



„BioTechNan – Program Interdyscyplinarnych Środowiskowych Studiów Doktoranckich KNOW z obszaru Biotechnologii i Nanotechnologii”

ROZPRAWA DOKTORSKA

Badania metabolomiczne bakterii *Pseudomonas aeruginosa*

Autor:

mgr inż. Karolina Anna Mielko

Promotorzy:

prof. dr hab. Piotr Młynarz

prof. dr hab. inż. Marcin Łukaszewicz

*Zakład Biochemii, Biologii Molekularnej i Biotechnologii, Wydział Chemiczny,
Politechnika Wroclawska*

Zakład Biotransformacji, Wydział Biotechnologii, Uniwersytet Wroclawski

Wrocław 2022



Politechnika Wroclawska



Uniwersytet
Wroclawski



UNIWERSYTET
PRZYRODNICZY
WE WROCLAWIU

Pragnę złożyć serdeczne podziękowania moim promotorom
Prof. dr hab. Piotrowi Młynarzowi oraz **Prof. dr hab. inż. Marcinowi Łukaszewiczowi**
za przeprowadzenie mnie przez trudny czas studiów doktoranckich
i doprowadzenie do napisania pracy doktorskiej.

Swoje podziękowania kieruję również do
Dr Wojciecha Wojtowicza i **Dr Sławomira Jabłońskiego**
za cenne rady i życzliwość.

Dziękuję
Kolegom i Koleżankom z Katedry Biochemii Biologii Molekularnej i Biotechnologii
Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej
oraz z Zakładu Biotransformacji Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego
za stworzenie miłej atmosfery pracy,
a przede wszystkim **Mgr. inż. Natalii Pudelko-Malik**
za ogromne pokłady optymizmu.

Wyrazy wdzięczności składam również mojej **Rodzinie i Przyjaciółom**,
a w szczególności **Pawłowi**, za wiarę we mnie i okazane wsparcie.

Spis treści

Wykaz skrótów.....	5
Streszczenie	6
Abstract	8
1. Wprowadzenie.....	10
1.1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> – pałeczka ropy błękitnej.....	10
1.1.1. Właściwości.....	10
1.1.2. Występowanie i chorobotwórczość	11
1.1.3. Antybiotykooporność	12
1.2. Biologia systemowa	14
1.2.1. Metabolomika.....	16
1.3. Techniki analityczne stosowane w metabolomice.....	18
1.3.1. Spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR)	19
1.4. Przygotowanie danych ¹ H NMR do analizy metabolomicznej	20
1.4.1. Korekcja linii bazowej.....	21
1.4.2. Korekta sygnałów rezonansowych	21
1.4.3. Normalizacja i skalowanie danych.....	22
1.4.4. Identyfikacja metabolitów	23
1.5. Analiza danych.....	23
1.5.1. Analizy statystyczne	23
1.5.2. Analizy chemometryczne	24
2. Cele pracy.....	26
3. Metodologia.....	27
3.1. Bakterie wykorzystane do eksperymentów	27
3.1.1. Szczepy <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27
3.1.2. Pozostałe mikroorganizmy	28
3.2. Hodowle bakteryjne	28
3.3. Metody przygotowania próbek do pomiarów (ekstrakcja).....	29
3.4. Eksperymenty NMR.....	29
3.4.1. Jedno – i wielowymiarowe analizy danych.....	30
4. Bibliografia.....	31
5. Przedstawienie publikacji będących wynikiem pracy doktorskiej	38
5.1. Oświadczenie współautora, kandydata do stopnia doktora o wkładzie merytorycznym w przedstawionych publikacjach.....	38
5.2. Metabolomic studies of <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	41

5.2.1.	Skrótowe omówienie publikacji	41
5.2.2.	Publikacja	43
5.3.	Comparison of bacteria disintegration method and their influence on data analysis in metabolomics.....	55
5.3.1.	Skrótowe omówienie publikacji	55
5.3.2.	Publikacja	58
5.4.	Possible metabolomic switch between environmental and pathogenic <i>Pseudomonas aeruginosa</i> strains: ¹ H NMR based metabolomics study	79
5.4.1.	Skrótowe omówienie publikacji	79
5.4.2.	Publikacja	81
5.5.	Metabolomics comparison of drug-resistant and drug-susceptible <i>Pseudomonas aeruginosa</i> strains (intra- and extracellular analysis).....	89
5.5.1.	Skrótowe omówienie publikacji	89
5.5.2.	Publikacja	91
6.	Podsumowanie i wnioski	115
7.	Dorobek naukowy	116

Wykaz skrótów

CF	– mukowiscydoza (ang. <i>cistic fibrosis</i>)
COSY	– spektroskopia korelacyjna (ang. <i>correlation spectroscopy</i>)
CPMG	– sekwencja pulsów (ang. <i>Carr-Purcell-Meiboom-Gill</i>)
FDR	– oczekiwana proporcja błędów I rodzaju wśród wyników istotnych statystycznie (ang. <i>false discovery rate</i>)
FID	– wolny zanik indukcyjny (ang. <i>free induction decay</i>)
GC	– chromatografia gazowa (ang. <i>gas chromatography</i>)
HMDB	– baza danych ludzkiego metabolomu (ang. <i>Human Metabolome Database</i>)
HSQC	– heterojądrowa pojedyncza korelacja kwantowa (ang. <i>heteronuclear single-quantum correlation spectroscopy</i>)
KEGG	– encyklopedia genów i genomów Koyoto (ang. <i>Koyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i>)
LB	– podłoże lizogenne (ang. <i>lysogeny broth</i>)
LC	– chromatografia cieczowa (ang. <i>liquid chromatography</i>)
MALDI	– desorpcja/ionizacja laserowa wspomagana matrycą (ang. <i>matrix-assisted laser desorption/ionization</i>)
MS	– spektrometria mas (ang. <i>mass spectrometry</i>)
NMR	– spektroskopie magnetycznego rezonansu jądrowego (ang. <i>nuclear magnetic resonance</i>)
NOESY	– spektroskopia jądrowego efektu Overhausera (ang. <i>nuclear overhauser effect spectroscopy</i>)
OPLS-DA	– OPLS-DA – ortogonalną analizę dyskryminacyjną częściowych mniejszych kwadratów (ang. <i>orthogonal partial last squares discriminant analysis</i>)
PAMDB	– baza danych metabolomu <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ang. <i>Pseudomonas aeruginosa Metabolome Database</i>)
PCA	– analiza głównych składowych (ang. <i>principal component analysis</i>)
PLS-DA	– analiza dyskryminacyjna częściowych mniejszych kwadratów (ang. <i>partial last squares discriminant analysis</i>)
PQN	– normalizacja do probabilistycznego ilorazu (ang. <i>probabilistic quotient normalisation</i>)
TMS	– tetrametylosilan (ang. <i>tetramethylsilane</i>)
TSP	– 3-(trimetylosililo)-propanosulfonian sodu (ang. <i>3-(trimethylsilyl) propanesulfonate sodium salt</i>)
UV	– skalowanie jednostkowej wariancji (ang. <i>unit variance</i>)
VIP	– zmienna znacząca dla projekcji (ang. <i>variance important in projection</i>)
WHO	– światowa organizacja zdrowia (ang. <i>World Health Organisation</i>)

Streszczenie

Pałeczka ropy błękitnej (*Pseudomonas aeruginosa*) jest Gram-ujemną bakterią, powszechnie występującą w środowisku naturalnym. Jednocześnie szczepy tego samego gatunku są niebezpiecznymi patogenami oportunistycznymi człowieka, opornymi na antybiotyki. *P. aeruginosa* została wraz z innymi szczepami bakteryjnymi zakwalifikowana do tzw. grupy „ESKAPE”. Poszukiwanie źródeł zjadliwości niniejszych drobnoustrojów jest niezbędne do efektywnego leczenia infekcji. Mikroorganizmy stosunkowo szybko nabywają oporność na antybiotyki, co jest związane z powszechnym stosowaniem terapeutyków nie tylko w medycynie, ale również w przemyśle. Szczególnie niebezpieczne dla zdrowia i życia człowieka są szczepy wzrastające w środowiskach szpitalnych. Badanie mechanizmów oporności na antybiotyki na różnych poziomach molekularnych pozwala na znalezienie niepoznanych dotąd zmian metabolicznych oraz biomarkerów antybiotykooporności. Jedną z nauk, która może przyczynić się do poznania różnic pomiędzy wspomnianymi szczepami jest metabolomika, zajmująca się analizą niskocząsteczkowych związków odzwierciedlających „obecny stan” komórki bakteryjnej.

Głównym celem badań przeprowadzonych w ramach rozprawy doktorskiej było poznanie i porównanie profili metabolomicznych różnych szczepów pałeczki ropy błękitnej, pozwalające na zrozumienie procesów adaptacji mikroorganizmu do zmienionych warunków środowiskowych czy nabywania oporności na antybiotyki. Przedstawiona dysertacja doktorska stanowi zbiór spójnych tematycznie artykułów – składa się z jednego artykułu przeglądowego oraz trzech prac zawierających oryginalne wyniki badań eksperymentalnych, w których skupiono się na analizie profili metabolomicznych mikroorganizmów, ze szczególnym uwzględnieniem *P. aeruginosa*.

W pierwszej pracy, która ma charakter przeglądu literaturowego, zdefiniowano pojęcie metabolomiki oraz omówiono możliwości jej wykorzystania w doświadczeniach na drobnoustrojach. Badania te dotyczą identyfikacji mikroorganizmów, a także wpływu czynników zewnętrznych na *P. aeruginosa*.

Kolejny artykuł przedstawia rezultaty eksperymentu metodologicznego, w którym oprócz pałeczki ropy błękitnej przeanalizowano również profile metabolomiczne pięciu innych bakterii. Przeprowadzono analizę porównawczą trzech metod dezintegracji komórek bakteryjnych – sonikacji, młyna piaskowego i dezintegratora tkanek. Wyniki pokazały, że przy użyciu każdej z wymienionych metod uzyskujemy takie same jakościowo rezultaty. Zmiany są ilościowe i dotyczą różnic w stężeniach poszczególnych metabolitów. Dodatkowo w pracy

udowodniono, że spektroskopia ^1H NMR jest narzędziem dyskryminującym metabolom badanych drobnoustrojów. Wyniki potwierdzają, że w przypadku badań metabolomicznych każdy etap eksperymentu musi zostać przeprowadzony w identyczny sposób, a jakiegokolwiek zmiany podczas przygotowania próbek prowadzą do zaburzenia poprawności analiz.

Druga praca eksperymentalna dotyczy porównań metabolitów wewnątrzkomórkowych szczepów pochodzących z różnych źródeł. Do analiz wykorzystano szczepy *P. aeruginosa* pochodzące ze środowiska naturalnego oraz izolowane z płwociny pacjentów chorych na mukowiscydozę. Przeprowadzono porównanie profili metabolomicznych z wykorzystaniem techniki NMR. Wyniki jedno- i wielowymiarowych analiz danych wykazały różnice w relatywnych stężeniach zidentyfikowanych związków. Zmiany te dotyczyły przede wszystkim związków zaangażowanych w szlaki przemian aminokwasów.

Ostatni artykuł to praca porównująca inną cechę *P. aeruginosa* – oporność na antybiotyki. Do badań wybrano izolowane od pacjentów szczepy, które posiadały różną wrażliwość na antybiotyki. W eksperymencie, oprócz tzw. metabolomicznego odcisku palca – pula metabolitów wewnątrzkomórkowych, przeanalizowano również tzw. metabolomiczny odcisk stopy – pulę analitów zewnątrzkomórkowych pochodzących z podłoża pochodowlanego. Przeprowadzone analizy statystyczne pozwoliły na zidentyfikowanie metabolitów różnicujących oba szczepy. Dodatkowo, wyniki porównań podłoża pochodowlanego pozwoliły na określenie związków wykorzystywanych w pierwszej kolejności w metabolizmie komórki bakteryjnej. Zmieniony metabolizm również w tym przypadku, związany jest głównie ze szlakami degradacji i syntezy aminokwasów.

Wyniki przeprowadzonych eksperymentów wykazały, że szczepy pochodzące z różnych środowisk mają odmienne profile metabolomiczne. Zaprezentowane wyniki potwierdzają obecność różnic w niskocząsteczkowych związkach szczepów *P. aeruginosa* mających różną oporność na antybiotyki. Różnice te wynikały przede wszystkim ze zmienionego metabolizmu aminokwasów. Dodatkowo potwierdzono, że w eksperymentach metabolomicznych każdy z etapów przygotowania próbek powinien przebiegać identycznie, a dobór odpowiedniej metody dezintegracji ma szczególne znaczenie w przypadku analiz celowanych. Co więcej, wykazano potencjał NMR jako narzędzia do rozróżniania i identyfikacji odmiennych rodzajów bakterii. Przyszłe badania powinny skupić się na analizie zmienionych ścieżek metabolicznych z wykorzystaniem dodatkowych technik analitycznych takich jak LC- czy GC-MS.

Abstract

Pseudomonas aeruginosa is a gram-negative bacterium that is widely distributed in the environment. At the same time, the same species strains are dangerous opportunistic pathogens of humans, resistant to antibiotics. *P. aeruginosa* was classified, along with other bacterial strains, into the so-called "ESKAPE" group. Searching for the sources of virulence of these microorganisms is necessary for the effective treatment of infections. Microorganisms quickly acquire resistance to antibiotics, which is related to the widespread use of therapeutics in medicine and industry. Strains growing in hospital environments are particularly dangerous to human health and life. Researching antibiotic resistance mechanisms at different molecular levels allows for finding previously unknown metabolic changes and antibiotic resistance biomarkers. One of the sciences that can contribute to understanding the differences between the above-mentioned strains is metabolomics, which deals with the analysis of small-molecule compounds reflecting the "current state" of the bacterial cell.

The main objective of the research conducted as a part of the doctoral dissertation was to learn and compare the metabolomic profiles of various *P. aeruginosa* strains, enabling the understanding of the processes of the microorganism's adaptation to changed environmental conditions or the acquisition of antibiotic resistance. The presented doctoral dissertation is a collection of thematically coherent articles - it consists of one review article and three papers containing original experimental results. The experimental studies focused on analyzing the metabolomic profiles of microorganisms, with particular emphasis on *P. aeruginosa*.

In the first work, a literature review, the concept of metabolomics was defined and the possibilities of its use in experiments on microorganisms were discussed. The studies concern the identification of microorganisms as well as the influence of external factors on *P. aeruginosa*.

The next article presents the results of a methodological experiment in which, in addition to the *P. aeruginosa*, the metabolomic profiles of five other bacteria were also analyzed. A comparative analysis of three methods of bacterial cell disintegration was carried out - sonication, sand mill, and tissue disintegrator. The results showed that using each of the above-mentioned methods, allowed to obtain the same qualitative results. The changes are quantitative and concern differences in the concentrations of individual metabolites. Additionally, the study proved that ^1H NMR spectroscopy is a tool that discriminates against metabolites of the studied microorganisms. The results confirm that in the case of metabolomics studies, each step of the experiment must be carried out in the same way, and any changes during the preparation of the samples lead to the incorrectness of the analysis.

The second experimental work concerns the comparisons of intracellular metabolites of strains from different sources. For analysis, were used *P. aeruginosa* strains isolated from the natural environment and off the sputum of patients suffering from cystic fibrosis. A comparison of the metabolomic profiles using the NMR technique was performed. The results of one- and multivariate data analyzes showed differences in the relative concentrations of the identified compounds. These changes mainly concerned compounds involved in the pathways of amino acid metabolism.

The last of the works is a study comparing another feature of *P. aeruginosa* - resistance to antibiotics. Strains isolated from patients with different sensitivity to antibiotics were selected for the study. In the experiment, in addition to the metabolomic fingerprint - the pool of intracellular metabolites, also the metabolomic footprint - a pool of extracellular analytes derived from the medium. The performed statistical analyzes allowed to identify the metabolites differentiating both strains. Additionally, the results of comparisons of the post-culture medium allowed determining the compounds used at the beginning in the metabolism of the bacterial cell. The altered metabolism, also, in this case, is mainly related to the degradation and synthesis pathways of amino acids.

The results of the conducted experiments showed that the strains from different environments have different metabolomic profiles. The presented results confirm the presence of differences in small-molecule compounds of *P. aeruginosa* strains having different resistance to antibiotics. These differences were mainly due to altered amino acid metabolism. In addition, it was confirmed that in metabolomics experiments, each stage of sample preparation should be identical, and the selection of an appropriate disintegration method is of particular importance in the case of targeted analyzes. Moreover, the potential of NMR as a tool of distinguishing and identifying different types of bacteria has been demonstrated. Future research should focus on the analysis of altered metabolic pathways using additional analytical techniques such as LC- and GC-MS.

1. Wprowadzenie

1.1. *Pseudomonas aeruginosa* – pałeczka ropy błękitnej

1.1.1. Właściwości

Pałeczka ropy błękitnej (łac. *Pseudomonas aeruginosa*, *P. aeruginosa*) została po raz pierwszy wyizolowana w 1882 roku przez Carla Gessarda i nazwana ówczesnie *Bacillus pyocaneus*. Doniesienia o zakażeniach bakteryjnych tym drobnoustrojem, rozpoznawane poprzez charakterystyczny zapach bandaży i ich zielono-niebieskie zabarwienie były już jednak opisywane wcześniej. Dopiero z biegiem lat, w 1894 roku, dokładne scharakteryzowanie drobnoustroju spowodowało zmianę nazwy na obowiązującą obecnie - *Pseudomonas aeruginosa* [1,2].

Mikroorganizm ten należy do grupy Gram ujemnych bakterii tlenowych o wymiarach: szerokość 0,5 - 0,8 μm , długość: 1,5 - 3,0 μm . Posiada jedną biegunowo położoną rzęskę. Gatunek *Pseudomonas aeruginosa*, należy do typu proteobakterii [3]. Szczegółową przynależność systematyczną przedstawiono w tabeli poniżej (Tabela 1) [4].

Tabela 1. Przynależność systematyczna *Pseudomonas aeruginosa* [4].

Królestwo	bakterie
Typ	proteobakterie
Klasa	gammaproteobakterie
Rząd	<i>Pseudomonadales</i>
Rodzina	<i>Pseudomonadaceae</i>
Rodzaj	<i>Pseudomonas</i>
Gatunek	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (pałeczka ropy błękitnej)

Charakterystyczną cechą rodzaju jest tworzenie biofilmu, wytwarzanie sideroforów oraz wydzielanie barwników – najczęściej są to piocyjanina (w kolorze błękitnozielonym) oraz fluoresceina (żółtozielony pigment fluoryzujący), działająca jak siderofor – jest wydzielana do podłoża, kiedy brakuje w nim żelaza niezbędnego do wzrostu mikroorganizmu. Niektóre szczepy wydzielają również melaninę (kolor brązowy) czy piorubinę (kolor czerwony) [2,5,6].

Na podłożach stałych obserwuje się biało-szare kolonie pałeczek. Szczepy izolowane od pacjentów są błyszczące i śluzowe (ze względu na wytwarzanie alginianu), a ich zapach przypomina jaśmin lub kredki świecowe. *P. aeruginosa* upłynnia żelatynę, wytwarza dwuhydrolazę argininy, redukuje azotany, jest oksydazo-dodatnia, ma zdolność fermentacji glukozy i maltozy (nie fermentuje laktozy), należy do mezofilii (wykazuje dużą tolerancję na temperaturę, chociaż temperatura optymalna wzrostu to 37°C) [3,5].

1.1.2. Występowanie i chorobotwórczość

Bakterie z rodzaju *Pseudomonas* mają małe wymagania odżywcze, w związku z czym występują w bardzo różnorodnych środowiskach, tj. ścieki, gleba, woda, a nawet powietrze, co czyni je dosyć „powszechnym” drobnoustrojem. Jednocześnie ten sam gatunek może być bardzo niebezpiecznym mikroorganizmem oportunistycznym człowieka (wywołującym infekcje u osób z obniżoną odpornością) [7,8]. Zakażenia *P. aeruginosa* są szczególnie niebezpieczne dla osób chorujących na mukowiscydozę (ang. *cystic fibrosis*, CF), powodując zakażenia układu oddechowego – zapalenie płuc [9]. Problem z infekcjami wywołanymi tym mikroorganizmem jest częstą przypadłością po zabiegach operacyjnych lub w przypadku rozległych oparzeń [10,11]. Drobnoustrój ten może powodować zapalenie wsierdzia (rozpoznawany często u osób po wszczepieniu sztucznej zastawki), zakażenia ucha wewnętrznego (tzw. ucho pływaka), zakażenia ośrodkowego układu nerwowego (zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych), zakażenia przewodu pokarmowego (tzw. gorączka Shanghai), zakażenia kości i stawów, zakażenia w obszarze gałki ocznej (często u osób noszących soczewki kontaktowe), zakażenia układu moczowego (związane z cewnikowaniem) [12] oraz zakażenia skóry (powszechnym zjawiskiem są zakażenia paznokci) [13].

Chorobotwórczość *P. aeruginosa* jest związana z tzw. czynnikami zjadliwości [14]. Do najważniejszych z nich należą fimbrie – białkowe wyrostki bakteryjnej błony komórkowej, które pozwalają na łatwiejszą kolonizację nabłonków poprzez wiązanie się do receptorów galaktozowych, sialowych i mannozowych [15]. Tworzenie biofilmu to kolejny czynnik, który wpływa na utrudnianie wchłaniania substancji do wnętrza komórki bakteryjnej. Alginian tworzący śluzową warstwę, stanowi fizyczną barierę przed składnikami układu immunologicznego gospodarza, czy innymi mikroorganizmami i zapewnia komórkom stosunkowo stabilne warunki bytowania [16,17]. Pałeczki ropy błękitnej wytwarzają również wiele toksyn, które wpływają na komórki gospodarza. Do najpowszechniejszych należą:

- egzotoksyna A, hamująca syntezę białek, co prowadzi do martwicy komórek;

- egzotoksyna S, stanowiąca swego rodzaju marker zakażenia, wykrywana we krwi pacjentów przed wystąpieniem bakteriemii;
- endotoksyna (LPS), odgrywająca rolę w patogenezie wstrząsu septycznego;
- cytotoksyna, rozkładająca lipidy oraz tworząca pory w błonie komórek gospodarza;
- hemolizyny unieczynnijające komórki odpowiedzi immunologicznej gospodarza [18,19].

Szczepy *P. aeruginosa* wytwarzają dodatkowo różnorodne enzymy proteolityczne. Część z nich jest odpowiedzialna za uszkodzanie tkanek (np. elastaza, proteaza alkaliczna), co ułatwia rozprzestrzenianie zakażenia w organizmie [20,21]. Za czynniki zjadliwości są uznawane również wspomniane już wcześniej barwniki, produkowane przez mikroorganizm. Piocyjanina (1-hydroksy-5-metylofenozyna) powoduje wzrost stężenia reaktywnych form tlenu, doprowadzając w skrajnych przypadkach do nekrozy tkanek gospodarza, ale również powodując zahamowanie wzrostu innych drobnoustrojów wokół kolonii (tę właściwość posiada również produkowany przez *P. aeruginosa* kwas piolipinowy, hamujący wzrost prątków gruźlicy (łac. *Mycobacterium tuberculosis*) [22].

1.1.3. Antybiotykooporność

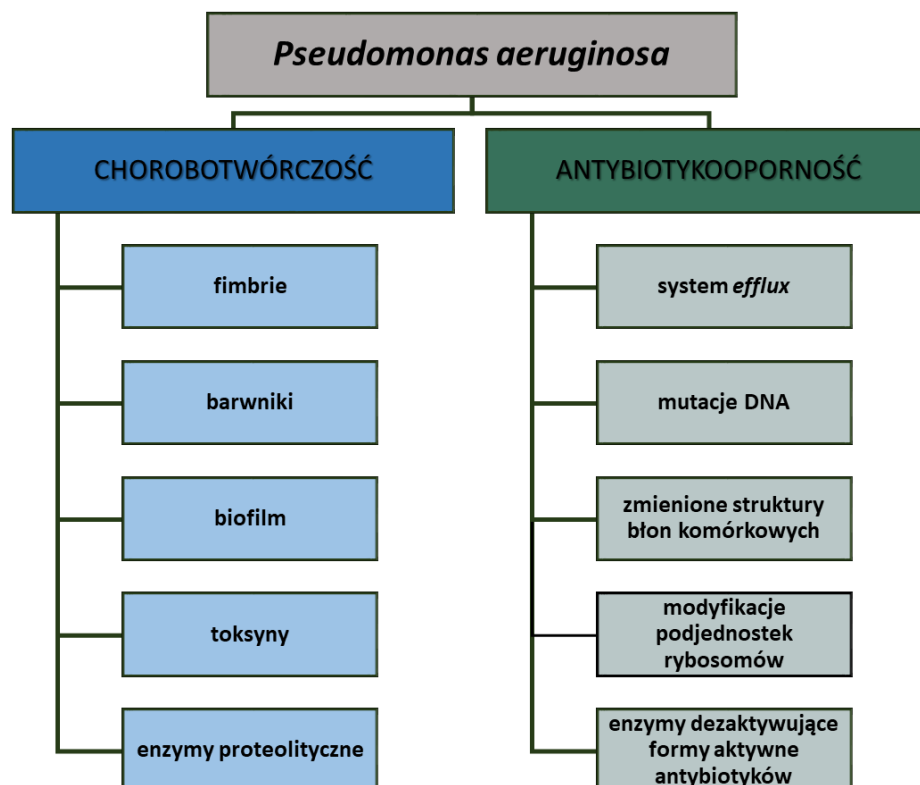
Antybiotykooporność jest coraz powszechniejszym zjawiskiem. W 2017 roku Światowa Organizacja Zdrowia (ang. *World Health Organisation*, WHO) opublikowała listę bakterii, dla których poszukiwanie nowych strategii leczenia jest kluczowe dla przyszłości medycyny [23]. Analizy przeprowadzone w 2019 roku pokazały, że zakażenia bakteryjne były powodem śmierci około 4,95 mln ludzi w tym roku, z czego prawie 1,5 mln to zgony spowodowane szczepami wielolekoopornymi [24].

