

## 6 Diskussion

### 6.1 Material und Methode

#### 6.1.1 Entwicklung der Methode

Es ist allgemein üblich, bei der Entwicklung neuer Systeme Machbarkeitsstudien durchzuführen. Sie sollen die Einsatztauglichkeit für spezifische Anwendungsgebiete überprüfen. Mit der vorliegenden Arbeit wurde als Alternative zu existierenden modernen molekularbiologischen und serologischen Methoden (DAHLÉN et al. 1990, EICK und PFISTER 2002, GREENSTEIN 1988, SLOTS und REYNOLDS 1982, WOLFF et al. 1991) die Fähigkeit des neu entwickelten Prototyps eines Multigassensorsystems untersucht, bakterielle Spezies *in vitro* durch ihre Ausdünstungen zu identifizieren.

Ausgangspunkt für Voruntersuchungen der vorliegenden Arbeit war der Prototyp des Multigassensorsystems. Art und Weise der Probensammlung zur Bereitstellung des Gasraumes über einer bakteriellen Kultur für die Sensoren des Messgerätes wurden mit Vorversuchen entwickelt. Erste Messungen von bakteriellen Kolonien auf einem Teflonträger zeigten Signaländerungen, die sich nicht vom Basiswiderstand unterschieden. Eine zweite Reihe von Messungen untersuchte die Gasräume über Ausschnitten einer bakteriellen Kultur von Kolonien auf Columbia-Blutagar auf dem Teflonträger. Durch die Hauptkomponentenanalyse und die lineare Diskriminanzanalyse konnten Unterscheidungen zwischen fünf parodontalpathogenen Spezies und sterilen Columbia-Blutagars erkannt werden. Wenige Messreihen von Kulturen der fünf Spezies auf Columbia-Blutagar mit Cystein-Zusatz zeigten Differenzen zu den Signalen von Kulturen auf Columbia-Blutagar ohne Zusatz von Cystein (Daten sind nicht aufgeführt). Diese Auswertungen haben gezeigt, dass ein bedeutender Faktor für die Anwendung von Multigassensorsystemen und damit verbunden der Signalentstehung die biochemische Stimulierung der bakteriellen Proben ist (PAVLOU et al. 2000, PAVLOU et al. 2002b). Die Pathogene müssen in einen katabolen Stoffwechsel kommen können, um die Freisetzung von charakteristischen „Düften“ möglich zu machen (PAVLOU et al. 2002b). Wasser, Nährstoffe in komplexen Medien und Wärme sind Voraussetzung dafür. Für die vorliegende Untersuchung wurden deshalb die bakteriellen Proben, wie unter Punkt 4.2.2 beschrieben, kultiviert und in ihrer Kultur unter standardisierten Messbedingungen in einer dafür entwickelten Messkammer gemessen. Im Vergleich zur vorliegenden Studie sind in der Literatur sowohl Untersuchungen von bakteriellen Spezies auf Agarkulturen (GIBSON et al. 1997, HOLMBERG et al. 1998,

PAVLOU et al. 2002a) als auch in Flüssigmedien (AATHITHAN et al. 2001, GARDNER et al. 1998, PAVLOU et al. 2000, PAVLOU et al. 2002b) publiziert. Des Weiteren wurden bakterielle Kolonien von Agarplatten entnommen und unmittelbar danach als Bakteriensuspension in steriler physiologischer Kochsalzlösung gemessen (DUTTA et al. 2002, LAI et al. 2002, THALER 2002). Auch mit der Methode dieser Studien konnten trotz fehlender Substrate in der Kochsalzlösung unterscheidbare Gruppierungen der untersuchten Spezies gezeigt werden. Insofern ist der für die vorliegende Untersuchung der parodontalpathogenen Spezies gewählte Versuchsansatz als sinnvoll zu bezeichnen.

### 6.1.2 Auswahl der bakteriellen Spezies

Spezifische gramnegative Bakterien spielen eine ätiologische Rolle in verschiedenen Formen humaner parodontaler Erkrankungen (DZINK et al. 1988, HAFFAJEE und SOCRANSKY 1994, MOORE und MOORE 1994, SLOTS 1976, SLOTS und GENCO 1984). *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Eikenella corrodens*, *Fusobacterium nucleatum* wurden neben anderen Spezies mit fortschreitendem parodontalen Krankheitsverlauf assoziiert (DZINK et al. 1988, SLOTS und GENCO 1984). Sie sind als Markerkeime für die Krankheitsaktivität anerkannt.

Für die vorliegenden Untersuchungen wurden die Markerkeime *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Eikenella corrodens*, *Fusobacterium nucleatum* zunächst ausgewählt, weil sie ohne besondere Ansprüche auf Agarkulturplatten anaerob anzüchtbar sind.

Parodontalpathogene Keime geben flüchtige Verbindungen ab und sind damit an der Bildung von Mundgeruch beteiligt (AWANO et al. 2002, LEE 2003, TONZETICH 1977, YAEGAKI und SANADA 1992a, 1992b). Untersuchungen durch Halimeter und gaschromatographische Verfahren konnten flüchtige Schwefelverbindungen nachweisen, aus denen der Mundgeruch hauptsächlich besteht (KOSHIMUNE et al. 2003, LEE 2003, PERSSON et al. 1989, TONZETICH 1971, 1977, TONZETICH und MC BRIDE 1981, YAEGAKI und SANADA 1992b). Zwischen der Konzentration dieser Verbindungen und dem Schweregrad der Parodontitis wurden Korrelationen nachgewiesen. Mit zunehmendem parodontalen Attachmentverlust können höhere Konzentrationen dieser Verbindungen gemessen werden (MIYAZAKI et al. 1996, MORITA und WANG 2001a, PERSSON et al. 1989, RIZZO 1967, TONZETICH 1978, YAEGAKI und SANADA 1992b). Methylmerkaptan und Schwefelwasserstoff sind die beiden nachweisbaren Hauptkomponenten. Entzündliche

Erkrankungen, wie die Parodontitis marginalis, sind charakterisiert durch einen gesteigerten Zerfall von Zellen, was wiederum zu einer Erhöhung der Konzentration von freien Aminosäuren führt. Insbesondere Leukozyten enthalten hohe Mengen an schwefelhaltigen Aminosäuren. Diese Aminosäuren sind Substrate des bakteriellen Stoffwechsels (KLEINBERG und WESTBAY 1992, LEE 2003). Welche spezifischen Organismen welchen Stoffwechselweg ausführen können, ist bisher nicht ausreichend bekannt (GREENMAN 1999). Derzeit sind wenige Informationen über spezifische Enzyme und ihre Synthese, Regulierung und Kontrolle im Stoffwechselgeschehen der beteiligten bakteriellen Spezies verfügbar. Durch die sensorische „organoleptische“ Überprüfung von Kulturen oraler Spezies durch trainierte Personen kann ein subjektiver Eindruck von Typen flüchtiger Verbindungen gewonnen werden. Die Hauptkategorien der anwesenden Komponenten werden als Sulfide, Amine, Säuren, Indole und andere unterschieden. Die Spezies *F. nucleatum* ist dafür bekannt, stark flüchtige schwefelhaltige Verbindungen neben Säuren und Aminen zu bilden. *P. gingivalis* ist ebenfalls ein starker Produzent von flüchtigen schwefelhaltigen Komponenten neben Aminen, Indol und anderen (GREENMAN 1999). Eine objektivere Analyse der flüchtigen Komponenten oraler Spezies ist durch gaschromatographische Verfahren möglich. Gaschromatographische Bestimmungen der flüchtigen Komponenten im Gasraum über Kulturen zeigen unterschiedlich zusammengesetzte Gasgemische und Konzentrationen der nachweisbaren Komponenten für verschiedene parodontalpathogene Spezies (GREENMAN 1999, PERSSON et al. 1990). Die Arbeitsgruppe von PERSSON et al. (1990) untersuchte gaschromatographisch in Kombination mit einem Flammenfotometer flüchtige Schwefelkomponenten im Gasraum über Kulturen und Suspensionen parodontalpathogener Spezies. Sie konnten unterschiedliche Konzentrationen von Schwefelwasserstoff bzw. Methylmerkaptan im Gasraum über bakteriellen Kulturen in Serum nachweisen (Tab. 18). Zu den stärksten Produzenten von Schwefelwasserstoff gehörte u. a. *P. gingivalis* mit einer Konzentration von mehr als 200  $\mu\text{mol/l}$  Serum. Diese Spezies produzierte auch signifikante Beträge von Methylmerkaptan in Serum (100-200  $\mu\text{mol/l}$ ). Im Vergleich dazu war die Konzentration von Schwefelwasserstoff, produziert durch *F. nucleatum* mit 20-100  $\mu\text{mol/l}$ , bzw. durch *E. corrodens* mit 5-20  $\mu\text{mol/l}$  Serum deutlich geringer. Methylmerkaptanproduktion im Serum konnte im Vergleich zu *P. gingivalis* nur noch für *F. nucleatum* mit einer sehr viel geringeren Konzentration von 1-10  $\mu\text{mol/l}$  nachgewiesen werden. Die gaschromatographische Bestimmung von Schwefelkomponenten, gemessen über Bakteriensuspensionen in isotoner Kochsalzlösung mit Zusatz der Aminosäuren L-Methionin oder L-Cystein, zeigte unterschiedliche Produktionsraten von Methylmerkaptan aus L-Methionin

für die Spezies *F. nucleatum* und *P. gingivalis* mit 70-100 nmol/h/g Protein, bzw. 15-40 nmol/h/g Protein (Tab. 19). Die Bildung von Schwefelwasserstoff aus L-Cystein konnte mit sehr geringen Produktionsraten für *A. actinomycetemcomitans* (>10 nmol/h/g Protein), etwas stärkeren für *P. gingivalis* (10-50 nmol/h/g Protein) und hohen für *E. corrodens* und *F. nucleatum* (100-400 nmol/h/g Protein) nachgewiesen werden. Die geringen Bildungsraten von Schwefelkomponenten aus den Substraten im Gegensatz zu hohen Konzentrationen im Serum durch die Spezies *P. gingivalis* wird durch den bekannten bevorzugten Abbau von Peptiden erklärt. Die Spezies *F. nucleatum* verstoffwechselt sowohl Aminosäuren als auch Peptide.

