

Aus der Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie und Intensivtherapie
der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock

Direktorin: Frau Prof. Dr. med. G. Nöldge-Schomburg

Universität
Rostock



Traditio et Innovatio

NACHWEIS VOLATILER ORGANISCHER VERBINDUNGEN
ZUR IDENTIFIZIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG VON
MYCOBACTERIUM AVIUM (SUBSP. *PARATUBERCULOSIS*)

INAUGURALDISSERTATION

zur

Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin (Dr. med.)
der Medizinischen Fakultät
der Universität Rostock

vorgelegt von

Klaus Klepik, geboren am 02. Juli 1986 in Ingolstadt

Rostock, 22. September 2017

GUTACHTER

Gutachter:

1. Prof. Dr. med. Dipl. chem. Jochen Schubert D.E.A.A.
Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie und Intensivtherapie
Universitätsmedizin Rostock
2. Prof. Dr. rer. nat. habil. Bernd Kreikemeyer
Institut für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene
Universitätsmedizin Rostock
3. Prof. Dr. vet. habil. Dr. sc. vét. Petra Reinhold
Institut für molekulare Pathogenese (IMP)
Friedrich-Loeffler-Institut

Datum der Einreichung: 29. September 2017

Datum der Verteidigung: 16. Mai 2018

INHALTSVERZEICHNIS

Abbildungsverzeichnis	5
Tabellenverzeichnis	6
Abkürzungsverzeichnis	7
1 Einleitung	8
1.1 Flüchtige organische Verbindung als Biomarker bakterieller Prozesse	8
1.2 Gasanalyse über bakteriellen Kulturen	10
1.3 Paratuberkulose: Ökonomische Bedeutung und mögliche Assoziation	12
1.4 Paratuberkulose: Probleme der Diagnostik	12
1.5 Paratuberkulose: VOC als Früherkennung?	13
1.6 Zielstellung der Arbeit	13
2 Material und Methoden	14
2.1 Referenzsubstanzen	14
2.2 MAP-Kulturen	14
2.3 Präkonzentration mittels SPME	16
2.4 Analysen der Kulturen	16
2.5 Vorversuche – Ziele, Vorgehen	17
2.6 VOC Identifizierung, Kalibrierung und Quantifizierung	17
3 Ergebnisse	19
3.1 Ergebnisse der Vorversuche	19
3.2 Auswahl der relevanten VOCs	20
3.3 Identifikation und Quantifizierung	22
3.3.1 Muster von VOC-Markern in MAP-Kulturen	22
3.3.2 Furane	25
3.3.3 Aldehyde	25
3.3.4 Kohlenwasserstoffe	25
3.3.5 N- und S-enthaltende Verbindungen	25
3.4 Differenzierung von MAP-Stämmen und Medien	26
3.5 Auswirkungen des bakteriellen Bewuchses auf die VOC-Emissionen	27
4 Diskussion	30
4.1 Diskussion der Vorversuche	30
4.2 Identifizierung von MAP-Markern per Mikroextraktion	30
4.3 Markerprofileunterschiede zwischen den Kulturen	30
4.4 Markerprofile und das Wachstumsstadium	32
4.5 Limitationen und Ausblicke	33
5 Zusammenfassung und Thesen	35
5.1 Zusammenfassung	35

5.2 Thesen	35
Literaturverzeichnis	36
Selbstständigkeitserklärung	47
Tabellarischer Lebenslauf	48
6 Anhang	49
6.1 Danksagung	49
6.2 Originalpublikationen und Tagungsbeiträge	49
6.2.1 Originalpublikationen	49
6.2.2 Tagungsbeiträge	50

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

1.1 Schematische Darstellung der verwendeten SPME Apparatur zur manuellen Extraktion des Gasraumes bakterieller Kulturen	11
1.2 Schematische Darstellung des verwendeten GC-MS Systems zur Analyse volatiler Biomarker	12
2.1 Besiedeltes Kulturröhrchen mit Schrägagar und SPME im Headspace	15
2.2 Kalibriergeraden und Geradengleichung für (a) 2-Methylheptan und (b) 2-Ethylfuran	18
3.1 Tendenzielle Veränderungen der emittierten VOC-Menge durch Kultur JII-3197 am Beispiel von 2-Ethyl-Furan bei vier Wiederholungsmessungen innerhalb von acht Tagen	19
3.2 Wiederholungsmessungen der Leermedien innerhalb von acht Tagen am Beispiel Furan	21
3.3 Chromatogramme von ausgewählten Ionenspuren (m/z 43 und m/z 81) aus dem Headspace des Referenzstammes DSM 44133	22
3.4 Heatmap mit den ausgewählten VOCs aus fünf verschiedenen MAP-Stämmen und Medien mit quantitativen Daten	23
3.5 Heatmap mit den ausgewählten VOCs aus fünf verschiedenen MAP-Stämmen und Medien mit auf Maximalwerte normalisierten Daten	24
3.6 Hauptkomponentenanalyse der emittierten VOCs aus fünf verschiedenen MAP-Stämmen und den leeren Medien	26
3.7 Loading Plot zur Hauptkomponentenanalyse auf VOCs, bestehend aus den 34 identifizierten VOCs aus fünf verschiedenen MAP-Stämme und den leeren Medien	27
3.8 Vergrößerte Darstellung der positiven X und der negativen Y Achse der Abbildung 3.7	28
3.9 Konzentrationen von a) 2-Ethylfuran, b) 2-Methylfuran, c) 2-Pentylfuran, d) Ethylacetat, e) Dimethyldisulfid und f) 1-Methyl-1H-Pyrrol bei unterschiedlichen bakteriellen Bewuchs (oder Dichten) der fünf verglichenen Stämme	29

TABELLENVERZEICHNIS

2.1 Molekulargenetische Eigenschaften der untersuchten MAP-Stämme	15
2.2 Ausgangsparameter GC/MS	16
3.1 Ausgewählte Massenspuren und Kalibrierungsdaten der Referenzsubstanzen	20

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

<i>in vitro</i>	lateinischer Begriff; sinngemäß für im Reagenzglas
<i>in vivo</i>	lateinischer Begriff; sinngemäß für am lebenden Objekt
C-Typ	Rind-Typ
CFU	Größe zur Quantifizierung von Mikroorganismen (engl.: colony forming unit)
GC-MS	Gaschromatographie und Massenspektrometrie
GC	Gaschromatographie
HS	Gasraum (engl.: headspace)
IMS	Ionen-Mobilitäts-Spektrometer (engl.: ion-mobility spectrometry)
LOD	Nachweisgrenze (engl.: limit of detection)
LOQ	Bestimmungsgrenze (engl.: limit of quantification)
m/z	Masse-zu-Ladung
MAP	Mycobacterium avium subspecies (ssp.) paratuberculosis
MS	Massenspektrometrie
NIST	Nationales Institut für Standardisierung und Technologie (in den USA)
ParaTB	Paratuberkulose
PCA	Hauptkomponentenanalyse (engl.: principal component analysis)
PC	Hauptkomponente (engl.: principal component)
PDMS	Polydimethylsiloxan
ppbV	Milliardstel Volumenanteil (engl.: parts per billion by volume)
ppmV	Millionstel Volumenanteil (engl.: parts per million by volume)
PTR-MS	Protonentransfer-Reaktions-Massenspektrometrie (engl.: proton-transfer-reaction mass spectrometry)
S-Typ	Schaf-Typ
S/N	Signal-Rausch-Verhältnisses (engl.: signal-to-noise ratio)
SIFT-MS	Ionenfallenmassenspektrometer (engl.: selected-ion flow-tube mass spectrometry)
SPE	Festphasenextraktion (engl.: solid phase extraction)
SPME	Festphasenmikroextraktion (engl.: solid phase microextraction)
u	atomare Masseneinheit (engl.: unified atomic mass unit)
VOC	flüchtige organische Verbindung (engl.: volatile organic compound)

EINLEITUNG

1.1 FLÜCHTIGE ORGANISCHE VERBINDUNG ALS BIOMARKER BAKTERIELLER PROZESSE

VOLATILE organische Komponenten (engl.: volatile organic compounds (VOCs)) sind allgegenwärtig in der Atmosphäre, haben einen großen Einfluss auf ihre Zusammensetzung und spielen eine entscheidende Rolle bei der Klimaveränderung [1]. Die meisten VOCs werden in städtischen Gebieten durch Industrieemissionen [2] und in den ländlicheren Gegenden durch die Vegetation [3] erzeugt, da alle lebenden Organismen innerhalb ihres Stoffwechsels VOCs erzeugen [4]. So kann man sogar Bakterien *in vivo* oder *in vitro* isoliert auf einem Nährmedium oft durch einen artspezifischen Geruch erkennen. Ein Beispiel ist der seit langem bekannte Geruch von *Clostridien* [5, 6] und *Escherichia coli* [7], aber auch der von Hefekulturen [8]. Die von Bakterien erzeugten VOCs stellen ein weites Feld dar. Bis heute konnten über 800 verschiedene VOCs, die aus verschiedensten Verbindungen und Stoffklassen bestehen, von mehr als 300 Bakterien [9] detektiert werden. Einige Beispiele sind Stickstoff enthaltende Verbindungen, Alkohole, Aldehyde, kurzkettige Fettsäuren und deren Derivate, flüchtige Schwefelverbindungen, Alkane und aromatische Verbindungen [4].

Viele Bakterien emittieren eine Reihe von VOCs. Es wurden z. B. bis zu 80 verschiedene VOCs beim Bakterium *Streptomyces* [10], 34 bei *Streptococcus pneumoniae* und 28 bei *Haemophilus influenzae* nachgewiesen [11]. Dabei zeigten sich bei *Haemophilus influenzae* die ersten, für dieses Bakterium spezifischen VOCs bereits 1,5 Stunden nach Ansetzen der Kultur mit ungefähr 8×10^6 [CFU/ml] [12]. Bei *Neisseria meningitidis* konnten nicht nur 75 VOCs während des Wachstums identifiziert werden, sondern darüber hinaus ein Markerset, bestehend aus 1,2-Dimethylcyclopropan, 2-Methylpropanal, Methacrolein, N-2-dimethyl-1-propanamin und 3-Methylbutanal erstellt werden, das die Präsenz des Bakteriums anzeigt [13]. Des Weiteren wurde bei über 150 genetisch verschiedenen Stämmen von *Pseudomonas aeruginosa* nachgewiesen, dass Cyanwasserstoff erzeugt wurde [14, 15]. Bei anderen Bakterienarten dagegen, wie beispielsweise *Tolypothrix distorta*, *Phormidium* sp., *Rivularia* sp. und *Calothrix parietina*, erfolgt die Freisetzung spezifischer VOCs erst nach der Zerstörung der Zellstruktur [16].

Bis heute ist der ursächliche Grund, warum Mikroorganismen VOCs erzeugen nicht endgültig geklärt. Die Wirkorte der von Bakterien erzeugten VOCs lassen sich aber in vier verschiedene Bereiche einteilen:

- a) Wirkung auf Pilze
- b) Wirkung auf Pflanzen
- c) Wirkung auf Lebewesen
- d) Wirkung auf Bakterien [7]

Die verschiedenen Auswirkungen der VOCs auf den Empfänger können mit Kommunikation, Unterstützung, Angriff und Verteidigung beschrieben werden.

Im Bereich der Bakterien-Pilz-Kommunikation existieren multiple Mechanismen. Zum Beispiel verringern die VOCs von *Streptomyces griseus* die Sporulation von *Gloeosporium aridum* [17] oder führen bei *Sclerotium cepivorum* und *Rhizoctonia solani* zu früherer Bildung von Sklerotiden [17]. Die VOCs

einiger *Streptomyces* spp. (Candicidin und eine unbekannte Cycloheximid-Candicidin-Mischung) haben eine antimykotische Wirkung auf verschiedene Pilze und hindern diese am Keimen [18, 19, 20, 21]. Eine inhibierende Wirkung auf das Wachstum von Pilzen haben beispielsweise die VOCs von *Stenotrophomonas maltophilia*, *Pseudomonas trivialis* und *Burkholderia cepacia*, so dass das Wachstum von *Rhizoctonia solani* in 30–99 % der Fälle zum Erliegen kommt [22]. Kai et al. konnte zeigen, dass eine Mischung aus bis zu 30 VOCs für die inhibierende Wirkung verantwortlich sind, wobei die Gruppe nur β -Phenylethanol, trans-9-Hexadecen-1-ol, Undecen, Undecadien, Dodecanal, Benzylnitril, Benzylloxybenzonitril und Dimethyltrisulfid identifizieren konnte. Es wird vermutet, dass die Bakterien auf diese Weise ihr langsames Wachstum im Vergleich zu den konkurrierenden Pilzen ausgleichen wollen [23]. Im Gegensatz dazu kann *Pseudomonas monteilii* das Myzelwachstum von *Pisolithus albus* stimulieren [24]. Moore-Landecker und Stozky zeigten 1972 mit zehn verschiedenen Bakterien- und fünf Pilzarten, dass durch VOCs eine Veränderung der Kolonie- und Hyphenmorphologie erfolgte [25]. Auch scheinen die Effekte, die die von Bakterien erzeugten VOCs auf Pilze haben, artspezifisch zu sein, so dass eine Pilzgattung jeweils anders auf verschiedene Bakterien in ihrer Nähe reagiert [26].

In der Bakterien-Pflanzen-Kommunikation ist bekannt, dass Bakterien mit Hilfe erzeugter VOCs, wie z. B. 2,3-Butandiol und Acetoin, die Widerstandsfähigkeit von Pflanzen gegen bakterielle Schädlinge erhöhen können [27]. Für 2,3-Butandiol wurde jedoch ebenfalls eine Senkung der Widerstandsfähigkeit nachgewiesen [28]. Außerdem kann durch VOCs allgemein das Wachstum von Pflanzen gesteigert oder verringert werden [29, 30, 31]. Farag et al. beschrieben 2006 [30] in diesem Zusammenhang bei *Bacillus amyloliquefaciens* 2-Methyl-1-butanol, 3-Methyl-1-Butanol, Butanol-3-methylacetat und Butan-1-methoxy-3-methyl als mögliche Trigger-VOCs.

In der Kommunikation von Bakterien mit Lebewesen können bakterielle VOCs als Signalstoffe dienen, in dem sie z. B. auf Menschen abstoßend wirken [32] oder in dem sie die Proliferation und Cytokinproduktion von bestimmten Interleukinen durch Lymphozyten, abhängig von der Dosis von Buttersäure, Propionsäure, Valeriansäure, und Isovaleriansäuren, hemmen [33]. Auch können verschiedene Tiere angelockt [34, 35, 36, 37, 38, 39], oder deren Bewegungsmöglichkeiten eingeschränkt und letztendlich ganz zum Erliegen gebracht werden [40]. *Bursaphelenchus xylophilus* und *Panagrellus redivivus*, zwei Fadenwürmer, konnten mit Phenol, 2-Octanol, Benzaldehyd, Benzolacetaldehyd, Decanal, 2-Nonanon, 2-Undecanon, Cyclohexen und Dimethyldisulfid jeweils vollständig bewegungsunfähig gemacht werden. Mit VOCs als Lockstoffen gelang es bestimmten Bakterien, die auf Bambusblättern und der Weißeiche leben, *Aedes aegypti* anzulocken und zur Eiablage zu stimulieren [41]. Die wichtigsten Bestandteile sind Nonansäure, Tetradekansäure und Tetradekansäure-Methylester, so dass nun eine neue Möglichkeit besteht, den Vektor u.a. des Dengue- und Gelbfiebers unter Kontrolle zu bringen.

Für die Zell-zu-Zell-Kommunikation zwischen Bakterien gibt es Hinweise, dass VOCs als diffusionsfähige Signalfaktoren eine Rolle spielen [42, 43]. Zudem können die Bakterien ein sogenanntes Quorum Sensing [44, 45] betreiben und so erkennen, wie viele andere Zellen im direkten Umfeld existieren, wobei sie nicht nur VOCs erkennen, die sie selbst erzeugen, sondern auch solche, die nur von anderen Arten erzeugt werden können. Viele gram-negative Bakterien verwenden hierzu N-Acylhomoserinlactone, aber auch diverse Fettsäurederivate, wie z. B. 3-Hydroxypalmitinsäure-Methylester. Im Gegensatz dazu verwenden gram-positive Bakterien Aminosäuren oder modifizierte Peptide als Signalmoleküle. Von bakteriell erzeugten VOCs wird auch die Resistenz gegen Antibiotika durch die Expression von Multi-Drug-Exporteur-Genen [46, 47], die Fähigkeit zur Bildung eines Biofilmes [48] und zur Erstellung [49] von hitzebeständigen Sporen und deren Menge [50] beeinflusst. Wrigley et al. zeigten 2003 am Beispiel der von *Bacteroides fragilis* erzeugten VOCs Acetat, Isobutyrat, Isovalerat und Succinat, dass *Clostridium perfringens* durch jene VOCs an der Bildung von Sporen behindert wurde.

Abgesehen von Bakterien behindern auch Pilzarten wie *Muscodor albus* mit Hilfe von VOCs andere Organismen (von Pilzen über Bakterien bis hin zu Nematoden und Arthropoden) teils so stark, dass diese absterben [51, 52].

Beachtet werden sollte im ganzen Bereich der bakteriellen VOCs zudem, dass sobald die entsprechenden VOCs nicht mehr an die Umgebung abgegeben werden, auch die damit verbundenen Effekte zurückgehen [53].

1.2 GASANALYSE ÜBER BAKTERIELLEN KULTUREN

DURCH Verbesserungen in der Analysetechnik seit Beginn der 80er Jahre wurden die nachweisbaren VOC-Konzentrationen in die Bereiche von nmol/l bis hin zu pmol/l abgesenkt. Möglich machten dies Fortschritte bei der Probenvorbereitung und den analytischen Methoden. Stetige Verbesserungen der Transportbehälter wie Beutel [54], Glaspipetten [55] oder von innen speziell beschichtete Gasbomben [56] machten es möglich, nicht nur am Ort der Probennahme die Analyten anzureichern und der weiteren Auswertung zuzuführen, sondern auch Proben in die Labore zu transportieren, um diese dort weiter zu verarbeiten.

Da von Mikroorganismen emittierte VOCs in Spurenkonzentrationen auftreten, muss die Probe vor der gaschromatographisch-massenspektrometrischen Analyse aufkonzentriert werden. Dazu wurde zunächst die Festphasenextraktion (engl.: solid phase extraction (SPE)) mit einem oder einer Kombination von mehreren Adsorptionsmaterialien verwendet. Materialien wie z. B. Aktivkohle [57], Tenax [58] oder graphitisierte Kohle [59] kommen zum Tragen. Die zu analysierenden Proben werden durch das Material geleitet und die Analyten reichern sich an den verwendeten Sorbentien an. Die Methode besitzt aber erhebliche Nachteile. Das für eine SPE-Messung benötigte Probenvolumen von 1–6 Liter [60, 61] ist relativ groß, womit diese Methode nicht einsetzbar ist, wenn nur wenig Gasvolumen zur Verfügung steht. Zudem verursachen die hohen Probefolumina einen großen Zeitaufwand bei der Probenahme. Schlussendlich ist auch die Desorption zur Analyse problematisch, da es bei Verwendung von Lösungsmitteln zu Verunreinigungen und zu Nebenreaktionen kommen kann. Die Thermodesorption mit anschließender Kryofokussierung [62] benötigt zwar nicht den Einsatz von Lösungsmitteln, ist aber aufwändig und führt unter anderem zur Kondensation von in der Probe enthaltenem Wasser. Die Verwendung von Trockenmittel, um dieses Problem zu beheben, kann zu einem Verlust an Analyten führen.