Pałeczka ropy błękitnej (wraz z pięcioma innymi mikroorganizmami: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Enterobacter spp.*) należy do grupy patogenów zwanej „ESKAPE” (jest to akronim od nazw rodzajowych bakterii wchodzących w skład tej grupy) [25], która charakteryzuje bakterie posiadające bardzo dużą oporność na antybiotyki. Znalezienie nowych sposobów zwalczania infekcji wywołanych przez drobnoustroje z grupy „ESKAPE” jest kluczowe dla możliwości dalszego leczenia [20,26].

Ze względu na występowanie szczepów opornych na antybiotyki, wybór związku aktywnego jest dosyć wąski. W zależności od zjadliwości do leczenia infekcji *P. aeruginosa* stosuje się: penicyliny (najczęściej z inhibitorami β -laktamaz, np. piperacylina), karbapenemy

(np. meropenem, imipenem) oraz cefalosporyny IV i V generacji (np. cefepim, ceftazydym), które wpływają na zaburzenie syntezy ściany komórkowej bakterii poprzez blokowanie transpeptydaz bakteryjnych; aminoglikozydy (np. tobramycyna, amikacyna), blokujące połączenie kodonu z antykodonem w podjednostce 30S rybosomu; fluorochinolony (np. lewofloksacyna, ciprofloksacyna) inhibujące działanie gyrazy – enzymu należącego do grupy topoizomeraz, odpowiedzialnego za prawidłowość procesu skręcania podwójnej helisy DNA oraz polimyksyny (np. kolistyna), należące do antybiotyków peptydowych, zaburzające strukturę błony komórkowej poprzez integrację z zawartymi w niej fosfolipidami [7,27]. Niestety, coraz częściej obserwujemy szczepy, które wykazują oporność na wszystkie możliwe antybiotyki, co uniemożliwia efektywne leczenie, a w przypadku osób z obniżoną opornością prowadzi do zwiększonej śmiertelności [21].

Wszystkie wymienione wcześniej cechy chorobotwórczości pośrednio sprawiają, że niektóre szczepy pałeczki ropy błękitnej są bardzo odporne na antybiotyki. Oporność ta wynika z cech wrodzonych, ale również nabytych. Schematyczne omówienie chorobotwórczości i antybiotykooporności przedstawiono na Rysunku 1.



Rysunek 1. Chorobotwórczość i antybiotykooporność *Pseudomonas aeruginosa*.

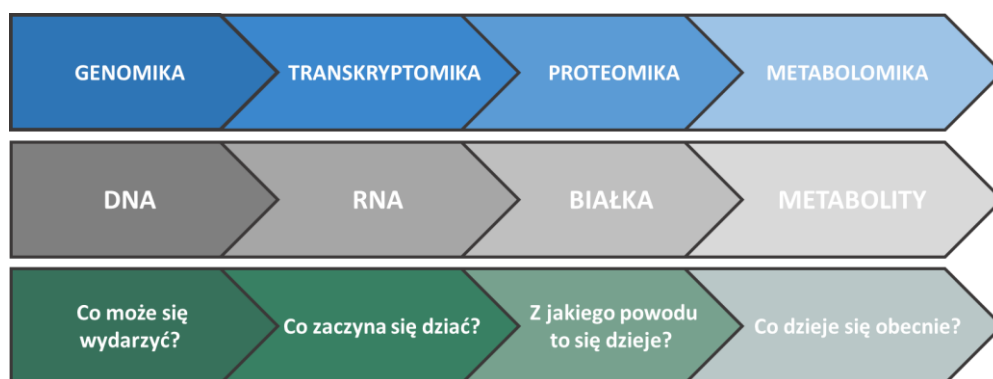
Podstawą wrodzonej oporności bakterii na antybiotyki jest posiadanie przez szczepy wielu enzymów zdolnych do dezaktywacji form aktywnych stosowanych związków (najpowszechniejsze są β -laktamazy, hydrolizujące wiązania w cząsteczkach antybiotyków β -laktamowych, ale są to również cefalosporynazy czy penicyliny) oraz modyfikacje miejsc docelowego działania antybiotyku lub podjednostek rybosomów [28]. Cechy te posiada również pałeczka ropy błękitnej. Jednym z wrodzonych czynników wpływającym na wielooporność lekową *P. aeruginosa* jest znacząco zmniejszona przepuszczalność błony zewnętrznej oraz mechanizm zamykania kanałów porynowych, co uniemożliwia im wnikanie do wnętrza komórki. W bakteriach bardzo rozwinięty jest również tzw. system *efflux*, który pozwala na aktywne usuwanie cząsteczek leków z komórki [29,30].

Oporność nabyta jest skutkiem mutacji i wytwarzania genów oporności. Zmiany te następują w wyniku horyzontalnego transferu genów między drobnoustrojami lub jako wypadkowa zmian środowiska, w którym bytują bakterie. Występowanie wielu mutacji jednocześnie jest korzystne dla szybkiej adaptacji mikroorganizmu na niesprzyjające warunki (np. obecność różnych antybiotyków, wahania temperatury czy dostępności tlenu). Efektem jest wytwarzanie dodatkowych enzymów wpływających na struktury cząsteczek leków [31,32]. Dość powszechnym środowiskiem bytowania *P. aeruginosa* są szpitale, w których stosuje się wiele różnych środków dezynfekcyjnych. Pałeczki ropy błękitnej nabywają dodatkowe cechy oporności, które umożliwiają im funkcjonowanie w coraz bardziej różnorodnych środowiskach i sprawiają, że są one coraz trudniejsze do eradykacji [33].

1.2. Biologia systemowa

Badania naukowe prowadzone na żywych organizmach są bardzo złożone i czasochłonne ze względu na ogrom informacji i zmian, jakie nieustannie zachodzą w komórce. Dokładne zbadanie procesów jest skomplikowane i wymaga połączenia informacji uzyskanych na różnych poziomach molekularnych. Na każdym z tych poziomów zakodowane są informacje biochemiczne, których przemiany są połączone. Odkrycia nowych związków i szlaków metabolicznych na przestrzeni lat pozwoliły na stworzenie obszernej sieci ich zależności. Należy pamiętać, że te same związki są bardzo często zaangażowane jednocześnie w wiele szlaków metabolicznych, jednak trwający obecnie rozwój bioinformatyki oraz gromadzenie nowych wyników w postaci baz danych, pozwala na odnajdywanie kolejnych połączeń (map) szlaków biochemicznych [34].

Podstawowy podział nauk biologii systemowej obejmuje szereg nauk omicznych – genomikę, transkryptomikę, proteomikę i metabolomikę. Każda z dziedzin jest stosowana w bardzo różnorodnych badaniach naukowych, a ich cechą wspólną jest utrzymanie homeostazy wewnątrz komórki, która zmienia się w czasie, ale również w odpowiedzi na czynniki środowiskowe (Rysunek 2) [35].



Rysunek 2. Dziedziny biologii systemowej i ich interakcje.

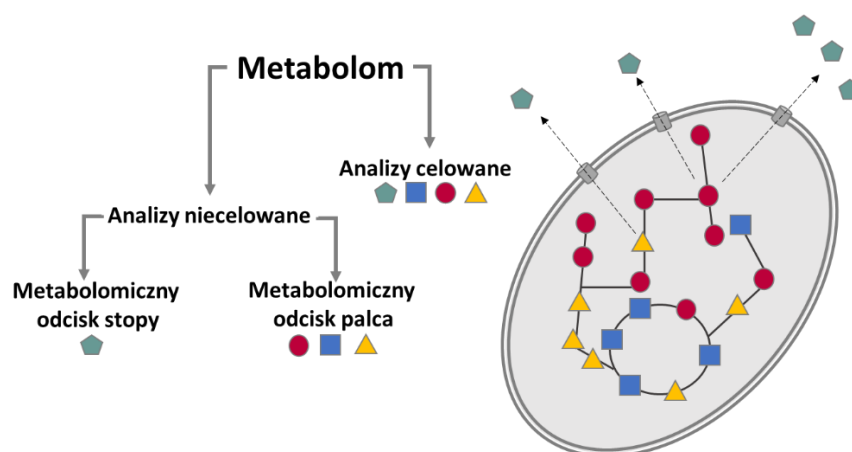
Pierwszą i najbardziej podstawową nauką należącą do biologii systemowej jest genomika, która zajmuje się badaniem informacji zawartych w DNA. Dynamika zmian genów jest stosunkowo wolna, dlatego nauka ta pozwala pośrednio odpowiedzieć na pytanie: „Co może się wydarzyć?”. Jest to najbardziej ogólny poziom badań, skupiający się na analizie całego genomu – określeniu sekwencji genów, poznaniu ich funkcji, określaniu zmienności np. w obrębie tego samego gatunku, a także ewolucji genów [36]. Kolejna dziedzina – transkryptomika, zajmuje się badaniem procesu transkrypcji, czyli przepisywania informacji z DNA na RNA. Zmiany obserwowane na tym poziomie molekularnym są bardziej dynamiczne niż w przypadku genomiki. Analiza transkryptomu odpowiada na pytanie: „Co zaczyna się dzieć?” i służy określeniu poziomu ekspresji genów w komórce [37]. Przedostatnią z wymienionych dziedzin biologii systemowej jest proteomika, w której analizowane są różnego rodzaju białka, zwane proteomem. Przemiany na tym poziomie są dosyć dynamiczne. Badania proteomiczne dotyczą analizy sekwencji białek, ich identyfikacji i rozdzielania, określania powstałych modyfikacji i ich trójwymiarowej struktury, ale również ilościowego określania zawartości białek w badanej próbce. W przypadku tej nauki omicznej, naukowcy poszukują odpowiedzi na pytanie: „Z jakiego powodu to się dzieje?” [38]. Podobne lub nawet bardziej dynamiczne zmiany mogą być obserwowane przy pomocy ostatniej z nauk omicznych – metabolomice. Na tym poziomie molekularnym naukowcy starają się odpowiedzieć na pytanie: „Co dzieje się obecnie?”. W tym celu analizują metabolity dostępne w danym czasie w komórce [39].

Każda z nauk omicznych może być wykorzystywana do bardzo różnorodnych celów – badań próbek pochodzących od pacjentów, linii komórkowych, tkanek, produktów spożywczych oraz szeroko rozumianej mikrobiologii, pozwalając na uzyskanie coraz bardziej dokładnego obrazu przemian biochemicznych zachodzących w mniej lub bardziej złożonych systemach biologicznych.

1.2.1. Metabolomika

Metabolomika (ang. *metabolomics*) to nauka zajmująca się analizą niskocząsteczkowych związków (<1500 Da), zwanych metabolitami. Całość tych związków tworzy metabolom (np. komórki bakteryjnej) [40]. Pierwsze doniesienia o badaniach, które teraz z perspektywy czasu można uznać za metabolomiczne, pochodzą z XVI wieku. Niemiecki lekarz Ulrich Pinder stworzył wówczas tzw. koło urynowe, służące do diagnozowania chorób poprzez analizę koloru, smaku i zapachu moczu pacjenta [41]. Obserwacje metabolitów na obecnym poziomie jako pierwszy prowadził w swoich badaniach Jeremy Nicholson już w 1989 roku, wykorzystując protonową spektroskopię magnetycznego rezonansu jądrowego ^1H NMR [42], jednak nazwę tej dziedziny nauki wprowadził po raz pierwszy Olivier Fiehn w 2002 roku [43]. Od tego czasu nastąpił bardzo szybki rozwój badań metabolomicznych, na co bezpośredni wpływ miał rozwój technik analitycznych – ich czułości i dokładności. Obecnie pojawia się coraz więcej podziałów badań metabolomicznych, które zajmują się analizą konkretnej grupy związków (np. lipidomika – badanie lipidów, czy cukromika – analiza cukrów) [44].

Ogólny podział analiz, jakie są przeprowadzane w obrębie badań metabolomicznych, to analizy celowane oraz niecelowane (tzw. profilowanie metabolomiczne). Analizy celowane skupiają się na konkretnych szlakach lub związkach. W drugim przypadku analizie podlega cały zbiór metabolitów wykrytych w danym doświadczeniu. Jeśli badania prowadzone są na metabolitach znajdujących się wewnątrz komórki, mówimy o tzw. metabolomicznym odcisku palca (ang. *metabolomics fingerprinting*). Analizy medium pochodowlanego, czyli substancji uwolnionych do środowiska, w którym hodowane są bakterie, nazywane są tzw. metabolomicznym odciskiem stopy (ang. *metabolomics footprinting*) (Rysunek 3) [45].



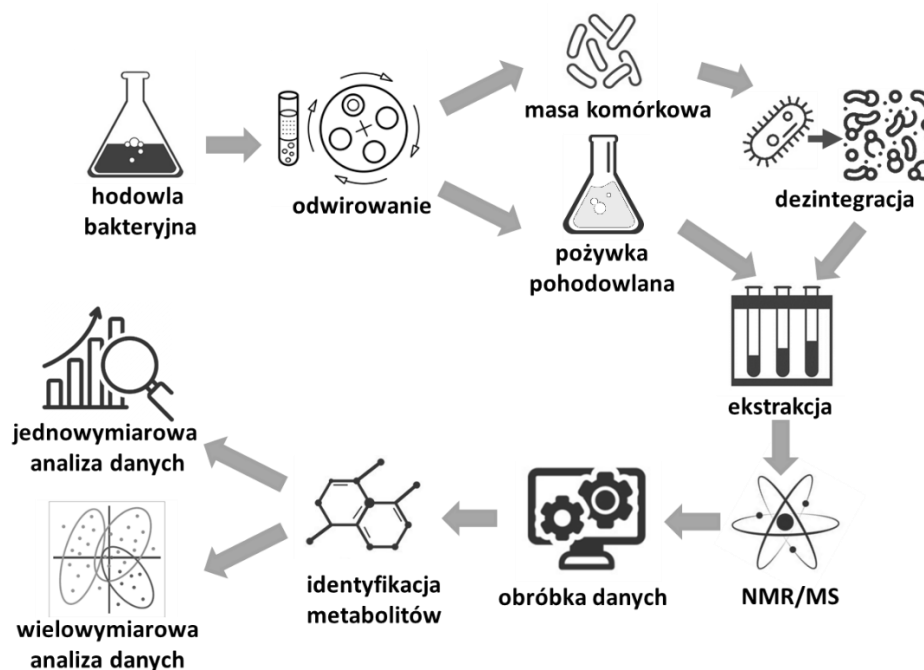
Rysunek 3. Rodzaje badań metabolomicznych.

Badania metabolomiczne prowadzi się analizując profile metabolomiczne, czyli wszystkie niskocząsteczkowe związki zidentyfikowane w próbce. Generalnie przyjęty schemat analiz polega na analizie porównawczej, czyli porównaniu jednej grupy próbek do drugiej - odnośnikowej. Dla przykładu, za grupy można uznać próbki pochodzące od pacjentów zdrowych (które stanowią kontrolę) oraz próbki od pacjentów ze zdiagnozowaną chorobą. Analogicznie,

w przypadku badań mikrobiologicznych, grupę stanowi pula szczepów bakteryjnych o odmiennych cechach (np. mających różną wrażliwość na antybiotyki). Oznacza to, że porównania bazują na zmianach w stężeniach zidentyfikowanych związków, co może wskazywać zmienione (np. pod wpływem choroby - w przypadku próbek od pacjentów lub zmienionego miejsca bytowania bakterii) szlaki biochemiczne. Analizy mogą być prowadzone w sposób ilościowy oraz jakościowy. W pierwszym przypadku stężenie metabolitów jest dokładnie określone, a przeprowadzane analizy statystyczne i chemometryczne są w stanie określić różnice w poziomach niskocząsteczkowych związków, które najbardziej różnicują badane grupy próbek. Jakościowy sposób pozwala na określenie odmienności badanych próbek na podstawie całego profilu metabolomicznego, bez konieczności identyfikacji poszczególnych związków [46]. Ten sposób jest stosowany bardzo często do identyfikacji i rozróżniania drobnoustrojów [47].

Eksperyment metabolomiczny w każdym przypadku ma bardzo podobny przebieg (Rysunek 4) [48]. Pierwszy etap to zebranie materiału do badań (dla badań mikrobiologicznych – hodowla drobnoustroju), następnie - w zależności od celu eksperymentu - zostaje przeprowadzona ekstrakcja masy komórkowej lub pożywki pohodowlanej. Metoda ekstrakcji jest dobierana dla konkretnego materiału (np. biofluidu czy komórek bakteryjnych), który ma być przeanalizowany. Najbardziej powszechną metodą jest ekstrakcja z użyciem metanolu

i wody. W przypadku analiz metabolitów wewnątrzkomórkowych, niezbędne jest również dobranie odpowiedniego sposobu dezintegracji. Przygotowane odpowiednio próbki są badane technikami analitycznymi (NMR oraz/lub MS), a otrzymane dane po obróbce są gotowe do identyfikacji metabolitów oraz analiz danych (zarówno jedno- jak i wielowymiarowych) [49,50].



Rysunek 4. Ogólny przebieg eksperymentu metabolomicznego dla mikroorganizmów.

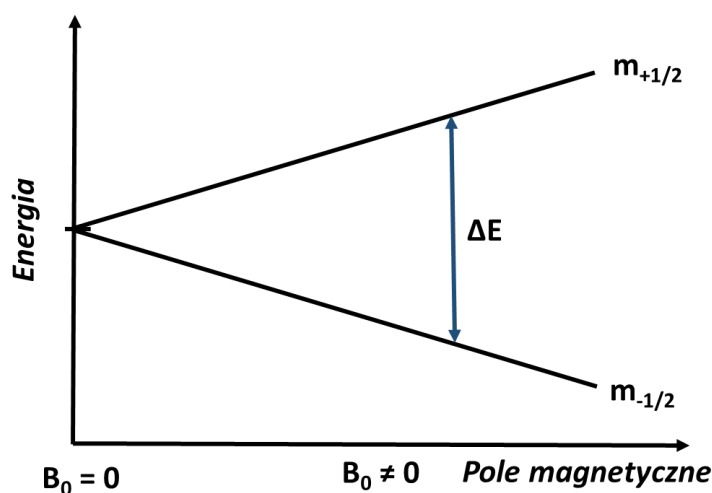
1.3. Techniki analityczne stosowane w metabolomice

W metabolomice powszechnie stosuje się dwie techniki analityczne – spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego (ang. *nuclear magnetic resonance*, NMR) oraz spektrometria mas (ang. *mass spectrometry*, MS), połączona z chromatografią cieczową (ang. *liquid chromatography*, LC) lub gazową (ang. *gas chromatography*, GC). W niniejszej dysertacji doktorskiej badania zostały przeprowadzone za pomocą spektroskopii NMR, w związku z czym wykorzystana metoda analityczna została krótko omówiona poniżej.

1.3.1. Spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR)

NMR jest techniką wykorzystywaną do analizy składu ilościowego i jakościowego badanej próbki. Metoda ta została odkryta w 1946 roku właściwie jednocześnie przez dwa niezależne zespoły badawcze – Edwarda Purcella [51] oraz Felixa Blocha [52], jednak już w 1924 roku Wolfgang Pauli pisał o możliwym posiadaniu przez jądra atomowe momentu magnetycznego [53].

Podstawą stosowania tej metody jest posiadanie przez jądra atomowe danego pierwiastka niezerowego spinu jądrowego ($I \neq 0$) (do takich jąder zaliczamy ^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{17}O , ^{19}F oraz ^{31}P). Umieszczenie próbki w zewnętrznym polu magnetycznym B_0 powoduje uporządkowanie jąder atomowych równoległe ($m_{+1/2}$) lub antyrównoległe ($m_{-1/2}$) względem kierunku przyłożonego pola. Jeśli tak uporządkowany układ spinów zostanie poddany działaniu promieniowania elektromagnetycznego o odpowiedniej częstotliwości, nastąpi absorpcja energii i spiny zmienią położenie z niższego poziomu energetycznego na wyższy. Dokładna energia (częstość promieniowania elektromagnetycznego) ΔE , niezbędna do spełnienia warunku rezonansu, zależy od rodzaju jądra i natężenia zewnętrznego pola magnetycznego. Zwiększanie wartości B_0 powoduje zwiększenie różnicy energii, a co za tym idzie, zwiększa rozdzielczość aparatu (Rysunek 5) [54,55]. Informacja jaką otrzymuje się po skończeniu pomiaru to wykres zależności intensywności sygnału od czasu, zwany swobodnym zanikiem indukcji (ang. *free induction decay*, FID). Dopiero po wykonaniu transformaty Fouriera otrzymujemy widmo NMR, czyli zależność intensywności absorpcji od natężenia pola magnetycznego [56].



Rysunek 5. Wpływ zewnętrznego pola magnetycznego B_0 na spiny jąder atomowych.

Pozycje sygnału absorpcyjnego na widmie określa się mianem przesunięcia chemicznego. Sygnał wzorca (TSP - 3-(trimetylosililo)-propinosulfonian sodu lub TMS - trimetylosilan) oznacza punkt zerowy, a pozostałe sygnały (skalibrowane w tzw. skali przesunięcia chemicznego δ wyrażonego w jednostkach ppm)) znajdują się zazwyczaj z lewej strony widma [55]. W celu określenia względnej liczby różnych protonów w analizowanej cząsteczce, sygnały na widmie są poddawane integracji (całkowaniu), co pozwala na określenie powierzchni pod każdym z pików. Stosunek powierzchni pików jest proporcjonalny do liczby równocennych jąder w danej grupie. Warto zwrócić uwagę na fakt, że sygnały absorpcji na widmie najczęściej nie występują w postaci pojedynczych pików. W cząsteczkach sąsiadujące spiny jądrowe oddziałują ze sobą, co powoduje rozszczepienie sygnału absorpcji i jest obserwowane na widmie jako tzw. sprzężenie-spinowo spinowe występujące w postaci sygnałów o różnej multipletowości [57].

W spektroskopii NMR najczęściej wykonuje się widma jedno (1D) oraz dwuwymiarowe (2D) (przykładami mogą być eksperymenty: homojądrowe ^1H - ^1H – np. COSY (ang. *correlation spectroscopy*) oraz heterojądrowe ^1H - ^{13}C – np. HSQC (ang. *heteronuclear single-quantum correlation spectroscopy*). W badaniach metabolomicznych w głównej mierze wykonuje się jednowymiarowe widma protonowe (^1H), a do pomiarów wykorzystuje się próbki w fazie ciekłej. Do wykonania pomiarów metabolomicznych należy dobrać odpowiednią sekwencję pulsów w zależności od analizowanego materiału biologicznego. Odpowiednia sekwencja pulsów umożliwi wyeliminowanie sygnału pochodzącego od rozpuszczalnika rozpuszczalnika lub/oraz sygnałów pochodzących od makromolekuł (np. białek czy lipidów), co z kolei pozwala na uzyskanie lepszego jakościowo widma. Najczęściej używanymi w metabolomicie sekwencjami pulsów są: NOESY (ang. *nuclear overhauser effect spectroscopy*, w nomenklaturze Bruker: *noesypr1d*) oraz CPMG (ang. *Carr-Purcell-Meiboom-Gill*, w nomenklaturze Bruker: *cpmgpr1d*). Pierwsza z nich jest wykorzystywana, gdy konieczna jest presaturacja rozpuszczalnika, druga natomiast, kiedy dodatkowo w próbce znajduje się dużo makromolekuł zaburzających sygnały pochodzące od innych związków [54,55].

1.4. Przygotowanie danych ^1H NMR do analizy metabolomicznej

Przygotowanie widm NMR do analizy danych jest wieloetapowe, a każdy etap ma kluczowe znaczenie dla rzetelności uzyskanych wyników. Podstawowy przebieg obróbki danych to: korekcja linii bazowej i sygnałów rezonansowych, normalizacja i skalowanie danych oraz

identyfikacja metabolitów. Każdy z etapów (wraz z analizami statystycznymi i chemometrycznymi danymi) zostanie omówiony poniżej.

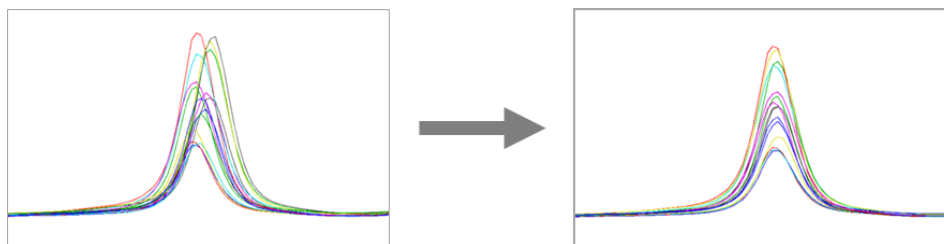
1.4.1. Korekcja linii bazowej

Poprawna korekcja widm uzyskanych przy pomocy spektroskopii jądrowego rezonansu jądrowego pozwala uniknąć niepożądanego zmiękania między próbkami. Podstawą jest sprawdzenie symetryczności szerokości sygnałów rezonansowych. Dla każdego widma należy sprawdzić również (i odpowiednio skalibrować, jeśli jest taka potrzeba) punkt odniesienia sygnału rezonansowego (najczęściej jest to TSP) oraz przeprowadzić korekcję fazy i linii bazowej. Na rynku istnieje wiele komercyjnie dostępnych programów (np. Mestrenova (Mestrelab Research S.L.), TopSpin (Bruker) czy Delta (Jeol), w których algorytmy umożliwiają częściowe zautomatyzowanie tych procesów. Pomimo to istotne jest manualne zweryfikowanie wyników przed przystąpieniem do dalszych etapów analiz oraz ich „wyeksportowanie” do formatu stosowanego np. w środowisku *Matlab*.