Spezies	Methylmerkaptan in $\mu\text{mol/l}$ Serum	Schwefelwasserstoff in $\mu\text{mol/l}$ Serum
<i>P. gingivalis</i>	100-200	>200
<i>F. nucleatum</i>	1-10	20-100
<i>E. corrodens</i>		5-20

Tab. 18 Gaschromatographische-flammenphotometrische Analyse schwefelhaltiger Verbindungen im Gasraum über Serum-Kulturen von einigen oralen Spezies (PERSSON et al. 1990)

Spezies	Methylmerkaptan aus L-Methionin in nmol/h/g Protein	Schwefelwasserstoff aus L-Cystein in nmol/h/g Protein
<i>P. gingivalis</i>	15-40	10-50
<i>F. nucleatum</i>	70-100	100-400
<i>E. corrodens</i>		100-400
<i>A. actinomycetem-comitans</i>		> 10

Tab. 19 Gaschromatographische-flammenphotometrische Analyse schwefelhaltiger Verbindungen im Gasraum über Suspensionen von oralen Spezies in isotoner Kochsalzlösung mit Zusatz der Aminosäuren L-Methionin oder L-Cystein (PERSSON et al. 1990)

Die Arbeit von GREENMAN (1999) untersuchte gaschromatographisch den Gasraum über Kulturen oraler Spezies. Sie konnten massenspektrometrisch unterschiedliche Konzentrationen flüchtiger Komponenten und unterschiedlich zusammengesetzte Gasmische für verschiedene orale Spezies nachweisen (siehe Tab. 20). Für die Spezies *P. gingivalis* wurden weit mehr flüchtige Komponenten ermittelt als für *P. intermedia* und *F. nucleatum*. Die Ergebnisse dieser beiden vorgestellten Untersuchungen (GREENMAN 1999, PERSSON et al. 1990) zeigen, dass sich die Spezies *P. gingivalis*, *P. intermedia* und *F. nucleatum* durch die Zusammensetzung der flüchtigen Gasmische über ihren Kulturen unterscheiden lassen. Für einige der nachgewiesenen Verbindungen wie Ethanol, Schwefelwasserstoff und Methylmerkaptan wurden mit dem Multigassensensorsystem KAMINA, welches auch in der vorliegenden Arbeit verwendet wird, Nachweisgrenzen ermittelt, die im Konzentrationsbereich von wenigen Teilchen pro Billion liegen (siehe Tab. 21) (GOSCHNICK 2003). Aus diesem Grund ist die vorliegende Untersuchung davon ausgegangen, dass die ausgewählten fünf Parodontalpathogene durch ihre

flüchtigen Verbindungen mit dem Multigassensensorsystem unterschieden werden können. Ergebnisse der Vortests der vorliegenden Studie haben eine Unterscheidung der fünf ausgewählten Spezies gezeigt und waren ausschlaggebend für die Weiterführung der Untersuchung zur Entwicklung eines stabilen LDA-Modells, mit dem unbekannte Proben dieser Keime identifiziert werden können.

Flüchtige Komponenten	<i>P. gingivalis</i>	<i>P. intermedia</i>	<i>F. nucleatum</i>
Schwefelwasserstoff	10-100 ppm	entdeckt	10-100 ppm
Methanethiol	10-100 ppm		10-100 ppm
Trimethylamin	10-100 ppm		10-100 ppm
Ethanol	10-100 ppm	10 ppm	10-100 ppm
1-Propanol	10-100 ppm		10-100 ppm
2-Butanon	10 ppm		
Butanamin	10-100 ppm		10-100 ppm
Essigsäure	10-100 ppm	>100 ppm	10-100 ppm
1-Butanol	10-100 ppm	10 ppm	10-100 ppm
Propionsäure	10-100 ppm	10 ppm	
Dimethyldisulfid	>100 ppm		>100 ppm
2-Methyl-Propionsäure	10-100 ppm	10-100 ppm	
Butansäure	>100 ppm		>100 ppm
Hexanamin	>100 ppm		10-100 ppm
3-Methyl-Butansäure	>100 ppm	10-100 ppm	10-100 ppm
2-Methyl-Butansäure	>100 ppm	10-100 ppm	
Pentanonsäure	10 ppm		
2,5-Dimethyl-Pyrazin	10-100 ppm		
1,4-Butandiamin	10-100 ppm		
1,5-Pentandiamin	10-100 ppm		
Benzaldehyd	10 ppm		
Dimethyltrisulfid	10-100 ppm		
Dimethyl	10-100 ppm		
Dimethyltetrasulfid	10 ppm		
Benzensäure	10-100 ppm		
Indol	10-100 ppm		10-100 ppm
Toluen			10-100 ppm

Tab. 20 Gaschromatographische-massenspektrometrische Analyse der flüchtigen Komponenten im Gasraum über Kulturen von einigen oralen Spezies (GREENMAN 1999)

		Zinndioxid-Gassensorarray	Wolframtrioxid-Gassensorarray
Methan	CH <sub>4</sub>	< 10 ppm	< 50 ppm
Benzol	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub>	< 0,1 ppm	< 0,1 ppm
Ammoniak	NH <sub>3</sub>	< 0,1 ppm	< 0,5 ppm
Stickstoffdioxid	NO <sub>2</sub>	< 1,0 ppm	< 0,5 ppm
Schwefelwasserstoff	H <sub>2</sub> S	< 0,1 ppm	< 0,1 ppm
Methylmerkaptan	CH <sub>3</sub> SH		< 3,0 ppm
Schwefeldioxid	SO <sub>2</sub>	< 1,0 ppm	< 1,0 ppm
Kohlenmonoxid	CO	< 0,1 ppm	
Formaldehyd	CH <sub>2</sub> O	< 0,5 ppm	< 1,0 ppm

Tab. 21 Nachweisgrenzen für einige Verbindungen für die beiden Detektionshalbleitermaterialien der KAMINA (GOSCHNICK 2003)

### 6.1.3 Messung anaerober und mikroaerophiler Keime

In der vorliegenden Studie wurden anaerobe und mikroaerophile Bakterien *in vitro* mit einem Multigassensensorsystem untersucht, das Luft als Trägergas nutzt. Es ist davon auszugehen, dass die Bakterienzellen durch den kurzzeitigen Sauerstoffkontakt während der Messung nicht vollständig sterben. Denn unmittelbar nach dem Start der Messung einer bakteriellen Kultur zeigte sich ein signifikanter Abfall der Sensorsignale auf dem Computerbildschirm, der innerhalb von 20 Minuten in eine statische Phase überging. Voruntersuchungen zeigten einen langsamen und flach abfallenden Verlauf der Sensorsignale nach mehr als einer Stunde für die Messung einer bakteriellen Kultur über die Dauer von mehreren Stunden. Da die gemessenen Proben Reinkulturen von Laborspezies waren, sind sehr hohe Zellzahlen in einer Probe vorhanden ( $10^{10}$  bis  $10^{20}$  Zellen pro Kultur). Möglicherweise sterben einige Zellen der anaeroben, Sauerstoffempfindlichen Spezies *P. gingivalis* und *F. nucleatum* während der Messung. Für die Auswertung der Messung ist jedoch die Konzentration der Keime unbedeutend. Bei den Spezies *A. actinomycetemcomitans* und *E. corrodens* handelt es sich um mikroaerophile, bzw. um fakultativ anaerobe Spezies. Sie können den Sauerstoff gut tolerieren. Außerdem haben Erfahrungswerte des Arbeitslabors und der Bakteriologie der Mikrobiologie der Charité gezeigt, dass die untersuchten Laborstämme der fünf Spezies bis zu einer Stunde Sauerstoff tolerieren können. So wurden die Stammkulturen der fünf Spezies für die Herstellung von Proben und zur Erhaltung der Spezies regelmäßig unter sauerstoffhaltiger Atmosphäre in einer keimarmen Arbeitsbank subkultiviert. Dieser Arbeitsvorgang umfasste bis zu 30 Minuten pro Spezies. Während des Untersuchungszeitraumes musste nur die Stammkultur der Spezies *F. nucleatum* einmal erneuert werden. Werden dagegen für andere Fragestellungen subgingivale klinische Proben für quantitative Bestimmungen kultiviert, ist das Arbeiten unter einer Anaerobierbank obligat, da viel kleinere Zellzahlen anaerober Spezies bestimmt werden müssen.

In der Literatur werden Multigassensensorsysteme vorgestellt, die sowohl Luft als auch Stickstoff als Trägergas verwenden (AATHITHAN et al. 2001, GARDNER et al. 1998, GIBSON et al. 1997, HOLMBERG et al. 1998). Die Messkammer des Prototyps der vorliegenden Untersuchungen war so aufgebaut, dass ein Deckel von der Größe des Deckels einer Zellkulturschale die Probe bedeckte. Das Volumen über der bakteriellen Probe war sehr klein. Eine Reagenzienmischung zur Schaffung eines anaeroben Milieus hätte keinen Platz gefunden. Kommerziell verfügbare Anaerobiersysteme benötigen im Durchschnitt mindestens 30 Minuten, um den Sauerstoffgehalt von eineinhalb Litern Luft unter 1 % zu senken. *In vitro* Messungen der

anaeroben Spezies *Clostridium* spp. und *Bacteroides fragilis* nutzten eine Messkammer mit einem Volumen von eineinhalb Litern, die eine kommerzielle Reagenzienmischung zur Herstellung eines anaeroben Milieus enthielt (PAVLOU et al. 2002a).