Eine große Weiterentwicklung für die Spurenanalytik gelang 1990 Arthur und Pawliszyn [63] mit der Entwicklung der Festphasenmikroextraktion (engl.: solid phase microextraction (SPME)). Hier werden die Analyten auf einer mit einem oder mehreren Sorbentien beschichteten Quarzglasfaser angereichert. Je nach physikochemischen Eigenschaften (Molekulargewicht, Polarität) des Analyten und den zu erwartenden Verteilungskoeffizienten (Gas/Fasermaterial) wird der geeignete Fasertyp ausgewählt. Ein wichtiger Unterschied zwischen SPME und SPE ist, dass sich bei der SPME nach einer gewissen Zeit ein Verteilungsgleichgewicht zwischen den Analyten in der Gasphase und der Faserbeschichtung einstellt und ab diesem Zeitpunkt keine weitere Anreicherung mehr möglich ist. Ein wesentlicher Vorteil der SPME-Technologie gegenüber der SPE ist das geringe benötigte Probefolumen von nur noch 10–20 mL [64], so dass nicht nur die zur Probenahme benötigte Zeit verringert, sondern auch neue Anwendungsgebiete eröffnet werden. Auch bei der SPME müssen im Anschluss an die Präkonzentration die angereicherten Stoffe von ihren Sorbentien entweder thermisch [59] oder per Mikrowellenenergie [58] desorbiert werden. Dies ist im Vergleich zur SPE weniger komplex, weniger zeitaufwändig und weniger fehleranfällig, da die thermische Desorption direkt im heißen Injektor des

Gaschromatographen erfolgen kann. Die SPME-Technologie kommt häufig in der pharmazeutischen, toxikologischen und in der Umweltanalytik zur Anwendung [65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72].

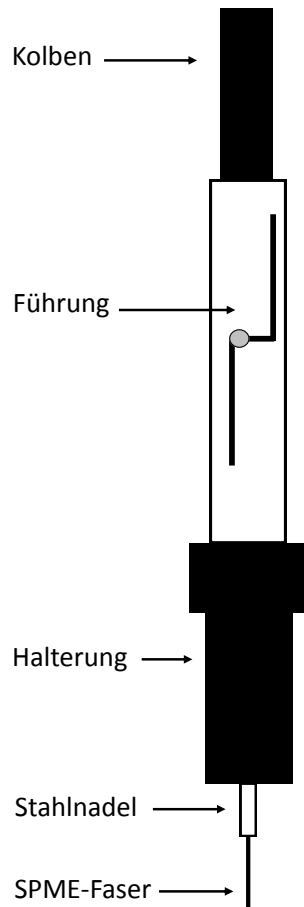


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der verwendeten SPME Apparatur zur manuellen Extraktion des Gasraumes bakterieller Kulturen

Auch in der Analysetechnik wurde eine Vielzahl von verschiedenen Methoden etabliert. Der Standard ist die Nutzung der Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS) [73, 74]. Im Gaschromatographen wird die desorbierte Probe von einem Inertgas durch eine Quarzglassäule, die im Inneren mit einer stationären Phase beschichtet ist, geleitet. Das Inertgas (mobile Phase) besteht meist aus Stickstoff oder Helium. Als stationäre Phase kommen u.a. Polydimethylsiloxan, Polyethylenglykol oder poröse Polymere zum Einsatz. Mit Hilfe eines Temperaturprogramms kann die Analyse optimiert werden. Die Trennung der Analyten erfolgt in Abhängigkeit vom Siedepunkt und den Wechselwirkungen der Analyten mit der stationären Phase. Am Ende der Säule registriert ein massenselektiver Detektor das zeitliche Auftreten der verschiedenen Komponenten. In den meisten Fällen handelt es sich dabei um ein sogenanntes Quadrupol-Massenspektrometer. Die Zeit, die eine Substanz benötigt, um das jeweilige chromatographische System zu durchlaufen, wird als Retentionszeit bezeichnet.

Im an das GC angeschlossenen MS werden die aus der Säule ankommenden Analyten mit Elektronen beschossen, wodurch sie fragmentiert und ionisiert werden. Die entstandenen Ionen werden dann anhand ihres Masse-zu-Ladungsverhältnisses detektiert. Das entstehende Fragmentmuster gibt Aufschluss über die Struktur des Analyten.

Die Identifizierung der Substanzen erfolgt anhand ihrer Retentionszeit und ihres charakteristischen Massenspektrums. Durch die zusätzliche Messung reiner Referenzsubstanzen ist eine eindeutige Iden-

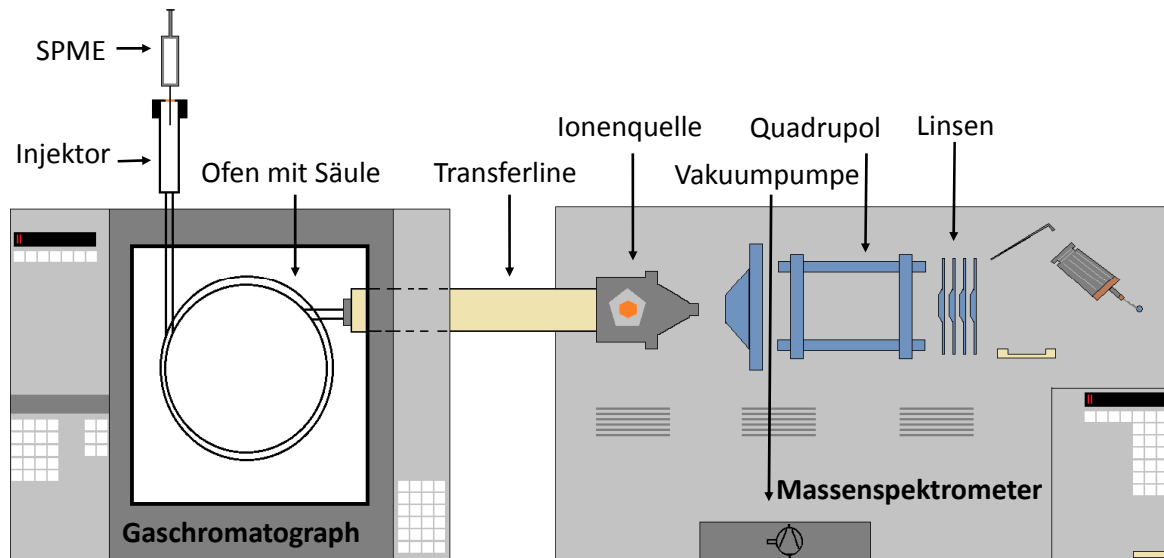


Abbildung 1.2: Schematische Darstellung des verwendeten GC-MS Systems zur Analyse volatiler Biomarker

tifizierung der Analyten möglich. Um eine quantitative Aussage zu treffen, können Kalibrierungen mit definierten Standards aus Referenzsubstanzen durchgeführt werden. Die Entwicklungen der SPME-GC-MS erlaubt die Erfassung von VOCs in Spurenkonzentrationen, so dass die beschriebenen Techniken für die Untersuchung der flüchtigen Stoffwechselprodukte von Bakterien im Rahmen dieser Arbeit verwendet werden konnten.

1.3 PARATUBERKULOSE: ÖKONOMISCHE BEDEUTUNG UND MÖGLICHE ASSOZIATION

PARATUBERKULOSE (ParaTB), eine chronisch fortschreitende Enteritis der domestizierten und wildlebenden Wiederkäuer, ist in allen Ländern mit intensiver Milchviehhaltung, Rinder- oder Schafs-Industrie weit verbreitet. In den USA verursachen die abnehmende Produktivität der Milch- und Fleischrinder und kontaminierte Milch und Käse schätzungsweise jährliche Verluste von \$200 Mio. bis \$250 Mio. Darüber hinaus gibt es Hinweise, dass das *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP), der Erreger der ParaTB, ein Kofaktor chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen wie Morbus Crohn beim Menschen sein könnte [75].

1.4 PARATUBERKULOSE: PROBLEME DER DIAGNOSTIK

DIE Kontrolle der ParaTB bei Nutztieren wird durch das Fehlen geeigneter Tests zur Identifizierung der Tiere in der frühen Phase der Erkrankung erschwert. Dies ist der geringen Empfindlichkeit der direkten und indirekten diagnostischen Verfahren geschuldet [76]. Obwohl die ursprüngliche Infektion in der Regel kurz nach der Geburt erfolgt, erscheinen die klinischen Symptome, wie Gewichtsverlust und Durchfall, nicht selten erst mindestens zwei Jahre später. Ebenso sind MAP in den ersten Jahren nach der Infektion nicht in fäkalen Ausscheidungen oder durch Bildung spezifischer Antikörper nachweisbar. Die Konzentration der MAP-Bakterien im Kot erhöht sich mit dem Fortschritt der Erkrankung [77]. Es wurde festgestellt, dass eine starke positive Korrelation zwischen der Intensität des Ausscheidens von MAP und der Bildung von spezifischen Antikörpern besteht [78].

Zusätzlich zu den biologischen Möglichkeiten hat ein direkter Nachweis von MAP im Kot auch methodische Einschränkungen. Der Nachweis von MAP-Genom mit Hilfe der PCR kann zwar innerhalb von drei Tagen erfolgen, jedoch ist das Verfahren nur bei Tieren, die große Mengen an MAP-Bakterien ausscheiden, empfindlich genug. Die Anzucht der Bakterien aus Stuhlproben ist dagegen die empfindlichste Methode, aber zeitlich durch den langen Replikationszyklus von MAP begrenzt. Mit festen Medien sind zwischen 4 und 18 Wochen notwendig, um ein sichtbares Koloniewachstum zu erhalten. Daher werden verschiedene automatisierte Flüssigkultur-Systeme ausgenutzt, um die Anzucht von MAP zu beschleunigen. Diese Methoden beruhen entweder auf dem Nachweis von bakteriellen Metaboliten im Headspace über der Kulturbrühe, in der Brühe selbst [79, 80, 81, 82, 83], oder auf den Verbrauch von Gasen durch lebende Bakterien. Letzteres führt zu einer negativen Druckänderung innerhalb des Headspace der Kulturflasche [84]. Trotz der Verringerung des Zeitrahmens für die Anzucht sind diese Methoden nicht spezifisch für den Nachweis von Mykobakterien und benötigen eine anschließende Bestätigung der Anwesenheit von MAP durch einen nachgeschalteten Test. Darüber hinaus sind all jene Verfahren, die zu nichtspezifischen Signalen führen anfällig für Verunreinigung durch andere Mikroorganismen.

1.5 PARATUBERKULOSE: VOC ALS FRÜHERKENNUNG?

EIN schneller, kostengünstiger und empfindlicher Test für den Nachweis von MAP *in vivo* und *in vitro* wäre wünschenswert. Auf dem Wissen basierend, dass Bakterien VOCs emittieren [7, 85], wurden bereits eine Reihe von Studien durchgeführt, um potentielle flüchtige Biomarker für Mykobakterien zu identifizieren [86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95]. Erste positive Ergebnisse mit spezifischen VOCs wurden bei Versuchen mit *Mycobacterium tuberculosis* und *Mycobacterium bovis* erlangt [93]. Auch konnte derivatisiertes Methylnicotinat als spezifischer Marker für *Mycobacterium tuberculosis* bei positiven Versuchspersonen in signifikant höherer Konzentration in der Ausatemluft, im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe, nachgewiesen werden [94]. Zudem wurden Unterschiede in den VOC-Mustern von MAP-infizierten und nicht infizierten Tieren in ersten Pilotversuchen unter Anwendung unspezifischer Techniken, wie der elektronischen Nase [86] oder IMS [91], beschrieben. Obwohl diese Ergebnisse vielversprechend sind, fehlen bei den potentiellen Markern jegliche detaillierte Informationen hinsichtlich ihrer Identität oder ihres biochemischen Ursprungs [91].

1.6 ZIELSTELLUNG DER ARBEIT

ZIEL dieser Arbeit war es, VOC-Profile im Headspace verschiedener MAP-Kulturen eindeutig zu identifizieren und zu quantifizieren. Hieraus sollten MAP-spezifische VOC-Muster erstellt werden, die einen ersten Schritt in Richtung einer nicht-invasiven *in vitro* und *in vivo* MAP-Detektion darstellen können.

Folgende Fragen sollten mit dieser Arbeit im Detail beantwortet werden:

- a) Lassen sich mittels Mikroextraktion und Gaschromatographie/Massenspektrometrie volatile MAP-Marker identifizieren?
- b) Unterscheiden sich die Markerprofile verschiedener MAP-Stämme?
- c) Hängen die VOC-Profile und Konzentrationen vom Wachstumsstatus der Bakterien ab?

MATERIAL UND METHODEN

2.1 REFERENZSUBSTANZEN

ACETON, 2-Butanon, Hexanal, Methacrolein, Isopren und Benzol wurden von Ionimed Analytik GmbH (Innsbruck, Österreich) bezogen. Butan, Pentan, Hexan und 2-Ethoxy-2-Methylpropan wurden von Supelco (Bellefonte, USA) gekauft. Methylisobutylketon, 3-Octanon, 2-Heptanon, 2-Methyl-Propanol, 2-Methylpenten, Furan, 2-Methylpropanal, Heptan, Methylacetat, Ethylacetat, 2-Methyl-Tetrahydrofuran, 2-Ethylfuran, 2-Pentylfuran, 4-Methylheptan, Dimethyldisulfid, 2-Methylbutanenitril und 2-Methyl-2-Butenal kamen von Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland). Octane wurde von Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland) gekauft. 1-Methylpyrrol, 2,4-dimethylheptene, 4-Methyloctan, 3-Methylfuran, 3-Methylbutanal und 2,4-Dimethylheptan wurde von TCI Europe NV (Zwijndrecht, Belgien) bezogen. Die SPME-Fasern (PDMS-Carboxen 75 µm) wurden bei Supelco (Bellefonte, USA) gekauft.

2.2 MAP-KULTUREN

DIE MAP-Stämme wurden auf Herrold Eigelb-Kulturmedien mit Mycobactin J und Amphotericin, Nalidixinsäure und Vancomycin (HEYM-MJ, Becton Dickinson, Sparks, USA) kultiviert. Zwei Loops (standardisierte Menge Bakterien in einer 5 mm Impföse, von Bakteriologen verwendet) Bakterien wurden in 4 ml Middlebrook 7H9 Flüssigmedium, welches Ölsäure, Albumin, Dextrose, Katalase, Mycobactin J, Polymyxin B, Amphotericin B, Carbenicillin und Trimethoprim (MB) enthält, in Suspension gebracht. Die Bakteriensuspension wurde anschließend gründlich mit sterilen Glasperlen verwirbelt und die nicht gelösten Bakterienaggregate konnten sich absetzen. Aus dem Überstand wurden Verdünnungen von 10^0 , 10^{-2} , 10^{-4} und 10^{-6} hergestellt.

200 µl bakterieller Suspensionen wurden jeweils auf die geeigneten Flächen des HEYM-MJ Nährmediums geimpft. Die Kulturröhrchen wurden mit Silikon-/Teflon-Septen verschlossen.

Die Kulturen wurden bei 37 °C in horizontaler Position für eine Woche und anschließend in aufrechter Position für fünf weitere Wochen inkubiert. Pro Verdünnung und MAP Stamm wurden auf diese Weise zwei Proben angesetzt. Zwei Kulturröhrchen HEYM-MJ Nährboden ohne Beimpfung mit Bakterien dienten als Kontrolle. Die folgenden MAP-Stämme wurden verwendet:

- DSM 44133 (ATCC19689), angepasster Laborstamm
- JIII-386, Feldstamm von Schafen
- JII-2421, Feldstamm von Rindern
- JII-3197, Feldstamm von Rindern
- JII-0817, Feldstamm von Rotwild

Die Feldstämme wurden primär aus Gewebe des Ileums (JIII-386), des Intestinums (JII-0817) oder aus Kot (Stamm JII-2421 und Stamm JII-3197) isoliert und nach den empfohlenen Standardprotokol-

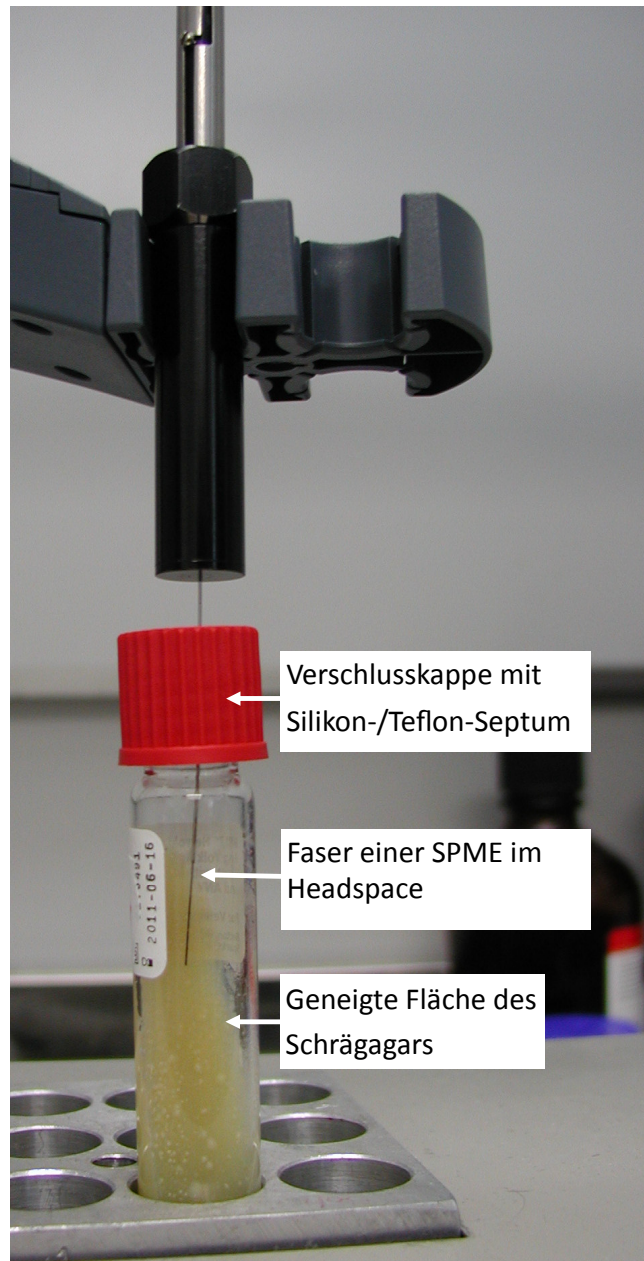


Abbildung 2.1: Besiedeltes Kulturröhrchen mit Schrägagar und SPME im Headspace

len des nationalen Referenzlabors kultiviert. Die molekulargenetischen Merkmale der Stämme sind in Tabelle 2.1 aufgeführt.

Tabelle 2.1: Molekulargenetische Eigenschaften der untersuchten MAP-Stämme. Tabelle modifiziert nach Trefz et al. [96].

			IS900-RFLP [97]	MIRU-VNTR [98]	MLSSR [99]
			BstI-PstII	Loci 292-X3-25-47-3-7-10-32	Loci 1-2-8-9
1	ATCC 19698	C-type [100]	C5-P1	32332228	7-10-5-5
2	JIII-386	S-type#	I6-P13	42131118	7-12-3-4
3	JII-2421	C-type	C1-P1	32332228	7-11-4-4
4	JII-3197	C-type	C1-P1	22522226	7-(-)-4-4
5	JII-0817	C-type	C17-P8	32332228	7-11-4-4

Type III

2.3 PRÄKONZENTRATION MITTELS SPME

DIE VOCs im Headspace über den MAP Kulturen wurden mittels SPME aufkonzentriert. Für alle Messungen wurden Carboxen/PDMS-Fasern mit einer Stärke von 75 μm (Supelco, Belfonte PA) verwendet. Bevor die SPME-Fasern zum ersten Mal verwendet wurden, wurden sie im Injektor eines GC bei 300 °C eine Stunde lang konditioniert. Anschließend wurde die Spitze der Faser mit einer Teflon-Kappe bis zur Verwendung abgedichtet. Vor der Wiederverwendung wurden die SPME-Fasern nochmalig 30 Minuten konditioniert. Ein Leerlauf wurde an jedem Tag vor der ersten Messung durchgeführt, um sicherzustellen, dass keine Verunreinigungen der Faser vorhanden waren. Um die Qualität der SPME-Fasern täglich zu kontrollieren, wurde ein Gas-Standard zu Beginn und am Ende eines jeden GC-MS Messtages analysiert.

Bevor die SPME Fasern in den Headspace eingebracht wurden, wurden die MAP-Kulturen bei 37 °C 20 Minuten lang konditioniert. Diese Temperatur wurde auch während der Probenahme konstant gehalten. Die SPME-Faser wurde durch das Septum in die Nährmediumsflasche eingeführt und für 20 Minuten bis zur Einstellung des Gleichgewichts im Headspace der Kultur belassen.