1.4.2. Korekta sygnałów rezonansowych

Uzyskane widmo NMR stanowi zbiór sygnałów rezonansowych oraz fragmentów, które nie dostarczają informacji o związkach – jest to tzw. szum. Podczas dalszej obróbki danych, fragmenty takie zostają usunięte. Podobnie postępuje się również z sygnałem rozpuszczalnika.

Próbki biologiczne (pomimo zastosowania buforów) mogą mieć nieznaczenie zmienione przesunięcia chemiczne dla poszczególnych metabolitów, a ich odpowiednie dopasowanie stanowi podstawę poprawności późniejszych analiz statystycznych i chemometrycznych. W celu ułatwienia dopasowania, możliwe jest zastosowanie wielu różnych algorytmów pozwalających na poprawne nałożenie sygnałów rezonansowych niskocząsteczkowych związków [58]. Jednym z nich jest algorytm stosowany w obszarze całego widma spektroskopowego – COW (ang. *correlation optimized wrapping*) [59]. Nakładanie sygnałów można również prowadzić dla zadanych przedziałów. Narzędziem do tego służącym może być algorytm *icoshift* [60]. Efekt jego działania przedstawiono na Rysunku 6.



Rysunek 6. Efekt działania algorytmu *icoshift* stosowanego do nakładania sygnałów rezonansowych.

Odpowiednia korekta sygnałów na widmie pozwala na dokładniejszą normalizację danych.

1.4.3. Normalizacja i skalowanie danych

Próbki pochodzenia biologicznego (ludzkie, odzwierzęce czy mikrobiologiczne) mają tzw. zmienność biologiczną. Odpowiednia normalizacja danych pozwala na usunięcie ze zbioru danych zmienności niebiologicznej – są to przykładowo różnice w rozcieńczeniach czy licznosciach materiału wziętego do analiz. Na usunięcie zmienności pozwala szereg normalizacji stosowanych powszechnie w badaniach metabolomicznych [61]. Popularną metodą jest normalizacja do standardu wewnętrznego, jednak często stosowana jest również normalizacja do probabilistycznego ilorazu (ang. *probabilistic quotient normalisation*, PQN), w której stosuje się medianę jako oszacowanie najbardziej prawdopodobnego ilorazu wartości z uwzględnieniem widm referencyjnych (będących najczęściej grupą kontrolną) [62].

Skalowanie danych (przeprowadzane w kolumnach macierzy, czyli sygnałach zmiennych) pozwala na zmniejszenie wpływu czynników zarówno biologicznych (np. duże różnice w stężeniach testowanych związków), jak i technicznych (do których można zaliczyć redukcję wpływu szumu w pomiarach). Wybranie odpowiedniej metody jest istotne i pozwala na uniknięcie utraty części informacji o zmienności między próbkami. W metabolomice najpopularniejszą metodą dla analiz wykorzystujących relatywne stężenia metabolitów jest tzw. skalowanie do jednostkowej wariancji (ang. *unit variance*, UV) (stosowane najczęściej dla analiz wyników uzyskanych techniką NMR), natomiast w przypadku eksperymentów opierających się o całe profile metabolomiczne jest to normalizacja *Pareto* (stosowana najczęściej dla analiz wyników uzyskanych techniką MS) [63]. Metody skalowania danych są stosowane przede wszystkim dla metod wielowymiarowych, które zostaną omówione w kolejnych podrozdziałach.

1.4.4. Identyfikacja metabolitów

Identyfikacja metabolitów jest końcowym etapem wstępnego przetwarzania danych. Każdy sygnał rezonansowy na widmie powinien zostać przypisany do konkretnego niskocząsteczkowego związku. W tym celu pomocne są powszechnie dostępne bazy danych, w których zdeponowane są informacje o przesunięciach chemicznych dla poszczególnych metabolitów. Najczęściej stosowane są HMDB (ang. *Human Metabolome Database*) [64] czy KEGG (ang. *Koyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) [34], jednak istnieją również bazy dedykowane poszczególnym mikroorganizmom (przykładem jest PAMDB (ang. *Pseudomonas aeruginosa Metabolome Database*)) [65]. Identyfikację metabolitów wspomaga również przeanalizowanie literatury przedmiotu, a w szczególnych przypadkach analiza widm 2D. Komercyjnie dostępne są programy (ChenomX, ChemonX Inc.), które wykorzystują bazy danych, pozwalają częściowo automatycznie przypisywać sygnały rezonansowe na widmach do określonych związków.

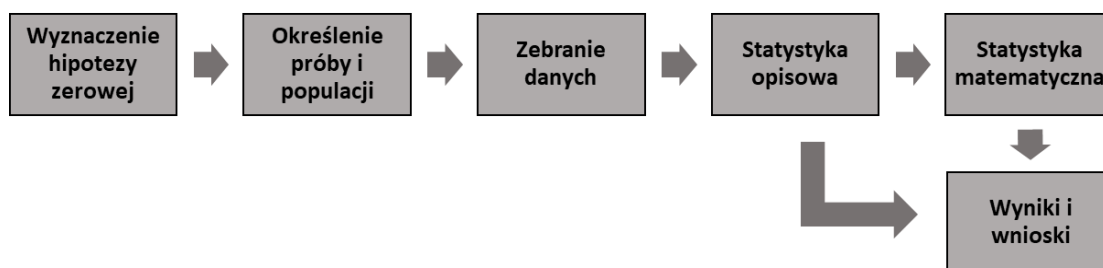
1.5. Analiza danych

Dane metabolomiczne uzyskane z widm spektroskopowych posiadają ogromną liczbę zmiennych, które mogą mieć znaczenie w różnicowaniu próbek oraz opisywaniu ich zmienności biologicznej. Fakt ten powoduje, że w celu prawidłowej analizy danych stosowane są jednowymiarowe analizy statystyczne oraz wielowymiarowe analizy chemometryczne [66].

1.5.1. Analizy statystyczne

Jednowymiarowe analizy danych są kluczowym elementem badań metabolomicznych. Celem analiz statystycznych jest dostarczenie informacji o różnicach pomiędzy testowanymi grupami. Podstawowy podział tej dziedziny to statystyka opisowa oraz statystyka matematyczna. Statystyka opisowa ułatwia interpretację danych dostarczając informacji między innymi o parametrach takich jak: średnia i mediana (tzw. miary tendencji centralnej) oraz wariancja i odchylenie standardowe (tzw. miary zmienności) [67]. Trzeba zaznaczyć, że ten rodzaj statystyki dostarcza informacji o konkretnej badanej próbce – nie umożliwia wnioskowania odnośnie całej populacji. Z tego powodu, niezbędna do opisanie zjawisk jest statystyka matematyczna (jako narzędzie wykorzystujące teorię rachunku prawdopodobieństwa pozwala analizować wyniki dla całej populacji), [68].

Schemat postępowania dla tego typu analiz danych przedstawia Rysunek 7.



Rysunek 7. Schemat postępowania dla jednowymiarowej analizy danych.

Pierwszym krokiem jest postawienie hipotezy zerowej H_0 , która będzie sprawdzana w kolejnych etapach analiz. Identyfikacja zmiennych za pomocą statystyki opisowej pozwala na testowanie postawionych wcześniej hipotez badawczych za pomocą dedykowanych testów. Najczęściej są to testy parametryczne dotyczące wartości parametrów populacji – średnia czy wariancja oraz testy nieparametryczne opisujące postać rozkładu lub losowość prób. Testy nieparametryczne stosowane są wtedy, kiedy nie ma spełnionych podstawowych założeń testów parametrycznych, a więc kiedy dane nie spełniają rozkładu normalnego, grupy nie są równie liczne lub istnieją obserwacje odstające. Wybór odpowiednich testów ma kluczowe znaczenie dla poprawności uzyskanych danych. W pierwszej kolejności sprawdza się normalność rozkładu (służą do tego np. test Shapiro-Wilka czy Lillieforsa), następnie analizuje się wariancję próbek (użytecznym narzędziem może być test Fischera lub test Levene’a). Ostatni krok to wybór testu statystycznego weryfikującego poprawność postawionej hipotezy (np. test Manna-Whitneya-Wilcoxon, test t-Studenta, test Kruskala Wallisa czy test ANOVA) [67,69]. Bardzo ważnym elementem analiz jest określenie odpowiedniego poziomu istotności uzyskanych wyników - najczęściej jest to 5%, chociaż można też spotkać analizy, gdzie poziom istotności określono na 1%, a nawet 0.1% [70].

1.5.2. Analizy chemometryczne

Analiza statystyczna pozwalająca na uzyskanie reprezentacji danych maksymalnie w trzech wymiarach, ze względu na złożoność danych uzyskiwanych w eksperymencie metabolomicznym, jest niewystarczająca do uzyskania pełnego obrazu zmian. W analizach opierających się na zidentyfikowanych sygnałach rezonansowych otrzymuje się macierz składającą się z kilkudziesięciu zmiennych. Co więcej, analizy mogą być również wykonywane na całości widma NMR - w tym przypadku, po procedurze segmentowania, otrzymuje się dane

tworzące macierz składającą się z około dziesięciu tysięcy zmiennych. Taka ilość informacji wymaga przygotowania wielowymiarowych analiz danych, które pozwalają na wyznaczenie najbardziej istotnych dla zmienności modelu parametrów [71,72].

Najbardziej podstawową techniką wykorzystywaną w analizach chemometrycznych jest analiza głównych składowych (ang. *principal component analysis*, PCA). Jest to metoda nienadzorowana, co oznacza, że do przeprowadzenia analiz nie jest konieczna znajomość przynależności obserwacji. Obliczanie modelu PCA polega na zamianie wyjściowych zmiennych nowymi, określanymi jako główne składowe, co jest możliwe dzięki skonstruowaniu nowych przestrzeni obserwacji. Obliczenie ładunków czynnikowych (które stanowią wytłumaczenie wariancji jako wartość procentowa) oraz stworzenie tzw. wykresu osypiska pozwala na określenie ilości składowych pozwalających na stworzenie modelu (najczęściej od 2 do 5). Każda kolejna składowa modeluje coraz mniejszy procent wytłumaczonej wariancji. Redukcja wielowymiarowości danych pozwala na zobrazowanie grupowania się prób i wykrycia zależności pomiędzy nimi [73,74].

Bardzo często celem wielowymiarowych analiz danych jest określenie różnic pomiędzy testowanymi grupami. W tym celu wykorzystuje się metody nadzorowane, w których konieczna jest znajomość przynależności obserwacji do danej grupy. Są to: analiza dyskryminacyjna częściowych mniejszych kwadratów (ang. *partial least squares discriminant analysis*, PLS-DA) oraz ortogonalna analiza dyskryminacyjna częściowych mniejszych kwadratów (ang. *orthogonal partial least squares discriminant analysis*, OPLS-DA). Metody nadzorowane, w zależności od liczby badanych grup, dzielą przestrzeń eksperymentalnych zmiennych na określoną liczbę. Każda obserwacja może być przydzielona tylko do jednej wyznaczonej przestrzeni. W przypadku tych modeli, wyznaczane są kowariancje pomiędzy macierzami. Model OPLS-DA różni się od PLS-DA kompleksowością, dając możliwość lepszego rozdzielenia wariancji, a co za tym idzie umożliwia skupienie się na zmienności międzygrupowej, a nie wewnątrzgrupowej [73,75].

2. Cele pracy

Celem przewodnim badań przedstawionych w niniejszej rozprawie doktorskiej było zastosowanie badań metabolomicznych do charakterystyki różnych szczepów Gram-ujemnej bakterii *Pseudomonas aeruginosa*. Poznanie nowych cech biochemicznych oraz procesów metabolicznych wyróżniających ten drobnoustrój od innych, stanowi podstawę dogłębnego zrozumienia procesów adaptacji mikroorganizmu do zmienionych warunków środowiskowych czy nabywania oporności na antybiotyki.

Cele szczegółowe pracy doktorskiej:

1. Opracowanie najbardziej efektywnej metody dezintegracji komórek bakteryjnych wykorzystywanej w analizach metabolomicznych.
2. Analiza profili związków niskocząsteczkowych różnych rodzajów bakterii (*P. aeruginosa*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *E. faecalis*, *B. cereus* oraz *C. glutamicum*).
3. Określenie różnic w metabolomie szczepów *P. aeruginosa* pochodzących ze środowiska naturalnego i izolowanych z płwociny pacjentów chorych na mukowiscydozę, pozwalające na identyfikację metabolitów szczególnie istotnych w procesie przystosowywania się drobnoustroju do zmienionych środowisk bytowania.
4. Scharakteryzowanie wewnątrz- i zewnątrzkomórkowego profilu metabolomicznego szczepów pałeczki ropy błękitnej opornych i wrażliwych na antybiotyki, wyznaczenie metabolitów mających kluczowe znaczenie dla antybiotykooporności bakterii.

3. Metodologia

3.1. Bakterie wykorzystane do eksperymentów

3.1.1. Szczepy *Pseudomonas aeruginosa*

Większość eksperymentów przeprowadzono na szczepach *Pseudomonas aeruginosa*, izolowanych od pacjentów chorych na mukowiscydozę oraz izolowanych ze środowiska naturalnego.

Poniżej przedstawiono krótką charakterystykę wspomnianych drobnoustrojów.

3.1.1.1. Szczepy izolowane od pacjentów chorych na mukowiscydozę

Szczepy *P. aeruginosa* izolowane z płuciny pacjentów chorych na mukowiscydozę były wykorzystane do eksperymentów porównujących oporność na antybiotyki oraz różnic wynikających z miejsca bytowania. Charakterystyka szczepów dostępna jest w sekcji materiałów dodatkowych pracy „*Possible metabolic switch between environmental and pathogenic Pseudomonas aeruginosa strains: ¹H NMR based metabolomics study*”. Dodatkowo w pracy „*Metabolomics comparison of drug-resistant and drug-susceptible Pseudomonas aeruginosa strains (intra- and extracellular analysis)*” w tabeli 1 można znaleźć informacje o antybiotykooporności testowanych szczepów.

3.1.1.2. Szczepy izolowane ze środowiska

Do porównania szczepów *P. aeruginosa* izolowanych z różnych źródeł, oprócz szczepów pobranych od pacjentów, wykorzystano również szczepy izolowane ze środowiska naturalnego (były to miejsca takie jak rzeka, doniczki, akwarium, powierzchnia owoców). Szczegółowe informacje o szczepach również są dostępne w sekcji materiałów dodatkowych pracy „*Possible metabolic switch between environmental and pathogenic Pseudomonas aeruginosa strains: ¹H NMR based metabolomics study*”.

Dla szczepów środowiskowych dostępne były dane o oporności na antybiotyki oraz wyniki testu API NF20, które potwierdziły rozpoznanie mikroorganizmu.

3.1.2. Pozostałe mikroorganizmy

W eksperymencie, który miał na celu porównanie efektywności metody dezintegracji na analizy metabolomiczne, wykorzystano szczepy referencyjne bakterii. Oprócz *P. aeruginosa* wykorzystano jeszcze pięć innych bakterii – zarówno Gram-dodatnich jak i Gram-ujemnych. Informacje o szczepach przedstawiono poniżej w Tabeli 2.

Tabela 2. Charakterystyka pozostałych szczepów drobnoustrojów wykorzystanych w badaniach.

L.p.	Nazwa drobnoustroju	Numer katalogowy
Bakterie Gram-ujemne		
1.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	DSMZ 1707
2.	<i>Escherichia coli</i>	ATCC 9212
3.	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC700603
Bakterie Gram-dodatnie		
4.	<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 29212
5.	<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 11778
6.	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	ATCC 13287

3.2. Hodowle bakteryjne

Wszystkie hodowle mikrobiologiczne były prowadzone w podłożu LB (ang. *lysogeny broth*) w temperaturze 37°C przy 180 obr/min (w doświadczeniu porównującym metody dezintegracji do podłoża dodano 0,5% glukozy, co umożliwiło uzyskanie OD hodowli, pozwalające na normalizację próbek). W pierwszej kolejności wykonywano posiew drobnoustroju na podłoże stałe, następnie przygotowywano hodowlę wstępną w objętości 5 ml. Hodowla właściwa zakładana była w objętości 100 ml podłoża LB. Czas hodowli był różny w zależności od przeprowadzonego doświadczenia. Dla porównań szczepów *P. aeruginosa* były to 24 h, natomiast w pracy metodologicznej hodowle drobnoustrojów prowadzono do czasu ich wejścia w fazę wzrostu logarytmicznego.

Dla części szczepów wykonano również krzywe wzrostu. W tym celu sprawdzano wartości OD poszczególnych hodowli co godzinę w osiemnastu punktach czasowych.

3.3. Metody przygotowania próbek do pomiarów (ekstrakcja)

Analiza metabolitów wewnątrzkomórkowych, oprócz doboru odpowiednich rozpuszczalników do ekstrakcji, wymaga również doboru odpowiedniej metody dezintegracji komórek bakteryjnych.

W przypadku eksperymentu porównania metabolitów *P. aeruginosa* pochodzących z różnych źródeł, przygotowano 300 mg naważki mokrej masy komórkowej, które były następnie ekstrahowane przy użyciu mieszaniny woda: metanol: chloroform (5:5:8) oraz homogenizowane przy użyciu dezintegratora tkanek (Tissue Lyser II, Qiagen).

W pozostałych dwóch eksperymentach ekstrakcję prowadzono na liofilizowanej suchej masie komórkowej (10 i 20 mg). Usunięcie wody pozwoliło na dokładne określenie biomasy i znormalizowanie danych. Jako ekstrahenta użyto mieszaniny metanol: woda (1:1), a do dezintegracji - oprócz dezintegratora tkankowego - wykorzystano również młyn piaskowy (FastPrer-24 5G Sample Preparation System, M. P. Biomedicals) oraz sonikację (Microson Ultrasonic Cell Disruptor, Mison).

Analiza zewnątrzkomórkowych metabolitów wymagała odparowania podłoża pochodowlanego, które następnie rozpuszczono w buforze PBS.

3.4. Eksperymenty NMR

Wszystkie widma magnetycznego rezonansu jądrowego, przygotowane w przeprowadzonych eksperymentach, zostały zarejestrowane przy pomocy spektrometru Bruker Avance II (Bruker, GmbH, Niemcy). Częstotliwość aparatu wynosi 600,58 MHz. Pomiary wykonano dla sekwencji pulsów *noesypr1d* oraz *cpmgpr1d* (w nomenklaturze firmy Bruker). Do analiz wykorzystano drugą z nich, ze względu na możliwość automatycznego zredukowania sygnałów rezonansowych pochodzących od makromolekuł. Szerokość widma wynosiła 20,01 ppm, a liczba punktów to 64 tysiące. Zastosowano 128 skanów z opóźnieniem relaksacji (D1) równym 3,5 s oraz czasem akwizycji 2,72 s.

W celu przygotowania widm do analizy, na każdym z widm położenie sygnału referencyjnego (TSP) przesunięto do 0,0 ppm, a następnie wykonano korekcję linii bazowej przy pomocy programu MestreNova (MestreNova v. 11.0.3).

Do identyfikacji sygnałów na widmach ^1H NMR użyto programu Chenomx NMR Analysis Software (NMR suite v. 8.5, Chenomx Inc.), który stanowi bazę danych o metabolitach

w zależności od czułości instrumentu oraz pH próbki. Każdorazowo potwierdzano również zidentyfikowany związek za pomocą powszechnie dostępnych baz danych, takich jak KEGG i PAMDB oraz sprawdzano literaturę przedmiotu.

3.4.1. Jedno – i wielowymiarowe analizy danych

Analizy jedno- i wielowymiarowe uzyskanych danych przeprowadzono dla zestawu zidentyfikowanych metabolitów. Jako względne stężenie metabolitu przyjęto sumę punktów w macierzy danych dla zakresu nienakładających się sygnałów. W pracy metodologicznej do analiz wykorzystano wartości stężeń poszczególnych metabolitów uzyskane w programie Chenomx NMR Analysis Software (NMR suite v. 8.5, Chenomx Inc.) poprzez porównanie do intensywności sygnału TSP o znanym stężeniu.

Analizę statystyczną wykonano przy użyciu programu MATLAB (MATLAB, v. R2014a, Mathworks Inc.). W celu zoptymalizowania nakładania się sygnałów na widmach zastosowano algorytmy *COW* oraz *icoshift* [59,60]. Przeprowadzono normalizację do probabilistycznego ilorazu PQN. Normalność rozkładu danych oceniono przy użyciu testu Shapiro-Wilka. Dla danych posiadających rozkład normalny wykorzystano test t-Studenta, natomiast dla danych nie spełniających normalności rozkładu wykorzystano test Manna-Whitneua-Wilcoxon. Dodatkowo w celu sprawdzenia porównań wielokrotnych, przeprowadzono procedurę Benjamini-Hochberd (ang. *false discovery rate*, FDR). Dla wszystkich analiz jednowymiarowych przyjęto poziom istotności < 0.05 .

Analizy wielowymiarowe przeprowadzono przy użyciu programu SIMCA (wersja 15.02, Sartorius Stedim Data Analytics AB). Zbiór danych do analizy stanowiła przekształcona macierz danych. Przed analizą chemometryczną wykonano skalowanie *Pareto* zbioru danych. Wykonano analizę głównych składowych PCA oraz ortogonalną analizę dyskryminacyjną częściowych mniejszych kwadratów OPLS-DA. Graficzne reprezentacje wspomnianych analiz zostały skonstruowane z różnej liczby składowych. Modele OPLS-DA poddano procedurze selekcji zmiennych z wykorzystaniem wartości VIP (ang. *variance important in projection*), a istotność została sprawdzona przy pomocy testu CV-ANOVA (przyjęto poziom istotności < 0.05).

4. Bibliografia

1. R. T. Villavicencio, The History of Blue Pus. *J. Am. Coll. Surg.* **1998**, *187*, 212–216, doi:10.1016/S1072-7515(98)00137-9.
2. J. Bennet, R. Dolin, M. Blaster, *Pseudomonas Aeruginosa and Other Pseudomonas Species. Principles and Practise of Infectious Diseases*; Elsever Saunders: Philadelphia, **2015**; s. 2518–2532.
3. H. G. Schlegel, Bakterie z Grupy *Pseudomonas* i Inne Pałeczki Gramujemne. *Mikrobiologia ogólna*; Wydawnictwo Naukowe PWN SA.: Warszawa, **2003**; s. 136–139.
4. NCBI:Txid208964.
5. P. R. Murray, K. S. Rosenthal, A. M. Pfaller, *Pseudomonas i Bakterie Podobne. Mikrobiologia*; Elsevier Urban and Partner, **2016**; s. 306–314.
6. J. Zhang, T. Zhao, R. Yang, I. Siridechakorn, S. Wang, Q. Guo, Y. Bai, H. C. Shen, X Lei, De Novo Synthesis, Structural Assignment and Biological Evaluation of Pseudopaline, a Metallophore Produced by *Pseudomonas Aeruginosa*. *Chem. Sci.* **2019**, *10*, 6635–6641, doi:10.1039/C9SC01405e.
7. P. Laborda, F. Sanz-García, S. Hernando-Amado, J.L. Martínez, *Pseudomonas Aeruginosa: An Antibiotic Resilient Pathogen with Environmental Origin. Curr. Opin. Microbiol.* **2021**, *64*, 125–132, doi:10.1016/j.mib.2021.09.010.
8. S. de Bentzmann, P. Plésiat, The *Pseudomonas Aeruginosa* Opportunistic Pathogen and Human Infections. *Environ. Microbiol.* **2011**, *13*, 1655–1665, doi:10.1111/j.1462-2920.2011.02469.x.
9. E. Faure, K. Kwong, D. Nguyen, *Pseudomonas Aeruginosa* in Chronic Lung Infections: How to Adapt Within the Host? *Front. Immunol.* **2018**, *9*, 1–10, doi:10.3389/fimmu.2018.02416.
10. P. Behzadi, Z. Baráth, M. Gajdács, It's Not Easy Being Green: A Narrative Review on the Microbiology, Virulence and Therapeutic Prospects of Multidrug-Resistant *Pseudomonas Aeruginosa*. *Antibiot.* **2021**, *10*, 42, doi:10.3390/antibiotics10010042.
11. I. Santi, P. Manfredi, E. Maffei, A. Egli, U. Jenal, U. Evolution of Antibiotic Tolerance Shapes Resistance Development in Chronic *Pseudomonas Aeruginosa* Infections. *MBio* **2021**, *12*, 1–17, doi:10.1128/mBio.03482-20-ST004.