Aufgrund der technischen Möglichkeiten des Gerätes war es nur möglich, Luft als Trägergas zu nutzen. Im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit haben veröffentlichte Studien von Multigassensystemen hauptsächlich aerobe Spezies untersucht (AATHITHAN et al. 2001, DUTTA et al. 2002, GARDNER et al. 1998, GIBSON et al. 1997, HOLMBERG et al. 1998, PAVLOU et al. 2000, PAVLOU et al. 2002b). In diesen Untersuchungen wurde ebenfalls Luft als Trägergas (DUTTA et al. 2002, GARDNER et al. 1998, GIBSON et al. 1997, HOLMBERG et al. 1998, PAVLOU et al. 2000, PAVLOU et al. 2002b) oder Stickstoff (AATHITHAN et al. 2001) verwendet. AATHITHAN et al. (2001) konnten mit einem System, das Stickstoff als Trägergas nutzte, für die aeroben Spezies *Proteus mirabilis*, *Klebsiella* spp. und aerobe *Staphylokokken* auswertbare Sensorsignale nachweisen. Der Gasraum über fakultativ anaeroben *Enterococce*n (AATHITHAN et al. 2001, GIBSON et al. 1997, HOLMBERG et al. 1998, PAVLOU et al. 2000) wurde sowohl mit Stickstoff als auch mit Luft als Trägergas gemessen, die mikroaerophile Spezies *Helicobacter pylori* mit Luft als Trägergas (PAVLOU et al. 2000). Die Messmethode der vorliegenden Studie hat zwar den Nachteil, dass anaerobe Keime nicht unter optimalen Bedingungen gemessen werden, sondern mit Sauerstoff in Berührung kommen. Aber die Geruchsmessung lieferte dennoch auswertbare Ergebnisse.

#### **6.1.4 Alter der Bakterien zum Zeitpunkt der Messung**

In der vorliegenden Studie betrug das Alter der bakteriellen Kulturen zum Zeitpunkt der Messung zwei bis zehn Tage. Die Dauer der Kultivierung richtete sich nach Angaben, die in der Literatur für die Kultivierung von Anaerobiern auf festen Nährböden angegeben sind (DAHLÉN und ROSLING 1998, DAHLÉN et al. 1990, DAHLÉN et al. 1996, EICK und PFISTER 2002, JOHANNSSON et al. 1994, LAUGHON et al. 1982, MOMBELLI et al. 2000, MOORE et al. 1982, PERSSON et al. 1990, PIRNAZAR et al. 1999, QUIRYNEN et al. 1998, SLOTS 1976, SLOTS et al. 1979, SOCRANSKY et al. 1988, TANNER et al. 1979, WILLIS et al. 1999). Da alle drei bis vier Tage von den fünf Spezies Subkulturen angefertigt werden konnten, sind nach dieser Zeit noch teilungsfähige Zellen vorhanden. Die Generationszeiten bakterieller Mikroorganismen können stark von Art zu Art variieren. Obligate Anaerobier wachsen in vitro bedeutend langsamer als Aerobier. (KAYSER et al. 1998). Der Zeitpunkt des Einsetzens der Phase des Absterbens ist nicht sicher bestimmbar. Es ist zu vermuten, dass nach Tagen tote und

lebende Zellen nebeneinander in der bakteriellen Kolonie vorhanden sind. Die Rate absterbender Bakterienzellen nimmt durch bestehende Konzentrationsgradienten, die zunehmende Erschöpfung der Nährstoffe und Anhäufung toxischer Stoffwechselprodukte innerhalb der bakteriellen Kolonie zu. Die stationäre Phase mit der Verlangsamung des Wachstums und die darauf folgende Phase des Absterbens können sich über mehrere Tage hinausziehen. PERSSON et al. (1989) zeigten, dass parodontalpathogene Keime über mehrere Tage flüchtige Metabolite bilden. Sie wiesen nach einem, drei und sieben Tagen im Gasraum über parodontalen Proben subgingivaler Läsionen in Suspension und in Serumkultur mittels Gaschromatographie/Flammenfotometrie flüchtige Schwefelkomponenten nach. Über den Zeitraum von sieben Tagen war ein kontinuierlich steigender Betrag von gebildetem Schwefelwasserstoff messbar. Nur lebende Zellen produzieren Schwefelwasserstoff. Die Bildung von Methylmerkaptan stieg über diesen Untersuchungszeitraum in vier von neun Proben exponentiell. In fünf von neun Proben sank die Bildung von Methylmerkaptan nach einem Maximum am zweiten, bzw. dritten Tag der Kultivierung kontinuierlich. In einer weiteren Untersuchung dieser Gruppe wurde nach drei bis fünf Tagen Kultivierung auf Agar, bzw. nach sieben Tagen Kultivierung in Serum, gaschromatographisch die Produktion von flüchtigen Schwefelkomponenten durch parodontalpathogene Keime nachgewiesen (PERSSON 1992). Die Ergebnisse dieser beiden Arbeiten (PERSSON 1992, PERSSON et al. 1989) bestätigen, dass Parodontalpathogene über mehrere Tage nachweisbare gasförmige Verbindungen abgeben, die dann auch mit Multigasensorsystemen, wie in der vorliegenden Untersuchung gezeigt, gemessen werden können.

In der vorliegenden Untersuchung wurden nur Proben gemessen, die sichtbares Koloniewachstum zeigten. Für alle gemessenen Proben konnten typische Signaländerungen während der Messungen (siehe Abb. 13) beobachtet werden. Da die Auswertungen der Vorversuche durch die lineare Diskriminanzanalyse und die Hauptkomponentenanalyse eine gute Trennung der bakteriellen Geruchsgruppen zeigten, wurde das Alter der Proben nicht auf ein bestimmtes festgelegt. Andere Bedingungen, wie der Ablauf der Messungen, die Messkammer und die Probenaufbereitung wurden nach einer Reihe von Vortests optimiert. So wurde eine Messkammer konstruiert, mit der Proben in Zellkulturschalen gemessen werden können. Damit hatten alle Proben die gleiche Oberflächengröße und gleiche Menge an Columbia-Blutagar. Die Schlauchverbindungen zwischen Messkammer und Messgerät wurden verkürzt, um den Transportweg für die Gasproben möglichst kurz zu halten. Da die Vorversuche relativ große Streuung innerhalb des sterilen Columbia-Blutagars als Referenz zeigten, wurde für



die vorliegenden Messungen anstelle dessen Luft (leere Zellkulturschalen) als Referenz zwischen den Proben gemessen.

In den Publikationen zu Anwendungen von Multigasensensorsystemen werden hauptsächlich aerobe Keime untersucht. Die Messungen der Kulturen werden nach kurzen Inkubationszeiten (bis zu 24 Stunden) durchgeführt (AATHITHAN et al. 2001, DUTTA et al. 2002, GIBSON et al. 1997). PAVLOU et al. (2000, 2002b) untersuchten aerobe Keime in Flüssigmedium nach fünf Stunden Kultivierung, damit sich die bakteriellen Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase befinden und die enzymatische Verdauung der flüssigen Medien zum Zeitpunkt der Messung so gering wie möglich ist. Anaerobe Kulturen der Spezies *Clostridium* und *Bacteroides fragilis* wurden 16 Stunden auf Agarplatten kultiviert, ehe sie gemessen wurden (PAVLOU et al. 2002a).

Zwei Veröffentlichungen haben frisch ausgeimpfte aerobe bakterielle Kulturen über einen Zeitraum von mehreren Stunden gemessen (GARDNER et al. 1998, HOLMBERG et al. 1998). GARDNER et al. (1998) untersuchten zwei Kulturen der Spezies *Escherichia coli* und *Staphylococcus aureus* innerhalb von zwölf Stunden 90-mal mit einem Multigasensensorsystem. Die Aktivität der Mikroorganismen wurde in Intervallen durch die optische Bestimmung der Zellzahl nachgewiesen. Für die Berechnung der Klassifikation durch ein künstliches neuronales Netz hatte das Alter der Kulturen keine Bedeutung (GARDNER et al. 1998). Dagegen gingen die beobachteten Wachstumskurven als zeitabhängige Parameter mit in das neuronale Netz ein, um die Erkennung der Wachstumsphase unbekannter Proben zu berechnen. HOLMBERG et al. (1998) beobachteten Kulturen von fünf bakteriellen Gruppen 19-mal innerhalb von 16 Stunden. Sie konnten in den Sensorantworten als Funktion der Zeit die bakteriellen Wachstumsphasen erkennen. Während des Koloniewachstums spiegeln die Konzentrationen der Substrate, Metabolite und Produkte die bakterielle Aktivität und die Bakterienzahl wider (CIMANDER et al. 2002b). Diese komplexen Situationen führen zu einer Sensorantwort mit einem exponentiellen Anstieg bis zum Zeitpunkt der maximalen Aktivität, gefolgt von einem exponentiellen Abfall.

Die vorliegende Arbeit wirft die Frage auf, ob das unterschiedliche Alter der gemessenen Kulturen zu den Ergebnissen geführt hat. Zusätzliche Auswertungen von Bakteriengruppen gleichen Alters (Punkt 5.8) haben keinen Einfluss auf die Erkennung für die einzelnen Spezies gezeigt. Die Erkennungsraten für jede der Spezies schwanken stark zwischen den einzelnen Gruppen der zwei bis zehn Tage kultivierten Proben. Es lässt sich keine systematische Korrelation zwischen Alter der Keime und Erkennung nachweisen. Die Unterschiede sind eher statistisch und nicht systematisch. Eine Ausnahme bilden die Werte für die Spezies

*F. nucleatum*. Sie können eine Verschlechterung der Erkennung für ältere Keime vermuten lassen. Diese Aussage lässt sich jedoch mit den vorhandenen Datensätzen nicht statistisch absichern. Werden weiter gefasste Altersklassen von zwei bis vier Tage und sechs bis zehn Tage alten Keimen in LDA-Modellen ausgewertet, unterscheiden sich die Erkennungsraten für die einzelnen Spezies nicht. Je nach Kombination der vorhandenen Datensätze kommt es auch bei dieser Gruppierung der Proben zu Schwankungen der Erkennungsraten. Beide Auswertungen der altersgruppierten Keime sind durch die geringe Größe der Datenbasis nicht statistisch abgesichert. Es lässt sich jedoch vermuten, dass keine Korrelation zwischen Alter der gemessenen Proben und Erkennung der Keime besteht.

