 2	38,89
756	21,36 2	TRIDECANE	C13H28	88,3	6,15E- 04	***	2,78E+0 6	1,26E+0 5	4,54	5,01E+0 4	2,67E+0 4	53,31

Anhang

577	19,16 2	CARANE	C10H18	82,1	6,22E- 04	***	5,03E+0 5	2,21E+0 4	4,39	4,93E+0 3	2,82E+0 3	57,11
441	17,35	PENTYL BUTYRATE	C9H18O2	89,6	9,98E- 04	***	1,26E+0 4	9,75E+0 2	7,71	1,02E+0 3	5,16E+0 2	50,65
788	21,79 8	DOCOSANE	C22H46	81,1	1,01E- 03	**	1,66E+0 6	9,03E+0 4	5,45	2,32E+0 4	5,09E+0 3	21,89
709	20,78	DECANOL	C10H22O	92,5	1,01E- 03	**	2,33E+0 6	1,28E+0 5	5,49	2,08E+0 4	8,42E+0 3	40,53
953	23,87 3	ISOPULEGYL ACETATE(EQUATORIAL)	C12H20O2	85	1,04E- 03	**	3,35E+0 5	1,87E+0 4	5,58	3,80E+0 3	1,29E+0 3	33,95
327	15,62 3	BENZALDEHYDE	C7H6O	95,8	1,16E- 03	**	3,23E+0 4	2,29E+0 3	7,10	3,50E+0 3	9,86E+0 2	28,15
550	18,89 9	ISOPENTYL ACETATE	C7H14O2	82,8	1,16E- 03	**	3,42E+0 6	2,02E+0 5	5,90	1,92E+0 4	1,13E+0 4	58,89
1063	25,17 7	DIISOPENTYL ETHER	C10H22O	83,8	1,37E- 03	**	6,87E+0 6	4,55E+0 5	6,62	9,57E+0 4	7,63E+0 4	79,74
495	18,13 9	PELARGONALDEHYDE	C9H18O	91,5	1,41E- 03	**	1,09E+0 6	7,07E+0 4	6,49	9,38E+0 3	3,54E+0 3	37,75
1159	26,36 9	HEPTADECANE	C17H36	80	1,45E- 03	**	5,67E+0 6	3,73E+0 5	6,57	2,03E+0 4	6,45E+0 3	31,79
1160	26,39 5	CYCLODODECYL FORMATE	C13H24O2	81,2	1,46E- 03	**	1,73E+0 4	1,19E+0 3	6,89	1,05E+0 3	3,03E+0 2	28,93
792	21,87 6	PARA- DIISOPROPYLBENZENE	C12H18	87,3	1,50E- 03	**	3,00E+0 5	2,58E+0 4	8,59	1,82E+0 4	1,18E+0 4	64,89
1491	31,28 5	TRICOSANE	C23H48	84,2	1,53E- 03	**	4,08E+0 4	2,81E+0 3	6,89	9,18E+0 2	4,12E+0 2	44,90
478	17,88	3-ETHYL-5- METHYLPHENOL	C9H12O	80,1	1,57E- 03	**	4,57E+0 4	4,47E+0 3	9,79	8,68E+0 3	3,17E+0 3	36,49
917	23,44 7	BETA-IONONE	C13H20O	80,7	1,66E- 03	**	2,36E+0 4	2,50E+0 3	10,59	3,62E+0 3	1,71E+0 3	47,12
420	17,04	META TOLUALDEHYDE	C8H8O	81,6	1,73E- 03	**	1,01E+0 4	8,67E+0 2	8,54	1,12E+0 3	3,84E+0 2	34,38
860	22,72 9	TETRADECANE	C14H30	86	2,08E- 03	**	3,45E+0 6	2,68E+0 5	7,78	8,45E+0 4	1,81E+0 4	21,43
371	16,29 2	BUTYL BUTYRATE	C8H16O2	98,2	2,25E- 03	**	5,84E+0 4	6,79E+0 3	11,62	5,77E+0 3	4,15E+0 3	71,97
733	21,05 2	2-UNDECANONE	C11H22O	80,6	2,46E- 03	**	2,40E+0 6	2,04E+0 5	8,50	3,61E+0 4	1,01E+0 4	28,00

Anhang

642	19,90 6	HEXADECANE	C16H34	82,3	2,52E- 03	**	1,17E+0 6	1,00E+0 5	8,56	2,53E+0 4	5,81E+0 3	22,98
763	21,46	PARA- DIISOPROPYLBENZENE	C12H18	88,7	2,54E- 03	**	5,58E+0 4	5,58E+0 3	10,00	3,45E+0 3	2,14E+0 3	61,94
1106	25,71 2	(Z)-9-HEXADECENAL	C16H30O	83,8	2,58E- 03	**	1,06E+0 5	9,31E+0 3	8,76	9,50E+0 2	4,58E+0 2	48,21
589	19,28 2	GAMMA-TERPINENE	C10H16	81,4	2,66E- 03	**	4,33E+0 4	3,84E+0 3	8,88	6,64E+0 2	2,94E+0 2	44,28
480	17,92 9	2-NONANONE	C9H18O	81,2	2,78E- 03	**	1,55E+0 6	1,42E+0 5	9,14	3,79E+0 3	8,71E+0 2	22,96
452	17,49 9	ACETOPHENONE	C8H8O	92,7	2,96E- 03	**	4,12E+0 5	3,88E+0 4	9,41	3,87E+0 4	9,96E+0 3	25,71
928	23,57 3	PENTACOSANE	C25H52	82,4	3,16E- 03	**	1,28E+0 6	1,25E+0 5	9,76	1,48E+0 4	1,15E+0 4	77,30
1051	25,00 7	TRIACONTANE	C30H62	82,4	3,24E- 03	**	7,90E+0 4	8,01E+0 3	10,14	4,24E+0 3	1,97E+0 3	46,53
200	12,78 2	PROPYL PROPIONATE	C6H12O2	91,6	3,36E- 03	**	1,27E+0 5	1,27E+0 4	10,05	2,17E+0 3	1,33E+0 3	61,13
263	14,30 5	2-HEPTANONE	C7H14O	86,7	3,53E- 03	**	5,02E+0 5	5,14E+0 4	10,24	4,44E+0 3	1,04E+0 3	23,39
817	22,20 4	HEXADECANOL	C16H34O	80,1	3,64E- 03	**	2,21E+0 6	2,30E+0 5	10,42	1,87E+0 4	9,25E+0 3	49,52
460	17,61 2	HEPTANOIC ACID	C7H14O2	80,7	3,70E- 03	**	5,43E+0 3	5,89E+0 2	10,85	1,64E+0 2	1,19E+0 2	72,66
280	14,71 8	4-(2 AMINOETHYL)- PHENOL	C8H11NO	84,1	3,71E- 03	**	9,39E+0 5	1,00E+0 5	10,67	1,42E+0 5	3,65E+0 4	25,82
121	10,24	PENTANAL	C5H10O	86,4	3,72E- 03	**	7,91E+0 3	8,28E+0 2	10,46	1,40E+0 2	5,20E+0 1	37,19
536	18,66 4	1-NONANOL	C9H20O	80,9	3,75E- 03	**	4,00E+0 5	4,19E+0 4	10,48	6,48E+0 3	1,29E+0 3	19,91
214	13,16 8	1-OCTENE	C8H16	80,4	3,75E- 03	**	1,17E+0 3	1,50E+0 2	12,74	1,84E+0 2	8,32E+0 1	45,21
432	17,19 2	DODECANE	C12H26	82,7	3,83E- 03	**	4,13E+0 4	4,55E+0 3	11,02	1,51E+0 3	1,05E+0 3	69,45
587	19,25 4	1-NONANOL	C9H20O	88,5	3,96E- 03	**	9,84E+0 5	1,07E+0 5	10,84	8,75E+0 3	2,53E+0 3	28,91
1147	26,20 1	2-PENTADECANONE	C15H30O	82,8	4,30E- 03	**	5,26E+0 5	5,94E+0 4	11,28	8,23E+0 3	3,78E+0 3	45,87

Anhang

279	14,66 9	2,5-HEXADIONE	C6H10O2	83,5	4,62E- 03	**	1,83E+0 5	2,14E+0 4	11,68	2,50E+0 3	9,39E+0 2	37,53
4	0,356	2-AMINO-1-ETHANOL	C2H7NO	80,8	4,80E- 03	**	1,31E+0 3	1,53E+0 2	11,69	1,44E+0 2	4,13E+0 1	28,70
456	17,56	PELARGONALDEHYDE	C9H18O	84,5	4,85E- 03	**	4,01E+0 4	4,81E+0 3	12,01	3,70E+0 2	1,27E+0 2	34,37
1321	28,47 6	TRICOSANE	C23H48	91,4	4,96E- 03	**	2,47E+0 5	3,00E+0 4	12,17	1,63E+0 3	7,64E+0 2	46,90
140	10,75 7	HEPTANE	C7H16	99,2	4,99E- 03	**	5,04E+0 5	6,36E+0 4	12,64	4,84E+0 3	1,12E+0 4	232,14
363	16,17 7	METHYL HEXYL KETONE	C8H16O	92,4	5,08E- 03	**	2,83E+0 5	3,46E+0 4	12,22	4,26E+0 3	1,45E+0 3	34,03
548	18,84 4	10-METHYL-1- DODECANOL	C13H28O	84,7	5,26E- 03	**	1,08E+0 5	1,33E+0 4	12,30	3,30E+0 3	8,43E+0 2	25,55
608	19,52 1	HEXANOIC ACID BUTYL ESTER	C10H20O2	98,6	5,78E- 03	**	1,13E+0 6	1,48E+0 5	13,12	1,38E+0 4	8,98E+0 3	64,88
47	6,001	ISOPROPYL ALCOHOL	C3H8O	84,7	5,78E- 03	**	2,41E+0 4	3,30E+0 3	13,66	1,00E+0 3	8,92E+0 2	89,11
271	14,51 8	HEPTANAL	C7H14O	80,6	5,88E- 03	**	4,24E+0 3	5,51E+0 2	13,00	1,90E+0 2	7,24E+0 1	38,19
926	23,54 5	LAURYL ACETATE	C14H28O2	81	5,88E- 03	**	1,52E+0 6	2,01E+0 5	13,27	1,49E+0 4	1,26E+0 4	84,50
932	23,64 5	2,6-DI-TERT-BUTYL-1,4- BENZOQUINONE	C14H20O2	86,2	6,05E- 03	**	2,76E+0 5	3,84E+0 4	13,91	1,75E+0 4	1,10E+0 4	62,69
220	13,35 4	CYCLOHEXANONE	C6H10O	80,1	6,44E- 03	**	4,05E+0 5	5,57E+0 4	13,73	8,78E+0 3	3,60E+0 3	41,04
318	15,42 6	3- METHYLCYCLOHEXANON E	C7H12O	93,1	8,05E- 03	**	2,13E+0 5	3,23E+0 4	15,18	8,91E+0 3	3,68E+0 3	41,28
84	8,547	ETHYL ACETATE	C4H8O2	83,2	8,68E- 03	**	7,10E+0 4	1,67E+0 4	23,52	7,02E+0 3	1,44E+0 4	204,93
1454	30,49	PYRENE	C16H10	85,4	8,74E- 03	**	1,08E+0 4	1,85E+0 3	17,08	9,77E+0 2	6,98E+0 2	71,43
275	14,62 6	2-ACETYLFURAN	C6H6O2	82,1	9,17E- 03	**	1,05E+0 5	1,65E+0 4	15,70	1,39E+0 4	4,59E+0 3	32,99
261	14,24 8	3-HEPTANONE	C7H14O	92	9,79E- 03	**	1,81E+0 5	3,05E+0 4	16,84	1,14E+0 4	6,73E+0 3	59,00