2.4 ANALYSEN DER KULTUREN

DIE Analyse wurde mit einem Agilent 7890A Gaschromatograph in Kombination mit einem Agilent 5975 inert XL Massenselektiven Detektor (MSD) durchgeführt. Als Säule kam eine CP-Pora Bond Q Fused Silica Säule (Varian Inc., CA) zum Einsatz. Die Analyse wurde nach manueller Injektion und thermischer Desorption der Analyten von der SPME Faser durchgeführt. Die Tabelle 2.2 zeigt ausgewählte analytische Parameter des GC/MS.

Tabelle 2.2: Ausgangsparameter GC/MS

GC/MS	Ausgangsparameter Wert
Injektor-Temperatur	290 °C
Trärgasflussrate	1,7 ml/min
Gesamtflussrate	50 ml/min
Säulentemperatur	90 °C
Ionenquellentemperatur	230 °C
Transferlinientemperatur	280 °C
Ionisationsenergie	70 eV

Für die Analyse wurde der splitless-Mode verwendet, so dass in den ersten 60 Sekunden das gesamte Trärgas, das mit der SPME-Faser in Kontakt kam, auf die Säule des Gaschromatographen überführt wurde. Nach der ersten Minute schaltete der Gaschromatograph in den split-Modus, so dass Trärgas nur noch zu einem kleinen Teil auf die Säule transferiert wurde (Split Ratio 1:30).

Die Ausgangstemperatur der Säule wurde zunächst für sechs Minuten bei 90 °C belassen, danach mit einer Rate von 15 °C pro Minute auf 120 °C erhöht, dann mit einer Rate von 10 °C pro Minute auf 140 °C und schließlich mit einer Rate von 15 °C pro Minute auf 260 °C angehoben.

Die die Säule verlassenden Verbindungen wurden per Elektronenstoß bei 70 eV ionisiert und anschließend massenspektrometrisch im Bereich von 35–300 u bei einer Scanrate von 2,73 Scans/s detektiert.

2.5 VORVERSUCHE – ZIELE, VORGEHEN

IN Vorversuchen sollte untersucht werden, welche VOCs im Headspace der Kulturen zu erwarten sind und ob eine wiederholte Probenahme sich systematisch auf die VOC Konzentrationen auswirkt. Dadurch sollte geklärt werden, ob sich die Kulturen für wiederholte Messungen eignen.

Die Messungen wurden an den in Kapitel 2.2 beschriebenen MAP Stämmen durchgeführt. Die verwendeten Bakterienkulturen lagen jeweils in zwei Ansätzen und in je vier Verdünnungsstufen vor. Probenahme und Analytik erfolgten wie unter Kapitel 2.4 erläutert wurde.

Jeder Messtag bestand aus der Messung des Kontrollstandards, eines Leermediums, gefolgt von vier Kulturmedien und eines weiteren Leermediums. Jede Probe wurde innerhalb von acht Tagen viermal gemessen.

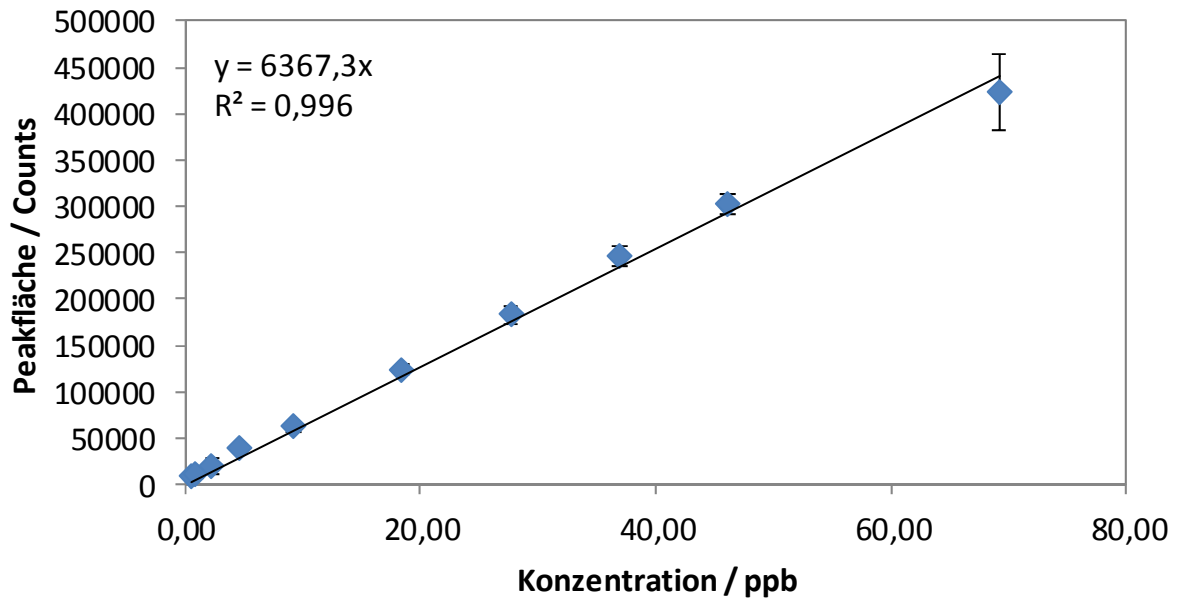
2.6 VOC IDENTIFIZIERUNG, KALIBRIERUNG UND QUANTIFIZIERUNG

GASSTANDARDS der potenziellen Marker-Substanzen wurden in Konzentrationen zwischen 0,46 und 1933,4 ppbV vorbereitet. Für die Kalibrierung und zur Bestimmung der Nachweis- (engl.: limit of detection (LOD)) und Bestimmungsgrenze (engl.: limit of quantification (LOQ)) wurden zehn verschiedene Konzentrationen hergestellt.

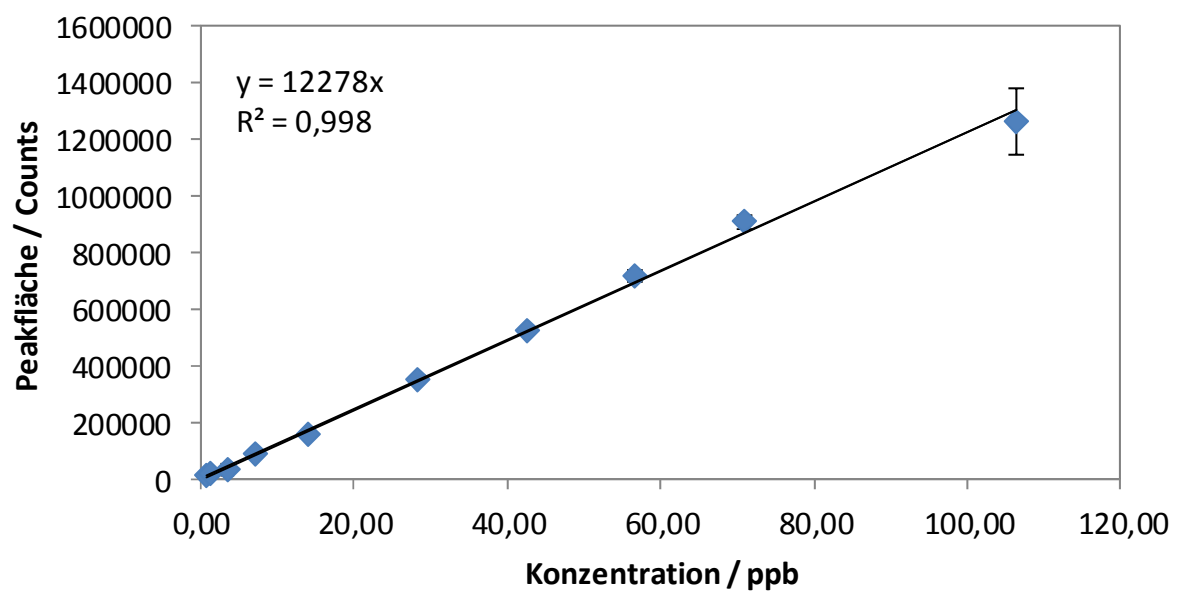
Die Kalibrierstandards wurden aus reinen Referenzmaterialien hergestellt, in dem definierte Volumina der Referenzsubstanzen mit Hilfe einer 10- μ l-Spritze in eine zuvor evakuierte Gasmaus mit einem Volumen von 100 ml überführt wurde. Die Gasmaus wurde dann mit reinem Stickstoff belüftet. 50 μ l des Gasgemisches wurden danach aus der Gasmaus in einen Tedlar-Beutel überführt, der mit einem Liter Stickstoff befüllt war. Durch die Verdünnung dieses Standards mit Stickstoff wurden unterschiedliche Konzentrationen in weiteren Tedlar-Beuteln hergestellt. 15 ml der so erhaltenen Gasstandards wurden in evakuierte 20 ml Headspacegläschen überführt und der Druck in den Gläschen anschließend mit Stickstoff ausgeglichen. Alle Gasstandards wurden mittels SPME unter den gleichen Bedingungen (37 °C, 20 min) wie die MAP-Kulturen vorkonzentriert.

LOD und LOQ für die SPME-GC-MS-Methode wurden anhand des Signal-Rausch-Verhältnisses (engl.: signal-to-noise ratio (S/N)) bestimmt. Das Rauschen wurde experimentell mittels Leerproben (reiner Stickstoff) ermittelt. LOD wurde als S/N von 3, LOQ als S/N von 10 definiert.

Zwei ausgewählte Kalibriergeraden sind exemplarisch in Abbildung 2.2 dargestellt.



(a) 4-Methylheptan



(b) 2-Ethylfuran

Abbildung 2.2: Kalibriergeraden und Geradengleichung (Mittelwerte und Standardabweichungen) für (a) 2-Methylheptan und (b) 2-Ethylfuran. Abbildungen modifiziert nach Trefz et al. [96].

ERGEBNISSE

3.1 ERGEBNISSE DER VORVERSUCHE

ABBILDUNG 3.1 zeigt typische Konzentrationsänderungen der im Headspace über den Bakterienkulturen gemessenen VOCs am Beispiel von 2-Ethyl-Furan. Dargestellt ist exemplarisch ein Ergebnis für alle gemessenen Ansätze der Kultur JII-3197. Aufgetragen wurden die Peakflächen der gemessenen Substanzen gegen die Reihenfolge, in der die Wiederholungsmessungen durchgeführt wurden. Zwischen den Messungen 1, 2 und 3 liegen zwei Tage, zwischen 1 und 4 zwischen vier und sieben Tage und Messung 2 und 3 erfolgte am gleichen Tag innerhalb von Stunden. Zwischen den Messungen 3 und 4 liegen für 10^0 fünf Tage, für 10^{-2} zwei Tage, für 10^{-4} vier Tage und für 10^{-6} drei Tage.

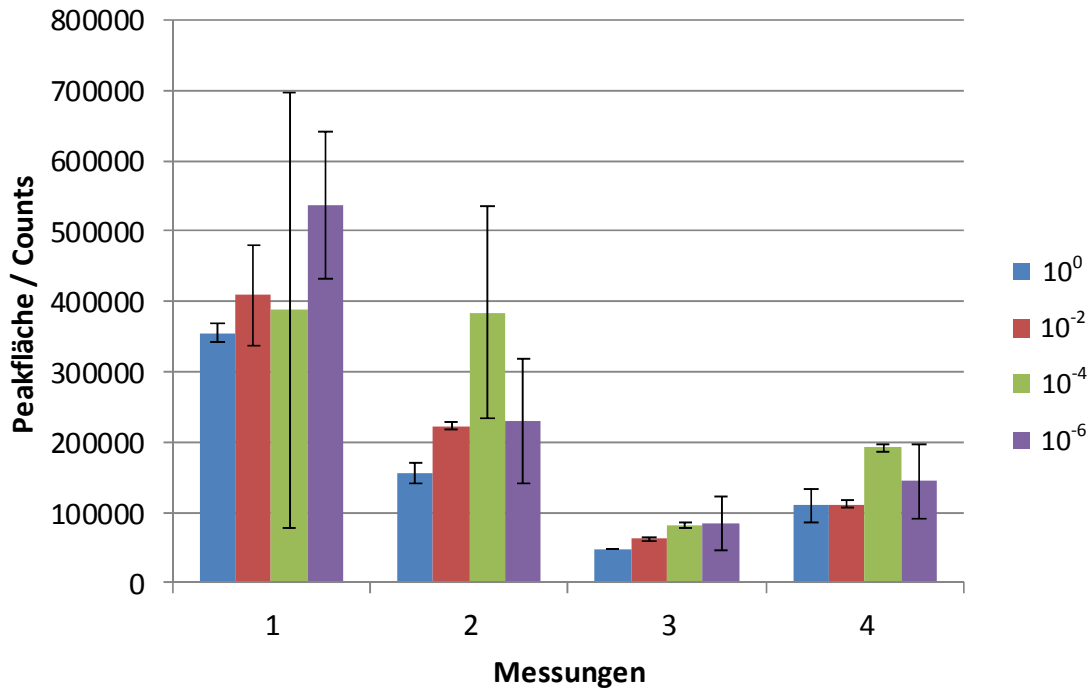


Abbildung 3.1: Tendenzielle Veränderungen der emittierten VOC-Menge durch Kultur JII-3197 am Beispiel von 2-Ethyl-Furan bei vier Wiederholungsmessungen (Mittelwerte und Standardabweichungen) innerhalb von acht Tagen. Abbildungen modifiziert nach Trefz et al. [96].

Für die meisten der gemessenen Substanzen zeigt sich ein deutlicher Abfall der gemessenen Peakflächen von der ersten zur zweiten Messung und ein weiterer Abfall von der zweiten zur dritten Messung, während die vierte und letzte Messung meist in etwa dem Niveau von Messung 3 entspricht oder sogar etwas höhere Werte aufweist, die allerdings deutlich unter denen von Messung 1 liegen.

Auch bei den Messungen des Leermediums wurden nach der ersten Messung deutlich geringere Peakflächen für die meisten VOCs gemessen. Die folgende Abbildung 3.2 zeigt den Konzentrationsverlauf der Wiederholungsmessungen eines Leermediums am Beispiel von Furan.

3.2 AUSWAHL DER RELEVANTEN VOCS

DIE SPME-GC-MS Messungen ergaben mehr als 100 einzeln nachweisbare VOCs im Headspace über den MAP-Kulturen.

Um zwischen flüchtigen Verbindungen aus dem Medium und denen, die von den MAP Kulturen erzeugt wurden zu unterscheiden, wurden die Konzentrationen der VOCs in den MAP-Kulturen mit denen aus dem Leermedium verglichen. Nur VOCs, die nicht in den Leermedien oder mit signifikant höherer Konzentration in den verschiedenen Kulturen im Vergleich zum Leermedium ($> 120\%$ im Vergleich zum Leermedium) nachweisbar waren, wurden als potentielle Biomarker berücksichtigt. Insgesamt konnten so 34 potentielle Markersubstanzen in den MAP-Kulturen identifiziert und im Folgenden näher untersucht werden. Chromatogramme ausgewählter Ionenspuren zweier SPME-GC-MS-Messungen, jeweils von einem Headspace über einer MAP-Kultur und über einem leeren Medium, wurden als Abbildung 3.3 eingefügt.

Tabelle 3.1: Ausgewählte Massenspuren und Kalibrierungsdaten der Referenzsubstanzen (SPME-GC-MS Assay; LOD = Detektionslimit, LOQ = Quantifizierungslimit)

Substanz	Retentionszeit in Minuten	Quantifi- zierungsson	Geraden- steigung	R^2	LOD / ppb	LOQ / ppb
2-Ethylfuran	21,948	81	12278	0,998	0,19	0,65
2-Methylfuran	15,818	82	8569,5	0,993	9,55	31,83
3-Methylfuran	16,621	82	8471,9	0,996	0,13	0,42
Furan	9,811	68	4624,9	0,999	0,10	0,35
2-Pentylfuran	28,402	81	649,56	0,995	4,64	15,45
2-Heptanon	26,457	43	1227	0,999	2,98	9,94
3-Octanon	28,356	43	244,29	0,999	22,64	75,46
Acetone	10,136	58	37285	0,998	16,96	56,53
Methylisobutylketone	24,002	43	5989,9	0,998	1,26	4,19
2-Butanon	16,112	43	55243	0,999	1,43	4,75
3-Methylbutanal	21,5	44	1953,2	0,999	0,98	3,28
2-Methylpropanal	14,598	43	3050	0,999	0,25	0,83
Methacrolein	14,135	70	2727,2	0,999	0,12	0,41
2-Methylbutanal	21,578	57	2451,8	0,999	0,70	2,33
2-Methyl-2-Butenal	22,766	84	1688,2	0,997	0,26	0,86
Hexanal	24,712	56	15793	0,999	4,66	15,52
4-Methylheptan	25,299	43	6367,3	0,996	2,04	6,81
4-Methyloctan	26,982	43	3674,3	0,997	2,30	7,66
2,4-Dimethylheptan	26,596	43	2167,6	0,999	1,41	4,71
Butan	8,082	43	27544	0,999	3,48	11,60
Pentan	13,24	72	7153,3	0,993	5,55	18,49
Hexan	20,605	86	9507,2	0,993	7,27	24,23
Heptan	23,832	43	2651,3	0,998	2,64	8,81
Oktan	25,793	43	1967,2	0,995	3,85	12,85
2,4-Dimethyl-1-Hepten	26,596	43	2534	0,98	19,19	63,98
2-Methyl-1-Penten	19,802	56	5081,4	0,999	0,73	2,43
Isopren	12,622	67	52400	0,999	2,14	7,14
Methylacetat	11,572	43	3207,4	0,999	0,29	0,97
Ethylacetat	17,933	43	4044,2	0,999	0,19	0,64
2-Ethoxy-2-Methylpropan	21,809	59	9559,3	0,999	0,43	1,43
1-Methyl-1H-Pyrrol	22,319	81	2760,3	0,999	0,26	0,87
2-Methylbutanenitril	22,967	55	7348,7	0,999	6,54	21,80
Dimethyldisulfid	22,612	94	4219,9	0,993	0,08	0,26
Benzol	20,203	78	163737	0,991	8,86	29,52

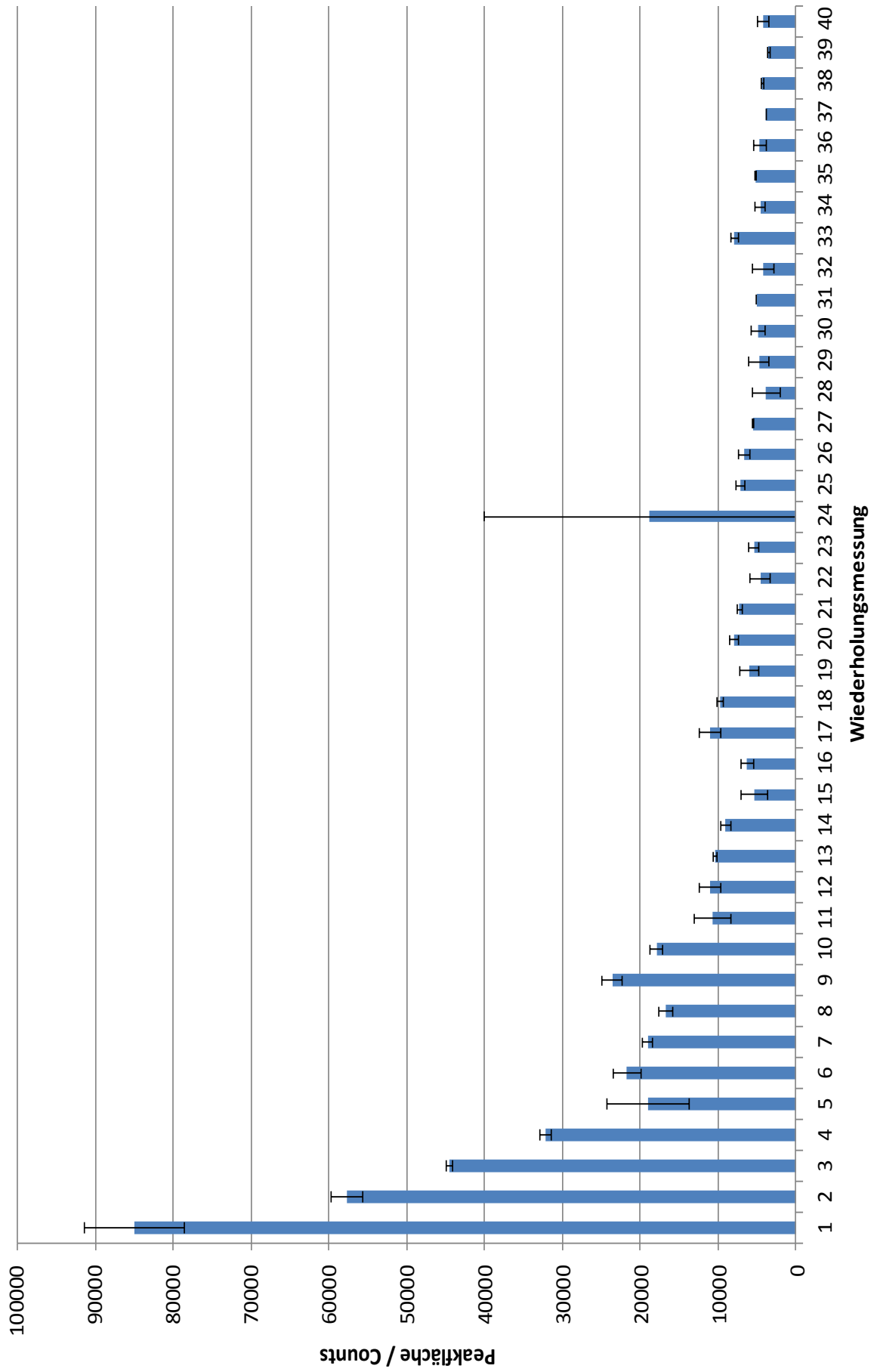


Abbildung 3.2: Wiederholungsmessungen (Mittelwerte und Standardabweichungen) der Leermedien innerhalb von acht Tagen am Beispiel Furan. Abbildungen modifiziert nach Trefz et al. [96].