### **6.1.5 Datenauswertung**

Ein Multigassensensorsystem ist nur so gut wie sein Mustererkennungssystem (DICKINSON et al. 1998). Daten von Multigassensensorsystemen sind nicht-linearer Natur. Dennoch werden zur Evaluierung von Sensordaten lineare Mustererkennungsmethoden benutzt, um sowohl einfache als auch komplexe Düfte zu analysieren (DICKINSON et al. 1998). Das Auflösen der komplexen Sensorantworten in Linearvektoren bietet eine nützliche Möglichkeit, multivariate Daten in einem zwei- oder dreidimensionalen Raum darstellen zu können. Für die Klassifikation von Quantifikationen oder Multikomponentengemischen können nicht-lineare Methoden, wie künstliche neuronale Netze, bessere Möglichkeiten bieten, Vorhersagen zu treffen (DICKINSON et al. 1998). Es wurden für Anwendungen von Multigassensensorsystemen sowohl lineare Mustererkennungsmethoden (AATHITHAN et al. 2001, LAI et al. 2002, MANTINI et al. 2000, MOHAMED et al. 2002, PAVLOU et al. 2002a, PAVLOU et al. 2002b, THALER 2002), als auch die Nutzung von künstlichen neuronalen Netzen (HOLMBERG et al. 1998, MANTINI et al. 2000, MOHAMED et al. 2002, PAVLOU et al. 2002a, PAVLOU et al. 2000, PAVLOU et al. 2002b) publiziert.

Viele der publizierten Studien führen Vergleiche unterschiedlicher Methoden (DUTTA et al. 2003, GIBSON et al. 1997, HOLMBERG et al. 1998, PAVLOU et al. 2002a, PAVLOU et al. 2000, PAVLOU et al. 2002b) oder Möglichkeiten der Nutzung einer Methode (GARDNER et al. 1998) zur Auswertung der Daten durch. Es wird vermutet, dass eine der Hauptursachen für falsche Klassifikationen vor allem in der Analyse der Daten liegt. Die Methode der Datenanalyse ist dann nicht stabil genug, um unbekannte Proben zu klassifizieren (HOLMBERG et al. 1998).

Die lineare Diskriminanzanalyse, die 1936 von Fisher begründet wurde, kann als eine Art Pendant der Hauptkomponentenanalyse für Objekt-Strukturierte Datensätze aufgefasst werden.

Ihr primäres Ziel besteht in der optimalen, linearen Trennung verschiedener vorgegebener Geruchsklassen bei minimaler Streuung innerhalb der Klasse, nicht in der Zuordnung von Testobjekten. Der Algorithmus wird zur Wiedererkennung von Gasen verwendet, da er sich nur auf die für die jeweilige Geruchsklasse charakteristischen Signalwerte stützt. Alle überflüssigen Signalbeiträge, z. B. ein wechselnder Geruchshintergrund, werden vernachlässigt.

Das in der vorliegenden Arbeit untersuchte Multigassensensorsystem KAMINA besitzt 38 Sensoren. Diese Anzahl ist im Vergleich zu anderen publizierten Systemen sehr hoch. Die Besonderheit dieses Systems gegenüber anderen liegt außerdem in der angewandten Gradiententechnik. Die Sensoren des Arrays unterscheiden sich nur graduell voneinander. Interne Untersuchungen im Forschungszentrum Karlsruhe (nicht veröffentlicht), haben die lineare Diskriminanzanalyse als beste Methode zur Auswertung für diesen entwickelten Sensorarraytyp ausgewählt. Aus diesem Grund wurden die vorgestellten Messungen mit dieser Methode ausgewertet. Die testweise Auswertung eines Teils der vorliegenden Daten durch ein künstliches neuronales Netz hat zu ähnlichen Ergebnissen wie durch die LDA geführt. Jedoch war es nicht möglich, für das künstliche neuronale Netz unterschiedliche Möglichkeiten der Datenauswertung zu testen. Aus diesem Grund ist ein Vergleich zwischen beiden Verfahren in dieser Arbeit nicht möglich. Die Ergebnisse der Auswertung durch die LDA zeigen, dass der Prototyp prinzipiell geeignet ist, Ausdünstungen bakterieller Proben zu messen. Obwohl die Erkennung nicht für alle der ausgesuchten Spezies zufrieden stellend ist, lassen sich in den Daten Strukturen von Gruppierungen erkennen. Es ist zu vermuten, dass die hohe Rate der falsch Klassifizierten auf die große Streuung der Daten zurückzuführen ist. Diese Streuung wird nicht durch die Diskriminanzanalyse verursacht, sondern wahrscheinlich durch andere Faktoren. Zu diesen Faktoren kann z.B. die Veränderung der Sensorsignale während des Untersuchungszeitraumes gehören.

Für die Fähigkeit der Erkennung unbekannter Proben durch ein Multigassensensorsystem ist nicht nur die Wahl zwischen linearem Verfahren oder künstlichen neuronalen Netzen als Mustererkennungsmethode entscheidend. Sowohl die Parameter, die eine Sensorantwort definieren, als auch die mathematischen Algorithmen in der Auswertung haben einen Einfluss auf die Fähigkeit zur Erkennung unbekannter Daten (GARDNER et al. 1998, HOLMBERG et al. 1998). Die Arbeit von GARDNER et al. (1998) zeigt, dass die Nutzung unterschiedlicher Sensormodelle (mathematischer Algorithmen) und unterschiedlicher Normierungsmethoden in einem künstlichen neuronalen Netz zu stark variierenden Klassifikationsraten führt. Durch die Kombination von Normierungsmethode und Sensormodell ergeben sich noch mehr Varianten,

die wiederum variierende Klassifikationsraten ergeben. Die Auswertung der Daten der vorliegenden Arbeit durch drei verschiedene Normierungen bestätigt diesen Punkt. Die Normierung auf den Medianwert ergab etwas bessere Erkennungsraten für das Fünf-Klassen-Modell der fünf untersuchten Parodontalpathogene als die Normierungen auf den Referenzwert steriler Agar bzw. Luft. Zusätzlich zur Normierung wurden vor der Auswertung der Daten in Übereinstimmung mit anderen Publikationen die Sensorantworten visuell im Hinblick auf sichtbare Ausreißer inspiziert (z. B. konstant instabile oder nicht antwortende Sensoren) (DICKINSON et al. 1998, PAVLOU et al. 2000).

Auch die Wahl der Parameter, die eine Sensorantwort definieren, hat einen großen Einfluss auf die Durchführung der Datenauswertung (GARDNER et al. 1998, HOLMBERG et al. 1998). Die Autoren der Studie von HOLMBERG et al. (1998) zeigten, dass nur vier von 48 ausgewählten Sensorparametern bedeutend waren für die Erkennung unbekannter Bakterienproben. Sie erreichten damit in einem Klassifikationsbaum eine Klassifikationsrate von 68 %. Der Vergleich der Nutzung dieser vier Parameter in einem künstlichen neuronalen Netz führte zu einer Klassifikationsrate von 76 % gegenüber 67 %, wenn alle 48 Parameter im künstlichen neuronalen Netz genutzt wurden. Auch diese Arbeit (HOLMBERG et al. 1998) zeigt, dass viele Möglichkeiten getestet werden müssen, um eine Methode der Datenanalyse zu finden, die die Erkennung optimiert. Für die Durchführung der linearen Diskriminanzanalyse in der vorliegenden Arbeit wurden unterschiedliche Möglichkeiten getestet. Mit diesem Verfahren kann die Erkennung der untersuchten parodontalen Spezies nicht verbessert werden. Da aber nicht ausgeschlossen werden kann, dass die Auswertung der Daten der vorliegenden Untersuchung durch eine andere Mustererkennungsmethode als die lineare Diskriminanzanalyse zu einer besseren Erkennung der fünf bakteriellen Spezies führen könnte, wäre eine weiterführende und vergleichende Auswertung der aufgenommenen Daten mit neuronalen Netzen oder ähnlichen Methoden sinnvoll.

### **6.1.6 Sensordrift**

In den Publikationen für Anwendungen von Multigassensoren werden zwei Arten der Sensordrift diskutiert, die kurzzeitig auftretende und die Langzeitdrift (BLIXT und BORCH 1999, DEWETTINCK et al. 2001, DUTTA et al. 2003, HUDON et al. 2000, LIDÉN et al. 2000, PAULSSON und WINQUIST 1999, PAVLOU et al. 2000). Vergleicht man in der vorliegenden Arbeit den Basiswiderstand der Sensorsignale zu Beginn einer Messung mit dem Basiswiderstand zwischen den Messungen der einzelnen Proben, ist ein zeitliches Abdriften der

Widerstandswerte innerhalb weniger Stunden zu erkennen (siehe Abb. 13). Da die Messung der Spezies *P. gingivalis* die stärksten Widerstandsänderungen der Sensoren verursachte und sich diese nur sehr langsam nach einer Messung wieder davon erholten, wurde diese Spezies als letzte Probe gemessen. Das Phänomen der Kurzzeitdrift begrenzt die Anzahl der möglichen Messungen pro Zeiteinheit (PAULSSON und WINQUIST 1999). Zusammen mit der Veränderung der Sensorsignale über die gesamte Dauer einer Untersuchung (Langzeitdrift) kompliziert dieses Phänomen das Antwortmuster des Sensorarrays (PAULSSON und WINQUIST 1999). Die Varianz innerhalb der Rohdaten (damit das Unterscheidungsvermögen zwischen den Klassen) nimmt mit zunehmender Anzahl der Wiederholungsmessungen einer Probe ab (OLSSON et al. 2000). Je größer die Varianz (bestimmt durch die Hauptkomponentenanalyse) innerhalb der Daten, umso besser ist die Unterscheidung zwischen verschiedenen Gruppen. Aufgrund dieses Verhaltens lässt sich auch eine Abnahme der Varianz in den Rohdaten mit zunehmender Anzahl von unterschiedlichen Proben, die hintereinander gemessen werden, vermuten. Hinsichtlich dieses Verhaltens können für die vorliegende Untersuchung keine Angaben gemacht werden, weil diesbezüglich keine Auswertungen durchgeführt wurden. Für die vorliegenden Messungen wurde jedoch jede Probe nur einmal gemessen. Dennoch sind je nach Menge der vorbereiteten Proben bis zu sieben Kulturen an einem Untersuchungstag gemessen worden. Die Beeinflussung der Fähigkeit zur Erkennung von unbekanntem Proben in einem bestimmten Modell durch die Veränderung der Sensorantworten innerhalb kurzer Zeitabstände und über einen langen Untersuchungszeitraum scheint durch die Ergebnisse der vorliegenden Studie unterstützt zu werden. Eine der Hauptursachen für die große Streuung der Daten innerhalb der fünf bakteriellen Geruchsgruppen im LDA-Modell lässt sich vermutlich auf eine Langzeitdrift der Sensorsignale zurückführen.