Anhang

208	12,98 3	2-METHYLPYRAZINE	C5H6N2	82,6	1,00E- 02	*	5,33E+0 4	8,82E+0 3	16,54	4,93E+0 3	1,92E+0 3	38,96
402	16,74 5	2-ETHYLHEXANOL	C8H18O	82,4	1,03E- 02	*	1,77E+0 4	3,08E+0 3	17,36	4,69E+0 2	2,40E+0 2	51,07
225	13,46 7	DIETHYLAMINE	C4H11N	83,6	1,11E- 02	*	2,69E+0 3	4,93E+0 2	18,34	1,48E+0 1	3,01E+0 1	202,90
1273	27,81 2	2-METHYLPROPYL BENZOATE	C11H14O2	80,3	1,11E- 02	*	3,95E+0 4	7,19E+0 3	18,17	5,77E+0 2	2,44E+0 2	42,21
992	24,32 6	PENTACOSANE	C25H52	80,3	1,14E- 02	*	1,44E+0 5	2,67E+0 4	18,48	1,68E+0 3	6,34E+0 2	37,76
567	19,06 3	3-BUTYLPYRIDINE	C9H13N	81,9	1,18E- 02	*	7,49E+0 4	1,39E+0 4	18,61	3,23E+0 3	2,28E+0 3	70,52
974	24,15 7	2,6-BIS(TERT-BUTYL)-4- METHYLPHENOL	C15H24O	93,3	1,19E- 02	*	3,96E+0 6	7,38E+0 5	18,63	3,22E+0 5	1,98E+0 5	61,44
183	12,27 3	2-HEXANONE	C6H12O	93	1,19E- 02	*	4,86E+0 4	1,06E+0 4	21,75	5,96E+0 3	6,47E+0 3	108,53
209	13,04 5	FURFURAL	C5H4O2	83,1	1,20E- 02	*	1,99E+0 4	3,50E+0 3	17,65	2,45E+0 3	8,52E+0 2	34,79
1097	25,56 6	BENZOPHENONE	C13H10O	84,5	1,24E- 02	*	3,58E+0 5	6,78E+0 4	18,91	1,04E+0 4	3,48E+0 3	33,38
417	17,01 7	OCTYL HEXANOATE	C14H28O2	80,4	1,24E- 02	*	2,00E+0 4	3,75E+0 3	18,76	8,37E+0 2	2,86E+0 2	34,17
977	24,17 9	1-NAPHTHOL	C10H8O	91,8	1,26E- 02	*	2,63E+0 4	4,96E+0 3	18,87	1,92E+0 3	1,02E+0 3	53,29
1322	28,48 1	UNDECYL BENZOATE	C18H28O2	80,1	1,31E- 02	*	1,82E+0 5	3,65E+0 4	19,98	3,46E+0 2	1,57E+0 2	45,57
461	17,62 7	1-OCTANOL	C8H18O	87,6	1,44E- 02	*	7,38E+0 4	1,51E+0 4	20,49	1,88E+0 3	5,56E+0 2	29,57
184	12,30 1	BUTYRIC ACID	C4H8O2	88,2	1,52E- 02	*	2,10E+0 4	4,51E+0 3	21,51	7,69E+0 2	9,32E+0 2	121,17
250	13,97 9	5-METHYL-3-HEXANONE	C7H14O	83,1	1,56E- 02	*	9,08E+0 2	1,89E+0 2	20,85	7,38E+0 1	3,95E+0 1	53,50
194	12,56 6	HEXANAL	C6H12O	87,7	1,58E- 02	*	3,58E+0 4	7,80E+0 3	21,78	4,33E+0 2	1,39E+0 2	32,14
392	16,63 1	GLYCEROL	C3H8O3	87,5	1,70E- 02	*	8,26E+0 2	2,16E+0 2	26,16	8,79E+0 1	1,39E+0 2	158,41
150	11,29 3	ISOAMYL ALCOHOL	C5H12O	89,9	1,73E- 02	*	1,10E+0 4	2,46E+0 3	22,30	3,98E+0 2	1,53E+0 2	38,45

Anhang

122	10,25 4	HEPTANE	C7H16	97	1,76E- 02	*	2,15E+0 4	5,03E+0 3	23,44	3,96E+0 2	9,19E+0 2	232,38
7	0,484	1,2-PROPANEDIOL	C3H8O2	81,8	2,07E- 02	*	2,08E+0 3	5,17E+0 2	24,87	2,55E+0 2	2,18E+0 2	85,40
745	21,19 8	CARVACROL	C10H14O	90,1	2,09E- 02	*	1,17E+0 4	2,78E+0 3	23,70	1,76E+0 3	1,05E+0 3	59,50
1477	31,02 3	PYRENE	C16H10	87,7	2,45E- 02	*	7,62E+0 3	2,05E+0 3	26,93	3,03E+0 2	3,18E+0 2	104,83
111	9,952	1-METHOXY-2- PROPANOL	C4H10O2	86,7	2,60E- 02	*	2,71E+0 3	7,71E+0 2	28,46	0,00E+0 0	0,00E+0 0	#DIV/0!
83	8,534	CHLOROFORM	CHCl3	95,9	2,75E- 02	*	3,48E+0 3	1,02E+0 3	29,35	0,00E+0 0	0,00E+0 0	#DIV/0!
182	12,23 2	ISOAMYL BUTYRATE	C9H18O2	80,1	2,77E- 02	*	1,00E+0 4	2,83E+0 3	28,34	4,13E+0 2	2,05E+0 2	49,70
80	8,43	HEXANE	C6H14	98,3	2,88E- 02	*	4,22E+0 5	1,26E+0 5	29,77	7,72E+0 3	1,54E+0 4	200,12
228	13,56 1	CHLOROBENZENE	C6H5Cl	93,8	2,93E- 02	*	3,92E+0 4	1,13E+0 4	28,83	1,93E+0 3	3,14E+0 2	16,26
170	11,97	1-PENTANOL	C5H12O	91,3	2,94E- 02	*	6,33E+0 3	1,89E+0 3	29,82	1,16E+0 2	4,79E+0 1	41,42
164	11,82 5	2-ETHOXYETHYLAMINE	C4H11NO	81,1	3,21E- 02	*	6,68E+0 3	2,09E+0 3	31,22	1,48E+0 2	1,56E+0 2	105,41
814	22,14 3	TRICOSANE	C23H48	94,2	3,28E- 02	*	9,19E+0 5	2,90E+0 5	31,51	1,88E+0 4	5,48E+0 3	29,09
414	16,96 1	BENZYL ALCOHOL	C7H8O	81,9	3,34E- 02	*	1,30E+0 4	4,00E+0 3	30,84	1,23E+0 3	1,18E+0 3	95,59
32	5,112	ACETONITRILE	C2H3N	90	3,44E- 02	*	8,57E+0 5	2,82E+0 5	32,93	9,96E+0 2	2,01E+0 3	201,95
115	10,05	2-PENTANONE	C5H10O	84,4	3,44E- 02	*	1,18E+0 6	3,88E+0 5	32,84	4,97E+0 3	2,67E+0 3	53,79
342	15,88	HEPTANOL	C7H16O	83,3	3,49E- 02	*	9,09E+0 3	2,83E+0 3	31,16	6,20E+0 2	2,91E+0 2	46,88
11	2,487	ETHYLENE-OXIDE	C2H4O	83,7	3,53E- 02	*	4,65E+0 3	1,44E+0 3	30,98	3,75E+0 2	1,72E+0 2	45,75
127	10,37 9	2-PENTANONE	C5H10O	89,1	3,59E- 02	*	2,14E+0 5	7,17E+0 4	33,58	1,04E+0 3	2,40E+0 3	230,51
71	7,952	ETHYL VINYL ETHER	C4H8O	83,2	3,60E- 02	*	5,36E+0 4	1,72E+0 4	32,15	2,80E+0 3	1,54E+0 3	54,96

Anhang

196	12,67	OCTANOL	C8H18O	89,8	3,61E-02	*	1,40E+04	4,31E+03	30,83	1,43E+03	7,13E+02	49,70
513	18,38 4	2-ETHYLHEXANOIC ACID	C8H16O2	81,5	3,65E-02	*	1,35E+05	4,51E+04	33,33	3,00E+03	2,04E+03	67,98
351	16,00 9	PHENOL	C6H6O	93,5	4,12E-02	*	3,89E+06	1,40E+06	35,94	4,03E+04	3,61E+04	89,62
204	12,9	OCTANE	C8H18	90,4	4,65E-02	*	1,45E+04	4,37E+03	30,08	4,37E+03	2,23E+03	51,03
37	5,413	ACETONE	C3H6O	89,2	4,67E-02	*	2,50E+05	9,25E+04	36,97	1,21E+04	5,36E+03	44,29
38	5,446	TRIMETHYLAMINE	C3H9N	80,6	4,73E-02	*	3,26E+03	1,18E+03	36,22	2,53E+02	1,19E+02	46,90

Anhang

Ergänzung zum Kapitel 5.3.5:

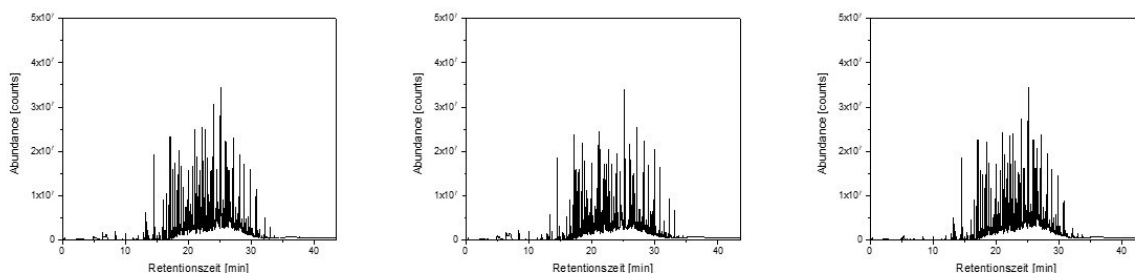


Abbildung 58: TICs der Analyse des extrazellulären volatilen Metaboloms von *P. aeruginosa* ATCC 10145 mittels TD-GC-qMS. Die Kultivierung erfolgte im in vitro Modell unter CF-ähnlichen Bedingungen. Hierfür wurde drei Replikate auf ASM-Agar unter anaeroben Bedingungen bei 37 °C im in vitro Biofilmmmodell kultiviert. Die Beprobung des Gasraumes erfolgte mittels der TFME auf kommerziellen PDMS-Filmen.

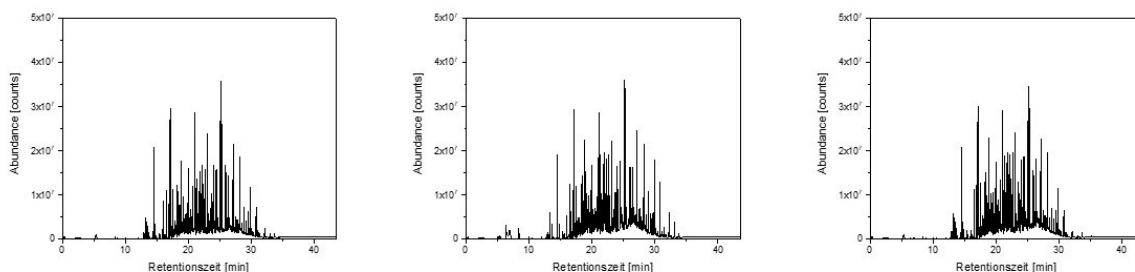


Abbildung 59: TICs der Analyse des extrazellulären volatilen Metaboloms von *P. aeruginosa* FRD1 mittels TD-GC-qMS. Die Kultivierung erfolgte im in vitro Modell unter CF-ähnlichen Bedingungen. Hierfür wurde drei Replikate auf ASM-Agar unter anaeroben Bedingungen bei 37 °C im in vitro Biofilmmmodell kultiviert. Die Beprobung des Gasraumes erfolgte mittels der TFME auf kommerziellen PDMS-Filmen.

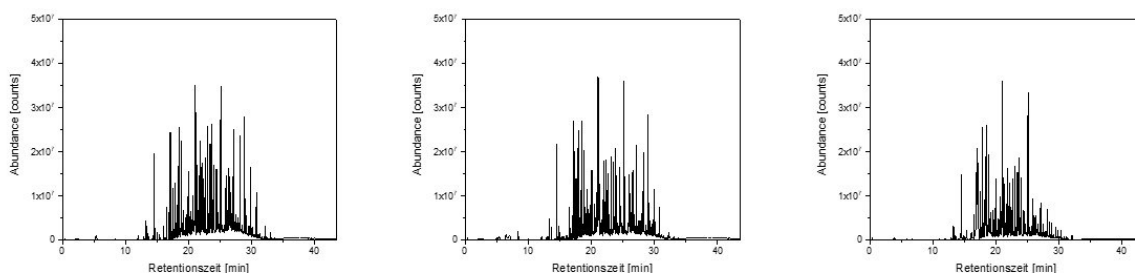


Abbildung 60: TICs der Analyse des extrazellulären volatilen Metaboloms von *P. aeruginosa* PAO1 mittels TD-GC-qMS. Die Kultivierung erfolgte im in vitro Modell unter CF-ähnlichen Bedingungen. Hierfür wurde drei Replikate auf ASM-Agar unter anaeroben Bedingungen bei 37 °C im in vitro Biofilmmmodell kultiviert. Die Beprobung des Gasraumes erfolgte mittels der TFME auf kommerziellen PDMS-Filmen.

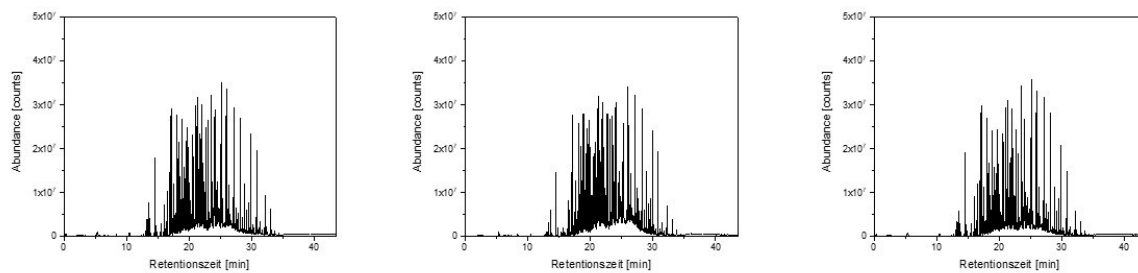


Abbildung 61: Verfahrensblank des *in vitro* CF-Biofilmmodells bei einer Kultivierung unter CF-ähnlichen Bedingungen (37 °C; anaerobe Bedingungen) auf ASM-Agar. Der Verfahrensblank wurde dem *in vitro* Biofilmmodell entnommen, welches nur das Nährmedium ASM enthält.

Anhang

Tabelle 22: Ergebnisse der Featureanalyse der Untersuchung des extrazellulären volatilen Metaboloms von *P. aeruginosa* unter CF-ähnlichen Bedingungen im in vitro Biofilmmodell und unter Verwendung des ASM-Agars. In der Tabelle ist der Vergleich der Feature zwischen den Stämmen *P. aeruginosa* ATCC 10145 und FRD1 ($n = 3$, je Bakterienstamm) gezeigt. Außerdem wurden die Metabolite mittels der MoNA Datenbank.