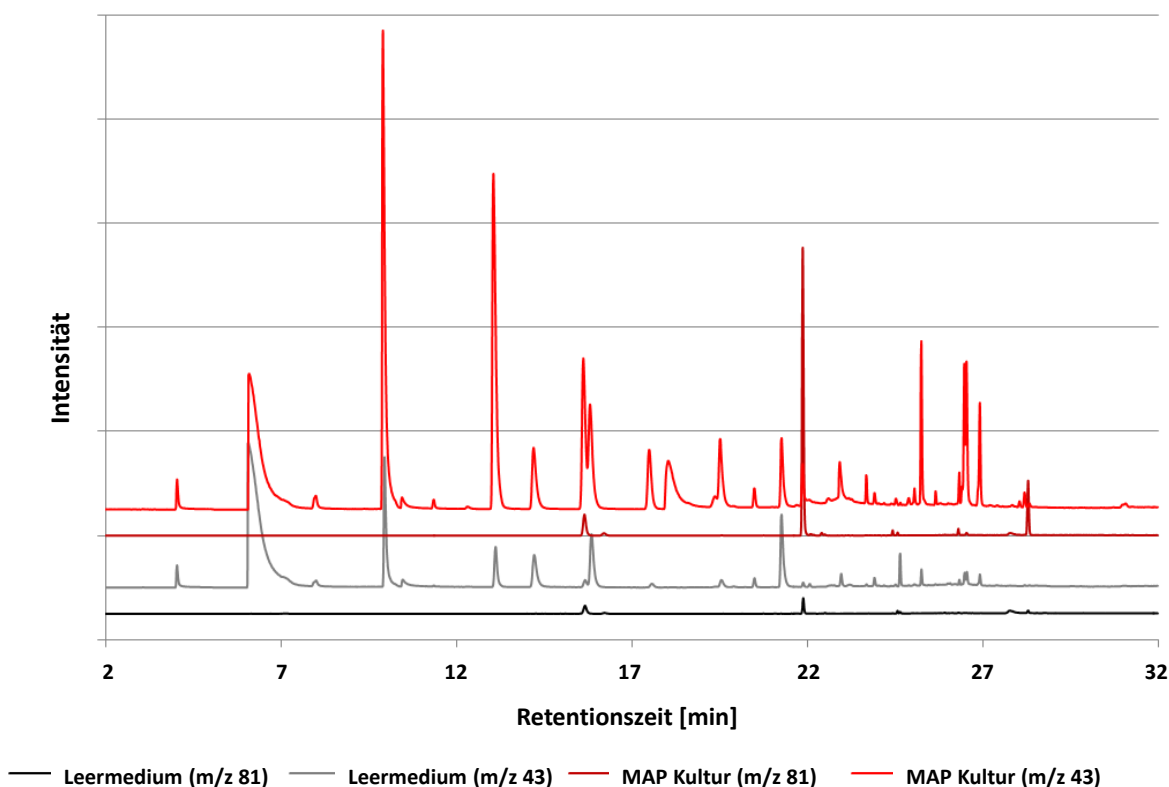


Abbildung 3.3: Chromatogramme von ausgewählten Ionenspuren (m/z 43 und m/z 81) aus dem Head-space des Referenzstammes DSM 44133 (Verdünnung von Bakterien 10^{-2} ; rotes Chromatogramm) und Leermedien (blaues Chromatogramm). Retentionszeiten von Marker-Substanzen wurden in Tabelle 3.1 beschrieben. Abbildungen modifiziert nach Trefz et al. [96].

3.3 IDENTIFIKATION UND QUANTIFIZIERUNG

UM die Verbindungen zu identifizieren, wurde eine spektrale Datenbank (NIST 2005 Gatesburg, PA, USA) als erster Ansatz verwendet. In einem zweiten Schritt wurden die GC Retentionszeiten und Massenspektren der potentiellen Markerverbindungen durch die Messung reiner Referenzsubstanzen bestätigt. In Tabelle 3.1 sind die Retentionszeiten und quantitativen Parameter („qualifier ions“, LODs und LOQs) aller 34 Substanzen dargestellt.

3.3.1 MUSTER VON VOC-MARKERN IN MAP-KULTUREN

IN den Abbildungen 3.4 und 3.5 sind die gemessenen VOC-Konzentrationen als Heatmap aller untersuchter MAP-Stämme und Verdünnungen dargestellt. Die verschiedenen VOCs wurden auf der y-Achse aufgetragen, während die verschiedenen MAP-Stämme auf der x-Achse mit zunehmender Verdünnung von links nach rechts über jeden Stamm aufgetragen wurden. Das Leermedium und die fünf untersuchten MAP-Stämme wurden durch rote Linien getrennt. Abbildung 3.4 zeigt quantitative Daten (ppbV), während sich dagegen Abbildung 3.5 auf Daten bezieht, bei denen die VOC Konzentrationen jeweils auf die maximale Konzentration in allen Proben normalisiert wurden. Auf diese Weise wurden relative Unterschiede erkennbar und die Varianz zwischen den Proben hervorgehoben.

Abbildung 3.4 macht deutlich, dass 2-Pentylfuran, 3-Octanon und Pentan Verbindungen sind, die in den Kulturen, aber nicht in den Leermedien detektiert wurden. Dahingegen ist 3-Methylbutanal

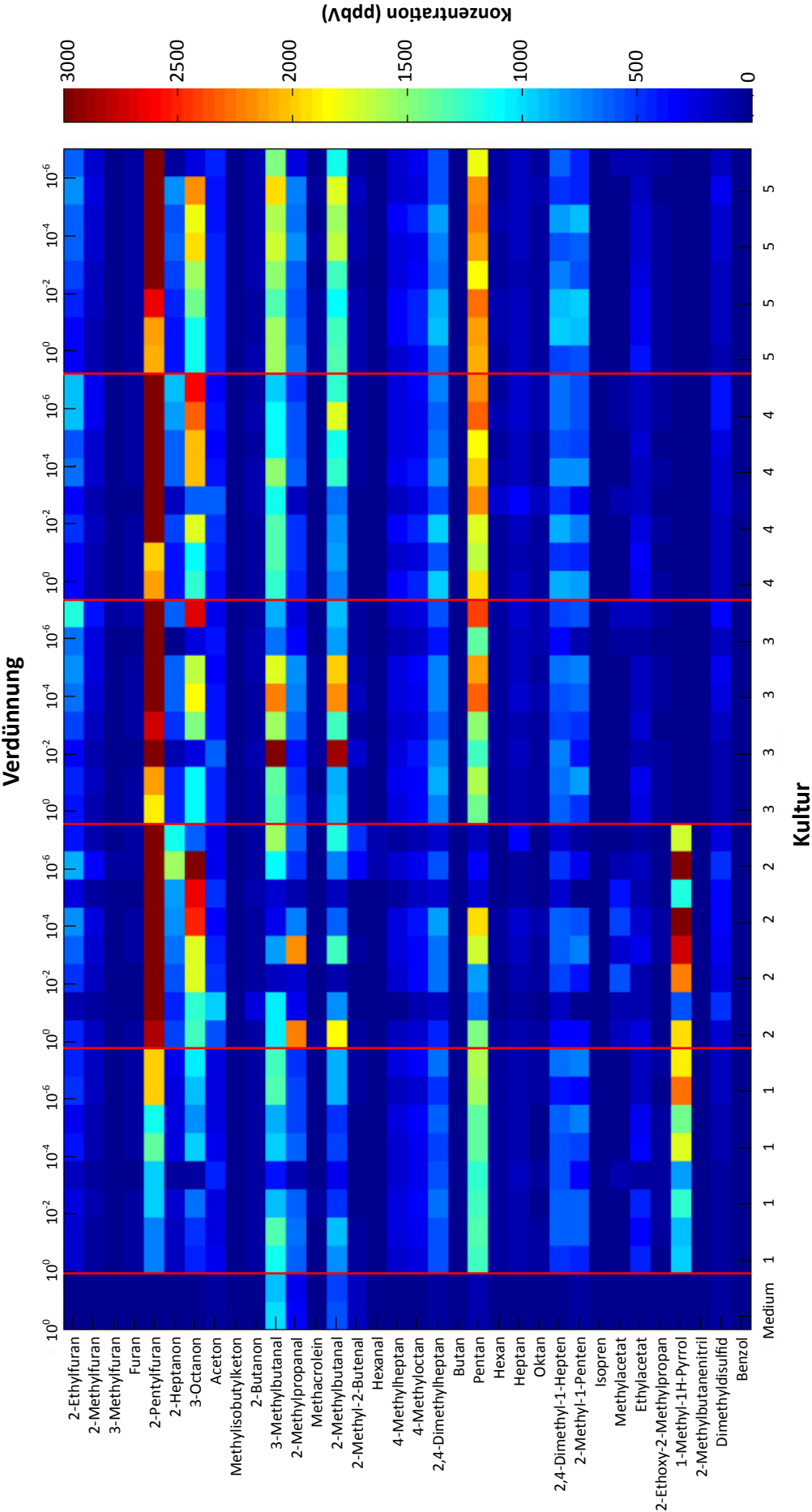


Abbildung 3.4: Heatmap mit den ausgewählten VOCs aus fünf verschiedenen MAP-Stämmen und Medien mit quantitativen Daten; Kulturen: 1 = DSM 44133, 2 = JIII-386, 3-5 = JIII-2421, JIII-3197, JIII-0817. Abbildungen modifiziert nach Trefz et al. [96].

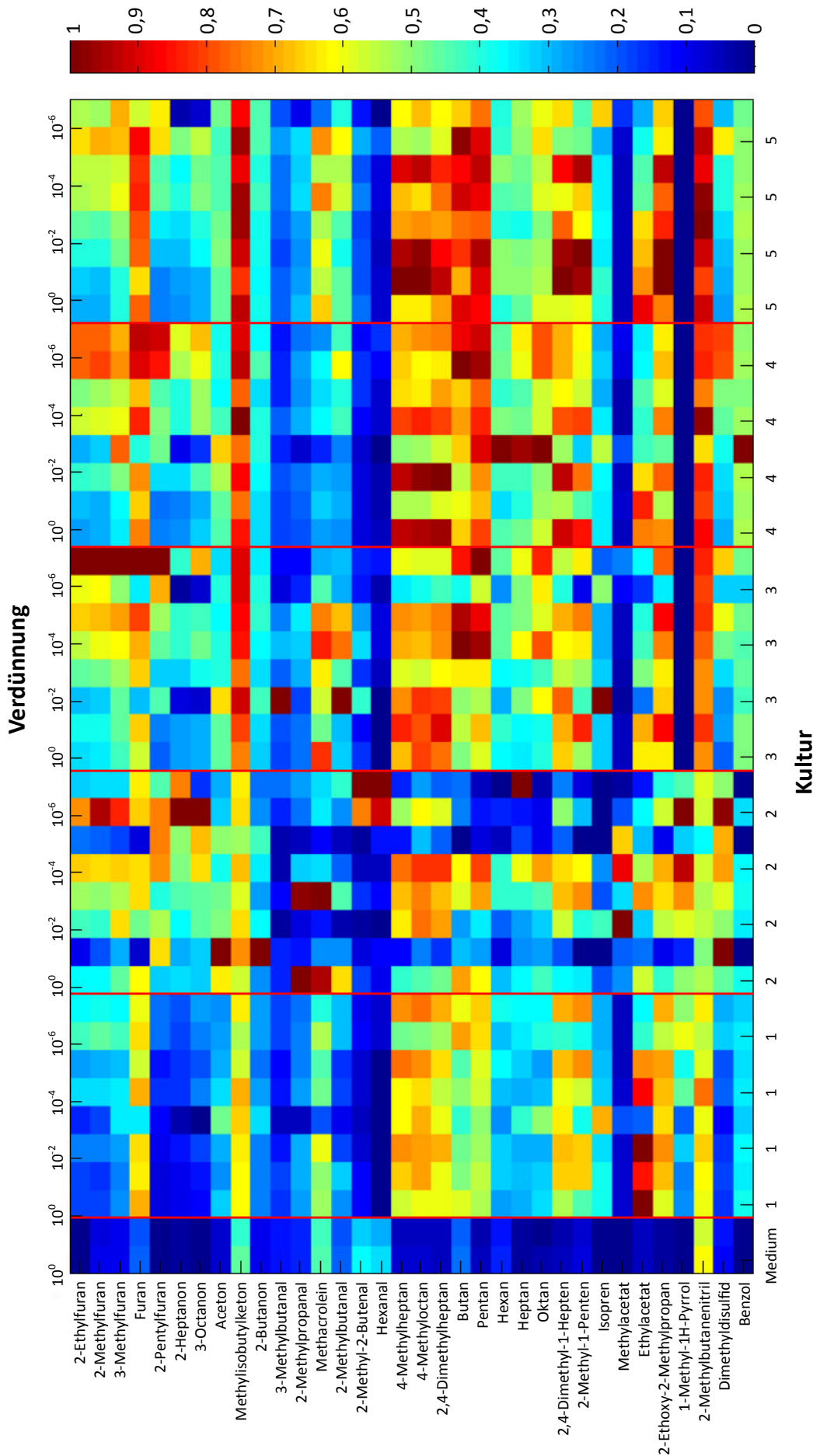


Abbildung 3.5: Heatmap mit den ausgewählten VOCs aus fünf verschiedenen MAP-Stämmen und Medien mit auf Maximalwerte normalisierten Daten; Kulturen: 1 = DSM 44133, 2 = JIII-386, 3-5 = JIII-2421, JIII-3197, JIII-0817. Abbildungen modifiziert nach Trefz et al. [96].

in den Leermedium aber auch in den Kulturen, vor allem in den Kulturen drei bis fünf vorhanden. Deutlich hebt sich auch 1-Methyl-1H-Pyrrol in den Kulturen eins und zwei hervor.

In Abbildung 3.5 ist die Ähnlichkeit der Kulturen drei bis fünf im Vergleich zum Leermedium und den Kulturen eins und zwei deutlich erkennbar. Beispielhaft dafür sind die Verbindungen 4-Methylheptan, 4-Methyloctan, 2,4-Dimethylheptan, Butan und Pentan.

Unter den identifizierten potenziellen Markersubstanzen waren Furane, Aldehyde, aliphatische und ungesättigte Kohlenwasserstoffe sowie stickstoffhaltige Verbindungen. In den folgenden Abschnitten werden die Ergebnisse der einzelnen Stoffklassen im Detail beschrieben.

3.3.2 FURANE

UNTER den erfassten Substanzen zeigten die substituierten Furane die höchsten Konzentrationen im Headspace über MAP Kulturen. Es wurden Konzentrationen bis 7 ppmV für 2-Pentylfuran gefunden. Die Konzentrationen von Furan, 2-Methylfuran und 3-Methylfuran waren im Headspace der MAP-Kulturen 2 bis 6 mal, die Konzentrationen für 2-Ethylfuran und 2-Pentylfuran waren 15 bis 191 mal höher als im Headspace der Leermedien.

3.3.3 ALDEHYDE

DIE Konzentrationen von 3-Methylbutanal, 2-Methylbutanal, 2-Methylpropanal und Methacrolein lagen in allen MAP-Proben sowie in den Leermedien über dem LOQ. Alle Proben der MAP-Feldstämme vom Rind emittierten (1,5 bis 2 mal) höhere Konzentrationen von 2-Methylbutanal im Vergleich zum Leermedium. Die Konzentration von 3-Methylpropanal lag in allen Proben der beiden MAP-Stämme vom Rind (JII-0817 und JII-3197) über denen im Leermedium. Die Mehrheit der MAP-Stämme vom Schaf zeigte niedrigere Konzentrationen als in den Leermedien.

3.3.4 KOHLENWASSERSTOFFE

DIE Konzentrationen von Pentan, 4-Methylheptan, 4-Methyloctan und 2,4-Dimethylheptan waren in den MAP-Proben im Vergleich zu den Leermedien immer erhöht. Allerdings waren die meisten Kohlenwasserstoffe auch in den Leermedien nachweisbar. Die Konzentrationen von Heptan waren in den Leermedien unter dem LOQ und in allen MAP-Proben stärker erhöht. Die Oktan-Konzentrationen lagen in den MAP-Proben über dem LOQ. Die Hexan-Konzentration war im Headspace der MAP-Proben vom Schaf niedriger und in allen anderen MAP-Proben höher, verglichen mit den Leermedien.

Die Konzentration von 2,4-Dimethyl-1-Hepten war unter dem LOQ in den Leermedien und in allen MAP-Proben höher. 2-Methyl-1-Penten konnte in den Leermedien und in den MAP-Kulturen bestimmt werden, die Konzentrationen waren jedoch in den meisten MAP-Proben höher. Isopren konnte in den Leermedien nicht nachgewiesen werden und die Konzentration in den meisten MAP-Proben lag unter der Bestimmungsgrenze.

3.3.5 N- UND S-ENTHALTENDE VERBINDUNGEN

1-METHYL-1-H-PYRROL konnte nicht in den MAP-Proben aus den drei Feldstämmen vom Rind detektiert werden, aber im Laborstamm und Feldstamm vom Schaf. Die Konzentration von 1-Methyl-Butannitril war bei allen MAP-Proben der Feldstämmen vom Rind höher im Vergleich zu

den Leermedien. Die Dimethyldisulfid Konzentrationen waren in den MAP-Proben höher als in den Leermedien.

3.4 DIFFERENZIERUNG VON MAP-STÄMMEN UND MEDIEN

DER Referenzstamm emittierte mit Ausnahme von Ethylacetat niedrigere Konzentrationen der meisten Substanzen im Vergleich zu den anderen vier untersuchten MAP Stämmen. Darüber hinaus verringerten sich die Konzentrationen von Ethylacetat mit höheren Verdünnungen. Im Gegensatz dazu zeigten die MAP-Proben der Feldstämmen vom Schaf (JIII-386) die größten Unterschiede zwischen den verschiedenen Proben (Wiederholungstest und Verdünnungen) und emittierten die höchsten Stoffkonzentrationen.