Die Basiswertdrift ist abhängig von der Zeit zwischen den einzelnen Probenmessungen (PAULSSON und WINQUIST 1999). Zeitvariierende Parameter werden oft in Kontrollsystemen beobachtet. Es ist daher sinnvoll, ein Kontrollmodell in die gesamte Datenevaluation einzuschließen, um das Verhalten des Basiswiderstands zu kontrollieren. In der Literatur wird die Nutzung unterschiedlicher mathematischer Modelle angegeben, um diesen Effekt zu kompensieren. So nutzten LIDÉN et al. (2000) und OLSSON et al. (2000) die totale Änderung der Widerstandswerte ohne Berücksichtigung des Basiswiderstandes, wenn die Antwortkurven der Sensoren den zuvor gemessenen Basiswiderstand nicht wieder erreichten. DEWETTINICK et al. (2001) überprüften die Reproduzierbarkeit der Daten durch die Berechnung der Variationskoeffizienten täglicher Messungen einer Referenzprobe. Für die vorliegenden

Untersuchungen wurden über mehrere Tage Referenzmessungen von leeren Zellkulturschalen und sterilen Columbia-Blutagars durchgeführt. Die Auswertung dieser Messungen durch die Hauptkomponenten- und die lineare Diskriminanzanalyse zeigten tägliche Abweichungen. Um diesen Einfluss innerhalb einer Messung zu berücksichtigen, wurden die Rohdaten mit der Referenz von sterilem Agar oder der leeren Schale/Luft normiert. Jedoch hatten beide Normierungen keinen verbessernden Einfluss auf die Erkennung des LDA-Modells im Vergleich zur Normierung auf den Median des Sensorarrays.

Die Überprüfung der Entwicklung der Modellerkennung (siehe Abb. 20 und Abb. 22) zeigt eine zeitliche Veränderung, die jedoch keine Linearität aufweist. Wenn nur wenige Datensätze einer Messung zur Modellbildung hinzugenommen werden, kann die Erkennung bis zu 10 % steigen oder fallen. Die Erkennungsraten alternieren um einen linear abfallenden Verlauf für Modelle mit einer Datenbasis bis zu 36 Messungen. Da manche Messungen im Abstand von weniger als 24 Stunden aufgenommen wurden, zwischen anderen wiederum mehrere Tage liegen, lässt sich keine direkte Korrelation zwischen der Erkennung und Veränderung der Rohdaten durch die Veränderung der Sensorsignale nachweisen.

## **6.2 Ergebnisse**

### **6.2.1 Erkennung von fünf bakteriellen Geruchsklassen durch die lineare Diskriminanzanalyse**

In der vorliegenden Untersuchung konnte mit der linearen Diskriminanzanalyse aus den Daten von 57 Messungen an bakteriellen Proben ein Modell für die Geruchsklassen von fünf parodontalpathogenen Spezies gebildet werden. Das Geruchsunterscheidungsvermögen dieses Fünf-Klassen-Modells ist gering. Dennoch konnten Erkennungsraten von 60,3 % für unbekannte Proben ermittelt werden. Ähnliche Ergebnisse mit einer Klassifikationsrate von 68 % für fünf bakterielle Spezies fanden HOLMBERG et al. (1998) unter Nutzung eines Klassifikationsbaumes. Benutzten die Autoren dieser Studie (HOLMBERG et al. 1998) die gleichen Sensorparameter in einem künstlichen neuronalen Netz, erhöhte sich die Klassifikationsrate auf 76 %. Ähnliche Unterschiede der Klassifikationsraten durch verschiedene Methoden der Auswertung werden auch durch die Arbeitsgruppe von DUTTA et al. (2002) vorgestellt. Mit der Hauptkomponentenanalyse (ein lineares statistisches Verfahren) war die Unterscheidung von sechs bakteriellen Spezies mit einer Klassifikationsrate von 74 % möglich. Die Gegenüberstellung der Anwendung von drei verschiedenen künstlichen neuronalen Netzen

fürte zu Klassifikationsraten von 75 %, 94 %, bzw. 98 %. Eine andere In-vitro-Untersuchung (PAVLOU et al. 2002a), die *Clostridium spp.* und *Bacteroides fragilis* von reinen Kontrollen unterschied, erreichte mit künstlichen neuronalen Netzen eine Klassifikationsrate von 94 %. Eine zweite Untersuchungsreihe dieser Arbeitsgruppe von fünf aeroben Spezies führte zu 98 % korrekter Vorhersage von unbekanntem Proben durch ein künstliches neuronales Netz (PAVLOU et al. 2000). In einer Untersuchung von wenigen Proben bakterieller Pathogene des oberen Respirationstraktes durch ein Multigassensensorsystem konnten mit Hilfe einer kanonischen Diskriminanzanalyse (lineares statistisches Verfahren) drei Spezies, bzw. in einem zweiten Satz vier Spezies, voneinander unterschieden werden (LAI et al. 2002, THALER 2002). In diesen Publikationen werden weder prozentuale Angaben für die korrekte Erkennung unbekannter Proben angegeben, noch Angaben über die Modellstabilität gemacht. Der direkte Vergleich der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit mit denen anderer Studien ist aufgrund der verschiedenen Methoden, die angewendet wurden, nur bedingt möglich. Alle publizierten Untersuchungen haben die Messungen innerhalb kurzer Zeiträume an wenigen Proben durchgeführt. In der Arbeit von PAVLOU et al. (2002a) wurden nur zwölf Agarkulturen von *Clostridium spp.*, bzw. vierzehn Agarkulturen von *Bacteroides fragilis* und weitere zehn sterile Agarplatten gemessen. Im Diagramm der Diskriminanzanalyse sind drei sehr gut separierte Ellipsen dargestellt. Allerdings bleibt ungeklärt, ob mit der untersuchten Anzahl von Proben ein ausreichend stabiles Modell gebildet wurde. Für die zweite Untersuchung dieser Arbeitsgruppe wurden insgesamt nur 53 Proben von fünf Spezies, einer Mischkultur und sterilem Medium mit einem Multigassensensorsystem gemessen. Auch hier zeigt die Abbildung der Diskriminanzanalyse gut separierte Gruppen (PAVLOU et al. 2002a). Bei Vergleich zur vorliegenden Arbeit lässt sich mit nur wenigen Datensätzen der fünf Parodontopathogene ein LDA-Modell bilden, das ebenfalls fünf gut separierte bakterielle „Geruchsgruppen“ unterscheidet (siehe Abb. 14). Die Streuung innerhalb der Daten ist sehr gering aufgrund der wenigen Datensätze. Jedoch ist dieses LDA-Modell aufgrund der geringen Größe der Datenbasis noch nicht stabil. In der Arbeit von PAVLOU et al. (2002a) wird die Stabilität des gebildeten Modells nicht überprüft. Auch die Gruppe um GARDNER et al. (1998) hat nur wenige Proben untersucht. Es wurden je 90 Wiederholungsmessungen der vier Kulturen von zwei Spezies innerhalb von zwölf Stunden aufgenommen. Sie konnten mit der Anwendung künstlicher neuronaler Netze Klassifizierungsraten von 25 % bis 96 % ermitteln. Die Höhe der Klassifikationsrate war abhängig vom gewählten Sensormodell (mathematischen Algorithmus) und Normierungsalgorithmus in Kombination oder allein (siehe Punkt 6.1.5). Die Modellstabilität wird auch in dieser Studie nicht diskutiert (GARDNER et al. 1998). Es werden zwar sehr viele

Sensorantwortvektoren (720) für die Auswertung benutzt, aber alle nur von vier Kulturen. DUTTA et al. (2002) haben innerhalb einer Woche von sechs bakteriellen Kulturen jeweils drei Lösungen von Bakterienkolonien in Suspension zehn Mal gemessen. Mit der Hauptkomponentenanalyse werden vier der sechs Spezies gut separiert und unterschieden. Zwei Spezies waren nicht unterscheidbar. Das Modell der Hauptkomponentenanalyse erreichte eine Klassifikationsrate von 74 % für unbekannte Proben (DUTTA et al. 2002). Zum einen sind die Messungen dieser Arbeitsgruppe (DUTTA et al. 2002) in nur wenigen Tagen durchgeführt worden, zum anderen sind alle bakteriellen Kolonien einer Spezies auch hier nur von einer Ausgangskultur auf Agar gemessen worden. Die Methoden der Arbeiten von DUTTA et al. (2002) und GARDNER et al. (1998) unterscheiden sich von der in der vorliegenden Studie. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sind durch die Messung von mehr als 150 Proben, die jeweils nur einmal gemessen wurden, ermittelt worden. Des Weiteren handelt es sich bei der vorliegenden Untersuchung um eine Langzeitanwendung des untersuchten Prototyps verglichen mit der Studiendauer der aufgeführten Arbeiten. In weiterführenden Arbeitsschritten sollte ein Gerät entwickelt werden, das jeden Tag praxisnah messen kann. Für den täglichen Gebrauch ist ein Messgerät sinnvoll, das nicht ständig kalibriert werden muss und bereits ein stabiles Modell für die Identifikation von klinischen Proben enthält. Die vorliegenden Untersuchungen wurden als Basis für die Entwicklung eines solchen Gerätes durchgeführt. Es wäre interessant zu sehen, wie sich die Klassifikationsraten der aufgeführten Studien (DUTTA et al. 2002, GARDNER et al. 1998, HOLMBERG et al. 1998, LAI et al. 2002, PAVLOU et al. 2002a, THALER 2002) im Langzeitversuch und mit größerem Probenumfang verhalten würden.