Alignme nt ID	RT [min]	Metabolitname	Summenfor mel	Scor e [%]	p-Wert	Lev el	MW ATCC	SD ATCC	RSD ATCC	MW FRD	SD FRD	RSD FRD
346	18,51 4	DI-N-BUTYLAMINE	C8H19N	85,8	1,78E- 06	***	8,60E+0 6	2,43E+0 5	2,83	1,75E+0 5	2,39E+0 5	136,44
192	15,57 3	2-ETHYLHEXANAL	C8H16O	83	2,72E- 05	***	3,10E+0 3	4,07E+0 2	13,15	1,69E+0 4	6,44E+0 2	3,80
646	23,74 2	ALPHA- BUTYL CINNAMALDEHYDE	C13H16O	84,2	3,26E- 05	***	2,37E+0 5	1,69E+0 4	7,11	5,39E+0 5	1,84E+0 4	3,41
260	17,02 5	STYRENE OXIDE	C8H8O	86,9	3,48E- 05	***	4,21E+0 3	3,98E+0 2	9,44	1,14E+0 4	4,44E+0 2	3,91
886	27,81 5	2-PENTADECANONE	C15H30O	81,3	4,77E- 04	***	3,20E+0 5	7,39E+0 3	2,31	4,20E+0 5	1,12E+0 4	2,66
147	14,23 2	5-METHYL-3-HEXANONE	C7H14O	89,5	5,42E- 04	***	1,56E+0 4	3,11E+0 2	1,99	1,28E+0 4	3,54E+0 2	2,76
268	17,16	BUTYL LEVULINATE	C9H16O3	82,3	7,13E- 04	***	4,02E+0 6	1,17E+0 5	2,92	5,49E+0 6	4,32E+0 4	0,79
907	28,17 3	1-HEXADECANOL	C16H34O	85,3	8,40E- 04	***	3,45E+0 5	2,98E+0 4	8,63	1,29E+0 5	2,15E+0 4	16,58
375	19,08 9	DIETHYL SUCCINATE	C8H14O4	84,5	1,07E- 03	**	9,00E+0 4	1,73E+0 3	1,92	1,02E+0 5	1,18E+0 3	1,15
308	17,90 9	2-OCTANONE	C8H16O	90,3	1,21E- 03	**	3,75E+0 6	3,19E+0 5	8,49	9,63E+0 5	1,43E+0 5	14,89
627	23,47 8	TRANS-2-DODECENYL ACETATE	C14H26O2	86,3	1,40E- 03	**	6,62E+0 5	2,58E+0 4	3,89	2,46E+0 5	5,31E+0 4	21,63
186	15,42	CYCLOHEPTANOL	C7H14O	82,9	1,48E- 03	**	1,78E+0 5	1,20E+0 4	6,72	7,87E+0 3	1,28E+0 3	16,20
150	14,28 5	2-HEPTANONE	C7H14O	87,9	1,50E- 03	**	6,89E+0 4	2,93E+0 3	4,25	4,83E+0 4	3,42E+0 3	7,08
1069	31,16 1	(Z)-6-OCTADECENOIC ACID METHYL ESTER	C19H36O2	82,3	1,92E- 03	**	7,59E+0 3	5,04E+0 2	6,63	1,26E+0 4	8,16E+0 2	6,50
257	16,99 8	BUTYL LEVULINATE	C9H16O3	82,6	2,54E- 03	**	1,42E+0 3	4,84E+0 2	34,12	5,62E+0 3	7,63E+0 2	13,58
577	22,57 2	1-TETRADECENE	C14H28	81	2,55E- 03	**	4,55E+0 5	9,26E+0 3	2,04	5,33E+0 5	1,44E+0 4	2,69

Anhang

4	0,441	HEPTANEDIOIC ACID DIMETHYL ESTER	C9H16O4	85,5	2,95E- 03	**	1,33E+0 5	1,99E+0 3	1,50	8,46E+0 4	6,30E+0 3	7,44
173	15,07 8	GAMMA-VALEROLACTONE	C5H8O2	89	3,16E- 03	**	1,14E+0 5	1,15E+0 4	10,08	2,99E+0 4	3,80E+0 3	12,71
471	20,71 5	1,4-DI-TERT-BUTYLBENZENE	C14H22	87,5	3,26E- 03	**	1,37E+0 6	8,05E+0 4	5,89	6,09E+0 5	1,08E+0 4	1,78
117	13,01 8	FURFURAL	C5H4O2	89,7	3,33E- 03	**	2,13E+0 5	1,74E+0 4	8,19	5,41E+0 5	4,81E+0 4	8,88
266	17,12 8	ETHYL 2-FUROATE	C7H8O3	88,8	3,60E- 03	**	4,51E+0 5	2,22E+0 4	4,93	8,16E+0 5	5,72E+0 4	7,01
752	25,54 1	BENZOPHENONE	C13H10O	87,8	4,19E- 03	**	7,33E+0 4	4,80E+0 3	6,55	1,05E+0 5	6,89E+0 3	6,57
644	23,72 1	DELTA-OCTALACTONE	C8H14O2	80,8	4,30E- 03	**	3,30E+0 5	3,59E+0 4	10,89	2,02E+0 4	2,53E+0 3	12,50
206	15,91 1	HEXANOIC ACID	C6H12O2	89,5	4,63E- 03	**	2,32E+0 2	1,06E+0 2	45,60	1,71E+0 4	2,02E+0 3	11,79
92	12,02 5	TOLUENE	C7H8	94,7	4,92E- 03	**	4,50E+0 5	6,22E+0 4	13,82	1,18E+0 5	7,66E+0 4	64,99
800	26,36 4	(Z)-10-PENTADECENE-1-OL	C15H30O	87,1	6,13E- 03	**	1,74E+0 4	1,90E+0 3	10,94	9,50E+0 3	1,25E+0 3	13,12
741	25,34 5	ISOPROPYL LAURATE	C15H30O2	94,3	6,32E- 03	**	1,42E+0 5	3,84E+0 4	27,16	1,66E+0 6	2,28E+0 5	13,80
277	17,28 9	3-METHOXYPROPYLAMINE	C4H11NO	82	6,44E- 03	**	7,58E+0 6	1,02E+0 5	1,34	1,84E+0 6	8,39E+0 5	45,49
253	16,88 3	5-METHYL-2- BUTYRYLFURAN	C9H12O2	84,4	6,67E- 03	**	1,08E+0 5	4,88E+0 3	4,51	1,28E+0 5	3,26E+0 3	2,55
104	12,45 8	HEXANAL	C6H12O	98,1	7,19E- 03	**	9,63E+0 3	1,50E+0 3	15,60	1,62E+0 4	1,65E+0 3	10,20
8	2,487	ISOBUTYRIC ANHYDRIDE	C8H14O3	82,2	7,59E- 03	**	4,04E+0 3	6,19E+0 2	15,32	1,55E+0 3	6,05E+0 2	39,08
3	0,387	P-METHYLBENZYL ALCOHOL	C8H10O	85,3	8,98E- 03	**	1,29E+0 5	6,59E+0 3	5,11	2,75E+0 5	3,00E+0 3	1,09
93	12,07	2-METHYLBUTYL ISOBUTYRATE	C9H18O2	88,9	9,20E- 03	**	8,61E+0 2	1,14E+0 2	13,27	1,43E+0 3	1,59E+0 2	11,09
109	12,67 7	PROPYL PROPIONATE	C6H12O2	92,4	9,43E- 03	**	3,28E+0 2	2,74E+0 1	8,35	1,31E+0 4	2,16E+0 3	16,52
512	21,36 2	4- ISOPROPYLCYCLOHEXANOL	C9H18O	84,4	9,55E- 03	**	1,37E+0 4	8,26E+0 3	60,30	4,39E+0 5	7,50E+0 4	17,09

Anhang

62	9,321	ISOVALERALDEHYDE	C5H10O	90,6	1,06E-02	*	3,00E+03	4,28E+02	14,25	4,79E+03	5,15E+02	10,75
386	19,258	1-NONANOL	C9H20O	81,2	1,07E-02	*	4,06E+05	1,22E+04	3,01	2,09E+05	4,28E+04	20,51
47	7,768	METHOXYACETALDEHYDE DIMETHYL ACETAL	C5H12O3	81,6	1,12E-02	*	1,75E+04	6,09E+02	3,49	1,46E+04	1,40E+02	0,96
85	11,422	PYRIDINE	C5H5N	92,2	1,21E-02	*	3,93E+04	2,87E+03	7,31	2,01E+04	5,46E+03	27,17
96	12,149	2-HEXANONE	C6H12O	96	1,23E-02	*	4,02E+03	4,41E+02	10,98	1,07E+04	1,55E+03	14,46
157	14,548	FURFURYL FORMATE	C6H6O3	87,4	1,26E-02	*	4,67E+06	2,19E+05	4,68	6,38E+06	4,71E+05	7,39
131	13,629	FURFURYL ALCOHOL	C5H6O2	98	1,41E-02	*	3,14E+04	1,56E+03	4,98	8,60E+04	1,19E+04	13,78
81	10,883	4-BROMOPHENYLBORIC ACID	C6H6BBrO2	84,2	1,47E-02	*	1,16E+02	1,41E+01	12,10	3,36E+02	5,37E+01	16,01
460	20,551	TRANS-2-DECENAL	C10H18O	94,4	1,49E-02	*	7,70E+04	6,40E+03	8,32	2,88E+05	4,72E+04	16,37
190	15,535	5-METHYLFURFURAL	C6H6O2	92,8	1,57E-02	*	2,07E+04	1,75E+03	8,47	3,79E+04	4,78E+03	12,62
132	13,638	FURFURYL ALCOHOL	C5H6O2	97,9	1,61E-02	*	1,25E+05	4,52E+03	3,63	2,68E+05	3,32E+04	12,40
29	5,975	2-PROPANOL	C3H8O	85,6	2,07E-02	*	6,00E+04	3,96E+03	6,59	4,29E+04	6,12E+03	14,26
345	18,51	TETRADECANE	C14H30	94,4	2,18E-02	*	2,21E+06	1,16E+05	5,23	1,31E+06	2,94E+05	22,47
71	10,176	1-METHOXY-2-PROPANOL	C4H10O2	86,9	2,30E-02	*	7,26E+04	2,03E+04	27,94	7,55E+03	6,22E+03	82,49
63	9,403	ISOVALERALDEHYDE	C5H10O	86,3	2,62E-02	*	1,01E+03	2,09E+02	20,74	1,59E+03	2,03E+02	12,80
224	16,271	BUTYL BUTYRATE	C8H16O2	94,6	2,67E-02	*	5,76E+03	4,95E+03	85,89	1,40E+05	3,98E+04	28,50
163	14,696	ETHYLENE GLYCOL MONO- ISOBUTYL ETHER	C6H14O2	85	2,76E-02	*	2,62E+03	6,93E+01	2,65	4,88E+03	6,76E+02	13,87
95	12,116	CYCLOPENTANONE	C5H8O	99,1	3,03E-02	*	1,96E+05	4,00E+04	20,43	8,88E+04	1,59E+04	17,87
316	18,051	1-HEPTADECENE	C17H34	81,8	3,08E-02	*	1,46E+05	6,36E+03	4,34	3,89E+05	7,65E+04	19,65

Anhang

168	14,79 9	MESITYL OXIDE	C6H10O	88,5	3,27E- 02	*	7,74E+0 5	2,38E+0 4	3,08	9,42E+0 5	6,40E+0 4	6,79
110	12,76 1	PROPYL PROPIONATE	C6H12O2	92,3	3,30E- 02	*	9,39E+0 3	1,41E+0 3	15,02	1,24E+0 5	3,71E+0 4	29,90
30	6,148	ISOPRENE	C5H8	82	3,41E- 02	*	5,76E+0 3	1,41E+0 3	24,47	1,60E+0 3	1,96E+0 2	12,21
382	19,17 7	UNDECANAL	C11H22O	85,2	3,43E- 02	*	2,04E+0 4	5,94E+0 2	2,91	1,42E+0 4	2,26E+0 3	15,90
12	3,78	L-ALANINE	C3H7NO2	81	3,45E- 02	*	3,24E+0 4	1,69E+0 3	5,20	5,01E+0 4	6,44E+0 3	12,86
273	17,23 1	3-METHYL-2-CYCLOHEXEN- 1-ONE	C7H10O	89,5	3,48E- 02	*	3,28E+0 5	3,32E+0 4	10,13	2,37E+0 5	3,71E+0 4	15,65
668	24,13 3	2,6-BIS(TERT-BUTYL)-4- METHYLPHENOL	C15H24O	95,6	3,51E- 02	*	7,14E+0 4	4,81E+0 3	6,73	1,83E+0 6	5,86E+0 5	32,05
779	26,00 6	HEXADECANOL	C16H34O	96,2	3,61E- 02	*	5,69E+0 5	3,09E+0 4	5,44	4,18E+0 5	6,33E+0 4	15,12
344	18,50 4	DODECANE	C12H26	85	3,66E- 02	*	9,48E+0 4	8,19E+0 2	0,86	2,59E+0 5	5,60E+0 4	21,62
77	10,60 5	PROPIONIC ACID	C3H6O2	84,4	3,74E- 02	*	1,00E+0 2	1,90E+0 1	18,93	1,19E+0 4	4,08E+0 3	34,17
35	6,564	2-ETHOXYETHANOL	C4H10O2	81	3,74E- 02	*	1,46E+0 3	8,25E+0 1	5,64	3,07E+0 3	5,73E+0 2	18,66
777	25,97 3	HEXADECANOL	C16H34O	96	3,97E- 02	*	1,62E+0 6	2,67E+0 4	1,64	1,15E+0 6	1,74E+0 5	15,18
203	15,85 9	HEPTYL FORMATE	C8H16O2	94,2	4,26E- 02	*	6,09E+0 3	6,58E+0 2	10,81	2,99E+0 4	8,87E+0 3	29,66
373	19,04 5	3-BUTYLPYRIDINE	C9H13N	85,4	4,30E- 02	*	6,66E+0 4	7,17E+0 3	10,76	2,73E+0 5	7,76E+0 4	28,44
76	10,56 1	4-BROMOPHENYLBORIC ACID	C6H6BBrO2	82,7	4,39E- 02	*	3,71E+0 2	5,85E+0 2	157,46	9,31E+0 4	3,48E+0 4	37,40
79	10,75 2	HEPTANE	C7H16	98,1	4,71E- 02	*	1,11E+0 4	1,10E+0 3	9,93	8,65E+0 3	9,71E+0 2	11,22

Anhang

Tabelle 23: Ergebnisse der Featureanalyse der Untersuchung des extrazellulären volatilen Metaboloms von *P. aeruginosa* unter CF-ähnlichen Bedingungen im in vitro Biofilmmodell und unter Verwendung des ASM-Agars. In der Tabelle ist der Vergleich der Feature zwischen den Stämmen *P. aeruginosa* FRD1 und PAO1 ($n = 3$, je Bakterienstamm) gezeigt. Außerdem wurden die Metabolite mittels der MoNA Datenbank.