Die Konzentrationen von gesättigten und ungesättigten Kohlenwasserstoffen waren tendenziell in den Feldstämmen vom Rind höher, als in den beiden anderen MAP-Stämmen. Die höchsten Mengen an Aldehyden konnten im Feldstamm vom Schaf (JIII-386) gefunden werden, allerdings war die Varianz zwischen den verschiedenen Proben hoch. Obwohl alle 34 ausgewählten Verbindungen von fast allen MAP-Proben emittiert wurden, waren die Konzentrationen der untersuchten Verbindungen zwischen dem Referenz-Stamm und den Feldstämmen der Schafe und Rinder verschieden.

Abbildung 3.6 zeigt den Score Plot und Abbildung 3.7 den Loading Plot einer Hauptkomponentenanalyse (engl.: Principal Component Analysis, PCA) aller 34 VOCs, wobei jeweils Hauptkomponente 1 (PC 1) und Hauptkomponente 2 (PC 2) das Koordinatensystem bilden. Die Daten wurden vor der PCA auf die Standardabweichung normiert und auf die Mittelwerte zentriert. Als Validierungsmethode wurde eine Kreuzvalidierung durchgeführt. PC 1 erklärt 37% der Varianz der Daten, während PC 2 18% erklärt.

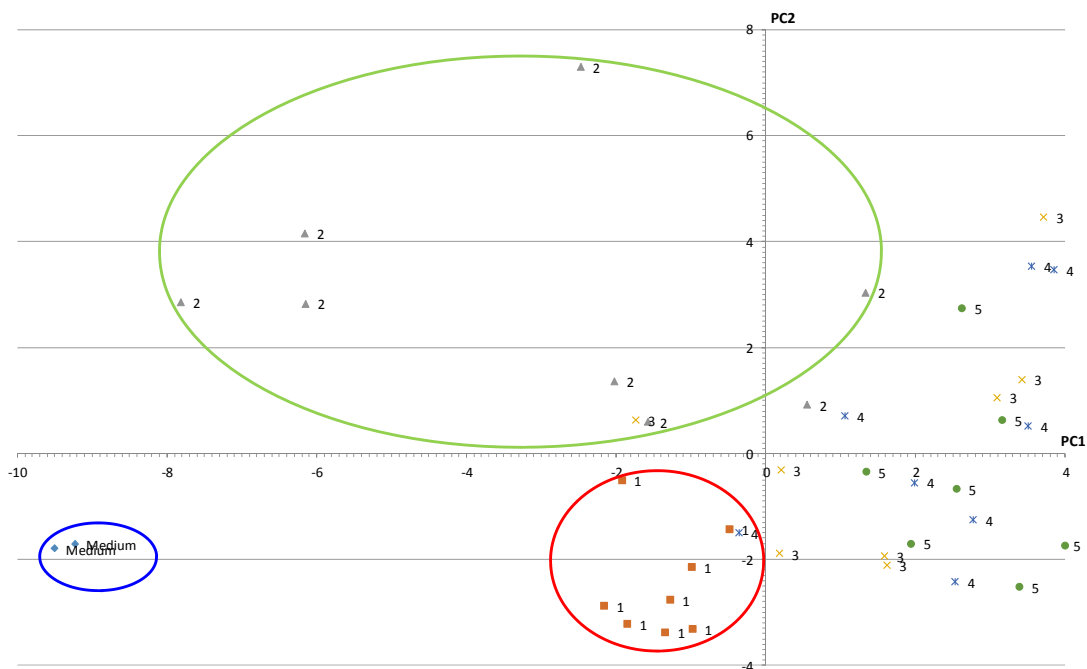


Abbildung 3.6: Hauptkomponentenanalyse (PC1: 38 %; PC2: 17 %) der emittierten VOCs aus fünf verschiedenen MAP-Stämmen und den leeren Medien. 1: DSM 44133 (Laborreferenzstamm), 2: JIII-386 (Schaf-Stamm), 3-5: JII-2421, JII-3197, JII-0817 (Feld-Stämme). Abbildungen modifiziert nach Trefz et al. [96].

Die Leermedien (blauer Kreis) waren negativ auf PC 1 und PC 2 korreliert und deutlich von allen fünf MAP-Stämmen getrennt. Der Referenzstamm (roter Kreis) zeigte eine leicht negative Korrelation auf PC 1 und PC 2. Die Feldstämme vom Schaf waren positiv auf PC 2 korreliert. Die Feldstämme vom Rind dagegen zeigten sich positiv auf PC 1, mit einer positiven und negativen Korrelation auf PC 2. Die hohen Schwankungen der gemessenen VOC-Konzentrationen zwischen den Wiederholungsmessungen und den Verdünnungen der MAP-Proben innerhalb des Feldstammes vom Schaf spiegeln sich auch in den Ergebnissen der PCA wieder. Während die drei Feldstämme vom Rind sowie der Referenz-Stamm tendenziell Cluster im Score Plot bildeten, wiesen die Scores des Feldstammes vom Schaf (grüner Kreis) eine größere Streuung auf.

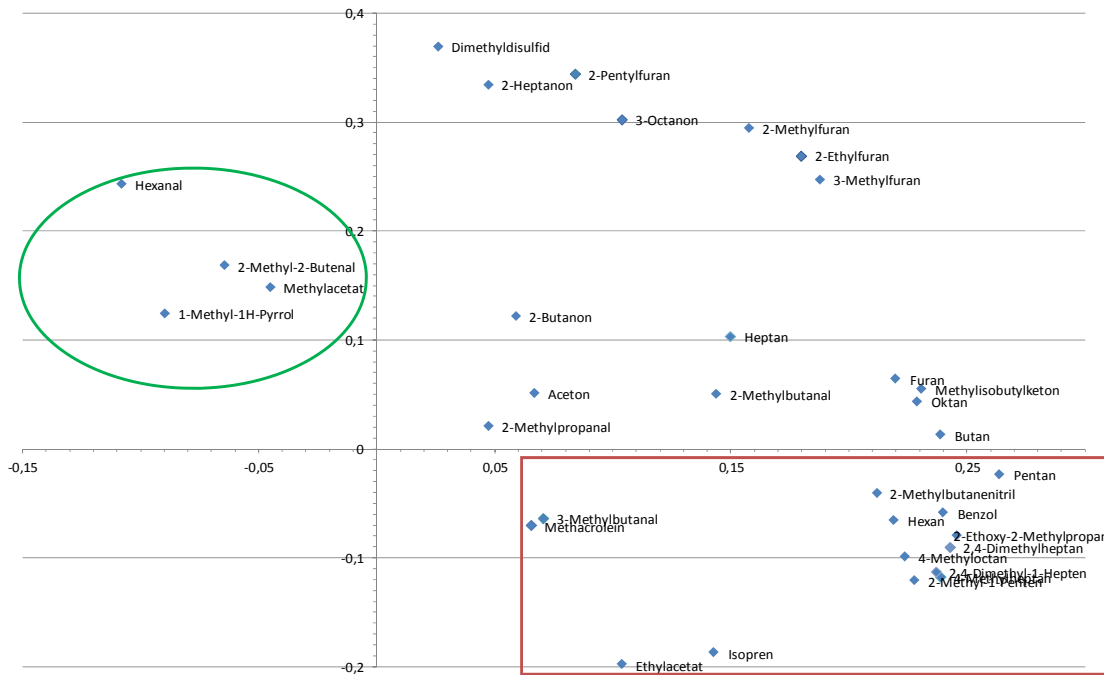


Abbildung 3.7: Loading Plot zur Hauptkomponentenanalyse (PC1: 38 %; PC2: 17 %) auf VOCs, bestehend aus den 34 identifizierten VOCs aus fünf verschiedenen MAP-Stämme und den leeren Medien. Abbildungen modifiziert nach Trefz et al. [96].

Abbildung 3.7 zeigt den Loading Plot von PC 1 gegen PC 2. Mit Ausnahme von Hexanal, 2-Methyl-2-Butenal, Methylacetat und 1-Methyl-1H-Pyrrol (alle im grünen Kreis) sind alle VOCs auf PC 1 positiv korreliert. Eine weitere Ausnahme bilden 3-Methylbutanal, Methacrolein, 4-Methylheptan, 4-Methyloctan, 2,4-Dimethylheptan, Pentan, Hexan, 2,4-Dimethyl-1-Hepten, 2-Methyl-1-Penten, Isopren, Ethylacetat, 2-Ethoxy-2-Methylpropan, 2-Methylbutanenitril und Benzol (rotes Rechteck und als Ausschnittsvergrößerung in Abbildung 3.8), die negativ auf PC 2 korreliert sind.

3.5 AUSWIRKUNGEN DES BAKTERIELLEN BEWUCHSES AUF DIE VOC-EMISSIONEN

IN Abbildung 3.9 ist der Einfluss verschiedener Verdünnungen der MAP-Proben auf die Konzentrationen von 2-Ethylfuran, 2-Methylfuran, 3-Methylfuran, 2-Pentylfuran, Ethylacetat, 1-Methyl-1H-pyrrol und Dimethyldisulfid gezeigt.

Die Konzentrationen von substituierten Furanen (Abb. 3.9(a) – Abb. 3.9(c)) im Headspace über den Kulturen verringerten sich mit höherem bakteriellen Bewuchs. Dies war im Feldstamm vom Schaf (JIII-386) weniger ausgeprägt. 3-Methylfuran zeigte im Vergleich zu den anderen drei substituierten

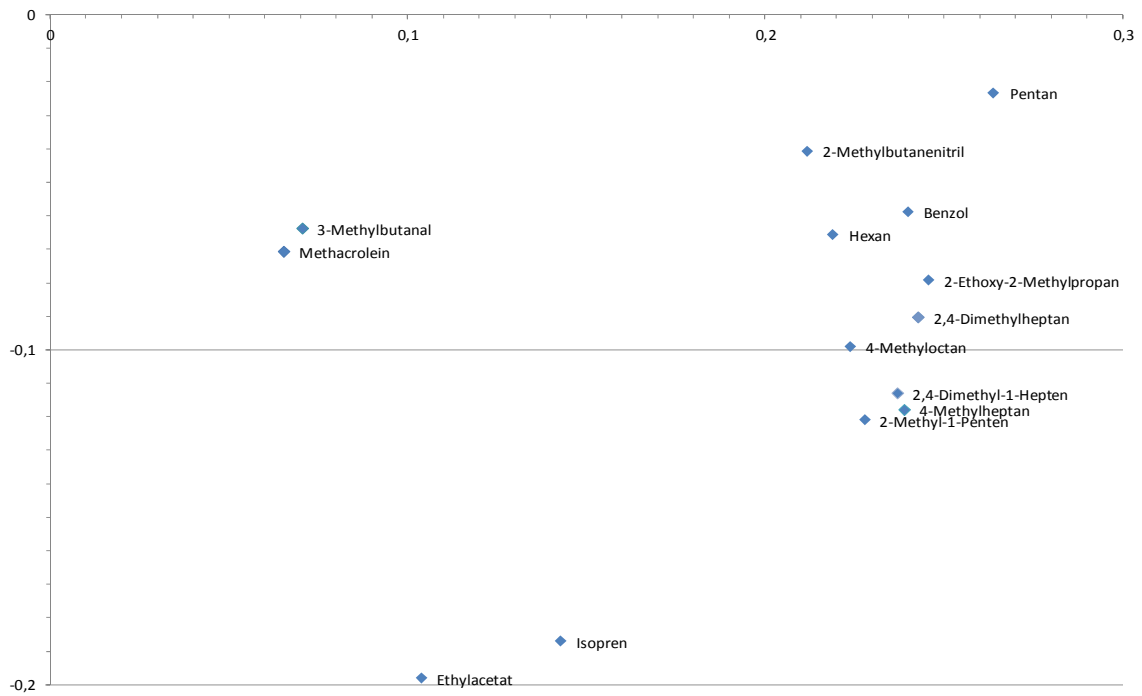


Abbildung 3.8: Vergrößerte Darstellung der positiven X und negativen Y Achse der Abbildung 3.7. Abbildungen modifiziert nach Trefz et al. [96].

Furanen eine weniger ausgeprägte Konzentrationsabhängigkeit. Die Konzentration von Furan zeigte keine Abhängigkeit von der Dichte des bakteriellen Bewuchses.

Im Gegensatz dazu erhöhte sich die Emission von Ethylacetat (Abb. 3.9(d)) mit zunehmender Dichte des bakteriellen Bewuchses.

1-Methyl-1H-Pyrrol (Abb. 3.9(f)) wurde nur im Referenzstamm und im Feldstamm vom Schaf detektiert und zeigte eine Abnahme der Konzentration bei Zunahme der Dichte des bakteriellen Bewuchses. Dimethyldisulfid (Abb. 3.9(e)) zeigte eine ähnliche Tendenz wie die substituierten Furane, aber auch hier war der Effekt im Referenzstamm weniger ausgeprägt.

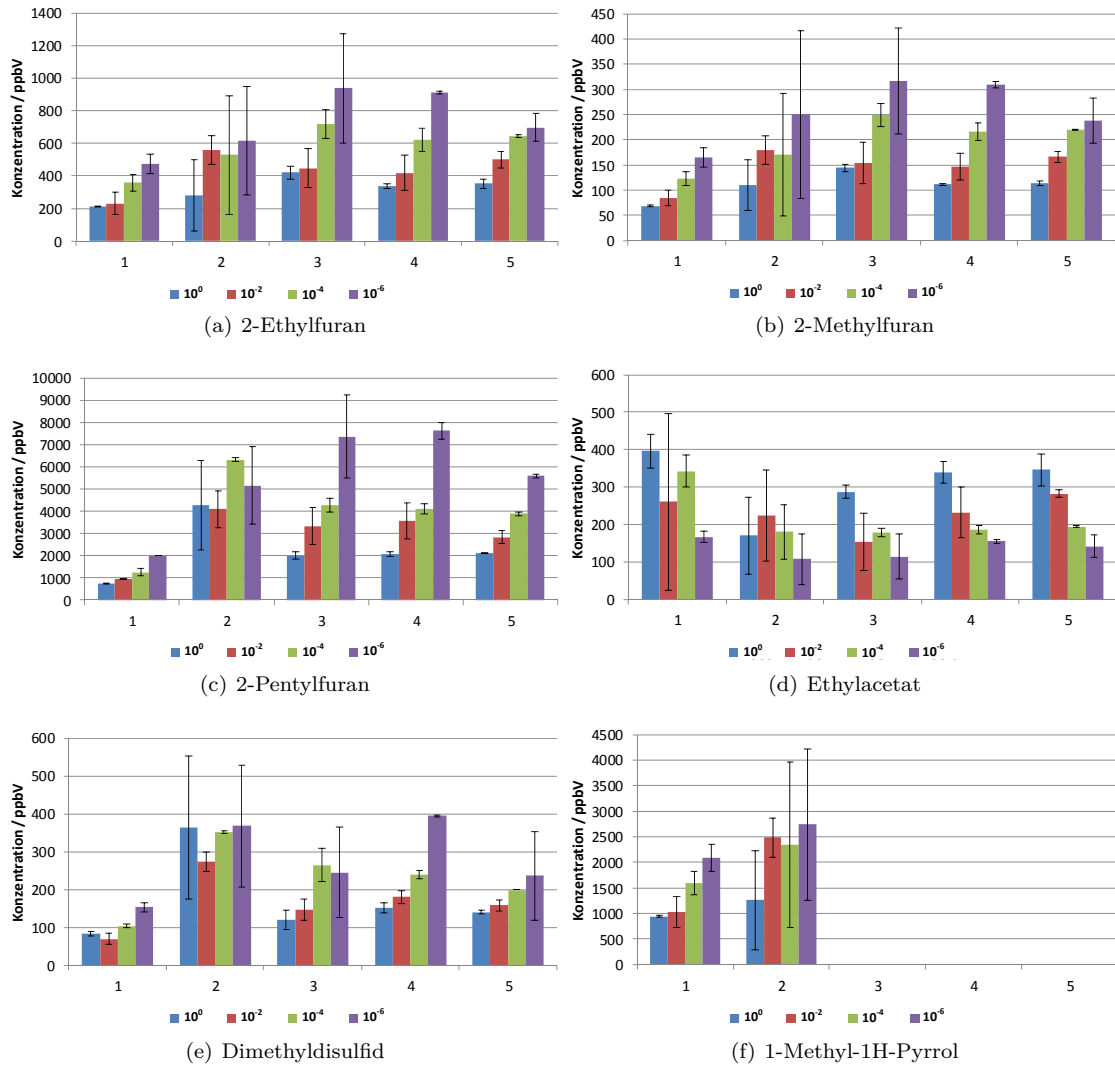


Abbildung 3.9: Konzentrationen (Mittelwerte und Standardabweichungen) von a) 2-Ethylfuran, b) 2-Methylfuran, c) 2-Pentylfuran, d) Ethylacetat, e) Dimethyldisulfid und f) 1-Methyl-1H-Pyrrrol bei unterschiedlichen bakteriellen Bewuchs (oder Dichten) der fünf verglichenen Stämme. 1: DSM 44133 (Laborreferenzstamm), 2: JIII-386 (Schaf-Stamm), 3-5: JII-2421, JII-3197, JII-0817 (Feld-Stämme). Abbildungen modifiziert nach Trefz et al. [96].

DISKUSSION

4.1 DISKUSSION DER VORVERSUCHE

DIE Ergebnisse der Wiederholungsmessungen zeigen, dass bei Verwendung der SPME trotz Gleichgewichtseinstellung eine so große Menge an VOCs aus den Kulturflaschen extrahiert werden, dass die Konzentration von Messung zu Messung deutlich abnehmen. Dieses Verhalten war bei allen 5 Kulturen und Verdünnungsstufen zu beobachten, so dass eine systematische Veränderung vorliegt. Wiederholte Messungen an einer Bakterienkultur sind somit nicht reproduzierbar möglich. Für die statistische Auswertung im Hauptversuch wurde daher nur die jeweils erste Messungen herangezogen, da zu diesem Zeitpunkt noch keine Veränderungen am Bakterienkultursystem erfolgt waren.

Auch bei den Messungen des Leermediums wurden nach der ersten Messung für die meisten VOCs deutlich geringere Peakflächen gemessen. Hier wurde im Hauptversuch ebenfalls nur die jeweils erste Messungen für die weitere statistische Auswertung verwendet.

4.2 IDENTIFIZIERUNG VON MAP-MARKERN PER MIKROEXTRAKTION

MEHR als 100 VOCs wurden im Headspace über den MAP-Kulturen mittels HS-SPME-GC-MS detektiert. Unter diesen mehr als 100 VOCs konnten 34 Verbindungen auf das Wachstum der Mykobakterien zurückgeführt werden. Angesichts der großen Zahl und der chemischen Vielfalt der VOCs, die aus Bakterienkulturen emittiert werden [4, 101], war eine eindeutige Identifizierung und zuverlässige Quantifizierung notwendig, um diese VOCs oder die daraus erstellten Muster als Biomarker für das bakterielle Wachstum verwenden zu können. In dieser Arbeit wurde zur Stoffidentifizierung nicht nur eine MS-Datenbankabfrage (z. B. NIST) verwendet, sondern die Substanzen auch durch die Analyse reiner Referenzsubstanzen bestätigt. Darüber hinaus wurde eine zuverlässige Quantifizierung durch Kalibrierungen unter Zuhilfenahme von Referenzmaterialien erreicht. Die LOD und LOQ wurden für alle Substanzen, die in dieser Studie diskutiert wurden, bestimmt. Vergleicht man die in dieser Arbeit verwendete Methode zur Identifizierung von bakteriellen VOCs mit den Ergebnissen der Übersichtsarbeit von Bos et al. [101], so ist feststellbar, dass die hier verwendete GC-MS Messung gegenwärtig als „Goldstandard“ zur Identifizierung unbekannter volatiler Markersubstanzen gilt.

4.3 MARKERPROFILEUNTERSCHIEDE ZWISCHEN DEN KULTUREN

ALLE fünf MAP-Stämme konnten deutlich von den Leermedien anhand der Muster ihrer emittierten VOCs, unterschieden werden. Darüber hinaus unterschieden sich die Muster der emittierten VOCs des Referenzstammes im Vergleich zu den Feldstämmen. Die Emissionsmuster von Leermedien und die verschiedener MAP-Proben unterschieden sich qualitativ und quantitativ voneinander. MAP-Proben emittierten VOCs, die nicht im Headspace der Leermedien gefunden werden konnten. Des Weiteren hatten Verbindungen, die sowohl im Headspace über den Kulturen als auch über den Leermedien gefunden wurden, im Headspace über den MAP-Proben höhere Konzentrationen. Unter

diesen Substanzen waren Furane, Aldehyde, aliphatische und ungesättigte Kohlenwasserstoffe und einige stickstoffhaltige Verbindungen die Häufigsten.