### 6.2.2 Erkennung klinischer Isolate

Die Fragestellung der vorliegenden Arbeit war zunächst, ob der Prototyp des Olfaktographen prinzipiell geeignet ist, die bakteriellen Spezies durch ihre abgegebenen „Gerüche“ zu erkennen. Am besten dafür geeignet ist die Untersuchung von Laborspezies, da diese erstens immer in ausreichend großer Zahl und leicht zugänglich sind und zweitens von diesen Stämmen aufgrund der gleichen „Vorgeschichte“ (Kultivierung, Lagerung usw.) ähnliche Gasgemische für Keime einer Spezies zu erwarten sind. Die Reproduzierbarkeit gemessener Daten ist eher gewährleistet als bei Isolaten klinischer Proben. Weiterführende, anspruchsvollere Aufgaben liegen in der Untersuchung klinischer Proben. Die wenigen Messungen der beiden klinischen Isolate von *P. gingivalis* und *P. intermedia* wurden nur beispielhaft ausgewertet, um zu überprüfen, ob es prinzipiell möglich ist, auch klinische Isolate zu untersuchen und in einem Modell der



Laborspezies wieder zu erkennen. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die einzelnen Testmessungen der klinischen Isolate von *P. gingivalis* und *P. intermedia* in einem Zwei-Klassen-Modell aus den Laborstämmen dieser Spezies sehr gut mit 100 %, bzw. 94 % der Messpunkte erkannt werden (siehe Tab. 6). Dagegen verringert sich die Erkennung für die Spezies *P. gingivalis* auf 85,7 % im Fünf-Klassen-Modell der Laborstämmen. Die klinischen Isolate der Spezies *P. intermedia* werden mit nur 13,1 % der Messpunkte im Fünf-Klassen-Modell der Laborstämmen erkannt. Nur eine der acht Kulturen der Spezies *P. intermedia* wird im Fünf-Klassen-Modell der Laborstämmen korrekt zugeordnet. Da mit 33,9 % Erkennung der Laborstamm von *P. intermedia* auch nicht als erkannt bezeichnet werden kann, kann eine Erkennung von klinischen Isolaten dieser Spezies nicht erwartet werden.

Da die Gewinnung von klinischen Isolaten sehr zeitaufwendig ist, ist die Entwicklung eines Modells durch Messungen von klinischen Proben auch sehr aufwendig. Laborspezies können in kürzerer Zeit und in großer Zellzahl kultiviert werden. Methoden, die mit einem zu hohen Aufwand verbunden sind, setzen sich in der Praxis nicht durch. Daher kommt der Fragestellung, ob klinische Keime in einem Modell aus Laborkeimen erkannt werden können, eine große Bedeutung zu. Die Ergebnisse zeigen für die Spezies *P. gingivalis* eine bessere Erkennung der klinischen Isolate als für die Laborspezies im Fünf-Klassen-Modell (siehe Tab. 8). Für klinische Isolate der Spezies *P. intermedia* ist die Erkennung im Fünf-Klassen-Modell der Laborkeime zunächst sehr schlecht, nach Zusammenfassung der unterschiedlich gewonnenen Datensätze für diese Spezies jedoch besser mit 42 % als die Erkennung für die Keime des Laborstammes von *P. intermedia* mit 33 % untereinander. Das deutet darauf hin, dass es durch das Hinzufügen von nur wenigen Daten klinischer Isolate in ein stabiles Modell aus Daten von Laborstämmen möglich sein wird, klinische Isolate ebenso sicher zu erkennen. Das setzt natürlich ein stabiles Modell der Laborstämmen mit der Möglichkeit der sicheren Erkennung dieser voraus, was zum Zeitpunkt mit dem Prototyp nicht möglich ist.

Vergleicht man das Vorgehen der vorliegenden Auswertungen mit den Anwendungen anderer Multigassensysteme, so werden in den Publikationen, die klinische Isolate untersuchten, nur Messungen von wenigen Proben (AATHITHAN et al. 2001, HOLMBERG et al. 1998, PAVLOU et al. 2000, PAVLOU et al. 2002b) durchgeführt. Ein Teil dieser Messungen wird zum Training eines künstlichen neuronalen Netzes, bzw. zur Modellbildung genutzt. Der zweite Teil von wenigen Messungen wird als Testmessungen genutzt, die gut bis sehr gut klassifiziert werden. PAVLOU et al. (2000) nutzten 23 Datensätze von 35 Probenmessungen als Trainingsdatensatz zur Modellbildung und die restlichen zwölf Datensätze als Testmessungen.

Für die Auswertungen durch den LDA-Modelltest in der vorliegenden Arbeit werden mit der „leave-one-out“-Methode alle möglichen LDA-Modelle berechnet, in denen jeweils ein Datensatz fehlt, der dann als Testdatensatz dient. Die Erkennung berechnet sich aus der Durchschnittsberechnung aller ermittelten Erkennungen für die jeweilige Spezies oder das gesamte Modell.

Das in der vorliegenden Arbeit vorgestellte Zwei-Klassen-Modell (siehe Punkt 5.5) ist durchaus für die Labordiagnostik von klinischen Isolaten als schnelle Screeningmethode anwendbar. Wird eine Spezies vermutet, kann bei vorhandenem Zwei-Klassen-Modell schnell eine Vorhersage durch das Messen des Gasraumes über einer Subkultur getroffen werden. Ansonsten kann die vorgestellte Methode keine Möglichkeit bieten, in der Praxis patientennah und schnell als diagnostisches Hilfsmittel zu dienen. Denn bei der Mikroflora parodontaler Läsionen handelt es sich meistens um eine Mischflora. Bisher nicht veröffentlichte Ergebnisse von Messungen an Mischkulturen der untersuchten fünf Parodontalpathogene ließen sich durch die Hauptkomponentenanalyse und die lineare Diskriminanzanalyse von Reinkulturen unterscheiden. Diese Ergebnisse sind in Übereinstimmung mit der Untersuchung von PAVLOU et al. (2002b). Sie konnten eine Mischpopulation von zwei Spezies von deren beiden Reinkulturen unterscheiden. Es ist jedoch mit den heutigen Methoden der Datenanalyse noch nicht möglich, die bakteriellen Spezies einer Mischpopulation zu identifizieren.

### **6.2.3 Mögliche Ursachen für den Anteil falsch zugeordneter unbekannter Proben**

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen im LDA-Modell sehr große Streuung innerhalb der Daten für alle fünf bakteriellen Geruchsklassen. Die Ursache dafür ist vermutlich in mehreren Punkten zu suchen. In der Arbeit von HOLMBERG et al. (1998) wurde abhängig von der Mustererkennungsmethode eine hohe Rate an falsch klassifizierten unbekanntem bakteriellen Proben festgestellt. Die Autoren führen die falsche Klassifikation auf vier Gründe zurück:

1. Das Sensorarray ist nicht fähig, die verschiedenen bakteriellen Gasgemische zu separieren.
2. Die Referenzmethode, um die richtige Klassenzugehörigkeit einer Probe zu bestimmen, ist nicht 100 % igr zuverlässig.
3. Innerhalb der Klassen existiert zu viel Variation.
4. Das System für die Sammlung der Gasproben und die Mustererkennungsmethode sind nicht stabil genug.

### **Fähigkeit des Sensorarrays**

Für die vorliegenden Untersuchungen können hinsichtlich der Eignung des Sensorarrays für die bakteriellen Gase der Parodontalpathogene keine ausreichenden Angaben gemacht werden. Das Duftprofil einer Kultur kann sich aus den spezifischen bakteriellen flüchtigen Produkten sowie den Duftkomponenten des Kulturmediums zusammensetzen (LAI et al. 2002). Die Zusammensetzung der spezifischen bakteriellen Gasgemische der fünf Parodontalpathogene der vorliegenden Untersuchung müsste gaschromatographisch in Kombination mit einer Massenspektrometrie analysiert werden. Mit den ermittelten Komponenten wäre das Sensorarray KAMINA im Hinblick auf die Frage der Eignung zu testen.