Alignme nt ID	RT [min]	Metabolitname	Summenfor mel	Scor e [%]	p-Wert	Lev el	MW FRD	SD FRD	RSD FRD	MW PAO	SD PAO	RSD PAO
497	21,11	DIFURFURYL ETHER	C10H10O3	85,7	2,93E- 10	***	8,86E+0 6	2,67E+0 4	0,30	2,83E+0 5	2,30E+0 4	8,14
346	18,51 4	DI-N-BUTYLAMINE	C8H19N	85,8	2,06E- 06	***	1,75E+0 5	2,39E+0 5	136,44	8,62E+0 6	2,56E+0 5	2,97
646	23,74 2	ALPHA- BUTYLCINNAMALDEHYDE	C13H16O	84,2	1,53E- 04	***	5,39E+0 5	1,84E+0 4	3,41	2,35E+0 5	9,16E+0 3	3,89
986	29,54 3	PALMITIC ACID	C16H32O2	88,7	6,27E- 04	***	1,32E+0 5	6,09E+0 3	4,62	6,56E+0 4	8,43E+0 3	12,85
277	17,28 9	3-METHOXYPROPYLAMINE	C4H11NO	82	7,24E- 04	***	1,84E+0 6	8,39E+0 5	45,49	8,40E+0 6	5,61E+0 5	6,68
80	10,80 9	DIMETHYLACETAL	C4H10O2	83,6	1,99E- 03	**	6,27E+0 2	1,88E+0 1	3,00	2,19E+0 2	4,98E+0 1	22,71
206	15,91 1	HEXANOIC ACID	C6H12O2	89,5	2,96E- 03	**	1,71E+0 4	2,02E+0 3	11,79	5,64E+0 2	5,54E+0 2	98,28
474	20,75 1	PENTADECANE	C15H32	80,2	3,34E- 03	**	9,91E+0 4	6,59E+0 3	6,65	5,90E+0 4	2,93E+0 3	4,97
96	12,14 9	2-HEXANONE	C6H12O	96	4,98E- 03	**	1,07E+0 4	1,55E+0 3	14,46	3,83E+0 3	1,00E+0 3	26,09
30	6,148	ISOPRENE	C5H8	82	5,50E- 03	**	1,60E+0 3	1,96E+0 2	12,21	2,16E+0 2	3,29E+0 1	15,21
741	25,34 5	ISOPROPYL LAURATE	C15H30O2	94,3	6,56E- 03	**	1,66E+0 6	2,28E+0 5	13,80	8,12E+0 4	2,19E+0 4	26,94
109	12,67 7	PROPYL PROPIONATE	C6H12O2	92,4	9,97E- 03	**	1,31E+0 4	2,16E+0 3	16,52	9,87E+0 2	2,06E+0 2	20,91
627	23,47 8	TRANS-2-DODECENYL ACETATE	C14H26O2	86,3	1,14E- 02	*	2,46E+0 5	5,31E+0 4	21,63	2,09E+0 6	3,63E+0 5	17,40
345	18,51	TETRADECANE	C14H30	94,4	1,23E- 02	*	1,31E+0 6	2,94E+0 5	22,47	2,58E+0 6	8,50E+0 4	3,30
99	12,26	ISOBUTYL METHYL KETONE	C6H12O	97,9	1,56E- 02	*	3,42E+0 4	6,25E+0 3	18,30	1,50E+0 4	4,85E+0 3	32,34
752	25,54 1	BENZOPHENONE	C13H10O	87,8	1,68E- 02	*	1,05E+0 5	6,89E+0 3	6,57	5,77E+0 4	1,46E+0 4	25,31

Anhang

1069	31,16 1	(Z)-6-OCTADECENOIC ACID METHYL ESTER	C19H36O2	82,3	1,93E- 02	*	1,26E+0 4	8,16E+0 2	6,50	4,51E+0 3	2,38E+0 3	52,81
295	17,61 7	OCTANOL	C8H18O	96,7	2,06E- 02	*	9,38E+0 4	1,04E+0 4	11,13	6,46E+0 4	7,84E+0 3	12,14
644	23,72 1	DELTA-OCTALACTONE	C8H14O2	80,8	2,14E- 02	*	2,02E+0 4	2,53E+0 3	12,50	2,63E+0 5	6,26E+0 4	23,83
104	12,45 8	HEXANAL	C6H12O	98,1	2,32E- 02	*	1,62E+0 4	1,65E+0 3	10,20	8,33E+0 3	2,88E+0 3	34,55
117	13,01 8	FURFURAL	C5H4O2	89,7	2,37E- 02	*	5,41E+0 5	4,81E+0 4	8,88	1,36E+0 5	1,33E+0 5	97,72
224	16,27 1	BUTYL BUTYRATE	C8H16O2	94,6	2,72E- 02	*	1,40E+0 5	3,98E+0 4	28,50	3,83E+0 3	1,92E+0 3	50,02
132	13,63 8	FURFURYL ALCOHOL	C5H6O2	97,9	2,75E- 02	*	2,68E+0 5	3,32E+0 4	12,40	6,95E+0 4	7,35E+0 4	105,81
252	16,86 5	NONANE	C9H20	80,6	2,76E- 02	*	1,13E+0 4	3,49E+0 2	3,08	7,61E+0 3	1,24E+0 3	16,30
316	18,05 1	1-HEPTADECENE	C17H34	81,8	2,91E- 02	*	3,89E+0 5	7,65E+0 4	19,65	1,38E+0 5	5,45E+0 3	3,94
190	15,53 5	5-METHYLFURFURAL	C6H6O2	92,8	3,21E- 02	*	3,79E+0 4	4,78E+0 3	12,62	1,56E+0 4	9,07E+0 3	58,18
110	12,76 1	PROPYL PROPIONATE	C6H12O2	92,3	3,39E- 02	*	1,24E+0 5	3,71E+0 4	29,90	1,08E+0 4	6,04E+0 2	5,60
315	18,03 8	METHYL BENZOATE	C8H8O2	80,4	3,43E- 02	*	1,65E+0 4	3,72E+0 3	22,63	5,78E+0 3	7,09E+0 2	12,27
203	15,85 9	HEPTYL FORMATE	C8H16O2	94,2	3,46E- 02	*	2,99E+0 4	8,87E+0 3	29,66	4,69E+0 3	1,78E+0 3	37,93
668	24,13 3	2,6-BIS(TERT-BUTYL)-4- METHYLPHENOL	C15H24O	95,6	3,48E- 02	*	1,83E+0 6	5,86E+0 5	32,05	7,34E+0 4	3,40E+0 4	46,32
255	16,94 5	2-ETHYLHEXANOL	C8H18O	92,4	3,58E- 02	*	9,18E+0 5	1,67E+0 5	18,25	5,12E+0 5	1,50E+0 5	29,22
344	18,50 4	DODECANE	C12H26	85	3,68E- 02	*	2,59E+0 5	5,60E+0 4	21,62	1,06E+0 5	1,21E+0 4	11,44
184	15,40 1	3-METHYLCYCLOHEXANONE	C7H12O	97,4	3,71E- 02	*	4,07E+0 5	1,06E+0 5	25,99	1,30E+0 5	2,98E+0 4	22,93
77	10,60 5	PROPIONIC ACID	C3H6O2	84,4	3,72E- 02	*	1,19E+0 4	4,08E+0 3	34,17	6,91E+0 1	8,65E+0 0	12,53
654	23,86 9	TRICOSANE	C23H48	91,3	3,78E- 02	*	1,88E+0 5	4,30E+0 4	22,93	8,89E+0 4	2,39E+0 4	26,82

Anhang

76	10,56 1	4-BROMOPHENYLBORIC ACID	C6H6BBrO2	82,7	4,39E- 02	*	9,31E+0 4	3,48E+0 4	37,40	3,14E+0 2	1,72E+0 2	54,82
----	------------	----------------------------	-----------	------	--------------	---	--------------	--------------	-------	--------------	--------------	-------

Tabelle 24: Ergebnisse der Featureanalyse der Untersuchung des extrazellulären volatilen Metaboloms von *P. aeruginosa* unter CF-ähnlichen Bedingungen im in vitro Biofilmmodell und unter Verwendung des ASM-Agars. In der Tabelle ist der Vergleich der Feature zwischen den Stämmen *P. aeruginosa* ATCC 10145 und PAO1 ($n = 3$, je Bakterienstamm) gezeigt. Außerdem wurden die Metabolite mittels der MoNA Datenbank.

Alignme nt ID	RT [min]	Metabolitname	Summenfor mel	Scor e [%]	p-Wert	Lev el	MW ATCC	SD ATCC	RSD ATCC	MW PAO	SD PAO	RSD PAO
315	18,03 8	METHYL BENZOATE	C8H8O2	80,4	9,89E- 05	***	2,13E+0 4	1,09E+0 3	5,11	5,78E+0 3	7,09E+0 2	12,27
471	20,71 5	1,4-DI-TERT-BUTYLBENZENE	C14H22	87,5	1,74E- 03	**	1,37E+0 6	8,05E+0 4	5,89	6,27E+0 5	1,22E+0 5	19,44
385	19,23 9	1-DECANOL	C10H22O	93,9	2,65E- 03	**	5,80E+0 5	4,72E+0 4	8,14	2,99E+0 5	2,50E+0 4	8,35
92	12,02 5	TOLUENE	C7H8	94,7	3,43E- 03	**	4,50E+0 5	6,22E+0 4	13,82	7,73E+0 4	7,77E+0 4	100,46
986	29,54 3	PALMITIC ACID	C16H32O2	88,7	1,11E- 02	*	1,14E+0 5	1,39E+0 4	12,20	6,56E+0 4	8,43E+0 3	12,85
345	18,51	TETRADECANE	C14H30	94,4	1,46E- 02	*	2,21E+0 6	1,16E+0 5	5,23	2,58E+0 6	8,50E+0 4	3,30
184	15,40 1	3-METHYLCYCLOHEXANONE	C7H12O	97,4	1,47E- 02	*	2,24E+0 5	1,90E+0 4	8,50	1,30E+0 5	2,98E+0 4	22,93
66	9,747	FORMIC ACID BUTYL ESTER	C5H10O2	88,6	1,75E- 02	*	2,97E+0 3	8,28E+0 2	27,90	5,13E+0 2	6,58E+0 2	128,33
627	23,47 8	TRANS-2-DODECENYL ACETATE	C14H26O2	86,3	2,05E- 02	*	6,62E+0 5	2,58E+0 4	3,89	2,09E+0 6	3,63E+0 5	17,40
30	6,148	ISOPRENE	C5H8	82	2,08E- 02	*	5,76E+0 3	1,41E+0 3	24,47	2,16E+0 2	3,29E+0 1	15,21
777	25,97 3	HEXADECANOL	C16H34O	96	2,15E- 02	*	1,62E+0 6	2,67E+0 4	1,64	8,57E+0 5	2,05E+0 5	23,87
324	18,16 3	PELARGONALDEHYDE	C9H18O	93,4	2,24E- 02	*	1,32E+0 5	8,37E+0 3	6,33	1,98E+0 5	2,15E+0 4	10,85
585	22,71	TETRADECANE	C14H30	96,8	2,32E- 02	*	4,90E+0 5	5,72E+0 4	11,68	3,23E+0 5	5,69E+0 4	17,61