12. M. W. Azam, A. U. Khan, Updates on the Pathogenicity Status of *Pseudomonas Aeruginosa*. *Drug Discov. Today* **2019**, *24*, 350–359, doi:10.1016/j.drudis.2018.07.003.
13. N. Spernovasilis, M. Psychogiou, G. Poulakou, Skin Manifestations of *Pseudomonas Aeruginosa* Infections. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **2021**, *34*, 72–79, doi:10.1097/qco.0000000000000717.
14. J. Chadha, K. Harjai, S. Chhibber, Revisiting the Virulence Hallmarks of *Pseudomonas Aeruginosa*: A Chronicle through the Perspective of Quorum Sensing. *Environ. Microbiol.* **2021**, doi:10.1111/1462-2920.15784.
15. M. Sultan, R. Arya, K. K. Kim, Roles of Two-Component Systems in *Pseudomonas Aeruginosa* Virulence. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 12152, doi:10.3390/ijms222212152.
16. G. Gebreyohannes, A. Nyerere, C. Bii, D. B. Sbhatu, Challenges of Intervention, Treatment, and Antibiotic Resistance of Biofilm-Forming Microorganisms. *Heliyon* **2019**, *5*, 02192, doi:10.1016/j.heliyon.2019.e02192.
17. E. Olivares, S. Badel-Berchoux, C. Provot, G. Prévost, T. Bernardi, F. Jehl, Clinical Impact of Antibiotics for the Treatment of *Pseudomonas Aeruginosa* Biofilm Infections. *Front. Microbiol.* **2020**, *10*, 2894, doi:10.3389/fmicb.2019.02894.
18. I. Jurado-Martín, M. Sainz-Mejías, S. McClean, *Pseudomonas Aeruginosa*: An Audacious Pathogen with an Adaptable Arsenal of Virulence Factors. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 3128, doi:10.3390/ijms22063128.
19. Y. Hilliam, S. Kaye, C. Winstanley, *Pseudomonas Aeruginosa* and Microbial Keratitis. *J. Med. Microbiol.* **2020**, *69*, 3–13, doi:10.1099/jmm.0.001110.
20. E. Rossi, R. La Rosa, J. A. Bartell, R. L. Marvig, J. A. J. Haagensen, L. M. Sommer, S. Molin, H. K. Johansen, *Pseudomonas Aeruginosa* Adaptation and Evolution in Patients with Cystic Fibrosis. *Nat. Rev. Microbiol.* **2020**, *19*, 331–342, doi:10.1038/s41579-020-00477-5.
21. K. Poole, *Pseudomonas Aeruginosa*: Resistance to the Max. *Front. Microbiol.* **2011**, *2*, 65, doi:10.3389/fmicb.2011.00065.
22. L. A. Meirelles, D. K. Newman, Both Toxic and Beneficial Effects of Pyocyanin Contribute to the Lifecycle of *Pseudomonas Aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* **2018**, *110*, 995–1010, doi:10.1111/mmi.14132.
23. <https://www.who.int/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>; dostęp: 23.05.2022, godz. 10:22.

24. C. J. Murray, K. Shunji Ikuta, F. Sharara, i in., Global Burden of Bacterial Antimicrobial Resistance in 2019: A Systematic Analysis. **2022**, 399. 10325. 629-655, doi:10.1016/S0140-6736(21)02724-0.
25. S. Santajit, N. Indrawattana, Mechanisms of Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. *Biomed Res. Int.* **2016**, 2016:2475067, doi:10.1155/2016/2475067.
26. L. B. Rice, Progress and Challenges in Implementing the Research on ESKAPE Pathogens. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **2010**, 31 Suppl 1, 7–10, doi:10.1086/655995.
27. P. Urbanowicz, M. Gniatkowski, „Ciężkozbrojny” *Pseudomonas Aeruginosa*: Mechanizmy Lekooporności I Ich Tło Genetyczn. *Kosm. Probl. Nauk Biol.* **2017**, 1, 11–29.
28. J. P. Horcajada, M. Montero, A. Oliver, L. Sorlí, S. Luque, S. Gómez-Zorrilla, N. Benito, S. Grau, Epidemiology and Treatment of Multidrug-Resistant and Extensively Drug-Resistant *Pseudomonas Aeruginosa* Infections. *Clin. Microbiol. Rev.* **2019**, 32(4), 00031-19, doi:10.1128/CMR.00031-19.
29. A. Zahedi-Bialvaei, M. Rahbar, R. Hamidi-Farahani, A. Asgari, A. Esmailkhani, Y. Mardani dashti, S. Soleiman-Meigooni, Expression of RND Efflux Pumps Mediated Antibiotic Resistance in *Pseudomonas Aeruginosa* Clinical Strains. *Microb. Pathog.* **2021**, 153, 104789, doi:10.1016/j.micpath.2021.104789.
30. Y. Morita, J. Tomida, Y. Kawamura, Multidrug Efflux System of *Pseudomonas Aeruginosa*. *Front. Microbiol.* **2012**, 3, 408, doi:10.3389/fmicb.2012.00408.
31. S. M. Hossein Khademi, P. Sazinas, L. Jelsbak, Within-Host Adaptation Mediated by Intergenic Evolution in *Pseudomonas Aeruginosa*. *Genome Biol. Evol.* **2019**, 11, 1385–1397, doi:10.1093/gbe/evz083.
32. C. López-Causapé, G. Cabot, E. del Barrio-Tofiño, A. Oliver, The Versatile Mutational Resistome of *Pseudomonas Aeruginosa*. *Front. Microbiol.* **2018**, 9, 685, doi:10.3389/fmicb.2018.00685/.
33. R. D. Al-Obaidi, H. O. M. A-Dhmoshi, S. Al-Khafaji, *Pseudomonas Aeruginosa* Associated Diseases: Mini Review. *J. Nat. Remedies* **2020**, 21, 972–5547, doi:10.5772/intechopen.95251.
34. M. Kanehisa, M. Furumichi, M. Tanabe, Y. Sato, Morishima, K. KEGG: New Perspectives on Genomes, Pathways, Diseases and Drugs. *Nucleic Acids Res.* **2017**, 45, 353–361, doi:10.1093/nar/gkw1092.

35. M. Vailati-Riboni, V. Palombo, J. J. Loor, What Are Omics Sciences? *Periparturient Diseases of Dairy Cows: A Systems Biology Approach*; Springer International Publishing, **2017**; s. 1–7.
36. A. L. McGuire, S. Gabriel, S. A. Tishkoff, i in., The Road Ahead in Genetics and Genomics. *Nat. Rev. Genet.* **2020**, *21*, 581–596, doi:10.1038/s41576-020-0272-6.
37. Z. C. Dong, Y. Chen, Transcriptomics: Advances and Approaches. *Sci. China Life Sci.* **2013**, *56*, 960–967, doi:10.1007/s11427-013-4557-2.
38. B. Aslam, M. Basit, M. A. Nisar, M. Khurshid, M. H. Rasool, Proteomics: Technologies and Their Applications. *J. Chromatogr. Sci.* **2017**, *55*, 182–196, doi:10.1093/chromsci/bmw167.
39. G. J. Patti, O. Yanes, G. Siuzdak, Metabolomics: The Apogee of the Omic Trilogy NIH Public Access. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2003**, *13*, 263–269, doi:10.1038/nrm3314.
40. A. K. Kosmides, K. Kamisoglu, S. E. Calvano, S. A. Corbett, Androulakis, I.P. Metabolomic Fingerprinting: Challenges and Opportunities. *Crit. Rev. Biomed. Eng.* **2013**, *41*, 205–221, doi:10.1615/critrevbiomedeng.2013007736.
41. J. K. Nicholson, J. C. Lindon, Systems Biology: Metabonomics. *Nature* **2008**, *455*, 1054–1056, doi:10.1038/4551054a.
42. J. K. Nicholson, I. D. Wilson, High Resolution Proton Magnetic Resonance Spectroscopy of Biological Fluids. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **1989**, *21*, 449–501, doi:10.1016/0079-6565(89)80008-1.
43. O. Fiehn, Metabolomics—the Link between Genotypes and Phenotypes. *Plant Mol. Biol.* **2002**, *48*, 155–171, doi:10.1023/A:1013713905833.
44. K. A. Mielko, P. Młynarz, Biotypowanie Mikroorganizmów Za Pomocą Spektrometrii Mas Orz Spektroskopii NMR. *Wiadomości Chem.* **2020**, *74*, 1–2.
45. M. L. Reaves, J. D. Rabinowitz, Metabolomics in Systems Microbiology. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2011**, *22*, 17–25, doi:10.1016/j.copbio.2010.10.001.
46. H. D. Patel, M. H. Johnson, P. M. Pierorazio, S. M. Sozio, R. Sharma, E. Iyoha, E. B. Bass, M. E. Allaf, Diagnostic accuracy and risks of biopsy in the diagnosis of a renal mass suspicious for localized renal cell carcinoma: Systematic review of the literature. *J. Urol.* **2016**, *195*, 1340–1347, doi:10.1016/j.juro.2015.11.029.

47. T. R. Sandrin, J. E. Goldstein, S. Schumaker, MALDI TOF MS profiling of bacteria at the strain level: A review. *Mass Spectrom. Rev.* **2013**, 32, 188–217, doi:10.1002/mas.21359.
48. K. Mohd Kamal, M. H. Mahamad Maifiah, N. Abdul Rahim, Y.Z.H.-Y. Hashim, M. S. Abdullah Sani, K. A. Azizan, Bacterial Metabolomics: Sample Preparation Methods. *Biochem. Res. Int.* **2022**, 2022, 1–14, doi:10.1155/2022/9186536.
49. J. Tang, *Microbial Metabolomics*; **2011**, 12(6), 391-403, doi:10.2174/138920211797248619.
50. K. A. Mielko, S. J. Jabłoński, J. Milczewska, D. Sands, M. Łukaszewicz, P. Młynarz, Metabolomic studies of *Pseudomonas aeruginosa*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2019**, 35, doi:10.1007/s11274-019-2739-1.
51. E. M. Purcell, H. C. Torrey, Resonance Absorption by Nuclear Magnetic Moments in a Solid. *Phys. Rev* **1946**, 69, doi:10.1103/physrev.69.37.
52. F. Bloch, Nuclear induction. *Phys. Rev.* **1946**, 70, 460–474, doi:10.1103/PhysRev.70.460.
53. J. J. Pekar, A brief introduction to functional MRI; history and today's developments. *IEEE Eng. Med. Biol. Mag.* **2006**, 24–26, doi:10.1109/memb.2006.1607665.
54. D. Marion, An introduction to biological NMR spectroscopy. *Mol. Cell. Proteomics* **2013**, 12, 3006–3025, doi:10.1074/mcp.O113.030239.
55. G. A. Nagana Gowda, D. Raftery, Recent advances in NMR-based metabolomics. *Anal. Chem.* **2017**, 89, 490–510, doi:10.1021/acs.analchem.6b04420.
56. R. R. Ernst, Nuclear magnetic resonance Fourier transform spectroscopy. *Biosci. Rep.* **1992**, 12, 143–187, doi: 10.1002/anie.199208053
57. J. H. F. Bothwell, J. L. Griffin, An introduction to biological nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Biol. Rev.* **2011**, 86, 493–510, doi:10.1111/J.1469-185x.2010.00157.x.
58. T. N. Vu, K. Laukens, Getting Your Peaks in Line: A Review of Alignment Methods for NMR Spectral Data. *Metabolites* **2013**, 3, 259, doi:10.3390/metabo3020259.
59. G. Tomasi, F. van den Berg, C. Andersson, Correlation optimized warping and dynamic time warping as preprocessing methods for chromatographic data. *J. Chemom.* **2004**, 18, 231–241, doi:10.1002/cem.859.

60. F. Savorani, G. Tomasi, S. B. Engelsen, icoshift: A versatile tool for the rapid alignment of 1D NMR spectra. *J. Magn. Reson.* **2010**, *202*, 190–202, doi:10.1016/j.jmr.2009.11.012.
61. H. U. Zacharias, M. Altenbuchinger, W. Gronwald, Statistical Analysis of NMR Metabolic Fingerprints: Established Methods and Recent Advances. *Metab.* **2018**, *8*, 47, doi:10.3390/metabo8030047.
62. F. Dieterle, A. Ross, G. Schlotterbeck, H. Senn, Probabilistic quotient normalization as robust method to account for dilution of complex biological mixtures. Application in 1H NMR metabonomics. *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 4281–4290, doi:10.1021/ac051632c.
63. R. A. van den Berg, H. C. J. Hoefsloot, J. A. Westerhuis, A. K. Smilde, M. J. van der Werf, Centering, scaling, and transformations: Improving the biological information content of metabolomics data. *BMC Genomics* **2006**, *7*, doi:10.1186/1471-2164-7-142.
64. D. S. Wishart, Y. D. Feunang, A. Marcu, i in., HMDB 4.0: the human metabolome database for 2018. *Nucleic Acids Res.* **2018**, *46*, 608–617, doi:10.1093/nar/gkx1089.
65. W. Huang, L. K. Brewer, J. W. Jones, A. T. Nguyen, A. Marcu, D. S. Wishart, A. G. Oglesby-Sherrouse, M. A. Kane, A. Wilks, PAMDB: A comprehensive *Pseudomonas aeruginosa* metabolome database. *Nucleic Acids Res.* **2018**, *46*, 575–580, doi:10.1093/nar/gkx1061.
66. S. Ren, A. A. Hinzman, E. L. Kang, R. D. Szczesniak, L. J. Lu, Computational and statistical analysis of metabolomics data. *Metabolomics* **2015**, *11*, 1492–1513, doi:10.1007/s11306-015-0823-6.
67. J. In, S. Lee, Statistical data presentation. *Korean J. Anesthesiol.* **2017**, *70*, 267, doi:10.4097/kjae.2017.70.3.267.
68. J. Koronacki, J. Mielniczuk, *Statystyka dla studentów kierunków technicznych i przyrodniczych*; Wydawnictwa Naukowo-Techniczne: Warszawa, **2009**.
69. M. Marusteri, V. Bacarea, Comparing groups for statistical differences: How to choose the right statistical test? *Biochem. Medica* **2010**, *20*, 15–32, doi:10.11613/bm.2010.004.
70. A. Stanisiz, *Przystępny kurs statystyki z zastosowaniem STATISTICA PL na przykładach z medycyny. Tom 1. Statystyki podstawowe*; StatSoft Polska: Kraków, **2006**.
71. E. C. Considine, R. M. Salek, A Tool to Encourage Minimum Reporting Guideline Uptake for Data Analysis in Metabolomics. *Metab.* **2019**, *9*, 43, doi:10.3390/metabo9030043.

72. A. Ji-Ye, H. He, R. Sun, Bin Multivariate statistical analysis for metabolomic data: The key points in principal component analysis. *Yaoxue Xuebao* **2018**, *53*, 929–937, doi:10.16438/j.0513-4870.2017-1288.
73. M. Daszykowski, B. Walczak, D. L. Massart, Projection methods in chemistry. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **2003**, *65*, 97–112, doi:10.1016/S0169-7439(02)00107-7.
74. J. Ren, A. Zhang, L. Kong, X. Wang, Multivariate Data Analysis Approach for Mass Spectrometry-Based Metabolomics. *Mass Spectrom. Metabolomics Clin. Herb. Med.* **2021**, 45–66, doi:10.1002/9783527835751.ch4.
75. T. K. Mal, Y. Tian, A. D. Patterson, Sample Preparation and Data Analysis for NMR-Based Metabolomics. *Methods Mol. Biol.* **2021**, *2194*, 301–313, doi:10.1007/978-1-0716-0849-4_16.

5. Przedstawienie publikacji będących wynikiem pracy doktorskiej

5.1. Oświadczenie współautora, kandydata do stopnia doktora o wkładzie merytorycznym w przedstawionych publikacjach

Karolina Anna Mielko

karolina.mielko@pwr.edu.pl

Zakład Biochemii, Biologii Molekularnej i Biotechnologii
Wydział Chemiczny
Politechnika Wrocławska

RADA DYSCYPLINY NAUKOWEJ

nauki chemiczne

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA , KANDYDATA DO STOPNIA DOKTORA

Oświadczam, że w publikacji:

- 1) *Metabolomic studies of Pseudomonas aeruginosa*, **K. A. Mielko**, S. J. Jabłoński, J. Milczewska, D. Sands, M. Łukaszewicz, P. Młynarz, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2019, 35(11):178, doi: 10.1007/s11274-019-2739-1
(IF₂₀₁₉ = 2.477, 70 pkt MNiSW₂₀₁₉₋₂₀₂₁)

mój udział polegał na:

- zgromadzeniu i przeanalizowaniu literatury naukowej niezbędnej do stworzenia pracy oraz przygotowaniu pierwotnej wersji manuskryptu,
- utworzeniu rysunków oraz tabeli zawartych w artykule;

- 2) *Comparison of bacteria disintegration methods and their influence on data analysis in metabolomics*, **K. A. Mielko**, S. Jabłoński, M. Łukaszewicz, P. Młynarz, *Scientific Reports*, 2021, 11:20859, doi: 10.1038/s41598-021-99873-x
(IF₂₀₂₀ = 4.380, 140 pkt MNiSW₂₀₁₉₋₂₀₂₁)

mój udział polegał na:

- przeanalizowaniu dostępnej literatury naukowej pozwalającej na zaplanowanie eksperymentu,
- przygotowaniu krzywych wzrostu mikroorganizmów i hodowli mikrobiologicznych,
- zebraniu i przygotowaniu materiału do pomiarów ¹H NMR,
- wykonaniu pomiarów ¹H NMR,
- przeprowadzeniu analiz statystycznych dla porównań dwóch grup,
- przeprowadzeniu analiz chemometrycznych uzyskanych danych,
- utworzeniu rysunków nr 1, 2, 4, 5 oraz tabeli nr 1,
- przygotowaniu przeglądu literaturowego niezbędnego do napisania wstępu oraz dyskusji,
- przygotowaniu pierwotnej wersji manuskryptu;

- 3) *Possible metabolic switch between environmental and pathogenic Pseudomonas aeruginosa strains: ¹H NMR based metabolomics study*, **K. A. Mielko**, S. Jabłoński, W. Wojtowicz, J. Milczewska, D. Sands, M. Łukaszewicz, P. Młynarz, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2020, 188 (113369), doi: 10.1016/j.jpba.2020.113369 (IF₂₀₂₀ = 3.935, 100 pkt MNiSW₂₀₁₉₋₂₀₂₁)

mój udział polegał na:

- współudziale w zaplanowaniu eksperymentu,
- przygotowaniu hodowli mikrobiologicznych,
- zebraniu materiału i wykonaniu ekstrakcji,
- przeprowadzeniu pomiarów ¹H NMR,
- wykonaniu analiz statystycznych i chemometrycznych uzyskanych danych,
- utworzeniu rysunków oraz tabel zawartych w artykule,
- analizie literatury niezbędnej do napisania wstępu oraz dyskusji,
- przygotowaniu pierwotnej wersji manuskryptu;

- 4) *Metabolomics comparison of drug-resistant and drug-susceptible Pseudomonas aeruginosa strains (intra- and extracellular analysis)*, **K. A. Mielko**, S. Jabłoński, Ł. Pruss, J. Milczewska, D. Sands, M. Łukaszewicz, P. Młynarz, *International Journal of Molecular Science*, 2021, 22(19):10820, doi: 10.3390/ijms221910820 (IF₂₀₂₀ = 5.924, 140 pkt MNiSW₂₀₁₉₋₂₀₂₁)

mój udział polegał na:

- współudziale w zaplanowaniu eksperymentu,
- przeprowadzeniu hodowli mikrobiologicznych,
- zebraniu i przygotowaniu materiału do pomiarów ¹H NMR,
- wykonaniu pomiarów ¹H NMR,
- przeprowadzeniu analiz statystycznych i chemometrycznych uzyskanych danych,
- utworzeniu rysunków oraz tabel zawartych w artykule,
- przygotowaniu przeglądu literaturowego niezbędnego do napisania wstępu oraz dyskusji,
- przygotowanie pierwotnej wersji manuskryptu.

Mielko K. A. 01.06.2022

(miejsowość, data)

Karolina Mielko

(podpis współautora)

5.2. Metabolomic studies of *Pseudomonas aeruginosa*

5.2.1. Skrótowe omówienie publikacji

„*Metabolomics studies of Pseudomonas aeruginosa*” jest pracą przeglądową. W artykule przedstawiono aktualną wiedzę na temat badań metabolomicznych dotyczących szczepów bakterii *Pseudomonas aeruginosa*.

W pierwszej części pracy scharakteryzowano mikroorganizm będący przedmiotem badań oraz powody, dla których celowe jest przeprowadzanie eksperymentów na omawianym poziomie molekularnym, a także przedstawiono dostępne bazy danych, w których opisana jest pałeczka ropy błękitnej. W kolejnym rozdziale – „*A closer look at an experiment in metabolomics*” - opisano podstawowe pojęcia związane z metabolomiką oraz zasady przeprowadzania eksperymentów metabolomicznych (przygotowanie próbek, ekstrakcje, używane metody pomiarów, obróbka i analiza uzyskanych danych), ze szczególnym uwzględnieniem analiz drobnoustrojów. Kolejne rozdziały poświęcone są szczegółowej charakterystyce możliwości, które stwarzają badania metabolomiczne w kontekście badań na mikroorganizmami. Fragment pracy zatytułowany „*Bacterial strain identification and differentiation*” opisuje możliwość szybkiej identyfikacji i rozróżniania drobnoustrojów na podstawie ich profilu metabolomicznego, przy użyciu technik analitycznych takich jak NMR i GC-MS. W kolejnej części – „*Identification of metabolic pattern determined by genome structure*” – przedstawiono eksperymenty wykorzystujące wymienione wcześniej techniki analityczne do identyfikacji specyficznych ścieżek metabolicznych wynikających ze zmienionej struktury genomu. Fragment ten przedstawia możliwości badań metabolomicznych, które mogą stanowić uzupełnienie innych nauk omicznych i umożliwiają określanie zmian niskocząsteczkowych związków w odpowiedzi na czynniki zewnętrzne (m. in. zmiana warunków wzrostu, związki chemiczne, obecność innych mikroorganizmów). Charakterystyka zmian profilu metabolitów w odpowiedzi na czynniki zewnętrzne została przedstawiona w rozdziale „*Identification of metabolic changes in response to external factors*”. Narzędzia metabolomiczne umożliwiają również poszukiwanie nowych niskocząsteczkowych związków chemicznych charakteryzujących drobnoustroje. W części „*Identification of new metabolites*” przedstawiono możliwość identyfikacji nowych lipopeptydów w ekstraktach pochodzących od *P. aeruginosa*.

Praca przeglądowa przedstawia pałeczkę ropy błękitnej jako mikroorganizm łatwo adaptujący się do nowych środowisk, a co za tym idzie, podatny na zmiany zewnętrzne. Metabolomika jest nauką, za pomocą której analizowane są zmiany zachodzące w komórce

w bardzo krótkim czasie - z tego względu stanowi doskonałe narzędzie do monitorowania procesów zachodzących w komórce jako odpowiedzi na czynniki zewnętrzne.

W omówionym artykule przedstawiono możliwości aplikacyjne metabolomiki, jednakże zwrócono również uwagę na konieczność stworzenia bardziej szczegółowych i obszernych baz danych zawierających informacje o metabolitach zidentyfikowanych różnymi metodami analitycznymi. Rozwój technik analitycznych takich jak NMR i MS w kontekście mikrobiologii pozwala na coraz dokładniejsze poznanie szlaków biochemicznych i rozróżnianie wielu różnych drobnoustrojów, w tym oczywiście również *P. aeruginosa*.

5.2.2. Publikacja



Metabolomic studies of *Pseudomonas aeruginosa*

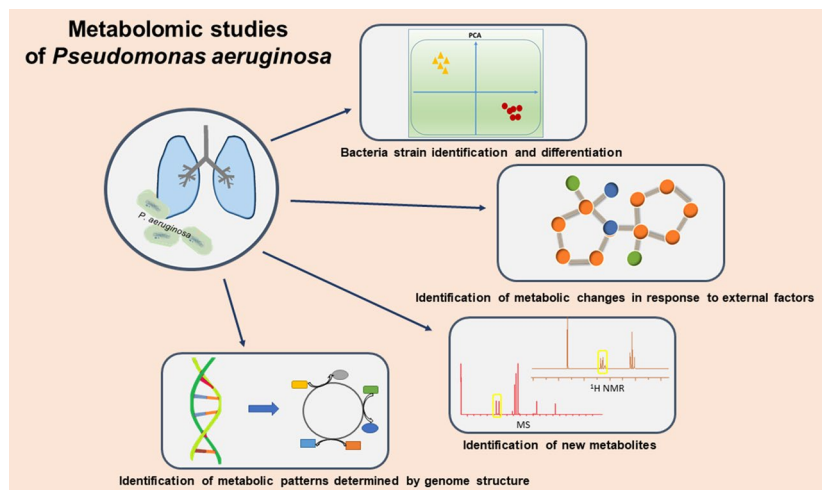
Karolina Anna Mielko¹ · Sławomir Jan Jabłoński² · Justyna Milczewska³ · Dorota Sands³ · Marcin Łukaszewicz² · Piotr Młynarz¹

Received: 18 June 2019 / Accepted: 14 September 2019 / Published online: 7 November 2019
© The Author(s) 2019

Abstract

Pseudomonas aeruginosa is a common, Gram-negative environmental organism. It can be a significant pathogenic factor of severe infections in humans, especially in cystic fibrosis patients. Due to its natural resistance to antibiotics and the ability to form biofilms, infection with this pathogen can cause severe therapeutic problems. In recent years, metabolomic studies of *P. aeruginosa* have been performed. Therefore, in this review, we discussed recent achievements in the use of metabolomics methods in bacterial identification, differentiation, the interconnection between genome and metabolome, the influence of external factors on the bacterial metabolome and identification of new metabolites produced by *P. aeruginosa*. All of these studies may provide valuable information about metabolic pathways leading to an understanding of the adaptations of bacterial strains to a host environment, which can lead to new drug development and/or elaboration of new treatment and diagnostics strategies for *Pseudomonas*.