### **Variation innerhalb der Geruchsklassen**

Ein Einfluss auf die hohe Rate an falsch klassifizierten Proben durch zu viel Variation innerhalb der bakteriellen Geruchsklassen (HOLMBERG et al. 1998) scheint durch die Ergebnisse der vorliegenden Studie unterstützt zu werden. Eine Ursache dafür liegt möglicherweise in der unterschiedlichen Kultivierungsdauer der Proben. Da diesbezüglich jedoch keine direkte Korrelation nachgewiesen werden konnte (siehe Punkt 5.8), wäre die Untersuchung unterschiedlicher Altersgruppen der Kulturen größeren Umfangs in weiterführenden Messungen zu empfehlen. Eine Veränderung der Spezies innerhalb des Untersuchungszeitraumes kann ausgeschlossen werden. Die Stammkulturen wurden regelmäßig durch standardisierte, in der Literatur übliche Methoden und Tests (BLIX et al. 1990, BUCHANAN und GIBBONS 1974, ZAMBON et al. 1985) überprüft und wenn notwendig erneuert. Eine weitere Ursache für die Varianz innerhalb der bakteriellen Klassen liegt wahrscheinlich in der Dauer des Untersuchungszeitraumes. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie unterstützen die Vermutung, dass sich das Sensormaterial über lange Zeiträume verändert (BLIXT und BORCH 1999, DEWETTINCK et al. 2001, DUTTA et al. 2003, HUDON et al. 2000, LIDÉN et al. 2000, PAULSSON und WINQUIST 1999, PAVLOU et al. 2000). Mit der Analyse der Entwicklung der Modellerkennung (siehe Punkt 5.7) können zwar zeitliche Datenblöcke sehr guter Erkennung ermittelt werden. Es ist jedoch nicht möglich zu sagen, was es für eine Veränderung des Sensormaterials ist. Eine kontinuierliche zeitliche Veränderung der Modellerkennung und damit den Sensorantworten ist nicht nachweisbar (siehe Abb. 20 bis Abb. 27). Über die Ursachen der Sensordrift wird in den Publikationen nur diskutiert. PAVLOU et al. (2000) beobachteten ein nicht signifikantes Abweichen der Sensorantworten mit einem Unterschied von 5 % von Tag zu Tag. Sie vermuten, dass diese Abweichungen durch langsame Veränderungen des Sensormaterials hervorgerufen werden. Weiterhin kommen unerklärliche

Variationen in den Sensorantworten als chaotische Muster für die Ursache der Drift in Frage. Zum einen können turbulente flüchtige Ströme im Gasraum über der Probe und zum anderen die Sensor-Molekül-Interaktion als Reize chaotische Muster hervorrufen, die die Sensorantwort verändern (PAVLOU et al. 2000). In der Studie von BLIXT und Borch (1999) zeigte die Überprüfung der Stabilität der Sensorsignale durch den Vergleich ihrer Stärke eine Veränderung der Sensitivität für vier von zehn MOSFET- und einen von vier Metalloxidsensoren innerhalb von sechs Monaten. Für Langzeitabweichungen der Sensorantworten stellte die Gruppe von LIDÉN (2000) durch Messen einer Standardlösung 5% bis 20 % innerhalb von sieben Wochen fest. Sie sehen die Ursache u. a. in den Sensoren, die eine niedrige Signalantwort geben und so ein kleines Verhältnis Signal-zu-Rauschen zeigen. In der vorliegenden Untersuchung konnte durch die Überprüfung der Modellstabilität kein direkter Einfluss der Zeit auf die Veränderung der Erkennungsraten des Modells gezeigt werden (siehe Punkt 5.6). Dennoch existieren Abweichungen der Sensorantworten für verschiedene Zeitblöcke. In Bezug auf die Ursachen für diese Abweichungen konnten keine eindeutigen Korrelationen ermittelt werden. Für die Analyse der Daten durch die lineare Diskriminanzanalyse wurden Sensoren mit Zeichen von Signalrauschen vermieden (LIDÉN et al. 2000). Die Veränderung der Sensitivität der Sensoren im Laufe der Zeit ist eine Schwierigkeit, die alle Multigassensoren, unabhängig von der Art des Sensortyps, betrifft (HUDON et al. 2000). Sie sollte in zukünftigen Arbeiten beachtet werden (DUTTA et al. 2003, HUDON et al. 2000). Eine mögliche Lösung besteht darin, das Sensorarray als ein Zeit variierendes dynamisches System zu sehen, dessen Variation durch adaptive Schätzalgorithmen in der Datenanalyse aufgespürt und gelöst werden müssen (DI NATALE et al. 2002, DUTTA et al. 2003).

### **Temperatur und Feuchtigkeit**

Im Zusammenhang mit der Sensordrift wird in einigen Publikationen der Einfluss der relativen Feuchtigkeit und der Temperatur auf die Sensorsignalbildung diskutiert. So wurden für MOSFET-Sensoren, Metalloxidsensoren (DUTTA et al. 2003, OLSSON et al. 2000, PAULSSON und WINQUIST 1999), leitende Polymere (GIBSON et al. 1997, PAVLOU et al. 2000) und piezoelektrische Sensoren (OGAWA und SUGIMOTO 2002) Einflüsse von Wasser und Feuchtigkeit auf die Sensorsignale beobachtet. Wird kein Aktivkohlefilter im Multigassensoren-System benutzt, beeinflusst eine sehr hohe relative Luftfeuchtigkeit des Trägergasstromes die Sensitivität von MOSFET-Sensoren (PAULSSON und WINQUIST 1999). Der in der vorliegenden Studie verwendete Prototyp nutzt wie viele der publizierten Multigassensoren-Systeme einen Aktivkohlefilter zur Reinigung des Trägergasstromes (GARDNER

et al. 1998, GIBSON et al. 1997, PAVLOU et al. 2000, PAVLOU et al. 2002b). Teilweise werden zusätzlich zum Aktivkohlefilter noch hydrophobe Biofilter für die Reinigung des Trägergasstromes verwendet (GARDNER et al. 1998, PAVLOU et al. 2000, PAVLOU et al. 2002b). Untersuchungen des Forschungszentrums Karlsruhe haben gezeigt, dass die relative Feuchtigkeit auf das Sensorsystem KAMINA nur Einfluss hat, wenn sie sehr gering oder höher als 90 % ist. Oberhalb von 64 % ist keine klare Abhängigkeit des Medianwertes der Sensorsignale von der relativen Feuchte erkennbar (GOSCHNICK und WALTER 2003). Im Bereich niederer relativer Feuchte bewirkt ein Anstieg der Luftfeuchte um 4 % einen Abfall des Medianwertes der Sensorsignale um circa 8 % (GOSCHNICK und WALTER 2003). Eine relative Luftfeuchtigkeit von 30-35 % zeigt keinen Einfluss auf die Sensoren, die für die vorliegende Arbeit verwendet wurden. Einflüsse von Werten über 35 % relativer Feuchte können durch den Aktivkohlefilter „abgefangen“ werden. Für die vorliegenden Untersuchungen wurde Außenluft als Trägergas benutzt. In dem untersuchten Prototyp wird der Luftstrom zuerst durch einen Aktivkohlefilter geleitet. Ein Einfluss von Schwankungen der relativen Luftfeuchtigkeit auf die Sensoren kann damit ausgeschlossen werden. Da für alle Messungen von bakteriellen Kulturen und für den sterilen Agar als Referenz eine relativ kleine und konstante Menge an Columbia-Agar von 5 ml verwendet wurden, sind eventuell mögliche Einflüsse der relativen Feuchte von Agar auf die Sensoren zu vernachlässigen.

PAULSSEN und WINQUIST (1999) beobachteten, dass es durch das Messen von Proben hoher relativer Feuchte neben einem Einfluss auf die Sensoren auch zu Kondenswasserbildung in den leitenden Teflonschläuchen kommen kann. Die Autoren dieser Studie haben Alkohol in Atemproben gemessen. In der vorliegenden Untersuchung konnte dieses Phänomen für die Messungen von Columba-Blutagar nicht festgestellt werden. Wenn es dennoch zu Kondenswasserbildung gekommen sein sollte, hatte dieser Vorgang in der Sensorkammer keine Bedeutung aufgrund der konstant hohen Arbeitstemperaturen von 320 °C und den vorhandenen Luftströmungen (PAULSSON und WINQUIST 1999).

In der vorliegenden Studie lag die Raumtemperatur abhängig von der Sonneneinstrahlung und Jahreszeit bei  $22 \pm 2$  °C. Temperaturänderungen beeinflussen die Sensoren der KAMINA nicht, da die Arbeitstemperatur von 320 °C sehr hoch ist und durch einen Regelkreis konstant gehalten wird. Beeinflussung der bakteriellen Proben durch Schwankungen von Temperatur oder Feuchtigkeit kann ausgeschlossen werden. In der Messkammer selbst herrschte eine durch einen Heizregelkreis konstant gehaltene Temperatur von 37 °C. Der Trägerluftstrom, der die Bakterien erreichte, war durch Aktivkohle gefilterte Luft geringer Feuchtigkeit.

Wenn Proben nicht von Umgebungseinflüssen isoliert werden können (wie Temperatur und relative Feuchtigkeit), schlagen DUTTA et al. (2003) vor, diese als Parameter im Trainingsdatensatz einzubeziehen. Sie konnten dadurch die Vorhersagbarkeit von flüssigen Teeproben durch ein künstliches neuronales Netz verbessern. Für die Auswertung der vorliegenden Arbeit können keine Aussagen darüber gemacht werden, da keine Parameter der Umgebungsbedingungen in die lineare Diskriminanzanalyse eingingen.