Anhang

71	10,17 6	1-METHOXY-2-PROPANOL	C4H10O2	86,9	2,42E- 02	*	7,26E+0 4	2,03E+0 4	27,94	4,49E+0 3	4,32E+0 3	96,39
140	13,97 7	1-HEXANOL	C6H14O	92,1	2,80E- 02	*	3,07E+0 3	1,63E+0 2	5,31	1,75E+0 3	4,64E+0 2	26,48
109	12,67 7	PROPYL PROPIONATE	C6H12O2	92,4	2,94E- 02	*	3,28E+0 2	2,74E+0 1	8,35	9,87E+0 2	2,06E+0 2	20,91
59	8,768	ACETIC ACID	C2H4O2	95,2	3,13E- 02	*	3,72E+0 4	1,20E+0 4	32,11	7,47E+0 3	6,23E+0 3	83,38
337	18,41 3	DODECANE	C12H26	94,1	3,27E- 02	*	1,27E+0 6	5,16E+0 4	4,08	1,62E+0 6	1,36E+0 5	8,40
1234	36,02 8	3,5-DI-TERT-BUTYL-4- HYDROXYBENZALDEHYDE	C15H22O2	86	3,42E- 02	*	4,46E+0 2	1,08E+0 2	24,23	1,92E+0 2	7,56E+0 1	39,43
924	28,45 8	PENTADECANE	C15H32	85,3	3,79E- 02	*	1,30E+0 5	2,64E+0 4	20,30	6,73E+0 4	1,18E+0 4	17,53
907	28,17 3	1-HEXADECANOL	C16H34O	85,3	4,08E- 02	*	3,45E+0 5	2,98E+0 4	8,63	1,52E+0 5	8,10E+0 4	53,24
304	17,80 7	2,6,11- TETRAMETHYLDODECANE	C15H32	80	4,23E- 02	*	8,93E+0 4	4,44E+0 3	4,97	7,97E+0 4	2,68E+0 3	3,37
215	16,02 5	PHENOL	C6H6O	95,9	4,31E- 02	*	2,35E+0 6	8,93E+0 5	37,98	4,20E+0 5	5,42E+0 5	129,09
288	17,48 4	ACETOPHENONE	C8H8O	84,2	4,32E- 02	*	3,34E+0 5	1,14E+0 4	3,41	2,76E+0 5	2,57E+0 4	9,31
595	22,92 8	1-TETRADECENE	C14H28	86,5	4,61E- 02	*	2,26E+0 5	7,45E+0 4	32,98	3,57E+0 4	7,99E+0 3	22,37
4	0,441	HEPTANEDIOIC ACID DIMETHYL ESTER	C9H16O4	85,5	4,62E- 02	*	1,33E+0 5	1,99E+0 3	1,50	9,71E+0 4	1,43E+0 4	14,72
320	18,12 7	PELARGONALDEHYDE	C9H18O	96,9	4,63E- 02	*	1,80E+0 5	2,29E+0 4	12,75	2,84E+0 5	4,81E+0 4	16,97
68	10,03 3	2-PENTANONE	C5H10O	92,2	4,95E- 02	*	8,00E+0 5	3,02E+0 5	37,71	1,27E+0 5	9,90E+0 4	78,14

Anhang

Anhang C Entwicklung und Anwendung einer Flüssigextraktionsmethode für TFME Sorptionsfilme zur Analyse von mVOCs mittels GCxGC-qMS

Ergänzung zum Kapitel 5.4.2:

Tabelle 25: Übersicht der blankreduzierten zuordbaren Analyten des Stammes *P. aeruginosa* ATCC 10145 unter aeroben Bedingungen inklusive der Retentionszeit und der Übereinstimmungswahrscheinlichkeit. Die Analyten wurden von dem beladenen TFME Film mit der Methode A (18 h Extraktion) desorbiert. Die Analyse erfolgte mit einem GCxGCq-MS.

Metabolit	Retentionszeit [min]	Übereinstimmungswahrscheinlichkeit (NIST-Datenbank) [%]
Phenol, 3,5-dimethyl-	18,594	87
Quinazoline, 2-methyl-	22,086	83
Benzoic acid, 3,5-dichloro-, methyl ester	24,425	79
Phenol, 2,4-bis(1,1-dimethyl)-	26,318	89
Ethanol, 2-(tetradecyloxy)-	28,278	87
7-Hexadecanonic acid, methyl ester, (Z),	36,451	83

Tabelle 26: Übersicht der blankreduzierten zuordbaren Analyten des Stammes *P. aeruginosa* ATCC 10145 unter aeroben Bedingungen inklusive der Retentionszeit und der Übereinstimmungswahrscheinlichkeit. Die Analyten wurden von dem beladenen TFME Film mit der Methode B (18 h Extraktion mit Konvektion) desorbiert. Die Analyse erfolgte mit einem GCxGCq-MS.

Metabolit	Retentionszeit [min]	Übereinstimmungswahrscheinlichkeit (NIST-Datenbank) [%]
-----------	----------------------	---

Keine Auswertung und Zuordnung von Peaks möglich, weil die Übereinstimmungswahrscheinlichkeit unterhalb von 80% lag!

Tabelle 27: Übersicht der blankreduzierten zuordbaren Analyten des Stammes *P. aeruginosa* ATCC 10145 unter aeroben Bedingungen inklusive der Retentionszeit und der Übereinstimmungswahrscheinlichkeit. Die Analyten wurden von dem beladenen TFME Film mit der Methode C (3 x 2 h Extraktion) desorbiert. Die Analyse erfolgte mit einem GCxGCq-MS.

Metabolit	Retentionszeit [min]	Übereinstimmungswahrscheinlichkeit (NIST-Datenbank) [%]
-----------	----------------------	--

Keine Zuordnung von Peaks möglich, weil die Übereinstimmungswahrscheinlichkeit unterhalb von 80% lag!

Tabelle 28: Übersicht der blankreduzierten zuordbaren Analyten des Stammes *P. aeruginosa* ATCC 10145 unter aeroben Bedingungen inklusive der Retentionszeit und der Übereinstimmungswahrscheinlichkeit. Die Analyten wurden von dem beladenen TFME Film mit der Methode D (3 x 2 h Extraktion mit Konvektion) desorbiert. Die Analyse erfolgte mit einem GCxGCq-MS.

Metabolit	Retentionszeit [min]	Übereinstimmungswahrscheinlichkeit (NIST-Datenbank) [%]
Ethanol, 2- (dodecyloxy)-	28,294	83
Methyl tetradecanolate	30,256	83
Hexadecanoic acid	37,668	89
9-Octadecenamide (Z)-	40,429	85

Anhang

Tabelle 29: Übersicht der blankreduzierten zuordbaren Analyten des Stammes *P. aeruginosa* ATCC 10145 unter aeroben Bedingungen inklusive der Retentionszeit und der Übereinstimmungswahrscheinlichkeit. Die Analyten wurden von dem beladenen TFME Film mit der Methode E (3 x 2 h Extraktion mit jeweils 15 min Ultraschallbehandlung) desorbiert. Die Analyse erfolgte mit einem GCxGCq-MS.

Metabolit	Retentionszeit [min]	Übereinstimmungswahrscheinlichkeit (NIST-Datenbank) [%]
Octadecanoic acid, methyl ester	36,780	88
9-Octadecenamide (Z)-	40,404	91
Octadecanoic acid, butyl ester	40,455	86

Anhang D Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1:** Schematische Darstellung des *in vitro* Biofilmmodells zur Kultivierung bakterieller Biofilme unter adaptierten Bedingungen einer CF-Lunge. In der Darstellung sind die Bestandteile des Modells, mit einer Petrischale aus Glas, in der sich das feste Agar-Nährmedium sowie der Biofilm befinden, gezeigt. Die Darstellung entspricht der Orientierung der Petrischale (Boden: oben; Deckel: unten) während der Kultivierung im Brutschrank. Graphik adaptiert von Koehler et al. [135]...... 56
- Abbildung 2:** Fotografische Aufnahmen der mit DAPI angefärbten Bakterienzellen von *P. aeruginosa* ATCC 10145 im Epifluoreszenzmikroskop. Die Fotografien a – c zeigen die Bakterienzellen, welche unter aeroben und die Fotografien d – f die Bakterienzellen die unter anaeroben Bedingungen bei 37 °C für 2 Tage auf LB-Agar kultiviert worden sind. Bei den Bildern a und d wurde eine Inokulationskonzentration von 10^4 Zellen·Platte⁻¹, bei b und e von 10^5 Zellen·Platte⁻¹ und bei c und f von 10^6 Zellen·Platte⁻¹ verwendet. 58
- Abbildung 3:** Ergebnisse der Gesamtzellzahlbestimmung mittels DAPI-Färbung und Auszählung im Epifluoreszenzmikroskop für die aerobe (Abb. a) und anaerobe (Abb. b) Kultivierung von *P. aeruginosa* ATCC 10145 im *in vitro* Biofilmmodell. Bei diesem Experiment wurde die Inokulationskonzentration variiert. Es wurden Inokulationskonzentrationen von 10^4 , 10^5 und 10^6 Zellen·Platte⁻¹ verwendet. 59
- Abbildung 4:** Graphische Darstellung der experimentell bestimmten Wachstumskurven unter aeroben („x“) und anaeroben („o“) Kultivierungsbedingungen. Die Wachstumskurven von *P. aeruginosa* ATCC 10145 wurde in einem Zeitraum von sieben Tage aufgenommen, wobei alle 24 h eine Beprobung stattfand. Hierzu wurden sieben Kultivierungsansätze je Kultivierungsbedingung im *in vitro* Biofilmmodell angezchtet. Zur graphischen Darstellung der Wachstumskurve wurde die ermittelte Gesamtzellzahl logarithmisch gegen die Kultivierungsdauer aufgetragen..... 61
- Abbildung 5:** Photographische Aufnahme von Biofilmen des Bakteriums *P. aeruginosa* ATCC 10145, welche im *in vitro* Biofilmmodell mit der entwickelten Methode kultiviert worden sind. Die Abbildung a zeigt den Biofilm nach 48 h Kultivierung bei 37 °C auf LB-Agar unter aeroben Bedingungen und die

Anhang

Abbildung b für die 48-stündige Kultivierung bei 37 °C auf LBN-Agar unter anaeroben Bedingungen..... 62

Abbildung 6: Photographische Aufnahme von Biofilmen der Bakterienstämme *P. aeruginosa* PAO1 (Abb. a und c) und FRD1 (Abb. b und d), welche im *in vitro* Biofilmmodell mit der entwickelten Methode kultiviert worden sind. Die Abbildungen a und b zeigen den jeweiligen Biofilm des entsprechenden Stammes nach 48 h Kultivierung bei 37 °C auf LB-Agar unter aeroben Bedingungen und die Abbildungen c und d für die 48-stündige Kultivierung bei 37 °C auf LBN-Agar unter anaeroben Bedingungen..... 64

Abbildung 7: Übersicht über die epifluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der mit DAPI angefärbten Bakterienzellen von *P. aeruginosa* PAO1 (Abb. a und b) und FRD1 (Abb. c und d) mit einer Inokulationskonzentration von 10^7 Zellen·Platte⁻¹. Die Abbildungen a und c zeigen die Kultivierung des jeweiligen Bakterienstammes bei 37 °C auf LB-Agar unter aeroben Bedingungen und die Abbildungen b und d bei 37 °C auf LBN-Agar unter anaeroben Bedingungen..... 65

Abbildung 8: Epifluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der mit DAPI angefärbten Bakterienzellen von *P. aeruginosa* ATCC 10145 (Abb. a und b) PAO1 (Abb. c und d) und FRD1 (Abb. e und f) mit einer Inokulationskonzentration von 10^7 Zellen·Platte⁻¹ unter aeroben (linke Spalte) und anaeroben (rechte Spalte) Kultivierungsbedingungen zur Bestimmung der mittleren Zelllänge. Die Kultivierung erfolgte für 48 h bei 37 °C auf LB- bzw. LBN-Agar..... 67

Abbildung 9: DTG-Kurven, normiert auf das Ausgangsgewicht, für alle drei Replikate (Repl. 1 = schwarz; Repl. 2 = rot; Repl. 3 = grün) der PDMS-Filme von Hersteller A (Abb. a) und Hersteller B (Abb. b). Ungefähr 5 mg der ausgewählten Folie wurden in einen Al₂O₃-Tiegel eingewogen und von 30 °C auf 900 °C mit einem Gradienten von 10 °·min⁻¹ erhitzt. Ein Stickstoff Gasstrom von 200 mL·min⁻¹ wurde in die Thermogravimetriekammer geleitet..... 73

Abbildung 10: TICs einer Analyse von Einzelstandards (n = 3), a: D4; b: D5; c: D6, mit TG-APPI-qMS. Für diese Untersuchungen wurden authentische Standards der drei zyklischen Siloxane verwendet. Es wurde eine dreifache Bestimmung jedes zyklischen Siloxans durchgeführt (schwarz = 1. Replikat; rot = 2. Replikat; blau = 3. Replikat) Zusätzlich ist der reale Temperaturgradient im

- TG-Ofen in grau dargestellt. Die genaue Temperatur wird in Grau auf der rechten y-Achse angezeigt. 74**
- Abbildung 11: Vergleich von drei möglichen Signalen von zyklischen Siloxanen, die in der APPI-Quelle während der TG-APPI-qMS-Analyse gebildet wurden. In jeder der Abbildungen ist das TIC (schwarz; 1/5 der Signalintensität) und die EICs für $[M]^+$ (grün), $[M+H]^+$ (blau) und $[M-CH_3]^+$ (rot) für a) D4 ($m/z [M]^+ = 296 \pm 0,3$; $[M+H]^+ = 297 \pm 0,3$; $[M-CH_3]^+ = 281 \pm 0$ dargestellt. 3) b) D5 ($m/z [M]^+ = 370 \pm 0,3$; $[M+H]^+ = 371 \pm 0,3$; $[M-CH_3]^+ = 355 \pm 0,3$) und c) D6 ($m/z [M]^+ = 444 \pm 0,3$; $[M+H]^+ = 445 \pm 0,3$; $[M-CH_3]^+ = 429 \pm 0,3$) gezeigt. 75**
- Abbildung 12: TG-APPI-qMS-Daten der Filme von a) Hersteller A und b) Hersteller B. In jedem Chromatogramm ist das TIC in Schwarz (1/5 der Signalintensität) sowie die EICs des Fragments $[M-CH_3]^+$ von D3 ($m/z = 207 \pm 0,3$; rot), D4 ($m/z = 281 \pm 0,3$; blau), D5 ($m/z = 355 \pm 0,3$; grün), D6 ($m/z = 429 \pm 0,3$; magenta) und D7 ($m/z = 503 \pm 0,3$; orange) dargestellt. Die rechte y-Achse und die graue Linie im Diagramm zeigen die gemessene Proben temperatur während der Analyse an. Die Filme wurden als Triplikate analysiert. 76**
- Abbildung 13: Weitere Untersuchungen der PDMS-Folie von Hersteller B. Der höchste Peak der DTG-Kurve und des TIC resultiert hauptsächlich aus einem Molekül mit einem m/z -Verhältnis von 353. Zur Veranschaulichung sind die EIC von $353 \pm 0,3$ im Vergleich zum TIC dargestellt. In grau ist das TIC (1/5 der Signalintensität) und in Rot das EIC gezeigt. 77**
- Abbildung 14: TIC der TD-GC-qMS Analyse des TFME Sorptionsmaterials des Herstellers A ohne vorherige Reinigung oder anderweitige Behandlung. 78**
- Abbildung 15: Chromatogramme der TD-GC-qMS Analyse der TFME Filme des Herstellers A nach einer vorherigen Behandlung mit LC-MS grade Methanol. a: nach 30-minütiger Behandlung mit Methanol; b: nach 60-minütiger Behandlung mit Methanol; c: nach 90-minütiger Behandlung mit Methanol; d: nach 120-minütiger Behandlung mit Methanol. 79**
- Abbildung 16: Chromatogramme der TD-GC-qMS Analyse der TFME Filme des Herstellers A nach einer vorherigen Behandlung mit LC-MS grade Methanol und 5% wässriger Decon 90 Lösung. a: 90 min Methanol und 30 min Decon 90; b: 90 min Methanol und 60 min Decon 90; c: 90 min Methanol und 90 min Decon 90; d: 90 min Methanol und 120 min Decon 90. 80**