Durch den Vergleich des ganzen Genoms von MAP wurden zwei große Abstammungslinien, die des Schafes und die des Rindes [102] differenziert. Historisch werden diese als „Schaf- oder S-Typ“ und als „Rind- oder C-Typ“ bezeichnet [100]. Mit Genotypisierungsverfahren kann man die S-Stämme noch weiter in zwei Subtypen unterteilen, nämlich in Typ I und Typ III [103]. Neben den genotypischen Unterschieden, zeigen Erregerstämme der beiden Abstammungslinien phänotypische Unterschiede, wie Wachstumsrate [100, 104, 105], die Nutzung von verschiedenen Eisenstoffwechselwegen [106] und Cytokininduktion in Makrophagen [107, 108].

Um die genetische Variabilität von MAP zu berücksichtigen, wurden ein im Labor angepasster Stamm, ein Feldstamm vom S-Typ und drei Feldstämme vom C-Typ untersucht. Es war möglich, den im Labor angepassten Stamm und den Feldstamm vom S-Typ von den Feldstämmen vom C-Typ durch ihre volatilen Emissionensmuster zu unterscheiden. 1-Methyl-1-H-pyrrol konnte nur im Headspace über Kulturen des im Labor angepassten Stammes und des Feldstammes vom S-Typ nachgewiesen werden. Pyrrole repräsentieren Grundbestandteile des Häm-Komplexes, die in Sensorproteinen [109] und in Katalasen-/Peroxidase-Enzymsystemen [110] der Mykobakterien gefunden werden können. Die Tatsache, dass 1-Methyl-1-H-Pyrrol in nachweisbaren Konzentrationen nur in dem im Labor angepassten Stamm und im Feldstamm vom S-Typ nachgewiesen werden konnte, kann hypothetisch einerseits auf die (phylo)genetischen Unterschiede zwischen den Schaf- und Rinderstämmen zurückgeführt werden und andererseits auf die verschiedenen langfristigen Umgebungsbedingungen, denen diese Bakterienstämme ausgesetzt wurden. Beide Gegebenheiten können zur Expression spezifischer Enzymsysteme geführt haben. Denn eine langfristige *in vitro* Passage beeinflusst auch die Genomvielfalt von MAP-Impfstämmen unter verschiedenen Kulturbedingungen, was zu einer großen Reihe an genomischen Vervielfältigungen, Deletionen und Transpositionen führt. Durch die Verwendung der klassischen systemischen Selektivierung von Subkulturen konnten spezifische MAP-genomische Veränderungen in einigen Impfstämmen bestimmt werden, bei denen die resultierenden attenuierten Phänotypen die Defizite in der Verarbeitung von hochreaktiven Sauerstoffspezies genetisch ursächlich erklären [111]. Dem gegenüber zeigen die Emissionen aus den drei Feldstämmen vom C-Typ keine deutlichen Unterschiede.

Obwohl die Ergebnisse von allen Verdünnungsreihen aller MAP-Stämme in die Hauptkomponentenanalyse gegeben wurden, war eine Unterscheidung des im Labor angepassten Stammes und des Feldstammes vom S-Typ von den drei Feldstämmen vom C-Typ möglich. Dies zeigt, dass das Emissionsmuster, das auf 34 ausgewählten VOCs basiert, nicht nur die Unterscheidung zwischen den Leermedien und den MAP-Stämmen ermöglicht, sondern auch die Unterscheidung verschiedener MAP-Stämme unabhängig von der Dichte des bakteriellen Bewuchses möglich macht.

Auch bestätigen die Ergebnisse die in der Literaturübersichtsarbeit über 31 Peer-Review-Publikationen von Bos et al. [101] 2013 aufgestellten Theorien. Die unterschiedlichen Studienergebnisse der betrachteten Veröffentlichungen führte die Arbeitsgruppe in einer ersten Theorie auf die teilweise unterschiedlichen Subtypen der Stämme zurück. Eine weitere ihrer Theorien besagte, dass die meisten Arbeiten Referenzstämme, einige aber stattdessen Feldstämme der Bakterien nutzen. So schlussfolgerten sie, dass jene verschiedenen effiziente Enzyme besitzen könnten. Die Schlussfolgerung, dass dies die klinische Identifikation von Subtypen durch VOCs erschweren könnte, ist durch die Ergebnisse dieser Studie klar widerlegt.

4.4 MARKERPROFILE UND DAS WACHSTUMSSTADIUM

Es bestehen Zusammenhänge zwischen der Dichte des bakteriellen Bewuchses und den Konzentrationen von 2-Ethylfuran, 2-Methylfuran, 3-Methylfuran, 2-Pentylfuran, Ethylacetat, 1-Methyl-1-H-pyrrol und Dimethyldisulfid im Headspace. Verschiedene Furane wurden bereits in unterschiedlichen Mikroorganismen nachgewiesen [4, 112, 113, 114, 115, 116] und auch als Indikatoren für das Pilzwachstum im Getreide erwogen [112]. 2-Pentylfuran wurde im Headspace über *Aspergillus fumigatus* sowie in der Atemluft von Patienten mit *Aspergillus fumigatus*-Infektion nachgewiesen [117, 118]. 2-Methylfuran, 2-Ethylfuran und 2-Pentylfuran waren auch als VOCs, die von Rhizobakterien stammen, bekannt. Dort aber waren diese VOCs nur in sehr geringen Konzentrationen [30] nachweisbar, während die Konzentrationen in den MAP-Proben im hohen ppmV-Bereich lagen. Eine Überwucherung mit *Aspergillus* konnte in allen analysierten MAP-Proben ausgeschlossen werden. Die hohen Furan-Konzentrationen scheinen daher ein Indikator für das Wachstum von Mykobakterien zu sein. Die Glykolipide der Zelloberflächen von Mykobakterien enthalten D-Galactofuran [119] und Arabinofuranosylreste [120]. Furfural und Furane könnten von diesen Pentoseverbindungen stammen. Darüber hinaus könnten Furane möglicherweise während des oxydativen Abbaus von Fettsäuren oder entlang des Syntheseweges über Acetyl-CoA-Bausteine [4] erzeugt werden.

Aus diesen biochemischen Stoffwechselwegen ließe sich rückschließen, dass Furane das Wachstum von (Myko)Bakterien im Sinne von Zellvermehrung anzeigen. Außerdem könnten Furane, die aus D-Galactofuran- oder Arabinofuranosylresten von Teilen der Oberflächenstrukturen der Mycobakterien stammen, eventuell sogar das Wachstum von spezifischen Mykobakterien anzeigen.

Der Struktur der Zellwand verdanken die verschiedenen Mykobakterienarten viele ihrer einzigartigen Eigenschaften, darunter die Widerstandsfähigkeit gegen bakterizide Abwehrmaßnahmen des Wirts und die geringe Durchlässigkeit für Antibiotika. Verbindungen, die strukturell mit Mykolsäuren verwandt sind, wurden in signifikanten Mengen in Mykobakterien gefunden. Diese Verbindungen beinhalten langkettige Säuren, Alkohole sowie Ketone [121]. Mykolsäuren stellen einen wichtigen Bestandteil der Zellhülle von Mykobakterien dar. Wenn diese langkettigen Fettsäuren enzymatisch oder thermisch gespalten werden, könnte dies verschiedene Aldehyde und Ketone erzeugen [122, 123]. Darüber hinaus wurden Aldehyde als Zwischenprodukte [124] bei der Biosynthese von Lipiden in Mykobakterien ermittelt. Es sind weitere Erkenntnisse und mehr experimentelle Daten über den Stoffwechsel der Mykolsäure notwendig um herauszufinden, ob einige Aldehyde spezifische Marker für das Wachstum von Mykobakterien darstellen können.

Betrachtet man die Struktur der Mykolsäuren, könnten die verzweigten Kohlenwasserstoffe auch durch oxydative oder enzymatische Spaltung dieser langkettigen Fettsäuren erzeugt werden. Es ist auch bekannt, dass Dimethyldisulfid aus Cystein oder Methionin durch Transaminierung oder Disproportionierung erzeugt wird [4].

Variierend dichter bakterieller Bewuchs erzeugte in den MAP-Proben unterschiedliche Emissionen von substituierten Furanen, Ethylacetat, Dimethyldisulfiden und Methylpyrrolen. Geringerer bakterieller Bewuchs führte zu höheren Konzentrationen an Furanen, Dimethyldisulfiden und Methylpyrrolen. Flüchtige Substanzen, z. B. Methyl-2,3,3,4-tetrahydroxyhydrofuran (S-THMF), wurden als Signalstoffe zur Kommunikation von Zelle zu Zelle in gram-positive und gram-negative Bakterien [7, 45] beschrieben. Daher könnten steigenden Konzentrationen an Furanen, Dimethyldisulfid und Methylpyrrol chemische Signale für das Potenzial des weiteren Wachstums in einer Kultur mit geringem bakteriellem Bewuchs sein. Da Ethylacetat während der Biosynthese von Fettsäuren [4] erzeugt wird, würde eine größere Mengen an im Wachstum befindlichen Zellen zu einer höheren Konzentration dieser Substanz im Headspace über den Kulturen führen.

Eine Verbindung zwischen dem mikrobiologischen Wachstum und der VOC-Emissionsdynamik zeigte auch Bunge et al. [125] mit PTR-MS [126] Messungen. Bei *Samonella enterica* korrelierte ein nicht identifiziertes Signal bei 89 amu mit der Zellzahl des bakteriellen Bewuchses und 2-Butanon konnte erst 9 Stunden nach der Beimpfung nachgewiesen werden. *Shigella flexneri* zeigte einen raschen Peak von Acetaldehyd und *Escherichia coli* zeigte 3–4 Stunden nach der Beimpfung einen Anstieg um 3 Potenzen, um danach langsam über den Rest der Messung abzufallen. Auch waren einige Substanzen nur über kurze Zeit nachweisbar, wie z. B. Aceton, das nur für 100 Minuten von *E. coli* produziert wurde.

4.5 LIMITATIONEN UND AUSBLICKE

DIE Analyse von aus mykobakteriellen Kulturen emittierten VOCs kann verwendet werden, um sowohl das Wachstum von Bakterien zu identifizieren, als auch, um zwischen verschiedenen Bakterienstämmen zu differenzieren. In dieser Arbeit wurden die Proben nur zu einem Zeitpunkt in ihrem Wachstumsverlauf gemessen. Die vier verschiedenen Verdünnungsstufen während der Beimpfung der Nährmedien ermöglichten es aber, verschiedene Bewuchsstadien zu erstellen. Dies greift auch eine weitere Theorie von Bos et al. [101] auf, die feststellten, dass in den betrachteten Arbeiten verschiedene Zeitpunkte des Wachstums betrachtete wurden. Hier könnte die Frage nach einem Unterschied zwischen der log- und stationären-Phase des MAP-Wachstums für zukünftige Ansätze gestellt werden.

Mit dem von Bunge et al. [125] gewählten Ansatz zur Probennahme bei Bakterien, eine PTR-MS [126] oder wie später bei Thorn et al. [127] eine SIFT-MS [128] zu nutzen, könnte in einer zukünftigen Versuchsreihe das Wachstum der MAP-Kulturen über einige Monate beobachtet und somit deren Verlauf genauer begutachtet werden. Die Generationszeit der von den genannten Arbeitsgruppen verwendeten Bakterien muss aber mit in Betracht gezogen werden. *Pseudomonas aeruginosa* besitzt eine Generationszeit von 30–40 Minuten [129], *Escherichia coli* von 20–30 Minuten [130] und *Staphylococcus aureus* von 25–30 Minuten [131]. Dem gegenüber steht MAP mit einer durchschnittlichen Generationenzeit von 1,4 Tagen [132, 133]. Die im Verhältnis enormen Unterschiede der Generationenzeit in Betracht ziehend, könnten die regelmäßiger erstellten Muster der emittierten VOCs wertvolle Informationen über genetische und umweltbedingte Veränderungen von Stoffwechselwegen der Mycobakterien liefern. Außerdem könnten sie die annähernde Berechnung des bakteriellen Bewuchses ermöglichen.

Eine weitere Möglichkeit für die Fortführung der Arbeit wäre die Frage in Hinblick auf die zweite Theorie von Bos et al. [101], ob und wie sich das VOC-Muster *in vitro* mit der Verwendung eines anderen Nähmediums oder der Bereitstellung eines anderen Nährstoffangebotes für die MAP-Kulturen ändern würde. McNerney et al. [134] verweist speziell bei Mycobakterien auf eventuelle große Unterschiede bei den emittierten VOCs in Bezug auf verschiedene Wachstumsbedingungen und Nährböden.

Auch könnte man in weiteren Versuchen die verwendete Säule oder den Fasertyp der zur Extraktion verwendeten SPME variieren, da so ein anderes Spektrum an VOCs nachgewiesen werden könnte, wie auch Tait et al. [135] berichtete.

Die im Rahmen dieser Arbeit erzielten Ergebnisse eröffnen auch die Möglichkeit, in Richtung einer *in vivo* Anwendung weitere Versuchsreihen anzustreben. So stellt sich die Frage, ob die identifizierten VOCs und das erstellte Markersset auch im *in vivo* Modell wiederzufinden sind. So könnten in Pilotmessungen Kotproben, Atem- oder Raumluft von mit MAP infizierten Tieren untersucht werden, um so das Markersset zu testen. Im weiteren Verlauf könnte auch hier eine Real-Time-Messung zeigen, wie schnell sich MAP unter verschiedenen Umgebungsbedingungen ausbreitet.

Abschließend wäre es interessant zu untersuchen, ob für andere Bakterien aus der Gattung der Mycobakterien oder gar aus der Abteilung der Actinobakterien auch ein solches Markerset erstellbar wäre.

ZUSAMMENFASSUNG UND THESEN

5.1 ZUSAMMENFASSUNG

DIESE Arbeit konnte mit ihrem beschriebenen Verfahren zum ersten Mal ein Markerset aus 34 eindeutig identifizierten VOCs zum Nachweis von *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* *in vitro* zeigen. Dies war sowohl bei unverdünnt vorliegenden Bakterienkulturen, als bei bis zum Faktor 10^{-6} verdünnten Stämmen durchgehend möglich.

Es konnten des Weiteren alle fünf verwendeten MAP-Stämme voneinander, aber auch vom verwendeten Leermedium unterschieden werden. Auch erzeugten die verringerten Konzentrationen bei den Verdünnungsstufen keine Probleme bei der Unterscheidung der jeweiligen Stämme. Zusätzlich unterschied sich das VOC-Muster des verwendeten Laborstammes deutlich von dem der Feldstämme.

Es zeigte sich, dass die Dichte des Bakterienwachstums einen Einfluss auf die Headspace-Konzentrationen von 2-Ethylfuran, 2-Methylfuran, 3-Methylfuran, 2-Pentylfuran, Ethylacetat, 1-Methyl-1-H-pyrrol und Dimethyldisulfid hat. Das zugrundeliegende Markerset ist aber auch bei großen Verdünnungsstufen weiterhin gültig, verschiedene Wachstumsstufen können somit detektiert werden.

5.2 THESEN

- 1) MAP-Bakterien erzeugen VOCs die mit den etablierten Methoden nachweisbar sind;
- 2) Die Festphasenmikroextraktion (SPME) in Kombination mit GC-MS ist eine geeignete Technik um VOCs über MAP-Kulturen bis in den Spurenbereich (ppbV) nachzuweisen;
- 3) Der verwendete Nährboden hat Einfluss auf die VOC-Emissionen und muss berücksichtigt werden;
- 4) MAP-Kulturen können anhand Ihrer VOC-Profile erkannt werden;
- 5) Genetisch verschiedene MAP-Stämme können über die Muster volatiler Verbindungen voneinander unterschieden werden;
- 6) Die VOC-Konzentrationen eines MAP-Stammes verschiedener bakterieller Dichte unterscheiden sich;
- 7) Die Analyse von VOCs über bakteriellen Kulturen erlaubt Rückschlüsse auf den bakteriellen Stamm und die aktuellen Wachstumsbedingungen
- 8) Eine VOC-Analyse über bakteriellen Kulturen bietet Potential für die Entwicklung diagnostischer Anwendungen

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] W. D. Collins, P. J. Rasch, B. E. Eaton, D. W. Fillmore, J. T. Kiehl, C. T. Beck, and C. S. Zender. Simulation of aerosol distributions and radiative forcing for indoex: Regional climate impacts. *Journal of Geophysical Research-Atmospheres*, 107(D19), Sep-Oct 2002. (Zitiert auf Seite 8.)
- [2] J. H. Woo, S. He, E. Tagaris, K. J. Liao, K. Manomaiphiboon, P. Amar, and A. G. Russell. Development of north american emission inventories for air quality modeling under climate change. *Journal of the Air & Waste Management Association*, 58(11):1483–1494, Nov 2008. (Zitiert auf Seite 8.)
- [3] A. Guenther, C. N. Hewitt, D. Erickson, R. Fall, C. Geron, T. Graedel, P. Harley, L. Klinger, M. Lerdau, W. A. McKay, T. Pierce, B. Scholes, R. Steinbrecher, R. Tallamraju, J. Taylor, and P. Zimmerman. A global-model of natural volatile organic-compound emissions. *Journal of Geophysical Research-Atmospheres*, 100(D5):8873–8892, May 20 1995. (Zitiert auf Seite 8.)
- [4] S. Schulz and J. S. Dickschat. Bacterial volatiles: the smell of small organisms. *Natural Product Reports*, 24(4):814–842, 2007. (Zitiert auf den Seiten 8, 30 und 32.)
- [5] F. K. Boland. Gas gangrene in compound fractures. *Ann Surg*, 90(4):603–13, Oct 1929. (Zitiert auf Seite 8.)
- [6] E. Tait, K. A. Hill, J. D. Perry, S. P. Stanforth, and J. R. Dean. Development of a novel method for detection of clostridium difficile using hs-spme-gc-ms. *Journal of Applied Microbiology*, 116(4):1010–1019, Apr 2014. (Zitiert auf Seite 8.)
- [7] M. Kai, M. Haustein, F. Molina, A. Petri, B. Scholz, and B. Piechulla. Bacterial volatiles and their action potential. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 81(6):1001–1012, Jan 2009. (Zitiert auf den Seiten 8, 13 und 32.)
- [8] P. Buzzini, A. Martini, F. Cappelli, U. M. Pagnoni, and P. Davoli. A study on volatile organic compounds (vocs) produced by tropical ascomycetous yeasts. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 84(4):301–11, 2003. (Zitiert auf Seite 8.)
- [9] U. Effmert, J. Kalderas, R. Warnke, and B. Piechulla. Volatile mediated interactions between bacteria and fungi in the soil. *Journal of Chemical Ecology*, 38(6):665–703, Jun 2012. (Zitiert auf Seite 8.)
- [10] J. S. Dickschat, T. Martens, T. Brinkhoff, M. Simon, and S. Schulz. Volatiles released by a streptomyces species isolated from the north sea. *Chemistry & Biodiversity*, 2(7):837–865, 2005. (Zitiert auf Seite 8.)
- [11] W. Filipiak, A. Sponring, M. M. Baur, C. Ager, A. Filipiak, H. Wiesenhofer, M. Nagl, J. Troppmair, and A. Amann. Characterization of volatile metabolites taken up by or released from streptococcus pneumoniae and haemophilus influenzae by using gc-ms. *Microbiology*, 158(Pt 12):3044–53, Dec 2012. (Zitiert auf Seite 8.)