Graphic abstract



Keywords Metabolomics · Metabolomic experiment · Cystic fibrosis · *Pseudomonas aeruginosa* · Strain identification

✉ Piotr Młynarz
piotr.mlynarz@pwr.edu.pl

¹ Bioorganic Chemistry Group, Faculty of Chemistry, Wrocław University of Science and Technology, Norwida 4/6, 50-373 Wrocław, Poland

² Biotransformation Department, University of Wrocław, Plac Uniwersytecki 1, 50-137 Wrocław, Poland

³ Mother and Child Institute, Kasprzaka 17a, 01-211 Warszawa, Poland

Introduction

Pseudomonas aeruginosa is a common, Gram negative environmental organism. It is often isolated from plants, fruits, soil, and water environments, such as rivers, lakes, and swimming pools. In particular circumstances, *P. aeruginosa* may be a significant pathogenic factor of severe

and often opportunistic infections in humans. It typically infects airways and urinary tracts, causes blood infections, and is the most common cause of burn injury infections, hot-tub dermatitis, and outer ear infections (known as swimmer's ear). *P. aeruginosa* is the most frequent colonizer of medical devices (catheters, nebulizers, humidifiers) and is one of the pathogens that cause nosocomial infections, such as ventilator-associated pneumonia, meningococcal meningitis, and sepsis (Bassetti et al. 2018). Treatment of *P. aeruginosa* infections can be difficult due to its natural and acquired resistance to antibiotics (Breidenstein et al. 2011).

Pseudomonas aeruginosa is one of the most common organisms isolated from the respiratory tract of cystic fibrosis patients (Bendiak and Ratjen 2009). The occurrence of the infection increases with age and can reach 80% in adults (Behrends et al. 2013). Several studies have shown that this infection leads to higher rates of pulmonary exacerbation and hospitalization in addition to more rapid disease progression, which leads to irreversible and destructive changes in the respiratory system and as a consequence, to chronic respiratory failure. It is also associated with more frequent cystic fibrosis complications, such as malnutrition or diabetes (Emerson et al. 2002; Kosorok et al. 2003; Nixon et al. 2001).

A characteristic feature of the genus *Pseudomonas* is biofilm formation and fluorescent dyes and siderophore production (Leon 1979; Peix et al. 2018; Winstanley et al. 2016). Moreover, microorganisms belonging to this genus show a high capability of utilizing different substrates and a high tendency toward antibiotic resistance. *P. aeruginosa* shows significant adaptation capabilities, as in the case of the development of chronic infections in patients with cystic fibrosis (CF). At this stage, the pathogen is practically impossible to eradicate.

Research on the system biology of *P. aeruginosa* has been carried out for a long time at different levels of molecular organization (genome, transcriptome, and proteome), resulting in detailed information about the genomic structure. The size of the *P. aeruginosa* genome is around 6.5 Mbp. However, the size range for different strains is between 5.2 and 7 Mbp (Schmidt et al. 1996). There are 5021 genes with more than 70% sequence identity between different *P. aeruginosa* strains, and among them, around 4500 genes with > 98% identity. It is suggested that about 4000 genes are common to the majority of the *P. aeruginosa* strains (they are so-called 'core genome') (Parkins et al. 2018). The core genome is accompanied by genes that are present in a smaller number of strains. It is estimated that the complete set of genes found in different *P. aeruginosa* strains include between 10,000 and 40,000 genes. The arrangement of the genome may differ between

strains; therefore, the identification of regions suitable for gene markers is difficult.

Information about *P. aeruginosa* gene and protein data is available from several databases: (1) the *Pseudomonas* Genome Database, which now has more than 200 complete *Pseudomonas* genomes (Winsor et al. 2016); (2) PseudoCyc with 121 pathways and over 800 enzymatic reactions (Romero and Karp 2003); and (3) the SYSTOMONAS database for the analysis of *Pseudomonas* systems biology (Choi et al. 2007). The information is also available in commonly used databases, such as KEGG (Kanehisa et al. 2017), PubChem (Kim et al. 2016), and HMDB (Wishart et al. 2013).

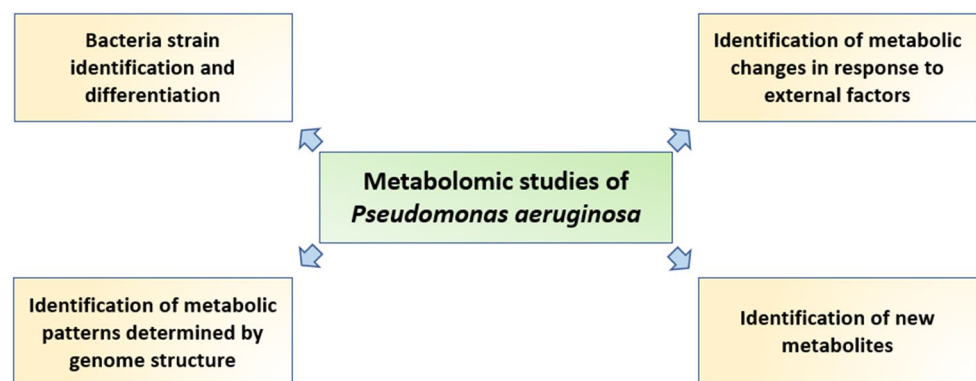
In recent years, metabolomic studies of *P. aeruginosa* have also been performed. The metabolome is the set of all relatively small compounds present in the cell and released to the environment. These low molecular weight compounds (<1500 Da) play different roles as substrates, intermediates, and products of metabolism (Fiehn 2002; Pearson 2007). The information about the presence and concentration of metabolites reflects the activity of metabolic pathways in the cell. Metabolomic studies usually rely on two analytical laboratory techniques for metabolite identification and quantification: (1) mass spectroscopy coupled with chromatography (C/MS) or (2) nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy.

Metabolomic studies may help solve the scientific problems unsolved by using other approaches used in system biology, such as identification of new metabolic pathways (Patti et al. 2012). These studies can provide us with data regarding virulence factors and adaptation features of a given strain to the host environment, and thereby provide a useful prognostic tool in *P. aeruginosa* infections. Due to rapid culture-independent tests, diagnosis of urgent cases and also their targeted treatment can occur quickly. These types of studies may also be used in the development of new strategies regarding the prevention and treatment of infections caused by microorganisms (Xu et al. 2014).

In this article, we present a summary of the recent achievements in the field of *P. aeruginosa* metabolomics. Metabolomic studies about *P. aeruginosa* strains comparison are shown in Table 1. Studies about interactions between two species of bacteria, such as quorum sensing and co-cultures, were also conducted. The individual metabolic profile of a strain depends on internal and external factors (such as genome structure and substrate availability, respectively) (Fig. 1).

Table 1 Metabolomic studies comparing *Pseudomonas aeruginosa* strains

Origin of samples	Amount of samples	Type of metabolites	Measurement method	Statistic methods	Metabolites (in total)	Author, year
CF patients	179	Extracellular	¹ H NMR	Linear modelling, 'sunburst' plots	29	Behrends et al. (2013)
Reference strain PAO1 and CF isolate TBCF10839	2	Intra- and extracellular	GC-MS	PCA	243	Frimmersdorf et al. (2010)
CF patients	49	Extracellular	¹ H NMR	PCA, PLS, OPLS-DA	85	Kozłowska et al. (2013)
CF patient (different breeding)	1	Living cells	¹ H HRMAS NMR	Student's t-test	24	Righi et al. (2018)
CF patients	3	Intra- and extracellular	LC-MS	PCA	221	Robroeks et al. (2010)
Clinical isolates: TBCF10839 and TBCF121838	2	Intracellular	GC-MS	Retention indices (RI)	80	Klockgether et al. (2013)
Reference strain PAO1 (different breeding)	21	Intra- and extracellular	¹ H NMR, ¹ H HRMAS NMR	PCA	–	Gjersing et al. (2007)

Fig. 1 Metabolomic studies of *Pseudomonas aeruginosa*

A closer look at an experiment in metabolomics

Experimental design, including metabolomic analytical parts, may differ depending on the available materials, resources, and scientific questions to be answered. The identification of metabolomic changes resulting from different factors requires a distinct experimental approach. Nevertheless, the general experimental pattern is the same.

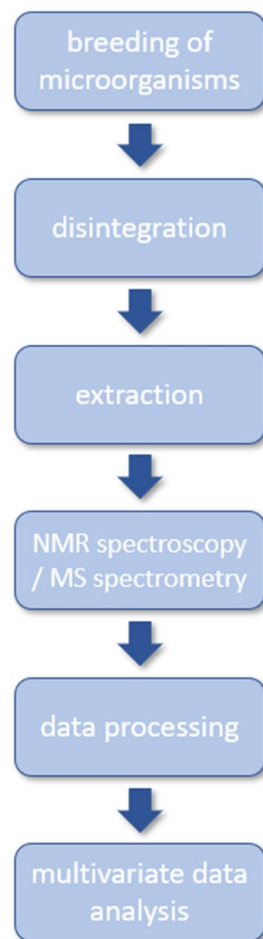
In metabolomics, as in many experiments, there are usually at least two sets of samples that are compared with one of them being the control (or reference) group. In general, metabolomic analyses cover two approaches to analyzing metabolites: (1) fingerprinting and (2) footprinting. The first contains the whole set of intracellular compounds, and the second tracks nutrient uptake and metabolite secretion (Behrends et al. 2014).

The typical workflow in microbiological metabolomic studies includes a few steps (Fig. 2).

Usually, in the first step, microorganisms are cultured *in vitro*. Appropriate disintegration (if intracellular metabolites studies are conducted) and an extraction method are then used. Metabolites from a chosen group (for instance, water-soluble) are isolated and concentrated. There are many possible approaches for metabolite sample preparation. This part of the process should be studied and depends on the purpose of the research.

In the next stage, metabolites are detected via analytical chemistry techniques. In the case of MS method, metabolites that are first separated by liquid or gas chromatography, then ionised, and detected by mass spectrometry instruments. This technique yields information about the mass to charge ratio of the analysed compounds, which could be detected by the most advanced instruments at very low femtomole to attomole detection limits. This information may be used for the identification of thousands of compounds in the sample

Fig. 2 Diagram of metabolomic experiment



or used as the characteristic metabolite pattern “fingerprint,” in an untargeted approach to the studied specimen. NMR spectroscopy due to application of a magnetic field allows assignment of the chemical shifts of ^1H and ^{13}C nuclei in organic compounds. This method enables identification and quantification of metabolites but at a much higher concentration than MS, which is at the mM level and strongly depends on the duration of the experiment. The second limitation is the number of compounds that can be identified, which are in the range of several dozen. However, the NMR method ensures reliable compound identification via a combination of one- and two-dimensional (1D and 2D, respectively) spectra measurements. A more detailed description of this technique may be found in the review article by Dona et al. (2016) or in dedicated handbooks. Both of these methods are complementary and mostly used in metabolomic studies.

To extract the information about metabolite type and concentration, the raw data must be further processed. The metabolic profile (list of detected metabolites with corresponding concentrations) of a single sample is still a large set of data; therefore, a comparison of samples and graphical representation of results is not easy using the conventional approach. Different statistical and chemometric methods

are used to find differences and prepare data visualization. The most commonly used method in multivariate data analysis is the principal component analysis (PCA). This method is used as a starting point for further analysis. PCA is an unsupervised method, which means that the samples are underlying without any additional input data. It allows for the determination of variability and identification of outliers during all of the attempts. Additionally, it enables to determine the relationship between groups to find differentiating metabolites. PCA may be used on a raw figure without any initial metabolite identification and quantification (Gjersing et al. 2007).

The partial and orthogonal partial least squares methods (PLS and OPLS, respectively) are used to develop models, predict differences, and search for significant markers. Both of these methods are supervised methods, in which individual observations are assigned based on a specific parameter (such as membership in a given group). A more detailed description of multivariate data analysis in metabolomics can be found in an article by Worley and Powers (2013).

Information concerning a metabolome may also be stored in a database. A database dedicated to the *P. aeruginosa* metabolome was created by Huang et al. (2018). The *P. aeruginosa* metabolome database (PAMDB) provides information about > 4370 metabolites and their chemical and biological functions, more than 1250 proteins including enzymes, and almost 1000 associated pathways. Furthermore, for some compounds, NMR and MS spectra are available. The database was created based on information available in other databases and in the literature (Huang et al. 2018).

Bacterial strain identification and differentiation

One way to conduct metabolomic experiments with microorganisms is to compare strains originating from different sources. Most studies describing strain identification use pure strains cultivated in vitro; however, a collection of a large set of metabolomic profiles is the first step in the development of methods enabling identification of strains without the need for bacteria isolation and cultivation. Such an approach would be a useful diagnostic tool because it would reduce the time between material collection and result delivery. For instance, preliminary research has proven that the analysis of volatile organic compounds (VOC) in a person’s breath might be useful for identification of respiratory tract bacterial infections; however, determination of the pathogenic strain responsible for the infection is still not possible (Maniscalco et al. 2019; Montuschi et al. 2012; Robroeks et al. 2010).

Bacterial strain identification based on the profile of volatile metabolites would be very useful in lung infection diagnoses. Nizio et al. conducted VOC profiling using gas chromatography/gas chromatography-time-of-flight mass spectroscopy (GC/GC-TOFMS) to differentiate bacteria associated with lung infections (*P. aeruginosa*, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Burkholderia cenocepacia*, *Stenotrophomonas maltophilia*, and *S. milleri*). Samples were analyzed in two periods: (1) short-term (between 2 and 5 days) and (2) long-term (between 48 and 50 days). Moreover, bacteria were cultured in two different growth phase conditions (stationary and logarithmic). The multivariate analysis showed that the VOC profile was sufficient for differentiation of bacteria species. However, the profiles were affected by sample storage conditions and bacterial growth phase (Nizio et al. 2016).

A similar approach for bacterial species identification was taken by Lawal et al. (2017). They investigated VOC profiles for the following bacterial species: (1) *Escherichia coli*; (2) *Klebsiella pneumoniae*; (3) *P. aeruginosa*; and (4) *Staphylococcus aureus*. These bacteria are often the cause of lung infections. To better simulate conditions in the respiratory tract, bacteria were also cultured in an artificial sputum medium. Comparison of VOC profiles was sufficient for species identification; however, profiles were considerably altered by the cultivation medium type (Lawal et al. 2017).

Moreover, in another article, Lawal et al. showed that the presence of the additional pathogen in the environment also changed the observed VOC profiles. The GC/MS method was used to identify and compare metabolites in mono and co-cultures of *P. aeruginosa* ATCC 10,145 and *Enterobacter cloacae* DSM 30,054. Among 60 VOCs identified, 24 had significantly increased and 13 decreased. Among these, under axenic cultures, bacteria-specific VOCs metabolites were identified as 2-methyl-1-propanol, 2-phenylethanol, and 3-methyl-1-butanol for *E. cloacae* while methyl 2-ethylhexanoate was characteristic for *P. aeruginosa*. However, in co-cultures, 2-methylbutyl acetate and methyl 2-methylbutyrate were found, both of which exhibited antimicrobial activity (Bail et al. 2009). In the PCA score plot, three nonoverlapping groups were observed: (1) *P. aeruginosa*; (2) *E. cloacae*; and (3) co-culture (Lawal et al. 2018).

A similar experiment conducted by Neerincx et al. also used two strains of bacteria (and co-culture): (1) *P. aeruginosa* strain ATCC 27,853 and (2) *Aspergillus fumigatus* strain AZN 8196 to compare VOCs in samples using the GC/MS method. They identified and examined 104 compounds. The PLS score plot was constructed for three-time points (16, 24, and 48 h). The analysis allowed identification of the combinations of VOCs associated with each group (*P. aeruginosa*, *A. fumigatus*, and co-culture). For each time point, specific VOC biomarker combinations were found,

and individual VOCs, which were present at all-time points (for example, 8-nonen-2-one in *A. fumigatus* and 2-nonanone in co-culture), were also assigned. What is more, the location of the groups on the PLS score plot changed over time; after 48 h, the metabolic profile of the co-cultures shifted towards *P. aeruginosa* (Neerincx et al. 2016). These results imply that the use of VOC profiling as a diagnostic tool may require a cultivation model that more accurately reproduces the conditions in the respiratory tract.

Palama et al. compared the bacteria responsible for urinary tract infections using the footprint approach. Using NMR, they measured the extracellular metabolites of 48 strains belonging to six species (*E. coli*, *P. aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Enterococcus faecalis*, *S. aureus*, and *S. saprophyticus*). Analysis of samples collected at different growth stages identified 43 metabolites. Unsupervised multivariate data analysis showed significant discrimination between the studied samples. Furthermore, the PCA score plot showed non-overlapping groups, which originated from different microorganisms. This experiment demonstrated that metabolic profiling could be a rapid method for identifying bacterial species (Palama et al. 2016).

Kozłowska et al. recovered 15 *P. aeruginosa* isolates from sputum samples and described several culture properties, such as mucoid, pigmentation, diversity, culture pH, and others. These properties were compared with information about the subjects (age, sex, body mass index [BMI], diabetes). Analysis of the media using ¹H NMR was performed. Statistical methods (PCA and OPLS-DA) were used to identify groups of isolates. The score plot showed four different clusters of various strains of *P. aeruginosa*. Additionally, each cluster was related to the pH of culture. Furthermore, the analysis of variance (ANOVA) test was used to find the relationship between PCA and clinical data. These experiments suggest that *P. aeruginosa* isolates have a range of growth strategies. Moreover, cluster membership was correlated with predicting patient lung function. Thus, NMR-based metabolomic profiling may be used as a prognostic tool in the diagnostics of *P. aeruginosa* infections (Kozłowska et al. 2013).

Identification of metabolic patterns determined by genome structure

Adaptation of bacteria metabolism is crucial for microorganism survivability in different environments. In particular, pathogens change their metabolism to use available resources in a host organism in the most efficient way and to evade the host immune system (Behrends et al. 2013). Identification of critical metabolic pathways necessary for pathogen survival may open new possibilities in therapy development. It may lead to a breakthrough in the treatment

of chronic infections, such as those observed in the case of cystic fibrosis patients.

Metabolic adaptation in the case of long-term infection is considered to be mainly the result of genomic changes. The comparison of closely related strains isolated from patients at different stages of infection development seems to be the best experimental approach for investigating these kinds of metabolomic alterations. Behrends et al. investigated the adaptation of *P. aeruginosa* strains to lung infections among CF patients. Exometabolomic, morphology, growth rate, and clinical data for 179 clinical isolates were analyzed. The isolates were recovered from 18 individual CF patients for 20 years. Metabolic experiments relied on NMR spectroscopy and allowed 29 metabolites to be identified. Despite the limited set of analyzed metabolites, significant changes in metabolic pathways could be identified. Strains isolated from patients suffering from long-term infection showed an improvement in amino acid uptake with a high biosynthetic cost. NMR was used to conduct exo-metabolomic analyses. This method provides a non-targeted and universal profile of all small-molecule metabolites present in cells. In total, 29 metabolites were identified, but not all of these were seen in all the samples. Nine metabolites have an association with length of infection, but most of the metabolites had no change. The exceptions were acetate, valine, serine, lysine, phenylalanine, tryptophan, trehalose, and tyrosine. Linear modelling for each metabolite against the variable 'patient' and 'length of infection' was used, and 'sunburst' plots for visual examination of the data were applied. This method allowed the comparison of the differences between patients and changes during infection to be followed. It also enabled the metabolomic profiling to identify the changing responses to long-term infection (Behrends et al. 2013).

A more detailed characterization of metabolome profiles was obtained using the GC/MS technique. However, the set of strains examined in this approach was relatively small. This approach was used by Klockgether et al. to compare several *P. aeruginosa* strains: (1) the reference strain (PAO1); and two strains isolated from CF patients: (2) TBCF10839 and (3) TBCF121838. GC/MS metabolomic analysis identified 80 intracellular compounds in the exponential growth phase. The concentrations of 21 compounds differed more than threefold between strains. In the case of trehalose, the level observed in strain TBCF10839 was 100 times higher than the one found in TBCF121838. The number of observed compounds in the stationary phase was similar. Moreover, this is one of the most detailed comparisons of *P. aeruginosa* strains that has ever been carried out. Apart from endo-metabolomic analysis, the experiments included several parameters: (1) genomic sequencing and comparison; (2) proteomic and transcriptome analysis; (3)

exopolysaccharide phosphorylation pattern determination; and (4) phenotypic examination (Klockgether et al. 2013).

Han et al. tested polymyxin-resistant and -susceptible strains to check bacterial metabolic and lipid profile responses. In this experiment, three strains of *P. aeruginosa* (wild-type and two *pmrB* mutant strains) were investigated using LC/MS analysis together with DNA sequencing and genomic analysis. Various extraction methods were used for the lipidome analysis. The PCA graph showed that metabolites were grouped depending on the extraction method, and there was a difference between the wild-type strain and *pmrB* mutants. The metabolomic analysis allowed identification of 578 metabolites. The PCA score plot revealed the sample grouping for each strain. These studies show that mutations in the *P. aeruginosa* genome causing resistance (or lack thereof) to antibiotics are reflected in the bacterial metabolomic profile (Han et al. 2018).

Possible metabolic adaptations to oxidative stress were analyzed by Thippakorn et al. two *P. aeruginosa* strains, PAO1 and a hyperpigmented strain HP, were compared. Metabolites were identified using the GC/MS technique. The comparison of exo-metabolome revealed differences in the level of antimicrobial compounds (lower in the case of the HP strain) and antioxidant compounds (lower in the case of PAO1). Adaptation to oxidative stress was also observed at the enzyme expression level; the HP strain had a significantly higher expression of malate synthase and isocitrate lyase. These enzymes produce substrates required for the synthesis of DHN-melanin (antioxidant dye). Surprisingly, the expression of antioxidant enzymes in the HP strain was reduced in comparison to the PAO1 strain (Thippakorn et al. 2018).

Identification of metabolic changes in response to external factors

Metabolic changes resulting from factors other than gene mutations may also play an important role in bacterial adaptation and survival. In the case of *P. aeruginosa*, several factors affecting metabolome were investigated: (1) growth medium composition; (2) growth conditions; (3) the presence of specific chemical compounds (including antibiotics); (4) other microorganisms; and (5) phage infection. Research focusing on these factors is crucial for the understanding of bacterial ecology and biochemistry. It may help to understand the mechanisms underlying phenomena, such as biofilm formation and antibiotic resistance (a considerable problem in the treatment of infections) or the mechanism of phage infection (possible alternative for conventional antibiotic therapy). Observation of metabolomic changes in response to a specific antibiotic compound may also help

in the discovery of the metabolic pathways responsible for microbial resistance (Han et al. 2019).

To identify metabolic response to environmental conditions, two *P. aeruginosa* strains, PAO1 and clinical isolate TBCF10839 (responsible for CF infections), were analyzed by Frimmersdorf et al. Exo- and endo-metabolomes from different culture conditions were compared. GC/MS analysis showed the presence of at least 243 compounds. One-hundred forty-four of these compounds could be identified when compared with metabolite libraries. Sixty metabolites were found in all culture conditions, and an additional 64 were present in most of the resulting profiles. Only 65 compounds were characteristic for specific growth conditions, and the observed changes were usually dependent on the selected medium. Moreover, not all carbon sources were used, which was the case even in the stationary phase (Frimmersdorf et al. 2010).

The problem of great clinical importance is the development of antibiotic resistance. Metabolomics was used by Han et al. to understand the molecular mechanisms underlying *P. aeruginosa*-related polymyxin resistance. Polymyxins are cyclic peptides used as the last-line therapeutic option for treatment of difficult-to-treat Gram-negative pathogens. The metabolic response of two *P. aeruginosa* strains (polymyxin susceptible PAK and resistant PAK*pmrB6*) to the presence of polymyxin B (4 mg/dm³) was compared. The metabolites were analyzed with LC/MS techniques. Four-hundred twenty-seven hydrophobic and 871 hydrophilic metabolites were identified. Most significant changes in the metabolic profile of both strains were observed after 1 h of incubation with polymyxin B. Polymyxin induced osmotic stress in both analyzed strains as indicated by the increased level of trehalose-6-phosphate. Moreover, the PAK showed a significant decrease in lipopolysaccharide and peptidoglycan synthesis. These results may be used in the development of a new generation of polypeptide antibiotics (Han et al. 2019).

A very interesting scientific question is the influence of bacteriophage infection of the bacterial metabolome. Investigation of mechanisms associated with phage infection may result in the development of new strategies in treating bacterial infection. The influence of phage infection on the metabolome of *P. aeruginosa* was investigated by De Smet et al. (2016). They used the PAO1 reference strain and infected it during the exponential growth state with six different bacteriophages. Metabolites were detected and quantified with injection-time-of-flight MS. This approach allowed for the identification of 518 metabolites. Metabolomic profiles of infected distinguished phages relying solely on resources available in host cells and could actively modulate host biosynthesis pathways. Phage infection had a significant influence on the concentration of 24.5% of the detected metabolites. However, only 2.4% of observed alterations

were common to all investigated phages. These metabolites were part of the nucleotide and sugar synthetic pathways. Amino acid metabolism is also affected by phage infection. However, the observed changes are not common and differ between individual bacteriophages. Some of the observed metabolic differences could be explained by the presence of enzymes encoded by auxiliary metabolic genes (AMG). However, the authors speculate that non-enzymatic proteins encoded by AMGs may be of equal importance. The data obtained in this project is available in the open database (<https://www.biw.kuleuven.be/LoGTdb/phageBiosystems/Home.aspx>).

Combined analyses of metabolome and the expression profile were carried out in the case of infection of *P. aeruginosa* PAK with PAK_P3 bacteriophage. Metabolite detection was done according to the protocol developed by De Smet et al. (2016). In this case, the pyridine metabolism was severely affected by phage infection. Moreover, the authors found that RNA-based regulation plays a central role in the PAK_P3 lifecycle since antisense transcripts are mainly produced during the early stage of infection, and viral small non-coding RNAs are expressed at the end of infection (Chevallereau et al. 2016).