Anhang

Abbildung 17: Chromatogramme der TD-GC-qMS Analyse der TFME Filme des Herstellers A nach einer vorherigen Behandlung mit LC-MS grade Methanol sowie 5% wässrigen Decon 90 Lösung und a: 1 Heizzyklus (50 °C bis 200 °C; Haltezeit: 120 min), b: 4 Heizzyklen (50 °C bis 200 °C; Haltezeit: jeweils 120 min) und c: 6 Heizzyklen (50 °C bis 200 °C; Haltezeit: jeweils 120 min).	81
Abbildung 18: TICs der Analyse der TFME-Filme von Hersteller A nach a) Lieferung und ohne Reinigung, b) nach 90 Minuten in Methanol, c) nach 90 Minuten in Methanol und 90 Minuten in 5% wässrige Decon 90 Lösung und d) nach dem gesamten Reinigungsverfahren einschließlich der thermischen Reinigung. Die Filme wurden mit TD-GC-qMS analysiert.	82
Abbildung 19: Veranschaulichung des Vorteils der Ofenraumkühlung, bzgl. der Detektion von niedrig siedenden Verbindungen und der Peakbreite, am Beispiel von Dimethyldisulfid (a) und 2-Methylbutanal (b). Hierzu wurden die Analyten des Multistandards mit einer Konzentration von 500 µM bzw. 50 µM auf TFME-Filmen sorbiert und mit dem TD-GC-qMS analysiert. Gezeigt sind Auszüge aus den TICs von der Analyse ohne (schwarz) und mit Ofenkühlung (blau).	84
Abbildung 20: Ergebnis der, mit der immersiven Methode, auf dem TFME Film sorbierten Modellsubstanzen. Aus dem TIC sind Vergrößerungen im Retentionszeitbereich von a) 6-8 min, b) 10-13 min, c) 13-17 min und d) 17-23 min gezeigt. Die zugeordneten Modellsubstanzen sind Dimethylsulfid (1, 6,86 min), 2-Methylbutanal (2, 10,75 min), Dimethyldisulfid (3, 12,57 min), 2-Hexanon (4, 13,35 min), 2-Heptanon (5, 15,31 min), 1-Octanol (6, 18,58 min), 2-Nonanon (7, 18,82 min), 1-Undecen (8, 19,02 min), 1-Decanol (9, 21,60 min) und 2-Aminoacetophenon (10, 22,00 min)	86
Abbildung 21: TICs der Analyse der volatilen Metabolite des Multistandards unter aeroben (a) und anaeroben (b) Kultivierungsbedingungen. 100 µL des Multistandards wurde auf dem LB- bzw. LBN-Agar ausplattiert und anschließend im in vitro Biofilmmodell kultiviert. Die Zuordnung der Peaks zu den Metaboliten wurden analog zu der Nummerierung in Tabelle 5 durchgeführt.	90
Abbildung 22: TIC der Analysen mit dem in vitro Biofilmmodell bei Verwendung des Stammes <i>P. aeruginosa</i> ATCC 10145 unter aeroben (a) oder anaeroben Bedingungen (b).	92

- Abbildung 23: Statistischer Vergleich zweier unterschiedlicher Wachstumsatmosphären (aerob und anaerob) bei der Kultivierung von *P. aeruginosa* ATCC 10145 im *in vitro* Biofilmmodell mittels einer PCA. Die Abbildung a zeigt den scores plot und die Abbildung b den loadings plot. Im loadings plot sind die Metabolite gekennzeichnet, welche in Abbildung 24 als Balkendiagramm gezeigt sind. 101**
- Abbildung 24: Graphische Darstellung des Vergleiches der Signalintensität unter aeroben und anaeroben Kultivierungsbedingungen von acht verschiedenen Metaboliten bei der Kultivierung von *P. aeruginosa* ATCC 10145 im *in vitro* Biofilmmodell. Die Mittelwerte der Signalintensitäten sowie die zugehörigen Standardabweichungen ($n = 9$) sind als Balkendiagramme dargestellt. Die Signifikanzanalyse der Differenz der Signalintensitäten wurde mit Hilfe eines t-Tests ($n = 9$, zweiseitige Verteilung, heteroskedastisch) durchgeführt. Die gezeigten Metabolite sind: a = 2-Methylpyrazin, b = Dimethyldisulfid, c = 5-Aminoquinolin, d = Methyl Isothiocyanat, e = 2-Nonanon, f = 2-Ethylhexanol. * = 0,05; ** = 0,01; *** = 0,001. 103**
- Abbildung 25: Beispiel für die Differenzierung der Kultivierungsbedingungen auf der Grundlage extrazellulärer flüchtiger Metaboliten. Zu diesem Zweck ist ein Ausschnitt der TICs aus der Abbildung 22 der Analyse von *P. aeruginosa* ATCC 10145 im Zeitraum von 17,5 min bis 21,5 min für aerobe (a) und anaerobe (b) Bedingungen dargestellt. Der linke Peak markiert den Metaboliten 1-Undecen, welcher nur unter aeroben Bedingungen gebildet wird. Im Chromatogramm der anaeroben Wachstumsbedingungen kann ein Peak bei gleicher Retentionszeit beobachtet werden. Dieser Peak resultiert jedoch aus dem LBN-Agar und ist auch im Verfahrensblank zu beobachten. Das zweite Beispiel (rechter Peak) zeigt 2-Undecanon, das nur unter anaeroben Bedingungen nachgewiesen werden kann. 104**
- Abbildung 26: Statistischer Vergleich zweier unterschiedlicher Wachstumsatmosphären (aerob und anaerob) bei der Kultivierung von *P. aeruginosa* PAO1 (Abb. a und b) und FRD1 (Abb. c und d) im *in vitro* Biofilmmodell mittels einer PCA. Die Abbildungen a und c zeigen die Ergebnisse der PCA als scores plots und die Abbildung b und d als loadings**

Anhang

plots. Im loadings plot sind die Metabolite gekennzeichnet, welche in der Abbildung 27 als Balkendiagramm gezeigt sind. 106

*Abbildung 27: Graphische Darstellung des Vergleiches der Signalintensität unter aeroben und anaeroben Kultivierungsbedingungen von acht verschiedenen Metaboliten bei der Kultivierung von P. aeruginosa PAO1 (Abb. a, b, e und f) sowie FRD1 (Abb. c, d, g, h) im in vitro Biofilmmodell. Die Mittelwerte der Signalintensitäten sowie die zugehörigen Standardabweichungen (n = 8) sind als Balkendiagramme dargestellt. Die Signifikanzanalyse der Differenz der Signalintensitäten wurde mit Hilfe eines T-Tests (n = 8, zweiseitige Verteilung, heteroskedastisch) durchgeführt. Die gezeigten Metabolite sind: a = 1-Tetradecen (PAO1), b = 3-Aminoquinolin (PAO1), c = Dimethyldisulfid (FRD1), d = 2-Aminoacetophenon (FRD1), e = 2,5-Hexadion (PAO1), f = Dimethyldisulfid (PAO1), g = Benzaldehyd (FRD1), h = 2-Hexanon (FRD1). * = 0,05; ** = 0,01; *** = 0,001. 107*

Abbildung 28: Vergleich der beiden Stämme P. aeruginosa FRD1 (Abb. a: blau) und PAO1 (Abb. b: rot) mit mukoiden bzw. nicht-mukoiden Phänotyp mittels PCA. Die Kultivierung von P. aeruginosa FRD1 und PAO1 erfolgte im in vitro Biofilmmodell unter anaeroben Bedingungen auf LBN-Agar. Die Abbildung a zeigt den scores plot und die Abbildung b den loadings plot. Im loadings plot sind die Metabolite gekennzeichnet, welche in der Abbildung 29 als Balkendiagramm gezeigt sind. 109

*Abbildung 29: Graphische Darstellung des Vergleichs der Signalintensität von sechs Metaboliten bei einer Kultivierung des mukoiden (P. aeruginosa FRD1) und nicht-mukoiden Stammes (P. aeruginosa PAO1) unter anaeroben Bedingungen auf LBN-Agar und im in vitro Biofilmmodell. Die Mittelwerte der Signalintensitäten sowie die zugehörigen Standardabweichungen (n = 8) sind als Balkendiagramme dargestellt. Die Signifikanzanalyse der Differenz der Signalintensitäten wurde mit Hilfe eines T-Tests (n = 8, zweiseitige Verteilung, heteroskedastisch) durchgeführt. Die gezeigten Metabolite sind: a = Octanol, b = Benzaldehyd, c = Propylbenzol, d = Dimethyldisulfid, e = 2-Undecanon, f = 4-Methylquinolin. * = 0,05; ** = 0,01; *** = 0,001. 110*

Abbildung 30: Vergleich zweier verschiedener Nährmedien (Abb. A: LBN = blau; PIAN = rot) bei einer Kultivierung der beiden Stämme P. aeruginosa PAO1 (a, b) sowie FRD1 (c, d) unter anaeroben Bedingungen im in vitro Biofilmmodell

<i>mittels PCA. Die Abbildung a zeigt den scores plot und die Abbildung b den loadings plot. Im loadings plot sind die Metabolite gekennzeichnet, welche in der Abbildung 31 als Balkendiagramm gezeigt sind.</i>	113
<i>Abbildung 31: Graphische Darstellung des statistischen Vergleichs der Signalintensität von vier Metaboliten bei einer Kultivierung auf LBN- bzw. PIAN-Agar unter anaeroben Bedingungen im in vitro Biofilmmodell. Hierzu wurden die Bakterienstämme P. aeruginosa PAO1 (a, b) sowie FRD1 (c, d) verwendet. Verglichen wurden fünf Replikate beider Stämme auf LBN-Agar und drei Replikate (FRD1) bzw. fünf Replikate (PAO1) auf PIAN-Agar. Die Mittelwerte der Signalintensitäten sowie die zugehörigen Standardabweichungen sind als Balkendiagramme dargestellt. Die Signifikanzanalyse der Differenz der Signalintensitäten wurde mit Hilfe eines T-Tests (zweiseitige Verteilung, heteroskedastisch) durchgeführt. Die gezeigten Metabolite sind: a = 1-Hexadecanol, b = Pentadecan, c = 2-Nonanon, d = 1-Octanol (alle ***; p ≥ 0,001).</i>	115
<i>Abbildung 32: Photographische Aufnahmen des ASM-Agars, ohne Sterilisation der Inhaltsstoffe, a: vor und b: nach der 48-stündigen Kultivierung unter aeroben Bedingungen bei 37 °C im in vitro Biofilmmodell.</i>	118
<i>Abbildung 33: Photographische Aufnahmen des ASM-Agars, mit a: Sterilisation aller Inhaltsstoffe und b: Sterilisation aller Inhaltsstoffe, mit Ausnahme des Eigelbes, nach der 48-stündigen Kultivierung unter aeroben Bedingungen bei 37 °C im in vitro Biofilmmodell.</i>	119
<i>Abbildung 34: Photographische Aufnahme des ASM-Agars, mit hinzugefügtem Kaliumnitrat, nach der 48-stündigen Kultivierung unter anaeroben Bedingungen bei 37 °C im in vitro Biofilmmodell.</i>	122
<i>Abbildung 35: Photographische Aufnahmen der Kultivierung von den beiden Stämmen P. aeruginosa PAO1 (a: aerob; b: anaerob) und FRD1 (c: aerob; d: anaerob) auf dem ASM-Agar. Es erfolgte eine 48-stündige Kultivierung bei 37 °C im in vitro Biofilmmodell.</i>	123
<i>Abbildung 36: Darstellung der Totalionenchromatogramme (TIC) der Analyse der TFME Filme aus der Kultivierung von a: P. aeruginosa ATCC 10145, b: P. aeruginosa PAO1 und c: P. aeruginosa FRD1 unter anaeroben Bedingungen und auf ASM-Agar im in vitro Biofilmmodell.</i>	126

Anhang

Abbildung 37: Vergleich der zur Verfügung stehenden *P. aeruginosa* Stämme (Abb. a: blau = ATCC 10145; rot = PAO1; schwarz = FRD1) mittels deren extrazellulären volatilen Metabolite. Die Kultivierung der drei Bakterienstämme erfolgte unter anaeroben Bedingungen sowie auf ASM-Agar im *in vitro* Biofilmmodell. Der Vergleich wurde mittels PCA durchgeführt. In Abbildung a ist der scores und in Abbildung b der loadings plot gezeigt. Im loadings plot sind die Metabolite gekennzeichnet, welche in Abbildung 38 und Abbildung 39 als Balkendiagramm gezeigt sind...... 127