- [12] W. Filipiak, A. Sponring, M. M. Baur, A. Filipiak, C. Ager, H. Wiesenhofer, M. Nagl, J. Troppmair, and A. Amann. Molecular analysis of volatile metabolites released specifically by staphylococcus aureus and pseudomonas aeruginosa. *BMC Microbiol*, 12:113, 2012. (Zitiert auf Seite 8.)
- [13] W. L. Wood, D. J. Higbee, M. Gooldy, S. Glogowski, R. Fitzpatrick, R. J. Karalus, T. D. Wood, and D. J. Mangino. Analysis of volatile bacterial metabolites by gas chromatography-mass spectrometry. *Spectroscopy*, 21(6):20–+, Jun 2006. (Zitiert auf Seite 8.)
- [14] W. Carroll, W. Lenney, T. Wang, P. Spanel, A. Alcock, and D. Smith. Detection of volatile compounds emitted by pseudomonas aeruginosa using selected ion flow tube mass spectrometry. *Pediatr Pulmonol*, 39(5):452–6, May 2005. (Zitiert auf Seite 8.)
- [15] D. Smith, P. Spanel, F. J. Gilchrist, and W. Lenney. Hydrogen cyanide, a volatile biomarker of pseudomonas aeruginosa infection. *J Breath Res*, 7(4):044001, Dec 2013. (Zitiert auf Seite 8.)
- [16] C. Höckelmann, T. Moens, and F. Jüttner. Odor compounds from cyanobacterial biofilms acting as attractants and repellents for free-living nematodes. *Limnology and Oceanography*, 49(5):1809–1819, 2004. (Zitiert auf Seite 8.)
- [17] A. H. McCain. A volatile antibiotic produced by streptomyces griseus. *Phytopathology*, 56(2):150–&, 1966. (Zitiert auf Seite 8.)
- [18] J. W. Whaley and A. M. Boyle. Antibiotic production by streptomyces species from the rhizosphere of desert plants. *Phytopathology*, 57(4):347–51, Apr 1967. (Zitiert auf Seite 9.)
- [19] T. S. Hora and R. Baker. Volatile factor in soil fungistasis. *Nature*, 225(5237):1071–&, 1970. (Zitiert auf Seite 9.)
- [20] T. S. Hora and R. Baker. Soil fungistasis - microflora producing a volatile inhibitor. *Transactions of the British Mycological Society*, 59(Dec):491–500, 1972. (Zitiert auf Seite 9.)
- [21] N. Fries. Effects of volatile organic compounds on growth and development of fungi. *Transactions of the British Mycological Society*, 60(Feb):1–21, 1973. (Zitiert auf Seite 9.)
- [22] M. Kai, U. Effmert, G. Berg, and B. Piechulla. Volatiles of bacterial antagonists inhibit mycelial growth of the plant pathogen rhizoctonia solani. *Arch Microbiol*, 187(5):351–60, May 2007. (Zitiert auf Seite 9.)
- [23] W. G. D. Fernando, R. Ramarathnam, A. S. Krishnamoorthy, and S.C. Savchuk. Identification and use of potential bacterial organic antifungal volatiles in biocontrol. *Soil Biology and Biochemistry*, 37(5):955–964, 2005. (Zitiert auf Seite 9.)
- [24] R. Duponnois and M. Kisa. The possible role of trehalose in the mycorrhiza helper bacterium effect. *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne De Botanique*, 84(6):1005–1008, Jun 2006. (Zitiert auf Seite 9.)
- [25] Moorelan.E and G. Stotzky. Morphological abnormalities of fungi induced by volatile microbial metabolites. *Mycologia*, 65(3):519–536, 1973. (Zitiert auf Seite 9.)
- [26] A. E. Mackie and R. E. Wheatley. Effects and incidence of volatile organic compound interactions between soil bacterial and fungal isolates. *Soil Biology & Biochemistry*, 31(3):375–385, Mar 1999. (Zitiert auf Seite 9.)

- [27] C. M. Ryu, M. A. Farag, C. H. Hu, M. S. Reddy, J. W. Kloepper, and P. W. Pare. Bacterial volatiles induce systemic resistance in arabidopsis. *Plant Physiol*, 134(3):1017–26, Mar 2004. (Zitiert auf Seite 9.)
- [28] M. D’Alessandro, M. Erb, J. Ton, A. Brandenburg, D. Karlen, J. Zopfi, and T. C. Turlings. Volatiles produced by soil-borne endophytic bacteria increase plant pathogen resistance and affect tritrophic interactions. *Plant Cell Environ*, 37(4):813–26, Apr 2014. (Zitiert auf Seite 9.)
- [29] C. M. Ryu, M. A. Farag, C. H. Hu, M. S. Reddy, H. X. Wei, P. W. Pare, and J. W. Kloepper. Bacterial volatiles promote growth in arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(8):4927–32, Apr 15 2003. (Zitiert auf Seite 9.)
- [30] M. A. Farag, C. M. Ryu, L. W. Sumner, and P. W. Pare. Gc-ms spme profiling of rhizobacterial volatiles reveals prospective inducers of growth promotion and induced systemic resistance in plants. *Phytochemistry*, 67(20):2262–2268, Oct 2006. (Zitiert auf den Seiten 9 und 32.)
- [31] H. Zhang, M. S. Kim, V. Krishnamachari, P. Payton, Y. Sun, M. Grimson, M. A. Farag, C. M. Ryu, R. Allen, I. S. Melo, and P. W. Pare. Rhizobacterial volatile emissions regulate auxin homeostasis and cell expansion in arabidopsis. *Planta*, 226(4):839–851, Sep 2007. (Zitiert auf Seite 9.)
- [32] C. Jardine, N. Gibson, and S. Hrudey. Detection of odour and health risk perception of drinking water. *Water Science and Technology*, 40(6):91–98, 1999. (Zitiert auf Seite 9.)
- [33] T. Kuritaochiai, K. Fukushima, and K. Ochiai. Volatile fatty-acids, metabolic by-products of periodontopathic bacteria, inhibit lymphocyte-proliferation and cytokine production. *Journal of Dental Research*, 74(7):1367–1373, Jul 1995. (Zitiert auf Seite 9.)
- [34] D.C. Robacker, A. J. Martinez, J. A. Garcia, and R. J. Bartelt. Volatiles attractive to the mexican fruit fly (diptera: Tephritidae) from eleven bacteria taxa. *Florida Entomologist*, 81(4):497, 1998. (Zitiert auf Seite 9.)
- [35] C. Hockelmann and F. Juttner. Volatile organic compound (voc) analysis and sources of limonene, cyclohexanone and straight chain aldehydes in axenic cultures of calothrix and plectonema. *Water Science and Technology*, 49(9):47–54, 2004. (Zitiert auf Seite 9.)
- [36] L. Tosi and C. Sola. Role of geosmin, a typical inland water odour, in guiding glass eel *anguilla anguilla* (l.) migration. *Ethology*, 95(3):177–185, 1993. (Zitiert auf Seite 9.)
- [37] D. C. Robacker and R. A. Flath. Attractants from staphylococcus aureus cultures for mexican fruit fly, *anastrepha ludens*. *J Chem Ecol*, 21(11):1861–74, Nov 1995. (Zitiert auf Seite 9.)
- [38] D.C. Robacker and R. J. Bartelt. Chemicals attractive to mexican fruit fly from *klebsiella pneumoniae* and *citrobacter freundii*. cultures sampled by solid-phase microextraction. *Journal of Chemical Ecology*, 23(12):2897–2915, 1997. (Zitiert auf Seite 9.)
- [39] C.-J. Lee, A. B. DeMilo, D. S. Moreno, and A. J. Martinez. Analysis of the volatile components of a bacterial fermentation attractive to the mexican fruit fly (*anastrepha ludens*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43(5):1348–1351, 1995. (Zitiert auf Seite 9.)
- [40] Y. Q. Gu, M. H. Mo, J. P. Zhou, C. S. Zou, and K. Q. Zhang. Evaluation and identification of potential organic nematicidal volatiles from soil bacteria. *Soil Biology & Biochemistry*, 39(10):2567–2575, Oct 2007. (Zitiert auf Seite 9.)

- [41] L. Ponnusamy, N. Xu, S. Nojima, D. M. Wesson, C. Schal, and C. S. Apperson. Identification of bacteria and bacteria-associated chemical cues that mediate oviposition site preferences by *aedes aegypti*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(27):9262–9267, Jul 8 2008. (Zitiert auf Seite 9.)
- [42] C. E. Barber, J. L. Tang, J. X. Feng, M. Q. Pan, T. J. G. Wilson, H. Slater, J. M. Dow, P. Williams, and M. J. Daniels. A novel regulatory system required for pathogenicity of *xanthomonas campestris* is mediated by a small diffusible signal molecule. *Mol Microbiol*, 24(3):555–566, May 1997. (Zitiert auf Seite 9.)
- [43] R. P. Ryan, Y. Fouhy, B. F. Garcia, S. A. Watt, K. Niehaus, L. Yang, T. Tolker-Nielsen, and J. M. Dow. Interspecies signalling via the *stenotrophomonas maltophilia* diffusible signal factor influences biofilm formation and polymyxin tolerance in *pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol*, 68(1):75–86, Apr 2008. (Zitiert auf Seite 9.)
- [44] C. M. Waters and B. L. Bassler. Quorum sensing: Cell-to-cell communication in bacteria. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 21:319–346, 2005. (Zitiert auf Seite 9.)
- [45] R. P. Ryan and J. M. Dow. Diffusible signals and interspecies communication in bacteria. *Microbiology*, 154(Pt 7):1845–58, Jul 2008. (Zitiert auf den Seiten 9 und 32.)
- [46] H. Hirakawa, Y. Inazumi, T. Masaki, T. Hirata, and A. Yamaguchi. Indole induces the expression of multidrug exporter genes in *escherichia coli*. *Mol Microbiol*, 55(4):1113–26, Feb 2005. (Zitiert auf Seite 9.)
- [47] N. M. Vega, K. R. Allison, A. S. Khalil, and J. J. Collins. Signaling-mediated bacterial persister formation. *Nat Chem Biol*, 8(5):431–3, May 2012. (Zitiert auf Seite 9.)
- [48] L. Eberl. N-acyl homoserinelactone-mediated gene regulation in gram-negative bacteria. *Systematic and Applied Microbiology*, 22(4):493–506, Dec 1999. (Zitiert auf Seite 9.)
- [49] D. M. Wrigley. Inhibition of *clostridium perfringens* sporulation by *bacteroides fragilis* and short-chain fatty acids. *Anaerobe*, 10(5):295–300, Oct 2004. (Zitiert auf Seite 9.)
- [50] Jr. Hinton, A. and M. E. Hume. Antibacterial activity of the metabolic by-products of a *veillonella* species and *bacteroides fragilis*. *Anaerobe*, 1(2):121–7, Apr 1995. (Zitiert auf Seite 9.)
- [51] D. Ezra, W. M. Hess, and G. A. Strobel. New endophytic isolates of *muscodor albus*, a volatile-antibiotic-producing fungus. *Microbiology*, 150(Pt 12):4023–31, Dec 2004. (Zitiert auf Seite 10.)
- [52] C. J. Alpha, M. Campos, C. Jacobs-Wagner, and S. A. Strobel. Mycofumigation by the volatile organic compound-producing fungus *muscodor albus* induces bacterial cell death through dna damage. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(3):1147–1156, Feb 2015. (Zitiert auf Seite 10.)
- [53] R. E. Wheatley. The consequences of volatile organic compound mediated bacterial and fungal interactions. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology*, 81(1-4):357–364, 2002. (Zitiert auf Seite 10.)
- [54] G. Metz, M. A. Gassull, A. R. Leeds, L. M. Blendis, and D. J. Jenkins. A simple method of measuring breath hydrogen in carbohydrate malabsorption by end-expiratory sampling. *Clin Sci Mol Med*, 50(3):237–40, Mar 1976. (Zitiert auf Seite 10.)

- [55] A. C. Monster and G. Boersma. Simultaneous determination of trichloroethylene and metabolites in blood and exhaled air by gas chromatography. *Int Arch Occup Environ Health*, 35(2):155–63, Aug 14 1975. (Zitiert auf Seite 10.)
- [56] B. O. Jansson and B. T. Larsson. Analysis of organic compounds in human breath by gas chromatography-mass spectrometry. *J Lab Clin Med*, 74(6):961–6, Dec 1969. (Zitiert auf Seite 10.)
- [57] A. Mutti, M. Falzoi, S. Lucertini, G. Arfini, M. Zignani, S. Lombardi, and I. Franchini. n-hexane metabolism in occupationally exposed workers. *Br J Ind Med*, 41(4):533–8, Nov 1984. (Zitiert auf Seite 10.)
- [58] S. M. Gordon. Identification of exposure markers in smokers’ breath. *J Chromatogr*, 511:291–302, Jul 6 1990. (Zitiert auf Seite 10.)
- [59] M. Phillips, G. A. Erickson, M. Sabas, J. P. Smith, and J. Greenberg. Volatile organic-compounds in the breath of patients with schizophrenia. *Journal of Clinical Pathology*, 48(5):466–469, May 1995. (Zitiert auf Seite 10.)
- [60] B. K. Q. Do, H. S. Garewal, N. C. Clements, Y. M. Peng, and M. P. Habib. Exhaled ethane and antioxidant vitamin supplements in active smokers. *Chest*, 110(1):159–164, Jul 1996. (Zitiert auf Seite 10.)
- [61] M. P. Habib, L. J. Tank, L. C. Lane, and H. S. Garewal. Effect of vitamin e on exhaled ethane in cigarette smokers. *Chest*, 115(3):684–90, Mar 1999. (Zitiert auf Seite 10.)
- [62] B. K. Krotoszynski, G. M. Bruneau, and H. J. Oneill. Measurement of chemical inhalation exposure in urban-population in the presence of endogenous effluents. *Journal of Analytical Toxicology*, 3(6):225–234, 1979. (Zitiert auf Seite 10.)
- [63] C. L. Arthur and J. Pawliszyn. Solid-phase microextraction with thermal-desorption using fused-silica optical fibers. *Analytical Chemistry*, 62(19):2145–2148, Oct 1 1990. (Zitiert auf Seite 10.)
- [64] H. Lord and J. Pawliszyn. Evolution of solid-phase microextraction technology. *Journal of Chromatography A*, 885(1-2):153–193, Jul 14 2000. (Zitiert auf Seite 10.)
- [65] C. Grote and J. Pawliszyn. Solid-phase microextraction for the analysis of human breath. *Analytical Chemistry*, 69(4):587–596, Feb 15 1997. (Zitiert auf Seite 11.)
- [66] M. Yonamine, N. Tawil, R. L. Moreau, and O. A. Silva. Solid-phase micro-extraction-gas chromatography-mass spectrometry and headspace-gas chromatography of tetrahydrocannabinol, amphetamine, methamphetamine, cocaine and ethanol in saliva samples. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 789(1):73–8, Jun 5 2003. (Zitiert auf Seite 11.)
- [67] G. Frison, L. Tedeschi, S. Maietti, and S. D. Ferrara. Determination of midazolam in human plasma by solid-phase microextraction and gas chromatography/mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 15(24):2497–501, 2001. (Zitiert auf Seite 11.)
- [68] Y. F. Sha, S. Shen, and G. L. Duan. Rapid determination of tramadol in human plasma by headspace solid-phase microextraction and capillary gas chromatography-mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal*, 37(1):143–7, Feb 7 2005. (Zitiert auf Seite 11.)

- [69] C. C. Camarasu, M. Mezei-Szuts, and G. B. Varga. Residual solvents determination in pharmaceutical products by gc-hs and gc-ms-spme. *J Pharm Biomed Anal*, 18(4-5):623–38, Dec 1998. (Zitiert auf Seite 11.)
- [70] D. H. Cho, S. H. Kong, and S. G. Oh. Analysis of trihalomethanes in drinking water using headspace-spme technique with gas chromatography. *Water Res*, 37(2):402–8, Jan 2003. (Zitiert auf Seite 11.)
- [71] D. W. Potter and J. Pawliszyn. Detection of substituted benzenes in water at the pg/ml level using solid-phase microextraction and gas chromatography-ion trap mass spectrometry. *J Chromatogr*, 625(2):247–55, Nov 20 1992. (Zitiert auf Seite 11.)
- [72] M. L. Musteata, F. M. Musteata, and J. Pawliszyn. Biocompatible solid-phase microextraction coatings based on polyacrylonitrile and solid-phase extraction phases. *Anal Chem*, 79(18):6903–11, Sep 15 2007. (Zitiert auf Seite 11.)
- [73] M. Phillips. Method for the collection and assay of volatile organic compounds in breath. *Analytical Biochemistry*, 247(2):272–278, May 1 1997. (Zitiert auf Seite 11.)
- [74] B. M. Kapur. Drug-testing methods and clinical interpretations of test results. *Bulletin on Narcotics*, 45(2):115–154, 1993. (Zitiert auf Seite 11.)
- [75] R. J. Chiodini, W. M. Chamberlin, J. Sarosiek, and R. W. McCallum. Crohn’s disease and the mycobacterioses: a quarter century later. causation or simple association? *Crit Rev Microbiol*, 38(1):52–93, Feb 2012. (Zitiert auf Seite 12.)
- [76] H. Koehler, F. Gierke, and P. Moebius. Paratuberculosis - current concepts and future of the diagnosis. *Magyar Allatorvosok Lapja*, (130):67–69, 2008. (Zitiert auf Seite 12.)
- [77] Collins M.T. Diagnosis of paratuberculosis. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 12(2):357–71, Jul 1996. (Zitiert auf Seite 12.)
- [78] M. T. Collins, S. J. Wells, K. R. Petrini, J. E. Collins, R. D. Schultz, and R. H. Whitlock. Evaluation of five antibody detection tests for diagnosis of bovine paratuberculosis. *Clin Diagn Lab Immunol*, 12(6):685–92, Jun 2005. (Zitiert auf Seite 12.)
- [79] L. A. Reddacliff, P. J. Nicholls, A. Vadali, and R. J. Whittington. Use of growth indices from radiometric culture for quantification of sheep strains of mycobacterium avium subsp. paratuberculosis. *Appl Environ Microbiol*, 69(6):3510–6, Jun 2003. (Zitiert auf Seite 13.)
- [80] R. J. Whittington, I. Marsh, M. J. Turner, S. McAllister, E. Choy, G. J. Eamens, D. J. Marshall, and S. Ottaway. Rapid detection of mycobacterium paratuberculosis in clinical samples from ruminants and in spiked environmental samples by modified bactec 12b radiometric culture and direct confirmation by is900 pcr. *J Clin Microbiol*, 36(3):701–7, Mar 1998. (Zitiert auf Seite 13.)
- [81] R. J. Whittington, I. Marsh, S. McAllister, M. J. Turner, D. J. Marshall, and C. A. Fraser. Evaluation of modified bactec 12b radiometric medium and solid media for culture of mycobacterium avium subsp. paratuberculosis from sheep. *J Clin Microbiol*, 37(4):1077–83, Apr 1999. (Zitiert auf Seite 13.)
- [82] S. Gumber and R. J. Whittington. Comparison of bactec 460 and mgit 960 systems for the culture of mycobacterium avium subsp. paratuberculosis s strain and observations on the effect of inclusion of ampicillin in culture media to reduce contamination. *Vet Microbiol*, 119(1):42–52, Jan 2007. (Zitiert auf Seite 13.)