### **Andere Einflussfaktoren**

Weitere mögliche Einflüsse auf die Stabilität der Signalantworten können durch Veränderungen des chemischen Hintergrundes hervorgerufen worden sein (DUTTA et al. 2003). Der Prototyp des Multigassensensorsystems KAMINA der vorliegenden Arbeit nutzt Luft als Trägergas (GARDNER et al. 1998, GIBSON et al. 1997, PAVLOU et al. 2002a, PAVLOU et al. 2000, PAVLOU et al. 2002b). Die Luft wurde für die Untersuchungen von außen angepumpt, da die Raumluft des Arbeitslabors zeitweise starken geruchlichen Schwankungen ausgesetzt war. Ein Einfluss von vorhandenen Gerüchen der Raumluft des Labors ist auszuschließen. Die Dichte der Verbindungen von ein- und ausgehenden Teflonschläuchen und des Gerätes selbst wurden durch Alkohol in unmittelbarer Nähe während Testmessungen überprüft. Außerdem wurde das Gerät mindestens eine Stunde durch das Messen von gefilterter Außenluft durchgespült. Alle Schlauchverbindungen bestehen aus Teflon, das ein anerkanntes geruchsinertes Material ist (HOLMBERG et al. 1998, PAULSSON und WINQUIST 1999, PAVLOU et al. 2000, PAVLOU et al. 2002b). Es können nur verunreinigende Stoffe der Außenluft Einfluss auf die Sensorsignalfeldbildung genommen haben. Durch Auswertungen der Daten der Referenz Luft (Messung einer leeren Zellkulturschale) mit einer Hauptkomponentenanalyse konnte Varianz innerhalb der Daten unterschiedlicher Messdurchläufe eines Tages und zwischen verschiedenen Tagen festgestellt werden. Erfahrungen durch Anwendung des Sensorarrays KAMINA im Forschungszentrum Karlsruhe zeigten einen veränderten Medianwert bei erhöhten Ozonwerten. Je nach Höhe der Konzentration werden Einflüsse durch diese Komponente durch die Aktivkohle gut abgefiltert. Aktivkohle ist nicht in der Lage alle molekularen Größen zu filtern. So werden niedermolekulare Substanzen, zu denen Stickstoffdioxid, Kohlenmonoxid und auch Methan gehören, nicht von der Kohle adsorbiert. Verunreinigende Einflüsse sollen jedoch in der vorliegenden Untersuchung durch die Normierung der Rohdaten auf eine Referenz (Luft oder sterilen Columbia-Agar) aufgehoben werden. Die Erkennung des Fünf-Klassen-Modells war dennoch geringer mit Luft-Referenz bzw. Agar-Referenz normierten Rohdaten als die Erkennung des Fünf-Klassen-Modells der Median normierten Rohdaten. Um mögliche

verunreinigende Einflüsse durch die variierende Zusammensetzung von Luft als Trägergas zu vermeiden, wird technische Luft als Trägergas in Multigassensoren Systemen verwendet (AATHITHAN et al. 2001, HOLMBERG et al. 1998). Die Anwendung dieser Methode war aufgrund der technischen Ausstattung des zu testenden Prototyps der vorliegenden Untersuchung nicht möglich.

Ein anderer zu diskutierender Aspekt ist der Strömungsweg der Gaskomponenten. Der Strömungsweg der Gaskomponenten zu den Sensoren wird durch die Länge des Teflonschlauches bestimmt. Flüchtige Moleküle bakteriellen Ursprunges können durch Zerstreuung während der Verzögerung zwischen der Probensammlung und der Reaktion am Sensorarray verloren gehen (AATHITHAN et al. 2001). Des Weiteren wird die Adsorption von Gasmolekülen an Proteinen in flüssigen Kulturmedien diskutiert (AATHITHAN et al. 2001). Die Signalentstehung hängt unmittelbar mit der Konzentration der Stoffe zusammen. Je länger der Strömungsweg der Gaskomponenten ist, desto mehr Moleküle können auf dem Weg zum Sensorarray verloren gehen. In der vorliegenden Untersuchung wurden nach den ersten Testmessungen die Teflonverbindungen zwischen Messkammer und Messgerät verkürzt. Hinsichtlich eines Einflusses auf die Sensorsignale können keine Aussagen gemacht werden.

#### **6.2.4 Eignung des Gerätes**

Die Ergebnisse der Arbeit zeigen, dass der Prototyp nur bedingt geeignet ist, bakterielle Proben zu messen, da die Erkennung nicht für alle der ausgesuchten Spezies zufrieden stellend ist. Die vorgestellte Methode ist nicht geeignet, als diagnostisches Hilfsmittel im Labor genutzt zu werden. Es ist nicht möglich, ein einmal entwickeltes Modell für die Erkennung von unbekanntem Proben der Spezies über lange Zeiträume anzuwenden, da sich die Sensorantworten verändern und das System nicht kalibrierbar ist. Für kurzzeitige Anwendungen zeigen die Publikationen anderer Multigassensoren Systeme jedoch, dass diese Technologie das Potential besitzt, bakterielle Vorgänge zu beobachten und bakterielle Proben wieder zu erkennen (AATHITHAN et al. 2001, CIMANDER et al. 2002a, DUTTA et al. 2002, GARDNER et al. 1998, GIBSON et al. 1997, PAVLOU et al. 2002a, PAVLOU und TURNER 2000, PAVLOU et al. 2000, PAVLOU et al. 2002b).

HUDON et al. (2000) untersuchten zwei kommerziell verfügbare und ein experimentelles Multigassensoren System im Hinblick auf die Eignung zur Messung von Duftintensitäten. Sie stellten signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Sensortechnologien in der Sensitivität gegenüber reinen Komponenten fest. Weiterhin stellten sie fest, dass die

Sensorantwort auf Proben von äquivalenten Duftintensitäten sehr unterschiedlich sein kann und von der Natur der anwesenden Komponenten abhängt (HUDON et al. 2000). In der vorliegenden Arbeit wurde nur ein phänomenologischer Versuch unternommen. Eine Erklärung darüber, welche flüchtigen Komponenten für die Sensorsignale verantwortlich sind, kann mit dem Stand der Untersuchung nicht gegeben werden. Das Multigassensensorsystem liefert eine Synthese einer komplexen Probe, kann aber weder die Komponenten analytisch separieren, noch die flüchtigen Stoffe identifizieren, die verantwortlich sind für die Unterschiede zwischen den Proben. Für diese Identifikation ist es wichtig, das Multigassensensorsystem mit anderen analytischen Techniken zu koppeln.

Viele der Studien benutzen Geräte mit Hybridtechnologien, um die Sensitivität gegenüber einer breiteren Auswahl von Komponenten zu erhöhen. Unterschiedliche MOSFET-Sensoren werden mit unterschiedlichen Metalloxidsensoren (PAULSSON und WINQUIST 1999) zusammen oder verschiedene leitende Polymere (GIBSON et al. 1997, PAVLOU et al. 2000) in einem System angewendet. Das Sensorarray KAMINA, das in dem Prototyp der vorliegenden Arbeit verwendet wird, besteht aus Metalloxidsensoren nur eines Halbleitermaterials. Die Sensoren unterscheiden sich durch die Herstellungstechnik nur graduell. Die Langzeitanwendung von Kombinationen verschiedener Sensortypen ist komplizierter, da das Driften der Sensorsignale der unterschiedlichen Sensortechnologien in unterschiedliche Richtungen unabhängig voneinander gehen kann. Geräte mit unterschiedlich kombinierten Sensortechnologien sind nur für sehr kurze Zeit stabil. Obwohl mit dem Multigassensensorsystem KAMINA in anderen Anwendungen (GOSCHNICK und WALTER 2003) sehr gute Ergebnisse erzielt wurden, ist seine Verwendung für die Erkennung von Bakterien begrenzt. Die Methode der Klassifizierung unbekannter Proben in einem Modell aus allen fünf bakteriellen Geruchsklassen ist nicht zufrieden stellend, um labortechnisch angewendet zu werden. Vereinfachende Methoden der Erkennung sind das Zwei-Klassen-Modell oder die schrittweise Klassifizierung. Um aber das Gerät anwenden zu können, muss mindestens ein schrittweiser Erkennungstest durchgeführt werden (APARICIO et al. 2000).

In dem untersuchten Prototyp der vorliegenden Arbeit sind zwei Multigassensensorsysteme aus verschiedenen Halbleiter-Metallen eingebaut. Durch die Kombination der zwei Halbleiter Wolframtrioxid und Zinndioxid sollte eine größere Menge Sensorinformationen verfügbar sein. Das Sensorarray aus Zinndioxid spricht stärker auf organische, das aus Wolframtrioxid auf anorganische Verbindungen an. Die Kombination der Daten beider Gassensorarrays bringt durch die kaum bedeutsame Verbesserung der Erkennung keine Vorteile für die Anwendung des Gerätes.



### **6.2.5 Multigassensensorsysteme im Vergleich mit anderen gassensitiven Methoden**

Neben der in Entwicklung befindlichen Technik der Multigassensensorsysteme existieren andere vergleichbare gassensitive Methoden. Gaschromatographische Methoden sind im Gegensatz zu Multigassensensorsystemen analytische Techniken, die zur chemischen Charakterisierung der Natur eines Duftes benutzt werden können. Die anwesenden Komponenten des Gasgemisches werden separiert, quantifiziert und identifiziert, mit einer geringeren Begrenzung für die Entdeckung des Stoffes selbst. Es wird jedoch nicht angezeigt, ob die Komponenten einen Duft enthalten oder nicht (DUTTA et al. 2002, OLSSON et al. 2000). Die Ergebnisse der gaschromatographischen Untersuchungen können mit Schwellkonzentrationen verglichen werden, um festzustellen, welche der vorhandenen Komponenten oberhalb ihrer Schwellkonzentration anwesend sind. Mögliche existierende physiologische Interaktionen zwischen diesen beteiligten Komponenten eines Gasgemisches werden dabei nicht analysiert. Reale Qualifizierungen des Gasgemisches sind nicht möglich (HUDON et al. 2000). Die Technik der Gaschromatographie ist hoch objektiv und sehr gut reproduzierbar. Sie ist jedoch nicht generalisiert anwendbar (GARDNER et al. 2000). Die Gaschromatographie kombiniert mit der Flammenphotometrie wird als Standard bei der Durchführung genauer Halitosismessungen genutzt. Exakte quantitative Bestimmungen von Methylmerkaptan, Schwefelwasserstoff und Dimethylsulfid, Hauptkomponenten der Halitosis, sind damit möglich. Das Verfahren basiert auf einer hoch entwickelten Technik, die einen erfahrenen Anwender erforderlich macht (AWANO et al. 2002, MURATA et al. 2002). Vergleicht man die Anwendung eines kommerziell verfügbaren Multigassensensorsystems mit der Durchführung einer gaschromatographischen Analyse (SOCOLOWSKY 1989), ist der Aufwand der Probenvorbereitung für Multigassensensorsysteme erheblich geringer. Die Investitionskosten und damit die Kosten pro Analyse sind ebenso niedriger als für eine gaschromatographische Untersuchung (GARDNER et al. 2000).