Abbildung 38: Graphische Darstellung des statistischen Vergleiches der Signalintensität von zwölf Metaboliten bei einer Kultivierung auf ASM-Agar unter anaeroben Bedingungen im *in vitro* Biofilmmodell. Hierzu wurde der Bakterienstamm *P. aeruginosa* FRD1 mit dem Stamm *P. aeruginosa* ATCC 10145 (a, d, g, j), der Stamm *P. aeruginosa* FRD1 mit dem Stamm *P. aeruginosa* PAO1 (b, e, h, k) sowie der Stamm *P. aeruginosa* ATCC 10145 mit dem Stamm *P. aeruginosa* PAO1 (c, f i, l) verglichen. Je Bakterienstamm wurden drei Replikate analysiert. Die Mittelwerte der Signalintensitäten sowie die zugehörigen Standardabweichungen sind als Balkendiagramme dargestellt. Die Signifikanzanalyse der Differenz der Signalintensitäten wurde mit Hilfe eines T-Tests ($n = 3$; zweiseitige Verteilung, heteroskedastisch) durchgeführt. Die gezeigten Metabolite sind: a = Benzophenon, b = Tetradecan, c = Toluol, d = 2-Ethylhexanal, e = 3-Methoxypropylamin, f = Trans-2-Dodecylacetat, g = 1-Hexadecanol, h = Pentadecan, i = Methylbenzoat, j = 2-Octanon, k = Isopren, l = 1-Decanol. * = 0,05; ** = 0,01; * = 0,001.**..... 130

Abbildung 39: Vergleich der mittleren Signalintensitäten ($n = 3$) von zwei extrazellulären volatilen Metaboliten zwischen den Bakterienstämmen *P. aeruginosa* ATCC 10145, PAO1 und FRD1. Die Bakterienstämme wurden unter anaeroben Bedingungen auf ASM-Agar im *in vitro* Biofilmmodell kultiviert. Die Mittelwerte der Signalintensitäten sowie die zugehörigen Standardabweichungen ($n = 3$) sind als Balkendiagramme dargestellt. Die Abbildung a zeigt die Signalintensitäten des Metabolits Dibutylamin und die Abbildung b die Signalintensitäten des Metabolite 2-Hexanon...... 131

Abbildung 40: Contour-Plot der GCxGC-qMS Analyse des Mixstandards ($c = 100 \mu\text{M}$) mit der initialen Methode. Mittels NIST-Datenbank konnten die

Metabolite Dimethyldisulfid (3), 2-Hexanon (4), 2-Heptanon (5), 1-Octanol (6), 2-Nonanon (7) und 2-Aminoacetophenon (8), zugeordnet werden.....	136
Abbildung 41: Contour-Plot der GCxGC-qMS Analysen des Mixstandards (c = 100 µM) mit variierender initialen Haltezeit (a: 0,2 min; b: 4,5 min; c: 6 min). Mittels NIST-Datenbank konnten die Metabolite 2-Methylbutanal (2), Dimethyldisulfid (3), 2-Hexanon (4), 2-Heptanon (5), 1-Octanol (6), 2-Nonanon (7) und 2-Aminoacetophenon (8) zugeordnet werden.....	
Abbildung 42: Contour-Plot der GCxGC-qMS Analysen des Mixstandards (c = 100 µM) mit der optimierten Haltezeit sowie variierender Heizraten (a: 10 °C·min⁻¹; b: 6 °C·min⁻¹; c: 5 °C·min⁻¹; d: 4 °C·min⁻¹). Mittels NIST-Datenbank konnten die Metabolite 2-Methylbutanal (2), Dimethyldisulfid (3), 2-Hexanon (4), 2-Heptanon (5), 1-Octanol (6), 2-Nonanon (7) und 2-Aminoacetophenon (8) zugeordnet werden.....	137
Abbildung 43: Contour-Plots der GCxGC-qMS Analyse der methanolischen Extrakte der TFME Filme von <i>P. aeruginosa</i> ATCC 10145. Abbildung a zeigt die Ergebnisse der Flüssiginjektion des ursprünglichen methanolischen Extraktes. In Abbildung b sind die Ergebnisse der Flüssiginjektion des methanolischen Extraktes nach der Aufkonzentrierung, mittels Verdampfung und Resuspension in Methanol, gezeigt.....	138
Abbildung 44: Darstellung der Ergebnisse der methanolischen Extrakte der TFME Filme der extrazellulären volatilen Metabolite von <i>P. aeruginosa</i> ATCC 10145 in Contour-Plots. In diesen Versuchen wurde das Splitverhältnis bei der GCxGC-qMS Analyse variiert. In Abbildung a bis c sind die Ergebnisse mit einem Splitverhältnis von 1:10, 1:5 und im splitless Modus gezeigt.....	143
Abbildung 45: Contour-Plots der GCxGC-qMS Analysen verschiedener Extraktionsmethoden von TFME Filmen, welche mit extrazellulären volatilen Metaboliten von <i>P. aeruginosa</i> ATCC 10145 im <i>in vitro</i> Biofilmmodell beladen worden sind. Abbildung a: 18-stündige methanolische Extraktion ohne Konvektion; b: 18-stündige methanolische Extraktion mit Konvektion; c: 3 x 2-stündige methanolische Extraktion ohne Konvektion; d: 3 x 2-stündige methanolische Extraktion mit Konvektion; e: 3 x 2-stündige methanolische Extraktion ohne Konvektion und im Anschluss jeder 2-stündigen Extraktion eine 15-minütige Behandlung im Ultraschallbad.....	144
Abbildung 45: Contour-Plots der GCxGC-qMS Analysen verschiedener Extraktionsmethoden von TFME Filmen, welche mit extrazellulären volatilen Metaboliten von <i>P. aeruginosa</i> ATCC 10145 im <i>in vitro</i> Biofilmmodell beladen worden sind. Abbildung a: 18-stündige methanolische Extraktion ohne Konvektion; b: 18-stündige methanolische Extraktion mit Konvektion; c: 3 x 2-stündige methanolische Extraktion ohne Konvektion; d: 3 x 2-stündige methanolische Extraktion mit Konvektion; e: 3 x 2-stündige methanolische Extraktion ohne Konvektion und im Anschluss jeder 2-stündigen Extraktion eine 15-minütige Behandlung im Ultraschallbad.....	145

Anhang

Abbildung 46: Contour-Plots der GCxGC-qMS Analyse von aufkonzentrierten, methanolischen Extrakten der extrazellulären volatilen Metabolite von <i>P. aeruginosa</i> ATCC 10145. Die Biofilme des Bakteriums wurden unter aeroben (Abb. a) und anaeroben (Abb. b) Bedingungen im <i>in vitro</i> Biofilmmodell auf LB-Agar bzw. LBN-Agar bei 37 °C kultiviert.	147
Abbildung 47: Contour-Plots der GCxGC-qMS Analyse von aufkonzentrierten, methanolischen Extrakten der extrazellulären volatilen Metabolite von <i>P. aeruginosa</i> PAO1 (a, b) und FRD1 (c, d). Die Biofilme der beiden Bakterien wurden unter aeroben (a bzw. c) und anaeroben (b bzw. d) Bedingungen im <i>in vitro</i> Biofilmmodell auf LB-Agar bzw. LBN-Agar bei 37 °C kultiviert.	149
Abbildung 48: TICs der Analyse des extrazellulären volatilen Metaboloms von <i>P. aeruginosa</i> ATCC 10145 unter aeroben Bedingungen bei 37 °C auf LB-Agar im <i>in vitro</i> Biofilmmodell. Es wurden neun Replikate mittels TFME beprobt und mit der TD-GC-qMS Methode analysiert.	i
Abbildung 49: TICs der Analyse des extrazellulären volatilen Metaboloms von <i>P. aeruginosa</i> ATCC 10145 unter anaeroben Bedingungen bei 37 °C auf LBN-Agar im <i>in vitro</i> Biofilmmodell. Es wurden neun Replikate mittels TFME beprobt und mit der TD-GC-qMS Methode analysiert.	ii
Abbildung 50: TICs der Analyse des extrazellulären volatilen Metaboloms von <i>P. aeruginosa</i> FRD1 mittels TD-GC-qMS. Die Kultivierung erfolgte im <i>in vitro</i> Modell auf LB-Agar unter aeroben Bedingungen bei 37 °C.	iii
Abbildung 51: TICs der Analyse des extrazellulären volatilen Metaboloms von <i>P. aeruginosa</i> FRD1 mittels TD-GC-qMS. Die Kultivierung erfolgte im <i>in vitro</i> Modell auf LBN-Agar unter anaeroben Bedingungen bei 37 °C.	iv
Abbildung 52: TICs der Analyse des extrazellulären volatilen Metaboloms von <i>P. aeruginosa</i> PAO1 mittels TD-GC-qMS. Die Kultivierung erfolgte im <i>in vitro</i> Modell auf LB-Agar unter aeroben Bedingungen bei 37 °C.	v
Abbildung 53: TICs der Analyse des extrazellulären volatilen Metaboloms von <i>P. aeruginosa</i> PAO1 mittels TD-GC-qMS. Die Kultivierung erfolgte im <i>in vitro</i> Modell auf LBN-Agar unter anaeroben Bedingungen bei 37 °C.	vi
Abbildung 54: Verfahrensblank des <i>in vitro</i> CF-Biofilmmodells. Der Verfahrensblank wurde dem <i>in vitro</i> CF-Biofilmmodell entnommen, welches nur das Nährmedium LB- bzw. LBN enthält. Dargestellt ist der TIC des	

<i>prozeduralen Blanks von a) der aeroben Kultur (LB-Agar) und b) der anaeroben Kultur (LBN-Agar).</i>	vii
<i>Abbildung 55: TICs der Analyse des extrazellulären volatilen Metaboloms von P. aeruginosa FRD1 mittels TD-GC-qMS. Die Kultivierung erfolgte im in vitro Modell auf PIAN-Agar unter anaeroben Bedingungen bei 37 °C.</i>	xix
<i>Abbildung 56: TICs der Analyse des extrazellulären volatilen Metaboloms von P. aeruginosa PAO1 mittels TD-GC-qMS. Die Kultivierung erfolgte im in vitro Modell auf PIAN-Agar unter anaeroben Bedingungen bei 37 °C.</i>	xix
<i>Abbildung 57: Verfahrensblank des in vitro CF-Biofilmmodells bei einer Kultivierung auf PIAN-Agar unter anaeroben Bedingungen. Der Verfahrensblank wurde dem in vitro Biofilmmodell entnommen, welches nur das Nährmedium PIAN enthält.</i>	xx
<i>Abbildung 58: TICs der Analyse des extrazellulären volatilen Metaboloms von P. aeruginosa ATCC 10145 mittels TD-GC-qMS. Die Kultivierung erfolgte im in vitro Modell unter CF-ähnlichen Bedingungen. Hierfür wurde drei Replikate auf ASM-Agar unter anaeroben Bedingungen bei 37 °C im in vitro Biofilmmodell kultiviert. Die Beprobung des Gasraumes erfolgte mittels der TFME auf kommerziellen PDMS-Filmen.</i>	xxxiv
<i>Abbildung 59: TICs der Analyse des extrazellulären volatilen Metaboloms von P. aeruginosa FRD1 mittels TD-GC-qMS. Die Kultivierung erfolgte im in vitro Modell unter CF-ähnlichen Bedingungen. Hierfür wurde drei Replikate auf ASM-Agar unter anaeroben Bedingungen bei 37 °C im in vitro Biofilmmodell kultiviert. Die Beprobung des Gasraumes erfolgte mittels der TFME auf kommerziellen PDMS-Filmen.</i>	xxxiv
<i>Abbildung 60: TICs der Analyse des extrazellulären volatilen Metaboloms von P. aeruginosa PAO1 mittels TD-GC-qMS. Die Kultivierung erfolgte im in vitro Modell unter CF-ähnlichen Bedingungen. Hierfür wurde drei Replikate auf ASM-Agar unter anaeroben Bedingungen bei 37 °C im in vitro Biofilmmodell kultiviert. Die Beprobung des Gasraumes erfolgte mittels der TFME auf kommerziellen PDMS-Filmen.</i>	xxxiv
<i>Abbildung 61: Verfahrensblank des in vitro CF-Biofilmmodells bei einer Kultivierung unter CF-ähnlichen Bedingungen (37 °C; anaerobe Bedingungen)</i>	

Anhang

auf ASM-Agar. Der Verfahrensblank wurde dem in vitro Biofilmmodell entnommen, welches nur das Nährmedium ASM enthält..... XXXV