- [83] R. W. Stich, B. Byrum, B. Love, N. Theus, L. Barber, and W. P. Shulaw. Evaluation of an automated system for non-radiometric detection of *Mycobacterium avium* paratuberculosis in bovine feces. *Journal of Microbiological Methods*, 56(2):267–275, Feb 2004. (Zitiert auf Seite 13.)
- [84] N Beth Harris, Suelee Robbe-Austerman, and Janet B Payeur. Effect of egg yolk on the detection of *mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* using the esp ii liquid culture system. *J Vet Diagn Invest*, 17(6):554–560, Nov 2005. (Zitiert auf Seite 13.)
- [85] M. Junger, W. Vautz, M. Kuhns, L. Hofmann, S. Ulbricht, J. I. Baumbach, M. Quintel, and T. Perl. Ion mobility spectrometry for microbial volatile organic compounds: a new identification tool for human pathogenic bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 93(6):2603–2614, Mar 2012. (Zitiert auf Seite 13.)
- [86] R. Fend, A. H. Kolk, C. Bessant, P. Buijtel, P. R. Klatser, and A. C. Woodman. Prospects for clinical application of electronic-nose technology to early detection of *mycobacterium tuberculosis* in culture and sputum. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(6):2039–45, Jun 2006. (Zitiert auf Seite 13.)
- [87] A. K. Pavlou, N. Magan, J. M. Jones, J. Brown, P. Klatser, and A. P. F. Turner. Detection of *mycobacterium tuberculosis* (tb) in vitro and in situ using an electronic nose in combination with a neural network system. *Biosensors & Bioelectronics*, 20(3):538–544, Oct 15 2004. (Zitiert auf Seite 13.)
- [88] N. Peled, R. Ionescu, P. Nol, O. Barash, M. McCollum, K. VerCauteren, M. Koslow, R. Stahl, J. Rhyan, and H. Haick. Detection of volatile organic compounds in cattle naturally infected with *mycobacterium bovis*. *Sensors and Actuators B-Chemical*, 171:588–594, Aug-Sep 2012. (Zitiert auf Seite 13.)
- [89] M. Phillips, V. Basa-Dalay, G. Bothamley, R. N. Cataneo, P. K. Lam, M. P. R. Natividad, P. Schmitt, and J. Wai. Breath biomarkers of active pulmonary tuberculosis. *Tuberculosis*, 90(2):145–151, Mar 2010. (Zitiert auf Seite 13.)
- [90] M. Phillips, R. N. Cataneo, R. Condos, G. A. R. Erickson, J. Greenberg, V. La Bombardi, M. I. Munawar, and O. Tietje. Volatile biomarkers of pulmonary tuberculosis in the breath. *Tuberculosis*, 87(1):44–52, Jan 2007. (Zitiert auf Seite 13.)
- [91] R. Purkhart, H. Kohler, E. Liebler-Tenorio, M. Meyer, G. Becher, A. Kikowatz, and P. Reinhold. Chronic intestinal mycobacteria infection: discrimination via voc analysis in exhaled breath and headspace of feces using differential ion mobility spectrometry. *Journal of Breath Research*, 5(2), Jun 2011. (Zitiert auf Seite 13.)
- [92] M. Shnayderman, B. Mansfield, P. Yip, H. A. Clark, M. D. Krebs, S. J. Cohen, J. E. Zeskind, E. T. Ryan, H. L. Dorkin, M. V. Callahan, T. O. Stair, J. A. Gelfand, C. J. Gill, B. Hitt, and C. E. Davis. Species-specific bacteria identification using differential mobility spectrometry and bioinformatics pattern recognition. *Analytical Chemistry*, 77(18):5930–5937, Sep 15 2005. (Zitiert auf Seite 13.)
- [93] M. Syhre and S. T. Chambers. The scent of *mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis*, 88(4):317–323, Jul 2008. (Zitiert auf Seite 13.)

- [94] M. Syhre, L. Manning, S. Phuanukoonnon, P. Harino, and S. T. Chambers. The scent of mycobacterium tuberculosis - part ii breath. *Tuberculosis*, 89(4):263–266, Jul 2009. (Zitiert auf Seite 13.)
- [95] L. X. Zhou, X. X. He, D. G. He, K. M. Wang, and D. L. Qin. Biosensing technologies for mycobacterium tuberculosis detection: Status and new developments. *Clinical & Developmental Immunology*, 2011. (Zitiert auf Seite 13.)
- [96] P. Trefz, H. Koehler, K. Klepik, P. Moebius, P. Reinhold, J.K. Schubert, and W. Miekisch. Volatile emissions from mycobacterium avium subsp. paratuberculosis mirror bacterial growth and enable distinction of different strains. *PLoS One*, 8(10):e76868, 2013. (Zitiert auf den Seiten 15, 18, 19, 21, 22, 23, 24, 26, 27, 28 und 29.)
- [97] P. Möbius, H. Hotzel, A. Raßbach, and H. Köhler. Comparison of 13 single-round and nested PCR assays targeting IS900, ISMav2, f57 and locus 255 for detection of mycobacterium avium subsp. paratuberculosis. *Veterinary Microbiology*, 126(4):324–333, jan 2008. (Zitiert auf Seite 15.)
- [98] V. C. Thibault, M. Grayon, M. L. Boschioli, E. Willery, C. Allix-Beguec, K. Stevenson, F. Biet, and P. Supply. Combined multilocus short-sequence-repeat and mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem-repeat typing of mycobacterium avium subsp. paratuberculosis isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, 46(12):4091–4094, oct 2008. (Zitiert auf Seite 15.)
- [99] A. Amonsin, L. L. Li, Q. Zhang, J. P. Bannantine, A. S. Motiwala, S. Sreevatsan, and V. Kapur. Multilocus short sequence repeat sequencing approach for differentiating among mycobacterium avium subsp. paratuberculosis strains. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(4):1694–1702, apr 2004. (Zitiert auf Seite 15.)
- [100] D. M. Collins, D. M. Gabric, and G. W. de Lisle. Identification of two groups of Mycobacterium paratuberculosis strains by restriction endonuclease analysis and DNA hybridization. *Journal of Clinical Microbiology*, 28(7):1591–1596, Jul 1990. (Zitiert auf den Seiten 15 und 31.)
- [101] L. D. Bos, P. J. Sterk, and M. J. Schultz. Volatile metabolites of pathogens: a systematic review. *PLoS Pathog*, 9(5):e1003311, May 2013. (Zitiert auf den Seiten 30, 31 und 33.)
- [102] F. Biet, I. A. Sevilla, T. Cochard, L. H. Lefrancois, J. M. Garrido, I. Heron, R. A. Juste, and other. Inter- and intra-subtype genotypic differences that differentiate Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis strains. *BMC Microbiol*, 12:264, Nov 2012. (Zitiert auf Seite 31.)
- [103] L. de Juan, J. Alvarez, A. Aranaz, A. Rodriguez, B. Romero, J. Bezoz, A. Mateos, and L. Dominguez. Molecular epidemiology of Types I/III strains of Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis isolated from goats and cattle. *Veterinary Microbiology*, 115(1-3):102–110, Jun 2006. (Zitiert auf Seite 31.)
- [104] L. de Juan, J. Alvarez, B. Romero, J. Bezoz, E. Castellanos, A. Aranaz, A. Mateos, and L. Dominguez. Comparison of four different culture media for isolation and growth of type II and type I/III Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis strains isolated from cattle and goats. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(9):5927–5932, Sep 2006. (Zitiert auf Seite 31.)
- [105] G. W. De Lisle, D. M. Collins, and H. F. Huchzermeyer. Characterization of ovine strains of Mycobacterium paratuberculosis by restriction endonuclease analysis and DNA hybridization. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 59(2):163–165, Jun 1992. (Zitiert auf Seite 31.)

- [106] H.K. Janagama, Senthilkumar, J.P. Bannantine, A. Kugadas, P. Jagtap, L. Higgins, B. Witthuhn, and S. Sreevatsan. Iron-sparing response of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis is strain dependent. *BMC Microbiology*, 22(10):268, October 2010. (Zitiert auf Seite 31.)
- [107] H. K. Janagama, K. i. Jeong, V. Kapur, P. Coussens, and S. Sreevatsan. Cytokine responses of bovine macrophages to diverse clinical Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis strains. *BMC Microbiol.*, 6:10, Feb 2006. (Zitiert auf Seite 31.)
- [108] E. Borrmann, P. Mobius, R. Diller, and H. Kohler. Divergent cytokine responses of macrophages to Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis strains of Types II and III in a standardized in vitro model. *Vet. Microbiol.*, 152(1-2):101–111, Aug 2011. (Zitiert auf Seite 31.)
- [109] A. Farhana, V. Saini, A. Kumar, J. R. Lancaster, and A. J. C. Steyn. Environmental heme-based sensor proteins: Implications for understanding bacterial pathogenesis. *Antioxidants & Redox Signaling*, 17(9):1232–1245, Nov 2012. (Zitiert auf Seite 31.)
- [110] D. A. Svistunenko, J. A. R. Worrall, S. B. Chugh, S. C. Haigh, R. A. Ghiladi, and P. Nicholls. Ferric haem forms of mycobacterium tuberculosis catalase-peroxidase probed by epr spectroscopy: Their stability and interplay with ph. *Biochimie*, 94(6):1274–1280, Jun 2012. (Zitiert auf Seite 31.)
- [111] T.J. Bull, A. Schock, J.M. Sharp, M. Greene, I.J. McKendrick, J. Sales, R. Linedale, and K. Stevenson. Genomic variations associated with attenuation in mycobacterium avium subsp. paratuberculosis vaccine strains. *BMC Microbiol*, 13:11, 2013. (Zitiert auf Seite 31.)
- [112] T. Borjesson, U. Stollman, and J. Schnurer. Volatile metabolites produced by six fungal species compared with other indicators of fungal growth on cereal grains. *Appl Environ Microbiol*, 58(8):2599–605, Aug 1992. (Zitiert auf Seite 32.)
- [113] F. C. Pollak and R. G. Berger. Geosmin and related volatiles in bioreactor-cultured streptomyces citreus cbs 109.60. *Appl Environ Microbiol*, 62(4):1295–9, Apr 1996. (Zitiert auf Seite 32.)
- [114] C. E. Scholler, H. Gurtler, R. Pedersen, S. Molin, and K. Wilkins. Volatile metabolites from actinomycetes. *J Agric Food Chem*, 50(9):2615–21, Apr 24 2002. (Zitiert auf Seite 32.)
- [115] J. S. Dickschat, S. C. Wenzel, H. B. Bode, R. Muller, and S. Schulz. Biosynthesis of volatiles by the mycobacterium myxococcus xanthus. *Chembiochem*, 5(6):778–87, Jun 7 2004. (Zitiert auf Seite 32.)
- [116] S. Schulz, J. Fuhlendorff, and H. Reichenbach. Identification and synthesis of volatiles released by the mycobacterium chondromyces crocatus. *Tetrahedron*, 60(17):3863–3872, Apr 19 2004. (Zitiert auf Seite 32.)
- [117] M. Syhre, J. M. Scotter, and S. T. Chambers. Investigation into the production of 2-pentylfuran by aspergillus fumigatus and other respiratory pathogens in vitro and human breath samples. *Medical Mycology*, 46(3):209–215, 2008. (Zitiert auf Seite 32.)
- [118] S. T. Chambers, M. Syhre, D. R. Murdoch, F. McCartin, and M. J. Epton. Detection of 2-pentylfuran in the breath of patients with aspergillus fumigatus. *Medical Mycology*, 47(5):468–476, 2009. (Zitiert auf Seite 32.)
- [119] R. K. Dhiman, P. Dinadayala, G. J. Ryan, A. J. Lenaerts, A. R. Schenkel, and D. C. Crick. Lipoarabinomannan localization and abundance during growth of mycobacterium smegmatis. *Journal of Bacteriology*, 193(20):5802–9, Oct 2011. (Zitiert auf Seite 32.)

- [120] B. J. Appelmelk, J. den Dunnen, N. N. Driessen, R. Ummels, M. Pak, J. Nigou, G. Larrouy-Maumus, S. S. Gurcha, F. Movahedzadeh, J. Geurtsen, E. J. Brown, M. M. Eysink Smeets, G. S. Besra, P. T. Willemsen, T. L. Lowary, Y. van Kooyk, J. J. Maaskant, N. G. Stoker, P. van der Ley, G. Puzo, C. M. Vandenbroucke-Grauls, C. W. Wieland, T. van der Poll, T. B. Geijtenbeek, A. M. van der Sar, and W. Bitter. The mannose cap of mycobacterial lipoarabinomannan does not dominate the mycobacterium-host interaction. *Cell Microbiol*, 10(4):930–44, Apr 2008. (Zitiert auf Seite 32.)
- [121] E. Rafidinarivo, M. Laneelle, H. Montrozier, P. Valero-Guillen, J. Astola, M. Luquin, J. Prome, and M. Daffe. Trafficking pathways of mycolic acids: structures, origin, mechanism of formation, and storage form of mycobacteric acids. *J Lipid Res*, 50(3):477–490, Mar 2009. (Zitiert auf Seite 32.)
- [122] C. E. Barry, R. E. Lee, K. Mdluli, A. E. Sampson, B. G. Schroeder, R. A. Slayden, and Y. Yuan. Mycolic acids: structure, biosynthesis and physiological functions. *Progress in Lipid Research*, 37(2-3):143–179, 1998. (Zitiert auf Seite 32.)
- [123] Y. Yuan, D. Mead, B. G. Schroeder, Y. Zhu, and C. E. Barry. The biosynthesis of mycolic acids in *Mycobacterium tuberculosis*. Enzymatic methyl(ene) transfer to acyl carrier protein bound meromycolic acid in vitro. *J. Biol. Chem.*, 273(33):21282–21290, Aug 1998. (Zitiert auf Seite 32.)
- [124] A. Chhabra, A.S. Haque, R.K. Pal, A. Goyal, R. Rai, S. Joshi, S. Panjikar, S. Pasha, R. Sankaranarayanan, and R.S. Gokhale. Nonprocessive $[2 + 2]e^-$ off-loading reductase domains from mycobacterial nonribosomal peptide synthetases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109(15):5681–5686, Apr 2012. (Zitiert auf Seite 32.)
- [125] M. Bunge, N. Araghipour, T. Mikoviny, J. Dunkl, R. Schnitzhofer, A. Hansel, F. Schinner, A. Wisthaler, R. Margesin, and T. D. Mark. On-line monitoring of microbial volatile metabolites by proton transfer reaction-mass spectrometry. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(7):2179–2186, Apr 2008. (Zitiert auf Seite 33.)
- [126] J. Rieder, P. Lirk, C. Ebenbichler, G. Gruber, P. Prazeller, W. Lindinger, and A. Amann. Analysis of volatile organic compounds: possible applications in metabolic disorders and cancer screening. *Wiener Klinische Wochenschrift*, 113(5-6):181–185, Mar 15 2001. (Zitiert auf Seite 33.)
- [127] R. M. S. Thorn, D. M. Reynolds, and J. Greenman. Multivariate analysis of bacterial volatile compound profiles for discrimination between selected species and strains in vitro. *Journal of Microbiological Methods*, 84(2):258–264, Feb 2011. (Zitiert auf Seite 33.)
- [128] P. Spanel and D. Smith. Progress in sift-ms: breath analysis and other applications. *Mass Spectrom Rev*, 30(2):236–67, Mar-Apr 2011. (Zitiert auf Seite 33.)
- [129] E. O. Powell. An outline of the pattern of bacterial generation times. *Journal of General Microbiology*, 18(2):382–&, 1958. (Zitiert auf Seite 33.)
- [130] H. Bremer. Variation of generation times in *escherichia coli* populations: its cause and implications. *Journal of General Microbiology*, 128(12):2865–76, Dec 1982. (Zitiert auf Seite 33.)
- [131] R. Lindqvist. Estimation of *staphylococcus aureus* growth parameters from turbidity data: Characterization of strain variation and comparison of methods. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(7):4862–4870, Jul 2006. (Zitiert auf Seite 33.)

- [132] R. S. Lambrecht, J. F. Carriere, and M. T. Collins. A model for analyzing growth-kinetics of a slowly growing mycobacterium sp. *Applied and Environmental Microbiology*, 54(4):910–916, Apr 1988. (Zitiert auf Seite 33.)
- [133] N. Elguezabal, F. Bastida, I. A. Sevilla, N. Gonzalez, E. Molina, J. M. Garrido, and R. A. Juste. Estimation of mycobacterium avium subsp paratuberculosis growth parameters: Strain characterization and comparison of methods. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(24):8615–8624, Dec 2011. (Zitiert auf Seite 33.)
- [134] R. McNerney, K. Mallard, P. I. Okolo, and C. Turner. Production of volatile organic compounds by mycobacteria. *FEMS Microbiol Lett*, 328(2):150–6, Mar 2012. (Zitiert auf Seite 33.)
- [135] E. Tait, J. D. Perry, S. P. Stanforth, and J. R. Dean. Identification of volatile organic compounds produced by bacteria using hs-spme-gc-ms. *Journal of Chromatographic Science*, 52(4):363–373, Apr 2014. (Zitiert auf Seite 33.)

SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG

HIERMIT erkläre ich, Klaus Klepik, geboren am 02.07.1986 in Ingolstadt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel „Nachweis Volatiler Organischer Verbindungen zur Identifizierung und Charakterisierung von *Mycobacterium avium* (subsp. *paratuberculosis*)“ selbstständig unter der Betreuung von Prof. Dr. med. Dipl. chem. J. Schubert und ohne Verwendung anderer als der angegebenen Hilfsmittel (und Quellen) verfasst habe. Die Dissertation ist bisher keiner anderen Fakultät vorgelegt worden. Ich erkläre weiterhin, dass ich zuvor kein Promotionsverfahren erfolglos beendet habe.

Rostock, den 22. September 2017

Klaus Klepik

TABELLARISCHER LEBENSLAUF

ANHANG

6.1 DANKSAGUNG

ZU Beginn möchte ich mich bei Prof. Dr. Jochen K. Schubert und bei Dr. Wolfram Miekisch für alles bedanken. Ohne die Überlassung des Themas und die freundliche Betreuung über all die Jahre und in all den Phasen dieser Arbeit wäre diese Dissertation nicht möglich gewesen.

Des Weiteren möchte ich Dr. Phillip Trefz danken, ohne dessen Rat, Tat und Wissen in biologischen, chemischen und biochemischen Fragen diese Arbeit bei weitem anders geworden wäre.

Dr.-Ing. Niels Lohmann möchte ich danken, da ohne sein Wissen und den Support in Sachen LaTeX im letzten zeitlichen Abschnitt der Arbeit diese nicht so schön geworden wäre, wie sie nun vor mir liegt.

Prof. Dr. Dr. Petra Reinhold, Dr. Heike Köhler und Dipl.-Tierärztin Sina Fischer vom Friedrich-Löffler-Institut in Jena danke ich für die kontinuierliche und sehr erfolgreiche Zusammenarbeit.

Dr. Patricia Fuchs danke ich für die Gespräche, die Unterstützung und den Umgang in all den Jahren bei Rombat.

Ich möchte mich auch noch explizit bei allen anderen Mitgliedern und Unterstützern der Arbeitsgruppe Atemgas-Analytik für eure freundliche und aufmerksame Zusammenarbeit bedanken.

Bei Dr. Götz Klaunick, Dr. Gerrit Bruns und Andrea Klepik möchte ich mich für die penible Grammatik- und Rechtschreibprüfung bedanken.

Zum Schluss ist es mir ein Bedürfnis, dem wichtigsten Teil meines Lebens zu danken: Meiner neuen kleinen Familie, meinen Freunden und meinen Eltern. Insbesondere letzteren gilt mein Dank, da ohne euch der Weg, der bis zu dieser Dissertation führte, nie möglich gewesen wäre.

6.2 ORIGINALPUBLIKATIONEN UND TAGUNGSBEITRÄGE

6.2.1 ORIGINALPUBLIKATIONEN

- Trefz P, Koehler H, **Klepik K**, Moebius P, Reinhold P, et al. (2013) Volatile Emissions from *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* Mirror Bacterial Growth and Enable Distinction of Different Strains. PLoS ONE 8(10): e76868. doi: 10.1371/journal.pone.0076868
- Bergmann A, Trefz P, Fischer S, **Klepik K**, et al. (2015) In Vivo Volatile Organic Compound Signatures of *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis*. PLoS ONE 27(4): doi: 10.1371/journal.pone.0123980

6.2.2 TAGUNGSBEITRÄGE

- **Klepik K**, Koehler H, Miekisch W, Reinhold P, Schubert J, Trefz P. HS-SPME-GC/MS For Detection of TB Related VOC Patterns in Map Cultures. PITTCON 2012 (Vortrag)
- Bergmann A, Fischer S, **Klepik K**, Koehler H, Miekisch W, Reinhold P, Schubert J, Trefz P. In Vivo Detection of Volatile Signatures from *Mycobacterium Avium* spp. *Paratuberculosis* (MAP) by Means of Needle-Trap-Micro-Extraction (NTME), Solid-Phase-Micro-Extraction (SPME) and GC-MS. PITTCON 2014 (Poster)
- Fischer S, Trefz P, Bergmann A, **Klepik K**, Ziller M, Schubert JK, Miekisch W, Köhler H, Reinhold P. Impact of food intake on in vivo VOC concentrations in exhaled breath of healthy goats. International Association of Breath Research (IABR) 2015 (Poster)