In another study concerning phage infection, Zhao et al. investigated the changes in *P. aeruginosa* metabolism and gene expression after infection with the PaP1 phage. For metabolite detection, ¹H NMR was used. The authors were able to identify and quantify 48 metabolites. In the case of 12 compounds, the observed level was significantly altered. Most changes were observed in the case of metabolites involved in energy metabolism and amino acid synthesis. Moreover, levels of NAD⁺ and betaine had considerably decreased. The authors conclude that the majority of observed changes were the result of the regulation of the host gene expression by the phage. Furthermore, they suggest that the alteration of the betaine synthesis pathway may be a potential target for therapy due to the importance of this compound for *P. aeruginosa* during infection (Zhao et al. 2017).

One of the most critical features of *P. aeruginosa* is its ability to form a biofilm. Gjersing et al. proved that the metabolome of *P. aeruginosa* planktonic cells differs from that of biofilm cells. They decided to compare the metabolomic profile of the reference strain, PAO1, with two different models of growth: (1) planktonic and (2) biofilm. For these two different types of growth, intra- and extracellular profile of the metabolites were examined. The ¹H NMR and high resolution-magic angle spinning nuclear magnetic resonance (¹H HRMAS NMR) methods were used. For both growth models, the recorded spectra showed different signal profiles, which showed separation between studied groups on the PCA score plot. This study demonstrates that the supernatants of biofilm and

batch planktonic cultures could be readily distinguished by PCA (for both ^1H NMR and ^1H HRMAS NMR). The results showed that the levels of metabolites in the planktonic culture were higher than in biofilm types of growth. The reason for this could have been the culture method. The planktonic culture was a standard batch fermentation without medium replacement. In biofilm culture, the medium was continuously replaced, thus metabolites produced by bacteria could not accumulate (Gjersing et al. 2007).

A fundamental phenomenon observed in bacteria is quorum sensing (QS). QS is a cell-to-cell communication mechanism, which is a biochemical mechanism that allows different bacterial groups to coordinate gene expression in a variety of environments and to also control bacterial metabolism. The functions controlled by QS are varied and depend on the needs of bacteria (Lee and Zhang 2015; Reading and Sperandio 2006). Such communication between cells plays an essential role in the creation of biofilms and infection initiation (de Kievit 2009). *P. aeruginosa* is one of the bacteria in which functioning QS plays a vital role. Reports showed that QS could be responsible for the central metabolism of this pathogen (Goo et al. 2015).

Righi et al. used ^1H HRMAS and ^1H NMR spectroscopy to determine changes in the metabolome in live bacterial cells in response to 2-aminoacetophenone (2-AA) (Righi et al. 2018). 2-AA is considered to be a volatile quorum-sensing molecule associated with the expression of virulence factors in *P. aeruginosa* and promoting the development of chronic infection (Kesarwani et al. 2011). To understand the impact of 2-AA on the metabolome, a clinically isolated *P. aeruginosa* strain, UCBPP-PA14, was cultured with and without 2-AA. NMR analysis used whole cells without any metabolite extraction. This rapid detection method was previously optimized for UCBPP-PA14 strain and prove to be accurate for *P. aeruginosa* metabolomic analysis. Twenty-four metabolites, such as osmolytes, amino acids, and phospholipids, were identified. The combined use of 1D and 2D spectra provided complete and unambiguous metabolite identification in the samples with the conclusion that 2-AA affects the metabolic profile of cells. Changes observed in metabolome suggest that 2-AA may induce changes in the capsular polysaccharides composition and trigger cellular osmoprotectant mechanisms (Righi et al. 2013).

Chen et al. conducted an experiment in which they studied the QS inhibitor, resveratrol. The *P. aeruginosa* reference strain, PAO1, was cultured with and without resveratrol (control group). ^1H NMR was then used to compare intracellular metabolites, which allowed 40 compounds to be identified. The PCA and PLS methods separated samples from the control cultures and resveratrol-treated cells. A reduced level of betaine and increased concentration of ethanolamine suggest the presence of oxidative stress in resveratrol-treated bacteria. Accumulation of succinate and branched-chain amino acids

implies the disruption of the TCA cycle and protein synthesis (Chen et al. 2017).

Another experiment by Devenport et al. compared the influence of N-acyl homoserine lactone (AHL) on the intracellular metabolite content of two *P. aeruginosa* strains. The studies were performed using the ^1H NMR, LC-MS, and GC-MS methods. One of the strains was the wild-type while the second was double mutant Δ *lasI* *rhII*, which did not allow the production of AHL signalling compounds. MS analysis allowed fatty acids in the samples to be identified. Observation of metabolic profiles in the time intervals (from 1 to 10 h) enabled the visualization of how the metabolite concentrations changed. In the mutant's supernatant, no AHL was detected. Furthermore, the mutant strain produced more acetate and used alanine faster than the wild-type strain. Moreover, PCA analysis clearly showed the strain grouping. The results showed that QS molecules influence fatty acid metabolism (Davenport et al. 2015).

Identification of new metabolites

Metabolomic analysis may be a very useful tool in the identification of novel compounds produced by microorganisms. Identification of new compounds produced by microorganisms is one of the fundamental goals of present-day microbiology. Microbiologically produced substances may be significant for medicine (new drugs), industry, and environmental protection (natural biodegradable detergents) (Janek et al. 2010).

Nguyen et al. identified new lipopeptides produced by *Pseudomonas* strains using LC/MS-based metabolomic analysis. In these studies, the authors investigated 260 strains of *Pseudomonas* isolated from different locations. Massive extracellular metabolomic analysis based on the C/MS technique allowed identification of common and strain-specific compounds. For the identification of potentially novel compounds, data obtained from LC-MS/MS was processed with Global Natural Products Social Molecular Networking. Further structural analysis of strain-specific compounds based on NMR spectroscopy has led to the identification of new lipopeptides and enabled evolutionary comparisons between them. Four new compounds produced by *Pseudomonas* strains were identified, poaemides and banana-mides (Nguyen et al. 2017).

Conclusions

Pseudomonas aeruginosa is a very flexible and variable microorganism, which allows it to adapt to various life conditions. Chronic infection in patients with cystic fibrosis are often incurable and represent a severe problem. The adaptation of *P. aeruginosa* to the environment is a scientifically

exciting problem and may be significant for therapeutic reasons. Therefore metabolomic analysis used for comparison of *P. aeruginosa* strains, causing infections among people suffering from cystic fibrosis can be very beneficial.

The presented research shows the diversity of the carried out experiments. Each of them: (1) comparing metabolome of isolates from patients suffering from cystic fibrosis with healthy people (2) characterization of compounds that make up the metabolome (3) identification of changes in metabolites during co-culture and quorum sensing; introduces a lot of new information on the functioning and dependence of this organism. The initial research showed that there are metabolome differences between strains isolated from the patients (Kozłowska et al. 2013). Observed changes included improved amino-acid uptake and reduced acetate production in strains responsible for chronic infection. However, the research also revealed great diversity between strains isolated even from one patient, thus it is hard to find any general pattern for *P. aeruginosa* adaptation strategy (Behrends et al. 2013). Moreover, it seems likely that metabolome is influenced more by the environment (medium type) than the strain genome (Frimmersdorf et al. 2010). Further research may give a better understanding of *P. aeruginosa* adaptation, however it must include a much bigger set of tested strains including environmental isolates.

Bacteriophages are considered an alternative for antibiotic therapy, especially in cases of antibiotic-resistant strain treatment. At present, the use of bacteriophages is an experimental therapy for individual cases. However, it is possible that in the future, human-designed bacteriophages will become more universal and more effective infection treatment method. The research on bacterial metabolomic changes during bacteriophage infection provides the foundations for the development of synthetic therapeutic bacteriophages.

The development of new diagnostic tools may significantly improve the therapy for *P. aeruginosa* infections. The most important information for the physician is the type of bacteria causing disease and its susceptibility to antibiotics. This type of information is critical at the beginning of therapy when a suitable and efficacious antibiotic has to be selected. The time required for data acquisition is crucial, especially in the case of life-threatening infections. Moreover, diagnostic tools are also critical in the assessment of therapy effectiveness. In the case of treatment effectiveness assessments, VOC analysis seems to be promising due to its noninvasive character and speed. However, the initial trials described in the literature were done on small groups of patients, and further tests are required.

In summary, complete identification and characterization of *P. aeruginosa* strain based on analytical multiplatform metabolic profiling is necessary. For some applications, a single method may be sufficient (treatment monitoring).

The use of metabolomic analytical tools for diagnostics will be possible only after the development of an extensive database containing metabolic profiles of different *P. aeruginosa* strains. Moreover, appropriate analytical software must be used for data interpretation.

Metabolomic studies of *P. aeruginosa* has provided new interesting information about the life of this microorganism. There is still much to be done before we obtain the full scope of *P. aeruginosa* capabilities. Yet there is no doubt that the effort must be taken, since it may help us resolve the health threats associated with *P. aeruginosa* infections.

Funding Funding was supported by Politechnika Wroclawska (Grant No. Statutory Research 2019) and National Center for Research and Development (Grant No. Power BioTechNan).

Compliance with ethical standards

Conflict of interest All authors declare that they have no conflict of interest.

Open Access This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made.

References

- Bail S, Buchbauer G, Jirovetz L, Denkova Z, Slavchev A, Stoyanova A, Geissler M (2009) Antimicrobial activities of roman chamomile oil from france and its main compounds. *J Essent Oil Res* 21(3):283–286. <https://doi.org/10.1080/10412905.2009.9700171>
- Bassetti M, Vena A, Croxatto A, Righi E, Guery B (2018) How to manage *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Drugs Context* 7:1–18. <https://doi.org/10.7573/dic.212527>
- Behrends V, Ryall B, Zlosnik JEA, Speert DP, Bundy JG, Williams HD (2013) Metabolic adaptations of *Pseudomonas aeruginosa* during cystic fibrosis chronic lung infections. *Environ Microbiol* 15(2):398–408. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2012.02840.x>
- Behrends V, Williams HD, Bundy JG (2014) Metabolic footprinting: extracellular metabolomic analysis. *Methods Mol Biol* 1149:281–292. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0473-0_230
- Bendiak G, Ratjen F (2009) The approach to *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. *Semin Respir Crit Care Med* 30:587–595. <https://doi.org/10.1055/s-0029-1238917>
- Breidenstein EBM, de la Fuente-Núñez C, Hancock REW (2011) *Pseudomonas aeruginosa*: all roads lead to resistance. *Trends Microbiol* 19:419–426. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2011.04.005>
- Chen T, Sheng J, Fu Y, Li M, Wang J, Jia AQ (2017) ¹H NMR-based global metabolic studies of *Pseudomonas aeruginosa* upon exposure of the quorum sensing inhibitor resveratrol. *J Proteom Res* 16(2):824–830. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.6b00800>
- Chevallereau A, Blasdel BG, De Smet J, Monot M, Zimmermann M, Kogadeeva M, Lavigne R (2016) Next-generation “-omics” approaches reveal a massive alteration of host rna metabolism

- during bacteriophage infection of *Pseudomonas aeruginosa*. PLoS Genet 12(7):e1006134. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006134>
- Choi C, Münch R, Leupold S, Klein J, Siegel I, Thielen B, Jahn D (2007) SYSTOMONAS—an integrated database for systems biology analysis of *Pseudomonas*. Nucleic Acids Res 35:533–537. <https://doi.org/10.1093/nar/gkl823>
- Davenport PW, Griffin JL, Welch M (2015) Quorum sensing is accompanied by global metabolic changes in the opportunistic human pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. J Bacteriol 197(12):2072–2082. <https://doi.org/10.1128/JB.02557-14>
- de Kievit TR (2009) Quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. Environ Microbiol 11(2):279–288. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2008.01792.x>
- De Smet J, Zimmermann M, Kogadeeva M, Ceysens PJ, Vermaelen W, Blasdel B, Bin Jang H, Sauer U, Lavigne R (2016) High coverage metabolomics analysis reveals phage-specific alterations to *Pseudomonas aeruginosa* physiology during infection. ISME J 10:1823–1835. <https://doi.org/10.1038/ismej.2016.3>
- Dona AC, Kyriakides M, Scott F, Shephard EA, Varshavi D, Veselkov K, Everett JR (2016) A guide to the identification of metabolites in NMR-based metabolomics/metabolomics experiments. Comput Struct Biotechnol J 14:135–153. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2016.02.005>
- Emerson J, Rosenfeld M, McNamara S, Ramsey B, Gibson RL (2002) *Pseudomonas aeruginosa* and other predictors of mortality and morbidity in young children with cystic fibrosis. Pediatr Pulmonol 34:91–100. <https://doi.org/10.1002/ppul.10127>
- Fiehn O (2002) Metabolomics—the link between genotypes and phenotypes. Plant Mol Biol 48(1–2):155–171
- Frimmersdorf E, Horatzek S, Pelnikovich A, Wiehlmann L, Schomburg D (2010) How *Pseudomonas aeruginosa* adapts to various environments: a metabolomic approach. Environ Microbiol 12(6):1734–1747. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2010.02253.x>
- Gjersing EL, Herberg JL, Horn J, Schaldach CM, Maxwell RS (2007) NMR metabolomics of planktonic and biofilm modes of growth in *Pseudomonas aeruginosa*. Anal Chem 79(21):8037–8045. <https://doi.org/10.1021/ac070800t>
- Goo E, An JH, Kang Y, Hwang I (2015) Control of bacterial metabolism by quorum sensing. Trends Microbiol 23(9):567–576. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2015.05.007>
- Han ML, Zhu Y, Creek DJ, Lin YW, Anderson D, Shen HH, Li J (2018) Alterations of metabolic and lipid profiles in polymyxin-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother. 62(6):e02656. <https://doi.org/10.1128/AAC.02656-17>
- Han ML, Zhu Y, Creek DJ, Lin YW, Gutu AD, Hertzog P, Purcell T, Shen HH, Moskowitz SM, Velkov T, Li J (2019) Comparative metabolomics and transcriptomics reveal multiple pathways associated with polymyxin killing in *Pseudomonas aeruginosa*. MSys 4(1):e00149–e218. <https://doi.org/10.1128/mSystems.00149-18>
- Huang W, Brewer LK, Jones JW, Nguyen AT, Marcu A, Wishart DS, Wilks A (2018) PAMDB: A comprehensive *Pseudomonas aeruginosa* metabolome database. Nucleic Acids Res 46:575–580. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1061>
- Janek T, Łukaszewicz M, Rezanika T, Krasowska A (2010) Isolation and characterization of two new lipopeptide biosurfactants produced by *Pseudomonas fluorescens* BD5 isolated from water from the Arctic Archipelago of Svalbard. Bioresour Technol 101(15):6118–6123. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.03.031>
- Kanehisa M, Furumichi M, Tanabe M, Sato Y, Morishima K (2017) KEGG: new perspectives on genomes, pathways, diseases and drugs. Nucleic Acids Res 45:353–361. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw1092>
- Kesarwani M, Hazan R, He J, Que Y, Apidianakis Y, Lesic B, Xiao G, Dekimpe V, Milot S, Deziel E, Lépine F, Rahme LG (2011) A quorum sensing regulated small volatile molecule reduces acute virulence and promotes chronic infection phenotypes. PLoS Pathog 7:e1002192. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002192>
- Kim S, Thiessen PA, Bolton EE, Chen J, Fu G, Gindulyte A, Bryant SH (2016) PubChem substance and compound databases. Nucleic Acids Res 44:1202–1213. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv951>
- Klockgether J, Miethke N, Kubesch P, Bohn YS, Brockhausen I, Cramer N, Tümmler B (2013) Intracolon diversity of the *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis airway isolates TBCF10839 and TBCF121838: distinct signatures of transcriptome, proteome, metabolome, adherence and pathogenicity despite an almost identical genome sequence. Environ Microbiol 15(1):191–210. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2012.02842.x>
- Kosorok M, Zeng L, West S, Rock M, Splaingard M, Laxova A, Green C, Collins J, Farrell P (2003) Acceleration of lung disease in children with cystic fibrosis after *Pseudomonas aeruginosa* acquisition. Pediatr Pulmonol 32:277–287. <https://doi.org/10.1002/ppul.2009>
- Kozłowska J, Rivett DW, Vermeer LS, Carroll MP, Bruce KD, James Mason A, Rogers GB (2013) A relationship between *Pseudomonas* growth behaviour and cystic fibrosis patient lung function identified in metabolomic investigation. Metabolomics 9(6):1262–1273. <https://doi.org/10.1007/s11306-013-0538-5>
- Lawal O, Muhamadali H, Ahmed WM, White IR, Nijssen TME, Goodacre R, Fowler SJ (2017) Headspace volatile organic compounds from bacteria implicated in ventilator-associated pneumonia analysed by TD-GC/MS. J Breath Res 12(2):026002. <https://doi.org/10.1088/1752-7163/aa8efc>
- Lawal O, Knobel H, Weda H, Nijssen TME, Goodacre R, Fowler SJ, Zakharkina T (2018) TD/GC–MS analysis of volatile markers emitted from mono- and co-cultures of *Enterobacter cloacae* and *Pseudomonas aeruginosa* in artificial sputum. Metabolomics 14(5):1–11. <https://doi.org/10.1007/s11306-018-1357-5>
- Lee J, Zhang L (2015) The hierarchy quorum sensing network in *Pseudomonas aeruginosa*. Protein Cell 6(1):26–41. <https://doi.org/10.1007/s13238-014-0100-x>
- Leon J (1979) Podstawy mikrobiologii lekarskiej. PZWL, Warszawa
- Maniscalco M, Fuschillo S, Paris D, Cutignano A, Sanduzzi A, Motta A (2019) Clinical metabolomics of exhaled breath condensate in chronic respiratory diseases. Adv Clin Chem 1(88):121–149. <https://doi.org/10.1016/bs.acc.2018.10.002>
- Montuschi P, Paris D, Melck D, Lucidi V, Ciabattini G, Raia V, Motta A (2012) NMR spectroscopy metabolomic profiling of exhaled breath condensate in patients with stable and unstable cystic fibrosis. Thorax 67(3):222–228. <https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2011-200072>
- Neerinx AH, Geurts BP, Habets MFJ, Booij JA, Van Loon J, Jansen JJ, Kluijtmans LAJ (2016) Identification of *Pseudomonas aeruginosa* and *Aspergillus fumigatus* mono- and co-cultures based on volatile biomarker combinations. J Breath Res 10(1):016002. <https://doi.org/10.1088/1752-7155/10/1/016002>
- Nguyen DD, Melnik AV, Koyama N, Lu X, Schorn M, Fang J, Dorrestein PC (2017) Indexing the *Pseudomonas* specialized metabolome enabled the discovery of poeamide B and the bananamides. Nature Microbiol 2(1):16197. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.197>
- Nixon GM, Armstrong DS, Carzino R, Carlin JB, Olinsky A, Robertson CF, Grimwood K (2001) Clinical outcome after early *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis. J Pediatr 138:699–704. <https://doi.org/10.1067/mpd.2001.112897>
- Nizio KD, Perrault KA, Troobnikoff AN, Ueland M, Shoma S, Iredell JR, Forbes SL (2016) In vitro volatile organic compound profiling using GC×GC–TOFMS to differentiate bacteria associated

- with lung infections: a proof-of-concept study. *J Breath Res* 10(2):026008. <https://doi.org/10.1088/1752-7155/10/2/026008>
- Palama TL, Canard I, Rautureau GJP, Mirande C, Chatellier S, Elena-Herrmann B (2016) Identification of bacterial species by untargeted NMR spectroscopy of the exo-metabolome. *Analyst* 141:4558–4561. <https://doi.org/10.1039/c6an00393a>
- Parkins MD, Somayaji R, Waters J (2018) Epidemiology, biology, and impact of clonal *Pseudomonas aeruginosa* infections in cystic fibrosis. *Clin Microbiol Rev* 31(4):1–38. <https://doi.org/10.1128/CMR.00019-18>
- Patti GJ, Yanes O, Siuzdak G (2012) Metabolomics: the apogee of the omic trilogy NIH Public Access. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13(4):263–269. <https://doi.org/10.1038/nrm3314>
- Pearson H (2007) Meet the human metabolome. *Nature* 446(7131):8. <https://doi.org/10.1038/446008a>
- Peix A, Ramírez-Bahena MH, Velázquez E (2018) The current status on the taxonomy of *Pseudomonas* revisited: an update. *Infect genet envol* 57:106–116. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2017.10.026>
- Reading NC, Sperandio V (2006) Quorum sensing: the many languages of bacteria. *FEMS Microbiol Lett* 254(1):1–11. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2005.00001.x>
- Righi V, Constantinou C, Kesarwani M, Rahme LG, Tzika AA (2013) Live-cell high resolution magic angle spinning magnetic resonance spectroscopy for in vivo analysis of *Pseudomonas aeruginosa* metabolomics. *Biomed Rep* 1(5):707–712. <https://doi.org/10.3892/br.2013.148>
- Righi V, Constantinou C, Kesarwani M, Rahme L, Tzika A (2018) Effects of a small, volatile bacterial molecule on *Pseudomonas aeruginosa* bacteria using whole cell high-resolution magic angle spinning nuclear magnetic resonance spectroscopy and genomics. *Int J Mol Med* 42(4):2129–2136. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2018.3760>
- Robroeks CMHHT, van Berkel JJBN, Dallinga JW, Jöbsis Q, Zimmermann LJI, Hendriks HJE, Dompeling E (2010) Metabolomics of volatile organic compounds in cystic fibrosis patients and controls. *Pediatr Res* 68(1):75–80. <https://doi.org/10.1203/PDR.0b013e3181df4ea0>
- Romero P, Karp P (2003) PseudoCyc, a pathway-genome database for *Pseudomonas aeruginosa*. *J Mol Microbiol Biotechnol* 5(4):230–239. <https://doi.org/10.1159/000071075>
- Schmidt KD, Tümmeler B, Römmling U (1996) Comparative genome mapping of *Pseudomonas aeruginosa* PAO with *P. aeruginosa* C, which belongs to a major clone in cystic fibrosis patients and aquatic habitats. *J Bacteriol* 178:85–93. <https://doi.org/10.1128/jb.178.1.85-93.1996>
- Thippakorn C, Isarankura-Na-Ayudhya C, Pannengpetch S, Isarankura-Na-Ayudhya P, Schaduangrat N, Nantasenamat C, Virapong P (2018) Oxidative responses and defense mechanism of hyper-pigmented *P. aeruginosa* as characterized by proteomics and metabolomics. *EXCLI J*. 17:544. <https://doi.org/10.17179/excli.2018-1238>
- Winsor GL, Griffiths EJ, Lo R, Dhillon BK, ShayJA Brinkman FSL (2016) Enhanced annotations and features for comparing thousands of *Pseudomonas* genomes in the *Pseudomonas* genome database. *Nucleic Acids Res* 44:646–653. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1227>
- Winstanley C, O'Brien S, Brockhurst MA (2016) *Pseudomonas aeruginosa* evolutionary adaptation and diversification in cystic fibrosis chronic lung infections. *Trends Microbiol* 24(5):327–337. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.01.008>
- Wishart DS, Jewison T, Guo AC, Wilson M, Knox C, Liu Y, Scalbert A (2013) HMDB 3.0-The human metabolome database in 2013. *Nucleic Acids Res* 41:801–807. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1065>
- Worley B, Powers R (2013) Multivariate analysis in metabolomics *Curr Metabol* 1(1):92–107. <https://doi.org/10.2174/2213235X11301010092>
- Xu YJ, Wang C, Ho WE, Ong CN (2014) Recent developments and applications of metabolomics in microbiological investigations. *Trends Anal Chem* 56:37–48. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2013.12.009>
- Zhao X, Shen M, Jiang X, Shen W, Zhong Q, Yang Y, Le S (2017) Transcriptomic and metabolomics profiling of phage–host interactions between PHAGE PaP1 and *Pseudomonas aeruginosa*. *Front Microbiol* 8:1–10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00548>

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

5.3. Comparison of bacteria disintegration method and their influence on data analysis in metabolomics

5.3.1. Skrótowe omówienie publikacji

Jednym z pierwszych kroków w analizie materiału biologicznego jest przygotowanie próbek, które jest niezwykle ważne ze względu na jego znaczenie dla otrzymanych końcowych wyników analitycznych. Jednakże każdy z etapów może być przeprowadzony z użyciem różnych metod badawczych i każdy z nich ma wpływ na efektywność otrzymywanych danych. Z tego powodu podczas przeprowadzania porównań metabolomicznych, próbki muszą być przygotowywane w identyczny sposób. Tylko takie rozwiązanie może zapewnić brak wpływu czynników trzecich na wyniki.

We wstępie pracy „*Comparison of bacteria disintegration method and their influence on data analysis in metabolomics*” omówiono najbardziej popularne metody ekstrakcji oraz dezintegracji mikroorganizmów, których szczegóły dostępne są w tabeli nr 1 publikacji. Dodatkowo scharakteryzowane zostały różnice w budowie komórek bakteryjnych dla różnych rodzajów mikroorganizmów oraz ich możliwy wpływ na efektywność różnych metod niszczenia błon komórkowych.

Do porównań wybrano sześć rodzajów bakterii – trzy bakterie Gram-ujemne (*P. aeruginosa*, *E. coli* oraz *K. pneumoniae*) oraz trzy Gram-dodatnie (*B. cereus*, *C. glutamicum* oraz *E. faecalis*). Wszystkie analizy wykonano w 5 powtórzeniach biologicznych. Hodowle drobnoustrojów prowadzone były w czasie pozwalającym na zebranie materiału do badań w fazie wzrostu logarytmicznego, dzięki czemu możemy bezpośrednio porównywać zmiany w metabolomie. W tym miejscu należy zaznaczyć, że metabolizm mikroorganizmów zmienia się stosunkowo szybko i może diametralnie różnić się pomiędzy fazami wzrostu. Informacje o krzywych wzrostu dla poszczególnych szczepów dostępne są na rysunku 1 w materiałach dodatkowych. W celu porównania wydajności procesu przygotowania próbek, do ekstrakcji wykorzystano mieszaninę rozpuszczalników o stałym stosunku objętościowym metanol:woda (1:1), wraz z użyciem trzech instrumentów dezintegracyjnych: dezintegratora tkankowego, sonikatora oraz młyna piaskowego. Wszystkie badania zostały przeprowadzone za pomocą protonowej spektroskopii jądrowego rezonansu magnetycznego ^1H NMR.