Anhang E Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1: Übersicht über die verwendeten Konzentrationen der Kalibrierniveaus sowie der verwendeten Volumina von der Stammlösung der D-Glucuronsäure und des Reinstwassers für die Herstellung der Kalibrierniveaus aus der Stammlösung.</i>	<i>47</i>
<i>Tabelle 2: Übersicht über die verwendeten Parameter für die Featureanalyse, Dekonvolierung und Zuordnung („identification“) mit Hilfe der Software MS-DIAL.</i>	<i>52</i>
<i>Tabelle 3: Übersicht über die aus den epifluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der mit DAPI angefärbten Bakterienzellen von P. aeruginosa ATCC 10145, PAO1 und FRD1 bestimmten mittleren Zelllängen sowie deren Standardabweichung und der prozentualen Abweichung der mittleren Zelllänge zwischen der aeroben und anaeroben Kultivierung des jeweiligen P. aeruginosa Stammes. Die Kultivierung erfolgte im in vitro Biofilmmodell bei 37 °C mit einer Inokulationskonzentration von 10⁷ Zellen·Platte⁻¹ und einer Inkubationszeit von 48 Stunden auf LB- bzw. LBN-Agar.</i>	<i>68</i>
<i>Tabelle 4: Übersicht über die ermittelten Peakbreiten in halber Höhe (FWHM) für ausgewählte Modellsubstanzen, mit und ohne Verwendung der Ofenraumkühlung.</i>	<i>85</i>
<i>Tabelle 5: Übersicht über die ermittelten instrumentellen Nachweis- (LOD) und Bestimmungsgrenzen (LOQ) für die ausgewählten Modellsubstanzen. Die Substanzen wurden auf einem TFME Film aus einem Multistandard im immersiven Modus adsorbiert und mit der beschriebenen TD-GC-qMS Methode analysiert. Die Konzentrationen der Modellsubstanzen im Multistandard wurden dabei zwischen 5 fM bis 500 µM variiert.</i>	<i>88</i>
<i>Tabelle 6: Übersicht über die Retentionszeiten der Analyten 2-Nonanon und 1-Undecen bei einer Beprobung mittels TFME und anschließender TD-GC-qMS Analyse. Aufgeführt sind die Retentionszeiten der Beprobung des Multistandards aus dem in vitro Biofilmmodell und des Bakteriums P. aeruginosa ATCC 10145 aus dem in vitro Biofilmmodell.</i>	<i>93</i>
<i>Tabelle 7: Zusammenfassung der berechneten Mittelwerte, Standardabweichungen und relativen Standardabweichungen der Retentionszeit, Peakfläche und -höhe sowie des NIST scores für neun</i>	

Anhang

Replikate der TD-GC-qMS Analyse von extrazellulären volatilen Metaboliten im in vitro Biofilmmodell unter aeroben Kultivierungsbedingungen. Ausgewertet wurden die Signale von 1-Undecen, Cyclododekan und 2-Methylquinoxalin. Bei den neun Replikaten handelt es sich um je drei technische Replikate von drei biologischen Replikaten des Bakteriums *P. aeruginosa* ATCC 10145..... 95

Tabelle 8: Zusammenfassung der berechneten Mittelwerte, Standardabweichungen und relativen Standardabweichungen der Retentionszeit, Peakfläche und -höhe sowie des NIST scores für neun Replikate der TD-GC-qMS Analyse von extrazellulären volatilen Metaboliten im in vitro Biofilmmodell unter anaeroben Kultivierungsbedingungen.

Ausgewertet wurden die Signale von 2,5-Dimethyl-pyrazin, 2-Nonanon und 2-Undecanon. Bei den neun Replikaten handelt es sich um je drei technische Replikate von drei biologischen Replikaten des Bakteriums *P. aeruginosa* ATCC 10145..... 96

Tabelle 9: Übersicht über die Gesamtzellzahlen (z) der Biofilme des Bakteriums *P. aeruginosa* FRD1 bei einer Kultivierung unter aeroben bzw. anaeroben Bedingungen auf ASM-Agar mit variierenden Kaliumnitratkonzentrationen. Es erfolgte eine 48-stündige Kultivierung bei 37 °C im in vitro Biofilmmodell..... 120

Tabelle 10: Vergleichende Übersicht über die Gesamtzellzahlen (z), KBE-Werte (y), des Anteiles der lebenden Zellen an der Gesamtzellzahl sowie des Uronsäuregehalts bei den Stämmen *P. aeruginosa* PAO1 und FRD1 bei einer aeroben und anaeroben Kultivierung. Es erfolgte eine 48-stündige Kultivierung bei 37 °C im in vitro Biofilmmodell..... 124

Tabelle 11: Übersicht über die Anzahl der ermittelten Metabolite mit einer signifikanten Abweichung der Signalintensität sowie der Zuordnung zu den verschiedenen Signifikanzlevel..... 128

Tabelle 12: Zusammenfassung der Ergebnisse zur Flüssigextraktion der mit Modellsubstanzen beladenen TFME Filme mit verschiedenen Lösungsmitteln. Zusätzlich wurde bei einigen Lösungsmitteln eine Verdampfung mit anschließender Resuspendierung in Methanol durchgeführt. 141

Tabelle 13: Ergebnisse der Zuordnung von extrazellulären volatilen Metaboliten des Bakteriums *P. aeruginosa* ATCC 10145. Die Zuordnung wurde mittels der NIST Datenbank durchgeführt, wobei Metabolite mit einem NIST Score von mehr als 80% als zugeordnet charakterisiert worden sind. In dieser Tabelle sind

die zugeordneten Metabolite mit der zugehörigen Retentionszeit sowie dem NIST Score aufgeführt.....	148
<i>Tabelle 14: Ergebnisse der Zuordnung von extrazellulären volatilen Metaboliten des Bakteriums P. aeruginosa PAO1. Die Zuordnung wurde mittels der NIST Datenbank durchgeführt, wobei Metabolite mit einem NIST Score von mehr als 80% als zugeordnet charakterisiert worden sind. In dieser Tabelle sind die zugeordneten Metabolite mit der zugehörigen Retentionszeit sowie dem NIST Score aufgeführt.....</i>	
.....	150
<i>Tabelle 15: Ergebnisse der Zuordnung von extrazellulären volatilen Metaboliten des Bakteriums P. aeruginosa FRD1. Die Zuordnung wurde mittels der NIST Datenbank durchgeführt, wobei Metabolite mit einem NIST Score von mehr als 80% als zugeordnet charakterisiert worden sind. In dieser Tabelle sind die zugeordneten Metabolite mit der zugehörigen Retentionszeit sowie dem NIST Score aufgeführt.....</i>	
.....	151
<i>Tabelle 16: Ergebnisse der Featureanalyse des Experimentes zur Untersuchung des extrazellulären volatilen Metaboloms von P. aeruginosa ATCC 10145 bei unterschiedlichen Wachstumsatmosphären (aerob und anaerob) im in vitro Biofilmmodell. Außerdem wurden die Metabolite mittels der MoNA Datenbank.....</i>	
.....	viii
<i>Tabelle 17: Ergebnisse der Featureanalyse des Experimentes zur Untersuchung des extrazellulären volatilen Metaboloms von P. aeruginosa FRD1 bei unterschiedlichen Wachstumsatmosphären (aerob und anaerob) im in vitro Biofilmmodell. Außerdem wurden die Metabolite mittels der MoNA Datenbank.....</i>	
.....	xi
<i>Tabelle 18: Ergebnisse der Featureanalyse des Experimentes zur Untersuchung des extrazellulären volatilen Metaboloms von PAO1 bei unterschiedlichen Wachstumsatmosphären (aerob und anaerob) im in vitro Biofilmmodell. Außerdem wurden die Metabolite mittels der MoNA Datenbank.....</i>	
.....	xiv
<i>Tabelle 19: Ergebnisse der Featureanalyse des Experimentes zur Untersuchung des extrazellulären volatilen Metaboloms von P. aeruginosa Stämmen mit mukoidem und nicht-mukoidem Phänotyp. Die Kultivierung der Stämme P. aeruginosa PAO1 (nicht-mukoid) und FRD1 (mukoid) erfolgten im in</i>	

Anhang

in vitro Biofilmmodell. Für die Kultivierung wurde eine Temperatur von 37 °C sowie anaerobe Bedingungen und LBN als Nährmedium gewählt. Außerdem wurden die Metabolite mittels der MoNA Datenbank. xvii

Tabelle 20: Ergebnisse der Featureanalyse des Experimentes zur Untersuchung des extrazellulären volatilen Metaboloms von *P. aeruginosa* FRD1 bei einer anaeroben Kultivierung im *in vitro* Biofilmmodell auf LBN- und PIAN-Agar. Außerdem wurden die Metabolite mittels der MoNA Datenbank. ... xxii

Tabelle 21: Ergebnisse der Featureanalyse des Experimentes zur Untersuchung des extrazellulären volatilen Metaboloms von *P. aeruginosa* PAO1 bei einer anaeroben Kultivierung im *in vitro* Biofilmmodell auf LBN- und PIAN-Agar. Außerdem wurden die Metabolite mittels der MoNA Datenbank. . xxvi

Tabelle 22: Ergebnisse der Featureanalyse der Untersuchung des extrazellulären volatilen Metaboloms von *P. aeruginosa* unter CF-ähnlichen Bedingungen im *in vitro* Biofilmmodell und unter Verwendung des ASM-Agars. In der Tabelle ist der Vergleich der Feature zwischen den Stämmen *P. aeruginosa* ATCC 10145 und FRD1 (n = 3, je Bakterienstamm) gezeigt. Außerdem wurden die Metabolite mittels der MoNA Datenbank. xxxvi

Tabelle 23: Ergebnisse der Featureanalyse der Untersuchung des extrazellulären volatilen Metaboloms von *P. aeruginosa* unter CF-ähnlichen Bedingungen im *in vitro* Biofilmmodell und unter Verwendung des ASM-Agars. In der Tabelle ist der Vergleich der Feature zwischen den Stämmen *P. aeruginosa* FRD1 und PAO1 (n = 3, je Bakterienstamm) gezeigt. Außerdem wurden die Metabolite mittels der MoNA Datenbank. xl

Tabelle 24: Ergebnisse der Featureanalyse der Untersuchung des extrazellulären volatilen Metaboloms von *P. aeruginosa* unter CF-ähnlichen Bedingungen im *in vitro* Biofilmmodell und unter Verwendung des ASM-Agars. In der Tabelle ist der Vergleich der Feature zwischen den Stämmen *P. aeruginosa* ATCC 10145 und PAO1 (n = 3, je Bakterienstamm) gezeigt. Außerdem wurden die Metabolite mittels der MoNA Datenbank. xlii

Tabelle 25: Übersicht der blankreduzierten zuordbaren Analyten des Stammes *P. aeruginosa* ATCC 10145 unter aeroben Bedingungen inklusive der Retentionszeit und der Übereinstimmungswahrscheinlichkeit. Die Analyten wurden von dem beladenen TFME Film mit der Methode A (18 h Extraktion) desorbiert. Die Analyse erfolgte mit einem GCxGCq-MS. xliii

Tabelle 26: Übersicht der blankreduzierten zuordbaren Analyten des Stammes *P. aeruginosa* ATCC 10145 unter aeroben Bedingungen inklusive der Retentionszeit und der Übereinstimmungswahrscheinlichkeit. Die Analyten wurden von dem beladenen TFME Film mit der Methode B (18 h Extraktion mit Konvektion) desorbiert. Die Analyse erfolgte mit einem GCxGCq-MS. xlv

Tabelle 27: Übersicht der blankreduzierten zuordbaren Analyten des Stammes *P. aeruginosa* ATCC 10145 unter aeroben Bedingungen inklusive der Retentionszeit und der Übereinstimmungswahrscheinlichkeit. Die Analyten wurden von dem beladenen TFME Film mit der Methode C (3 x 2 h Extraktion) desorbiert. Die Analyse erfolgte mit einem GCxGCq-MS..... xlv

Tabelle 28: Übersicht der blankreduzierten zuordbaren Analyten des Stammes *P. aeruginosa* ATCC 10145 unter aeroben Bedingungen inklusive der Retentionszeit und der Übereinstimmungswahrscheinlichkeit. Die Analyten wurden von dem beladenen TFME Film mit der Methode D (3 x 2 h Extraktion mit Konvektion) desorbiert. Die Analyse erfolgte mit einem GCxGCq-MS..... xlv

Tabelle 29: Übersicht der blankreduzierten zuordbaren Analyten des Stammes *P. aeruginosa* ATCC 10145 unter aeroben Bedingungen inklusive der Retentionszeit und der Übereinstimmungswahrscheinlichkeit. Die Analyten wurden von dem beladenen TFME Film mit der Methode E (3 x 2 h Extraktion mit jeweils 15 min Ultraschallbehandlung) desorbiert. Die Analyse erfolgte mit einem GCxGCq-MS..... xlv

Wissenschaftliche Publikationen in peer-reviewed Journalen

Veröffentlicht:

T. Koehler, I. Ackermann, D. Brecht, F. Uteschil, J. Wingender, U. Telgheder*, O.J. Schmitz*, *Analysis of volatile metabolites from in vitro biofilms of Pseudomonas aeruginosa with thin-film microextraction by thermal desorption gas chromatography-mass spectrometry*, Anal. Bioanal. Chem. **(2020)**.
<https://doi.org/10.1007/s00216-020-02529-4>.

Wissenschaftliche Vorträge

T. Koehler*, U. Telgheder, J. Wingender, O. J. Schmitz, *Bakterielle Lungeninfektionen: Wie die Thermodesorption GC-MS helfen kann, eine Früherkennung zu entwickeln*, Gerstel Anwenderseminar 2019, **09.05.2019**, Mülheim a.d.R., Deutschland.

T. Koehler*, I. Ackermann, J. Wingender, U. Telgheder, O. J. Schmitz, *Bakterielle Lungeninfektionen: Wie die Thermodesorption-GC-MS für eine Früherkennung von P. aeruginosa eingesetzt werden*, 30. Doktorandenseminar des AK Separation Science, **12. – 14.01.2020**, Hohenroda, Deutschland.

T. Koehler*, I. Ackermann, J. Wingender, U. Telgheder, O. J. Schmitz, *How bacterial pneumonia and cystic fibrosis fit together: A metabolomic approach for the analysis of mVOCS from Pseudomonas aeruginosa biofilms*, Agilent Clinical Research Webinar, **16.06.2020**.

Posterbeiträge

T. Koehler*, O. J. Schmitz, S. W. Meckelmann, *Characterization of the human plasma lipidome using LC-IM-qTof-MS*, analytica conference 2018, **10. – 12.04.2018**, München, Deutschland.

Anhang G Curriculum Vitae

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.