Analiza widm pozwoliła na zidentyfikowanie we wszystkich badanych ekstraktach bakteryjnych 42 metabolitów, jednak niektóre z nich występowały tylko w wybranych szczepach mikroorganizmów. (np. 5-aminopentanian i izocytrynian zostały zidentyfikowane tylko w *P. aeruginosa*). Stężenia zidentyfikowanych związków dostępne są w materiałach dodatkowych publikacji w tabelach S2 i S3. Reprezentatywne widma 1D ^1H NMR dla każdego

rodzaju bakterii wraz z opisem sygnałów rezonansowych przedstawiono na rysunku 2. Szczegółowe informacje o przesunięciach chemicznych są dostępne również w materiałach dodatkowych (tabela S1, rysunek S2 i S3). Warto zaznaczyć, że dla różnych metod dezintegracji, w przypadku jednego szczepu nie odnotowano zmian jakościowych. Oznacza to, że każda z metod dezintegracji pozwoliła na zidentyfikowanie takich samych metabolitów, jednak ich poziomy stężenie różniły w zależności od sposobu niszczenia błon komórkowych. Różnice te zostały przedstawione w formie mapy ciepła – „heatmapy” (rysunek 3).

W celu określenia istotnej statystycznie zmienności pomiędzy metodami dezintegracji dla poszczególnych metabolitów w obrębie jednego mikroorganizmu, przeprowadzono testy statystyczne, których wyniki zebrano w tabeli 2. Różnice nie były istotne statystycznie dla każdego ze zidentyfikowanych metabolitów, jednak zostały pokazane dla poszczególnych związków. Na podstawie zmienności w stężeniach poszczególnych metabolitów wybrano sposób, którego zastosowanie pozwoliło na uzyskanie najbardziej wydajnej metody dezintegracji, w rozumieniu otrzymania największych stężeń większości zidentyfikowanych metabolitów. Sonikacja pozwoliła na uzyskanie najwyższych stężeń niskocząsteczkowych związków dla dwóch bakterii Gram ujemnych - *P. aeruginosa* i *K. pneumoniae* oraz jednej bakterii Gram dodatniej - *C. glutamicum*. Dezintegrator tkankowy jest najbardziej efektywną metodą dla *B. cereus*, natomiast młyn piaskowy dla *E. coli* i *E. faecalis*.

Wyniki wielowymiarowych analiz danych porównujących rezultaty badań analitycznych otrzymanych poprzez zastosowanie różnych metod dezintegracji badanego materiału biologicznego (przedstawione na rysunku 5) pokazują grupowanie się próbek, co świadczy o wpływie zastosowanych metod niszczenia błon komórkowych na efektywność uzyskanych wyników. Różnice te widać szczególnie w przypadku *E. coli* oraz *P. aeruginosa*. Najmniejszy wpływ zauważono dla *B. cereus* – w tym przypadku punkty odzwierciedlające różne metody dezintegracji nie grupowały się. Dodatkowo należy zaznaczyć, że wspomniane różnice wynikają ze zmienionych stężeń metabolitów, a nie z faktu ich obecności lub nie w danej próbce, co najprawdopodobniej jest następstwem różnej budowy ściany komórkowej testowanych mikroorganizmów.

Oprócz porównania metod dezintegracji przeanalizowano również profile mikroorganizmów pomiędzy sobą. Uzyskane wyniki nienadzorowanych wielowymiarowych analiz danych przeprowadzonych dla metabolitów wewnątrzkomórkowych (przedstawione na rysunku 4 modele PCA), pokazują różnicowanie się próbek. Grupowanie to uzyskano przy wykorzystaniu każdej z metod dezintegracji, co jasno wskazuje, że ^1H NMR może być wykorzystywany do identyfikacji i rozróżniania drobnoustrojów poprzez różnicowanie ich metabolitów i może dodatkowo wspomagać lub zastąpić obecnie coraz częściej stosowane

narzędzie do identyfikacji mikroorganizmów jakim jest MS. Jednakże zastosowanie tej metody w identyfikacji mikroorganizmów wymaga dalszych badań, w tym stworzenia dedykowanych baz danych, których dostępność jest obecnie mała.

W przeprowadzonym badaniu potwierdzono, że wybór metody dezintegracji jest kluczowy dla poprawności eksperymentów metabolomicznych. Otrzymane wyniki udowadniają, że dezintegracja próbek będących elementem jednego projektu (jeśli wyniki mają być zanalizowane poprawnie) musi być przeprowadzona w dokładnie taki sam sposób. Rezultaty przeprowadzonych badań mogą być bardzo pomocne w analizach metabolomiki celowanej - wskazując metodę dezintegracji komórki bakteryjnej, która pozwoli na uzyskanie najwyższych stężeń konkretnego związku niskocząsteczkowego.

5.3.2. Publikacja



OPEN

Comparison of bacteria disintegration methods and their influence on data analysis in metabolomics

Karolina Anna Mielko¹, Sławomir Jan Jabłoński², Marcin Łukaszewicz² & Piotr Młynarz¹✉

Metabolomic experiments usually contain many different steps, each of which can strongly influence the obtained results. In this work, metabolic analyses of six bacterial strains were performed in light of three different bacterial cell disintegration methods. Three strains were gram-negative (*Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, and *Klebsiella pneumoniae*), and three were gram-positive (*Corynebacterium glutamicum*, *Bacillus cereus*, and *Enterococcus faecalis*). For extraction, the methanol–water extraction method (1:1) was chosen. To compare the efficiency of different cell disintegration methods, sonication, sand mill, and tissue lyser were used. For bacterial extract metabolite analysis, ¹H NMR together with univariate and multivariate analyses were applied. The obtained results showed that metabolite concentrations are strongly dependent on the cell lysing methodology used and are different for various bacterial strains. The results clearly show that one of the disruption methods gives the highest concentration for most identified compounds (e. g. sand mill for *E. faecalis* and tissue lyser for *B. cereus*). This study indicated that the comparison of samples prepared by different procedures can lead to false or imprecise results, leaving an imprint of the disintegration method. Furthermore, the presented results showed that NMR might be a useful bacterial strain identification and differentiation method. In addition to disintegration method comparison, the metabolic profiles of each elaborated strain were analyzed, and each exhibited its metabolic profile. Some metabolites were identified by the ¹H NMR method in only one strain. The results of multivariate data analyses (PCA) show that regardless of the disintegration method used, the strain group can be identified. Presented results can be significant for all types of microbial studies containing the metabolomic targeted and non-targeted analysis.

The analysis of cell metabolite compositions and concentrations (metabolomics) is a rapidly developing research tool. It was successfully used to analyze bacterial cell adaptation, microorganism identification, and phage infection mechanisms¹. It is also considered a promising diagnostic tool in the case of bacterial infections². Analytical technologies used in metabolomics include mainly chromatography coupled with mass spectrometry (MS) or nuclear magnetic resonance (NMR).

Due to the low concentration of metabolites (approximately 2% of cell dry mass) and detection limits of analytical techniques, the investigation of intracellular metabolites usually requires initial extraction and concentration. The metabolite extraction efficiency determines the amount of biomass required for the experiment, which may cause problems due to low biomass yields for certain species of microorganisms^{3,4}.

Methods used in sample preparation differ depending on reported research (Table 1). This situation may be confusing for scientists starting their adventure with metabolomics. Moreover, it was proven that the choice of sample preparation method may influence obtained metabolite profile⁵. Thus making comparisons of data obtained by different research teams is very difficult.

Choosing a proper disruption method and conditions for selected materials may be crucial for the reliability of the obtained experimental results. “Too-mild” conditions lead to a lower metabolite extraction efficiency and underrepresentation of metabolites from more break-up-resistant cells. This effect may be very significant for samples containing different species of microorganisms. On the other hand, an excessively long

¹Department of Biochemistry, Molecular Biology and Biotechnology, Faculty of Chemistry, Wrocław University of Science and Technology, Wrocław, Poland. ²Biotransformation Department, Faculty of Biotechnology, University of Wrocław, Wrocław, Poland. ✉email: piotr.mlynarz@pwr.edu.pl

Disruption method	Extraction method	Organism	Amount of biomass	Analytical method	References
Freeze–thaw (×3)	Chloroform/methanol/water (1:3:1)	<i>P. aeruginosa</i>	~10 ⁸ CFU/ml (OD ₆₀₀ =0.5)	HPLC/LC–MS	6
Ultrasonic bath 15 min. 70 °C	Methanol/water/chloroform (3:3:2)	<i>P. aeruginosa</i>	150 mg wet biomass	GC/MS	7,8
60% ethanol at 78 °C for 2 min, liquid nitrogen freezing	3 ml ethanol (60%)	<i>P. aeruginosa</i>	4·10 ⁸ CFU, 1 ml OD ₆₀₀ 1.0	TOF–MS	9
Vortexed with methanol	Methanol/water/chloroform (5:5:8)	<i>P. aeruginosa</i>	300 mg wet biomass	¹ H NMR	10
Freeze–thaw (×3) in 50% methanol	Methanol/water (1:1)	<i>K. pneumoniae</i>	~8·10 ⁸ CFU/ml (OD ₅₅₀ =0.7)	¹ H NMR	11
Cryostat (~ -50 °C)	100% methanol	<i>K. pneumoniae</i>	(OD ₆₀₀ = 0.4–0.6)	LC/MS	12
Homogenization with PBS and sonication bath 30 min	PBS buffer	<i>K. pneumoniae</i>	300 ml, OD ₆₀₀ = 0.7–0.9	¹ H NMR	13
Freeze–thaw (×3) in 50% methanol, liquid nitrogen freezing 1 min	Methanol/water (1:1)	<i>B. cereus</i>	50 mg	GC/TOF–MS	14,15
Boiling in water for 15 min	Water	<i>C. glutamicum</i>	1–4 mg	GC/MS	16
Ultrasonic bath 15 min 70 °C in methanol	Methanol/water/chloroform (3:3:2)	<i>C. glutamicum</i>	5·10 ¹⁰ CFU	GC/MS	17
Incubation with solvents in -20 °C for 4 h	Methanol/water/chloroform (1:1:2)	<i>C. glutamicum</i>	20–50 mg wet biomass	LC/MS–MS	18
Freeze–thaw (×3) in 50% methanol	Methanol/water (1:1)	<i>E. faecalis</i>	50 ml of culturebroth	GC/MS	19
Sonication: sequence (6 s/4 s) for 6 min and bath for 20 min	Methanol/water/chloroform (4:1:1)	<i>E. coli</i>	5 ml, OD ₆₀₀ = 1.0	GC–MS	20
Freeze–thaw (×3) in methanol, liquid nitrogen freezing	100% methanol	<i>E. coli</i>	20 ml, 10 ⁸ CFU/ml	¹ H NMR	21

Table 1. Cell disruption methods used in metabolome analysis.

disintegration process may alter the metabolite composition due to the degradation of liable compounds or enzymatic reactions^{4,10}.

The bacterial cytoplasmic membrane is the most important barrier holding metabolites in the cell. It may be passively passed by small uncharged or nonpolar molecules (water, carbon dioxide or hydrogen, protonated organic acids). The membrane is relatively susceptible to disruption with chemical agents such as organic solvents or detergents^{22,23}, and it is not an effective barrier for hydrophobic molecules. Due to lipid solubility in organic solvents, most metabolite extraction protocols use organic solvents such as methanol, chloroform, or ethanol. The additional role of organic solvents is the denaturation of enzymes, which may influence the metabolite profile after cell disruption.

The presence of a thick cell wall could reduce the amount of extracted metabolites. The cell wall is resistant to disintegration with chemical solvents, however, it is not as an effective barrier for soluble molecules as lipid membrane. Passive diffusion through the cell wall is possible for globular molecules up to 25 kDa²⁴. It is known that cell wall disruption affects the metabolomic profile obtained of bacteria and the effect is much stronger in the case of gram-positive *Enterococcus faecalis* than for gram-negative *Escherichia coli*^{22,24}.

The more substantial effect of cell wall disruption in the case of *E. faecalis* may be explained by bacterial cell wall resistance and structure. Bacteria are classified as gram-positive or gram-negative. This classification originates from the result of Gram staining, which is associated with the structure of the cell wall. The bacterial cell wall is mainly composed of the peptidoglycan polymer, which is also known as murein. In the case of gram-negative bacteria, the layer of peptidoglycan is localized in the periplasmic space and is relatively thin. In *Escherichia coli* the peptidoglycan layer is flexible net, and its thickness is between 2.5 and 6 nm²⁵. The pressure required for the destruction of the cell wall in *E. coli* is around 50 MPa²⁶. In gram-positive bacteria, only one lipid membrane is present, and the outer peptidoglycan layer is thicker. In species like *Staphylococcus aureus* murein still resembles a net composed of relatively short amino sugar strands (6 disaccharide units on average)²⁷. The thickness of this structure is around 25 nm²⁸. In the case of *Bacillus subtilis* the cell wall organization is more sophisticated. The cell wall is composed of long murein cables wrapped around the cell along the longer axis. A considerable fraction (around 25%) of peptidoglycan strains is longer than 500 disaccharide units²⁹. The cell wall of gram-positive species, in general, is regarded as tough. The pressure required to destroy the cell wall in *Staphylococcus aureus* is around 250 MPa, and in *B. subtilis* it is around 100 MPa, respectively. Higher durability of *S. aureus* cell may result also from spherical cell shape. Cell resistance in the general population of bacteria is not equal for all cells. Thus disruption of 50% of cells is much easier than disrupting 95% of cells²⁶.

Several methods were developed to achieve this since disruption of the bacterial cell wall is crucial in many laboratories and industrial operations (DNA and protein isolation). Physical cell disruption methods involve the following processes: pressure disruption, sonication (exposure to ultrasound), freezing, and milling^{30,31}. In pressure disruption, cells are forced to pass through narrow channels with high flow velocities. The cells are disrupted by forces caused by shear stress, turbulence, and friction. During sonication, cells are disrupted by shock waves produced by a dedicated device. During milling, cells are squeezed and damaged during collisions with bead particles and vessel walls. Freezing causes the formation of water crystals inside cells, resulting in volume extension and cell disruption. The efficiency of the cell disruption process depends on the amount of energy delivered to the system. Better disruption requires harsh conditions or longer time^{26,30}.

In metabolomics studies, each step of the sample preparation influences results. An adequately prepared protocol is more reliable and can be useful. Metabolomics as a scientific branch could give information about differences between microorganisms. The most popular analytical tool in clinical laboratories is mass spectrometry

(MS)³², but the results of previous experiments provided evidence that the nuclear magnetic resonance (NMR) method can be used as an analytical tool for rapid bacterial identification³³. Metabolic analysis has been used to examine and compare extra- and intracellular bacterial primary and secondary metabolites. Furthermore, it can be useful in pathway discovery and regulation³⁴. These examples clearly show that the development of NMR techniques, database creation, and finding the most suitable sample preparation protocol can improve metabolomics studies and probably support future clinical diagnosis.

Our goal was to determine the influence of the cell mechanical disruption method on the metabolite profile obtained with ¹H NMR spectroscopy for six different bacteria species. Bacteria species selection was based on their difference in cell wall structure and shape. These factors may influence cell mechanical resistance and metabolite extraction procedure efficiency.

Objectives

The research aimed to check which disintegration method is the best for conducting NMR analysis (metabolomic fingerprinting) and if it influences the analysis of different bacterial strains.

Material and methods

Bacterial strains and culture conditions. In this study, six strains were analyzed. Three strains were gram-negative bacteria (*Pseudomonas aeruginosa* DSMZ 1707, *Escherichia coli* ATCC 9212, and *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603), and three were gram-positive bacteria (*Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Bacillus cereus* ATCC 11778, and *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13287).

In the first step, the strains were routinely grown on Miller's LB broth agar (BioShop) with 0.5% glucose (BioShop) (Behrends, 2013), which provided growth suitable for the collection of the inoculum.

To evaluate the differences between strains, bacteria were cultured in 10 cm Petri dishes for 24 h at 37 °C. Afterward, a preculture was prepared by inoculating the bacterial culture into 20 ml of liquid LB broth medium and incubated for 24 h at 37 °C with shaking (315 r.c.f.). Next, 100 ml of the culture was prepared in a 300 ml Erlenmeyer flask. The initial OD_{600nm} for all cultures was 0.1. Cultures were incubated at 37 °C for the appropriate time for the particular strain (Table 2).

Growth curve measurements (in triplicate) were conducted for each strain to determine when the bacteria were in a logarithmic growth phase. For this purpose, the absorbance of the samples was measured at a wavelength of 600 nm. The measurement was started during the establishment of the culture (from OD_{600 nm} = 0.1) and was carried out for 16 h. The growth curves are available in the Supplementary materials (Figure S1). These results allowed us to obtain the culturing time for each strain. It was seven hours for *P. aeruginosa*, four hours for *E. coli*, three and a half hours for *K. pneumoniae*, three hours for *E. faecalis*, five hours for *B. cereus*, and nine hours for *C. glutamicum*.

After this time, the cultures were centrifuged (23,635 rcf, 5 min, 4 °C) (Sigma 3-18KS, Polygen), and the bacterial pellet was washed with 0.9% NaCl solution and stored at – 80 °C. To determine the number of cells, the bacterial pellet was lyophilized (ScanvacCoolsave, Labogene). Before extraction, 10 mg of each sample was weighed in tubes (Eppendorf). The entire protocol was repeated for each strain, and each disintegration method was performed five times.

Extraction, disintegration and samples preparation. Ten milligrams of lyophilized cells were suspended in 500 µl of methanol (LiChrosolv) and 500 µl of water (LiChrosolv). To compare the effectiveness of disintegration methods, we chose three methods. In the first case, sonication was used. The samples were sonicated for 5 min in a 15 s/15 s cycle (Microson Ultrasonic Cell Disruptor, Mison). The second method used a sand mill. For each sample, 0.5 mL of 0.5 mm glass balls (Carl Roth GmbH + Co. KG) was added and homogenized in 9 cycles of 60 s/60 s (FastPrep-24 5G Sample Preparation System, M. P. Biomedicals). In the third method of disintegration, a tissue lyser was used (Tissue Lyser II, Qiagen). Samples were homogenized for 10 min at 30 1/s frequency. Each sample was performed in five replicates.

After disintegration, the samples were centrifuged (2100 rcf, 10 min, 4 °C) (Micro 220R, Hettich), and 720 µl of the clarified upper phase was transferred into a new tube (Bionovo). The extracts were evaporated in a vacuum centrifuge (40 °C, 1500 rpm, 8 h) (WP-03, JWElectronic). In the next step, 600 µl of PBS buffer (0.5 M, 10% D₂O, 1 g NaN₃, pH = 7.0, TSP = 0.3 mM) was added to each sample and mixed for 3 min. The obtained samples were centrifuged (21,000 rcf, 10 min, 4 °C), and 550 µl was transferred into 5-mm NMR tubes (5SP, Armar Chemicals) for measurement. Until the measurements were taken, the samples were stored at 4 °C.

The experimental scheme is shown below (Fig. 1).

¹H NMR spectroscopy analysis of the bacterial metabolites. Standard one-dimensional ¹H NMR experiments were performed on a Bruker AVANCE II 600.58 MHz spectrometer. All one-dimensional ¹H NMR spectra were obtained using the *cpmgpr1d* pulse sequence (in Bruker notation) by the suppression of water resonance through presaturation. The acquisition parameters were as follows: spectral width, 20.01 ppm; the number of scans, 128; relaxation delay, 3.5 s; total spin-echo delay, 0.001 s; acquisition time, 2.72 s; selective irradiation of the water resonance signal, 4.712 ppm; and time-domain points, 64 K. Before Fourier transformation, the FIDs were multiplied by an exponential function equivalent to that of a 0.3 Hz line-broadening factor. The spectra were referenced to the TSP resonance at 0.0 ppm and manually corrected for the phase and baseline (MestReNova v. 11.0.3).

Concentration counting and metabolites identification. All spectra were exported to Matlab (Matlab v. 8.3.0.532) for preprocessing. For ¹H NMR signal identification and counting the metabolite concentration,

Metabolite	G(+)			G(-)		
	BC	CG	EF	EC	KP	PA
5-Aminopentanoate	–	–	–	–	–	2.90E-02
4-Aminobutyrate	7.57E-01	1.21E-01 [#]	4.94E-03	7.33E-01 [#]	5.39E-02 [#]	–
Acetate	1.90E-01	2.72E-01	8.56E-04	8.65E-03[#]	3.52E-04	7.30E-05
Adenine	2.91E-01 [#]	8.42E-03	–	–	2.05E-01	–
Adenosine	8.31E-02	–	9.02E-03	1.93E-03[#]	1.14E-01 [#]	–
Alanine	3.43E-03	7.99E-01	1.28E-03	3.88E-02[#]	4.24E-02[#]	5.62E-04
AMP	–	9.23E-02	5.47E-02 [#]	8.08E-03[#]	–	3.57E-01
Asparagine	–	–	1.17E-01	–	–	–
Aspartate	5.70E-01	6.31E-01	1.05E-01	–	–	3.72E-01
Betaine	7.62E-01	5.19E-01	6.82E-01	–	8.88E-01	8.05E-02 [#]
Cholate	5.09E-02	2.99E-03[#]	1.45E-01 [#]	1.93E-02[#]	2.53E-02	3.65E-02[#]
Formate	3.48E-02	1.17E-07	1.98E-01	4.00E-02[#]	9.85E-01 [#]	1.91E-03[#]
Fumarate	–	–	–	–	8.06E-01	–
Glutamate	7.56E-01	4.48E-01	2.33E-01	–	–	2.72E-01
Glutamine	–	–	7.09E-01	–	–	–
Glycine	1.04E-01 [#]	6.78E-01	1.37E-01 [#]	9.44E-03[#]	2.31E-02	4.02E-01
Histidine	9.21E-01	5.25E-03[#]	1.40E-01 [#]	4.03E-01 [#]	6.14E-02	–
Inosine	5.21E-02	3.54E-02[#]	1.24E-02	–	–	–
Isocitrate	–	–	–	–	–	1.06E-02[#]
Isoleucine	1.90E-01	6.26E-01	1.78E-01	9.97E-02 [#]	1.18E-01	8.24E-01
Lactate	3.55E-01	9.35E-03	5.41E-01	1.83E-02[#]	7.66E-01	2.68E-01
Leucine	5.48E-01	1.54E-01	1.82E-01 [#]	1.25E-01 [#]	2.46E-01	6.43E-02
Lysine	6.97E-01	9.14E-01 [#]	4.93E-03	1.28E-02[#]	3.80E-02[#]	4.49E-06
Methionine	5.90E-05	9.63E-03[#]	3.07E-03[#]	1.07E-15[#]	3.68E-03	5.92E-04
NAD+	9.97E-02 [#]	1.79E-02	2.30E-01 [#]	7.11E-03[#]	3.66E-02	4.62E-01
Nicotinate	–	–	–	–	2.30E-01 [#]	–
O-Phosphocholine	4.58E-02	2.06E-01	5.93E-01	2.00E-02[#]	3.20E-01 [#]	5.36E-03
Oxypurinol	5.48E-02	8.25E-03	–	–	4.06E-01	–
Phenylalanine	3.00E-01	9.22E-01	8.05E-01	9.14E-01 [#]	4.24E-01	2.95E-01
Propyleneglycol	7.81E-03	–	–	–	1.37E-01	–
Pyruvate	4.12E-01	5.08E-01	4.53E-02[#]	3.07E-03[#]	3.25E-01 [#]	5.78E-01
Sarcosine	4.47E-03[#]	9.91E-01	1.10E-02	–	1.12E-01	1.53E-01
Succinate	6.80E-01	4.16E-01	4.39E-01	6.13E-02 [#]	3.68E-01 [#]	2.87E-01
Threonine	9.18E-01	4.39E-01	9.05E-01	1.68E-01 [#]	6.77E-01 [#]	1.38E-01
Trehalose	–	5.10E-01 [#]	–	–	–	–
Tyramine	9.05E-01	7.50E-01	5.65E-01	–	2.93E-01	3.53E-01
Tyrosine	4.00E-01	9.22E-01	4.62E-01	–	3.67E-01	5.59E-01
UDP-glucose	7.57E-01	4.63E-01	–	6.99E-03[#]	–	–
Uracil	5.59E-01	–	–	2.31E-01 [#]	9.64E-01	1.45E-01
Uridine	1.00E-02	–	–	–	–	–
Valine	1.88E-01	4.48E-01	2.72E-01	5.39E-02 [#]	5.31E-02 [#]	2.24E-01
β-Alanine	8.99E-01	8.99E-01	–	–	–	–

Table 2. The p-values resulting from analysis of variance between three disintegration methods in each bacteria strain (BC—*B. cereus*; CG—*C. glutamicum*; EF—*E. faecalis*; EC—*E. coli*; KP—*K. pneumoniae*; PA—*P. aeruginosa*). [#]Kruskal–Wallis test; bold—results with p-value < 0.05.

Chenomx NMR Analysis Software (NMR suite v. 8.5, Chenomx Inc.) was used. The concentration of each compound was calculated by comparison to a reference signal—TSP with a known concentration of 0.3 mM. The metabolites for each strain were also checked in the KEGG database.

Statistical data analysis. Statistical analysis was done in R software (version 4.1.0) with gplots package (version 3.1.1). For all repetitions, distribution normality of data was tested with Shapiro–Wilk method, equity of variance was checked with Bartlett's test. The repetitions were also checked with the Dixon test to see if one outlier value can be rejected. In comparison among bacteria strains and disintegration method, assumptions variance analysis with ANOVA method, followed by post hoc analysis with HSD Tukey test were done for data samples fitting. For other data, Kruskal–Wallis alternative test was used, followed by the Wilcoxon signed-rank

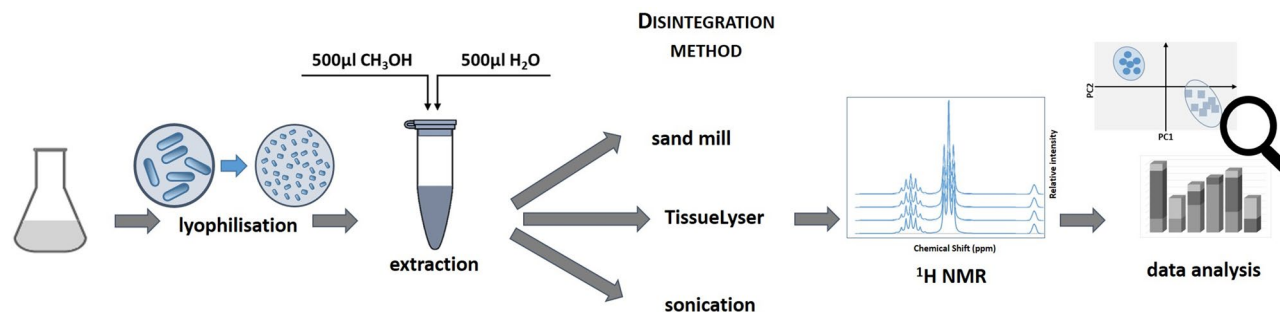


Figure 1. The experiment scheme.

test for individual pairs of data sets with p-value correction according to the Benjamini–Hochberg procedure. Statistical significance was assumed at the p-value < 0.05. Additionally, the heatmap for each sample was generated. For this analysis, function 'heatmap.2' was used with default settings for hierarchical clustering.

Multivariate data analysis. Multivariate data analysis was performed on a set of the assigned metabolites. To compare all samples—17 metabolites present in all samples were used (acetate, alanine, cholate, formate, glycine, isoleucine, lactate, lysine, leucine, methionine, NAD⁺, o-phosphocholine, phenylalanine, pyruvate, succinate, threonine, and valine). For comparison of gram-negative strains—18 metabolites common for this bacteria were used (uracil in addition to previously described metabolites). For comparison between gram-positive strains—26 metabolites common for this bacteria were used (compounds common for all strains and 4-aminobutyrate, aspartate, betaine, glutamate, histidine, inosine, sarcosine, tyramine, and tyrosine). The input for SIMCA-P (v 17.0, Umetrics, Umeå, Sweden) software was a transformed data matrix consisting of metabolite concentrations for each sample. The data sets were scaled using UV scaling before the chemometric analysis. For bacteria strains classification, principal component analysis (PCA) was carried out.

Results

Metabolites identification and concentration. On the obtained spectra, in total, 43 metabolites were identified. Not all metabolites were found in the spectrum of each strain. Eighteen common metabolites were identified for all 6 strains (acetate, alanine, cholate, formate, glycine, isoleucine, lactate, leucine, lysine, methionine, methanol, NAD⁺, o-phosphocholine, phenylalanine, pyruvate, succinate, threonine, valine). Some of the metabolites were identified for only one strain (in the *P. aeruginosa* spectrum: 5-aminopentanoate and isocitrate; in the *E. faecalis* spectrum: asparagine and glutamine; in the *B. cereus* spectrum: uridine and β-alanine; in the *K. pneumoniae* spectrum: fumarate and nicotinate; in the *C. glutamicum* spectrum: trehalose). Other metabolites (4-aminobutyrate, adenine, adenosine, AMP, aspartate, betaine, glutamate, histidine, inosine, sarcosine, tyramine, oxypurinol, tyrosine, UDP-glucose, propylene glycol, uracil) have been identified in several strains.

Representative ¹H NMR spectra obtained from different bacteria strains with marked identified metabolites are presented below (Fig. 2). A more detailed representation of the identified peaks for each of the tested strains is available in the supplementary materials (Figures S2, S3), where information about the chemical shift for each metabolite are deposited in Table S1.

In *E. coli* strain 23 metabolites were identified, while in *B. cereus*—34 and in *C. glutamicum*—31. The number of identified metabolites in *E. faecalis* and *K. pneumoniae* was 30. In *P. aeruginosa* 28 metabolites were identified. For each sample, the concentration of the metabolites was calculated. The cell disruption method did not affect the number of identified metabolites. The data about average concentration with the standard deviation are presented in the supplementary materials (Tables S2, S3).

Methods comparison—statistical analysis. The changes in the metabolite concentrations, which depend on the disintegration methods are present on the heatmap (Fig. 3). Hierarchical clustering of average metabolite concentrations resulted in the grouping of samples from individual species in separate clusters. Furthermore, this analysis revealed that for *K. pneumoniae*, *E. coli*, and *E. faecalis* the most differentiating method is sand mill. The tissue lyser was the most distinguishing method in *P. aeruginosa* and *C. glutamicum* strain, while for *B. cereus*—sonication was different from the other disintegration processes.

The results obtained on the heat-map (Fig. 3) should be analyzed together with statistical analysis results (Table 2). This analysis was performed to find out the differences between the three disintegration methods for each strain.

Among all metabolites identified for *B. cereus*, the statistically significant differences between disintegration methods were obtained for alanine, formate, methionine, o-phosphocholine, propylene glycol, sarcosine, and uridine. Comparing the metabolite concentrations obtained by three different methods for *Bacillus cereus* samples showed that the highest average concentrations of 25 metabolites were found after using the tissue lyser instrument, accounting almost 74% of all identified metabolites in this strain. However, only in the case of sarcosine, the difference was statistically significant. Sonication of *B. cereus* samples allowed us to obtain the highest concentration for two metabolites and was statistically significant only for formate. The sand mill gave the highest yield of extraction for other metabolites, and the difference was statistically significant for alanine and methionine.

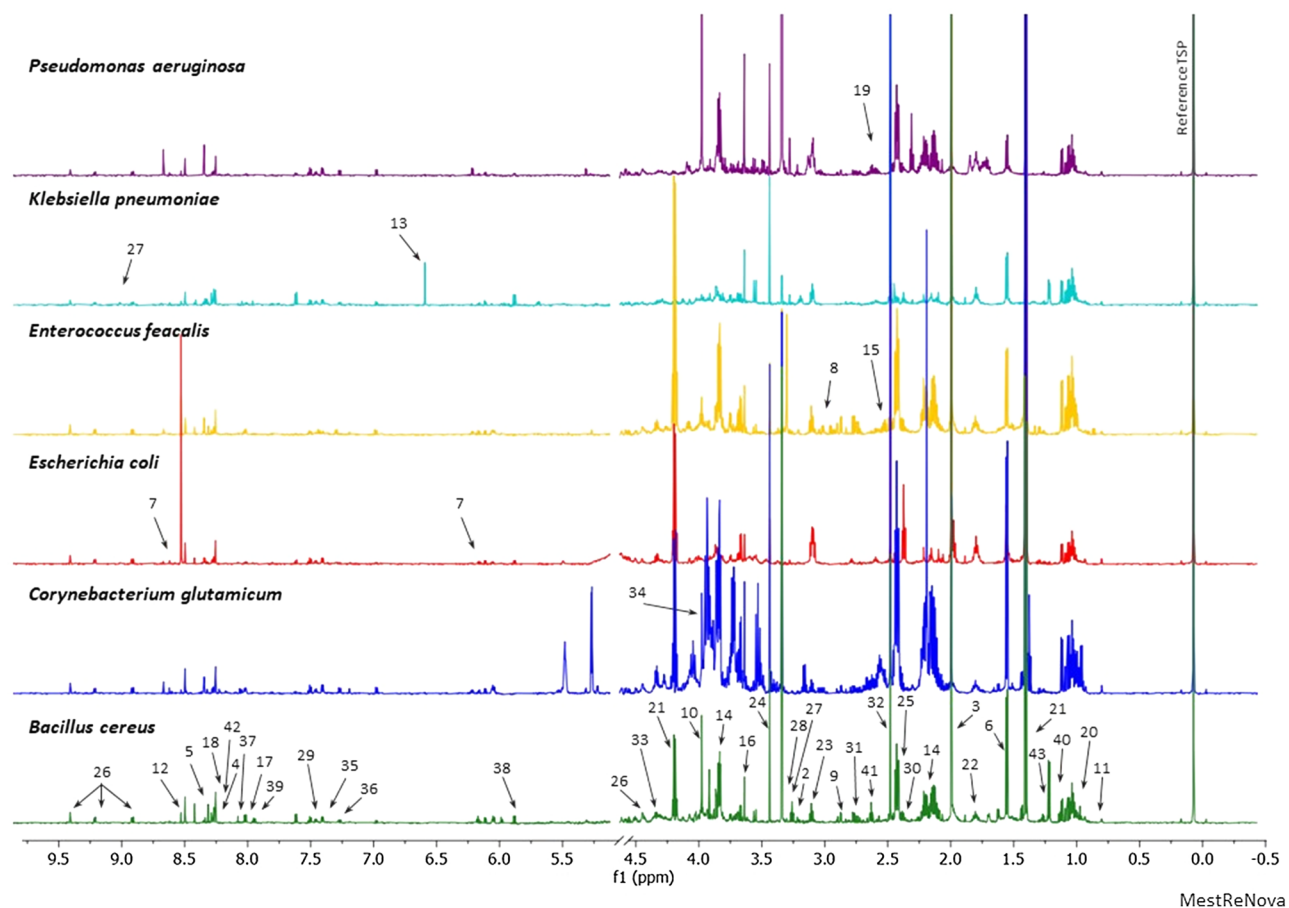


Figure 2. The representative 1D ^1H NMR cpmgpr1d spectra obtained from different bacteria strains. (1: 5-aminopentanoate; 2: 4-aminobutyrate; 3: acetate; 4: adenine; 5: adenosine; 6: alanine; 7: AMP; 8: asparagine; 9: aspartate; 10: betaine; 11: cholate; 12: formate; 13: fumarate; 14: glutamate; 15: glutamine; 16: glycine; 17: histidine; 18: inosine; 19: isocitrate; 20: isoleucine; 21: lactate; 22: leucine; 23: lysine; 24: methanol; 25: methionine; 26: NAD $^+$; 27: nicotinate; 28: O-phosphocholine; 29: phenylalanine; 30: pyruvate; 31: sarcosine; 32: succinate; 33: threonine; 34: trehalose; 35: tyramine; 36: tyrosine; 37: UDP-glucose; 38: uracil; 39: uridine; 40: valine; 41: β -alanine; 42: oxypurinol; 43: propylene glycol).

In gram-positive species, *Enterococcus faecalis*, statistically significant differences between disintegration methods were found for nine metabolites—4-aminobutyrate, acetate, adenine, alanine, lysine, methionine, pyruvate, and sarcosine. Disintegration using a sand mill gave the highest concentrations for twenty-six compounds, accounting almost 87% of all identified metabolites. Eight metabolites were statistically significant. Sonication gave the highest concentration in the case of three metabolites, but only sarcosine turned out to be significant. Tissue lyser use gave the highest amount of phenylalanine.

The analysis of the third gram-positive strain, *Corynebacterium glutamicum*, showed that the statistically significant differences between disintegration methods were obtained for nine metabolites—adenine, cholate, formate, histidine, inosine, lactate, methionine, NAD $^+$, and oxypurinol. Sonication gave the highest concentration of most of the identified metabolites—twenty, which consist more than 64% of all identified metabolites, but the statistical importance was obtained for six compounds. The tissue lyser yielded the highest concentration for six metabolites, among which three were statistically different. Additionally, five metabolites were found at the highest level when the sand mill was used, but no one was statistically important.

When we compared the metabolite concentrations in *Escherichia coli* samples, the highest concentrations of eleven metabolites were obtained after sand milling. Among these compounds, seven were statistically significant—acetate, adenosine, alanine, AMP, glycine, lysine, and pyruvate. Sonication and tissue lyser of these samples allowed us to obtain the highest concentrations for six metabolites. For sonication, four metabolites were statistically significant (cholate, lactate, methionine, and NAD $^+$), when tissue lyser gives only two differentiating metabolites—formate and o-phosphocholine.

In the case of a different gram-negative strain, *Pseudomonas aeruginosa*, the statistically significant differences between disintegration methods were obtained for nine—5-aminopentanoate, acetate, alanine, cholate, formate, isocitrate, lysine, methionine, and o-phosphocholine. For almost all identified metabolites, disintegration using sonication yielded the highest concentrations. It is 19 metabolites, which consist almost 68% of all identified metabolites in this strain, among which seven were statistically significant. The tissue lyser yielded the highest

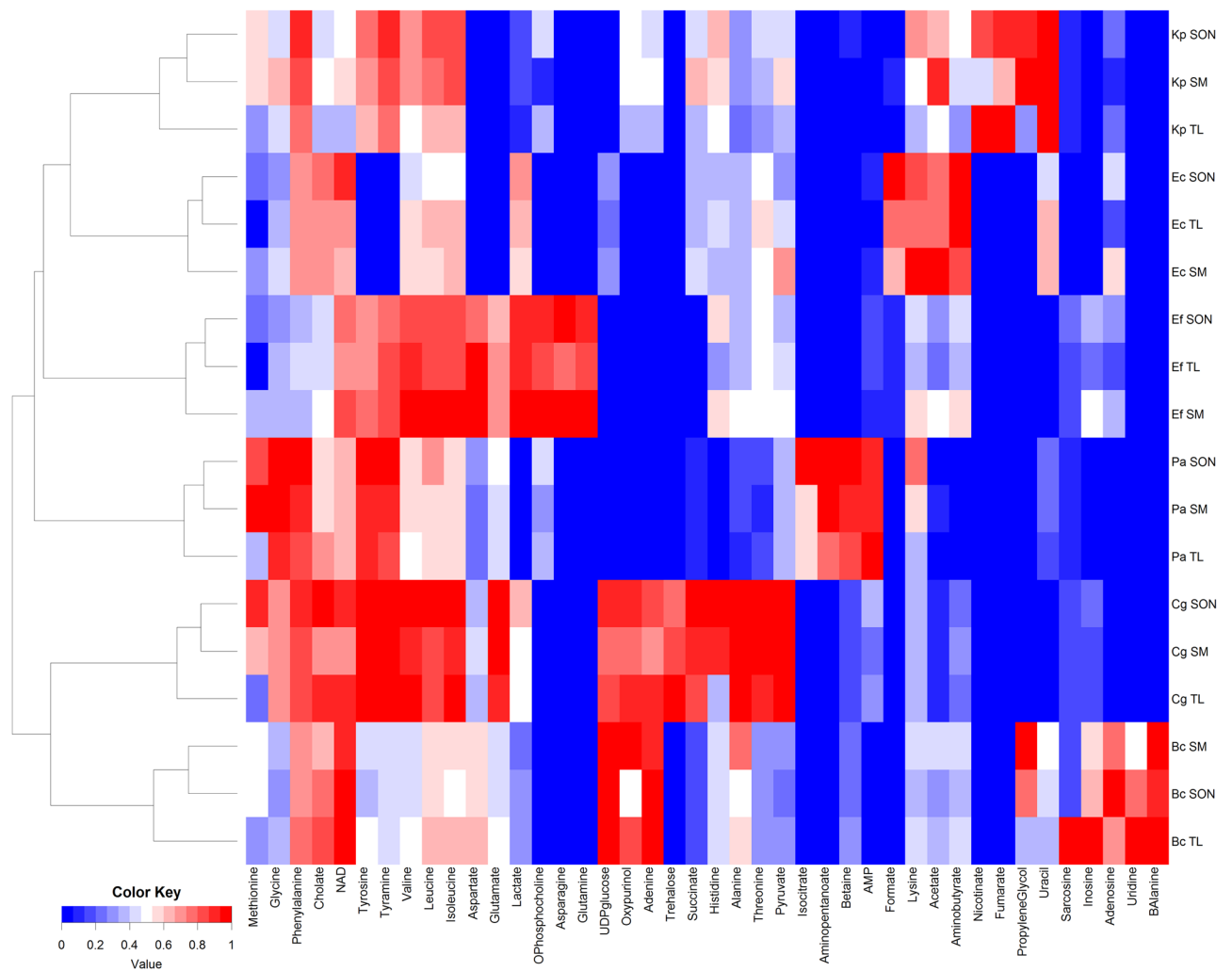


Figure 3. Heat-map comparing the average concentration of metabolites. The heat map was generated by hierarchical clustering analysis (HCA) of all identified metabolites. Red color represents high metabolite concentration and intense blue color represents very low metabolite concentration or metabolite absence (SM—sand mill; TL—tissue lyser; SON—sonication; BC—*B. cereus*; CG—*C. glutamicum*; EF—*E. fecalis*; EC—*E. coli*; KP—*K. pneumoniae*; PA—*P. aeruginosa*).

concentration for three metabolites, but only cholate was statistically significant. Sand milling yielded the highest amounts of six metabolites, but the result was statistically significant for acetate.

Analysis of the third gram-negative strain, *Klebsiella pneumoniae*, allowed to obtain seven statistically important metabolites—acetate, alanine, cholate, glycine, lysine, methionine, and NAD⁺. Sonication yielded the highest concentrations of sixteen identified metabolites, of which three were statistically important. The tissue lyser enabled us to obtain the highest concentrations of three metabolites, no one of them was significant. When the sand mill was used, the highest concentrations of eleven metabolites were found. However, only four of them were statistically important.

To investigate if all disintegration methods give the same information about the average concentration relation and statistical comparison among gram-positive and gram-negative strains, additional analyses were performed.

In the group of gram-negative strains, the all average level ratio of common metabolites was almost the same in acetate, alanine, cholate, formate, glycine, lactate, leucine, lysine, methionine, NAD⁺, o-phosphocholine, phenylalanine, succinate, threonine, and uracil. Three metabolites had different relations of the concentration average— isoleucine, pyruvate, valine. Statistical analysis performed on one disintegration method allowed to obtain many statistical importance differences between strains, but the results are not similar in each disintegration method. Detailed information about these analyses is available in supplementary materials (Table S4).

Analogical analyses were performed for gram-positive strains. In this case, the average concentration relation wasn't the same in almost half of the common metabolites. Also for statistical analyses performed on one disintegration method, the statistical important metabolites are not similar in each disintegration method. Detailed information about analyses performed in gram-positive strains is available in supplementary materials (Table S5).

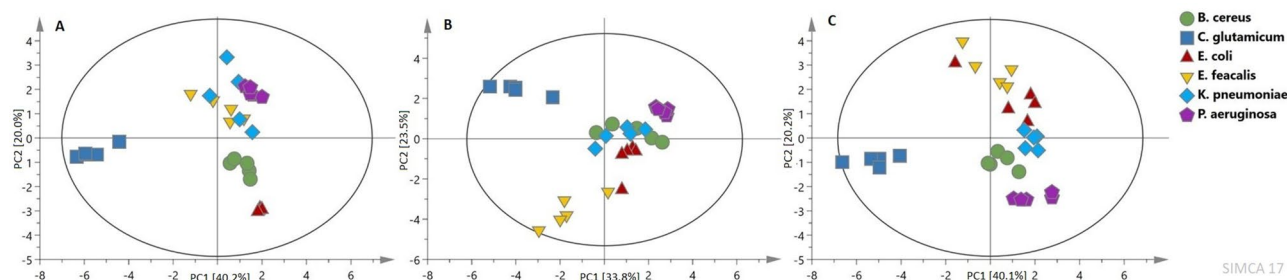


Figure 4. PCA score plots for each one disintegration method for all strains: (A) sonication, (B) sand mill, (C) tissue lyser.

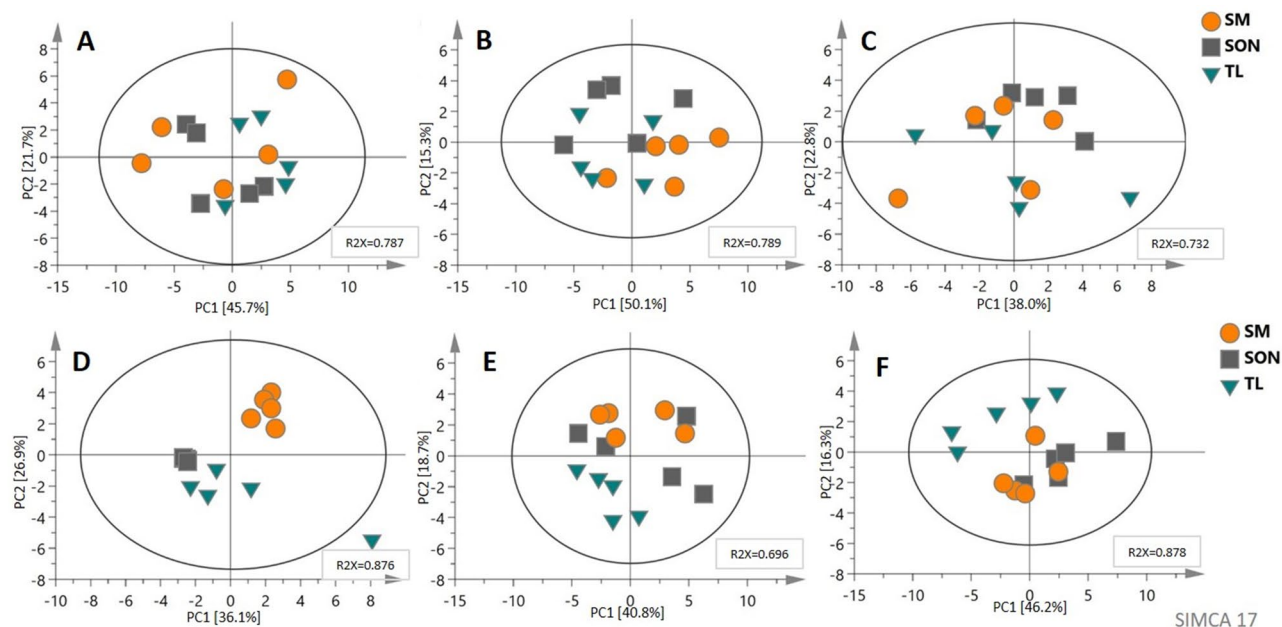


Figure 5. PCA models for separate analysis of each single bacterium strain. (A) *B. cereus*; (B) *E. feacalis*; (C) *C. glutamicum*; (D) *E. coli*; (E) *K. pneumoniae*; (F) *P. aeruginosa* (SM—sand mill; SON—sonication; TL—tissue lyser).

Multivariate data analysis. Multivariate data analyses were performed to compare disintegration methods for different bacteria strains. PCA score plots show how disintegration methods influence multivariate data analysis. This unsupervised comparison allowed to obtain grouping of samples according to the type of micro-organism for each disintegration method. It is worth to mentioning that this type of chemometric analysis distinctively reflects the similarities and differences of the cell disruption method on studied bacterial strands. The PCA model for the samples subjected to sonication was prepared based on seven PCs with the total variance in the data equal 0.982. The sand mill model consists of six PCs and with an R2X value of 0.955, while the tissue lyser model consists of two PCs and with an R2X value equal 0.603 (Fig. 4).

The results showed, that each of the used disintegration methods can be applied in metabolomics studies, but for the data preparation only one of them should be chosen.

Besides comparison on all strains, the analyzes were conducted among the limited data. One of them is the comparisons made separately for the gram-positive strains and gram-negative strains. In this case, we can observe the clear separation of each strain comparing samples together and separately for each disintegration method, while PCA analysis is performed. The models and their parameters are available in supplementary materials (Figure S4).

Additionally, multivariate analyses for each strain separately were prepared to obtained information about samples grouping for different disintegration methods. These results showed that among all strains, we can observe distinguished groups for the disintegration method only in *E. coli*, while for some other strains the clustering trends are outlined. The remaining PCA analyzes performed for the single bacterium illustrate that samples prepared with different disintegration methods are similar or overlap (Fig. 5).

Discussion

The adequately prepared protocols are essential in research studies. In metabolomics, the fundamental issue is the sample preparation, which allows performing reliable analyzes.

Many protocols are based on cell disintegration—this step is especially important when intracellular metabolites analyses are performed. To compare the differences between the disruption method, six bacteria strains were used in the study—three gram-positive strains and three gram-negative strains. LB medium used for bacterial cultivation was additionally enriched with 0.5% glucose to obtain better biomass growth, which allowed to obtain enough material for analyses. These changes were necessary because some strains are growing very poorly, and the typical LB medium does not allow to obtain the required weight of the lyophilisate. Additionally, for each strain, growth curves were prepared. During bacterial growth, changes in bacterial metabolism occurred, and these results allowed to determine when all examined bacterial strains were in the logarithmic growth phase. In this phase, the division of bacteria is continuous at a constant rate, and the number of cells increases exponentially. Furthermore, the bacterial population in this phase is nearly uniform in terms of their number, chemical composition, other physiological properties of the cell, and metabolic activity^{35,36}.

The extraction procedure was performed on lyophilized samples, giving us the possibility to accurately determine each sample's biomass. The methodological advantages of this bacterial preparation form for metabolomic applications are the possibility of longer storage/transport, ease of measuring the same number of cells (mass provides sufficient information), and reduction of the extraction scale (this involves a large number of samples that are compared in metabolomics)^{37,38}.

In metabolomics studies, many different solvents and procedures are using for sample preparation. We decided to use for extraction water and methanol. The use of polar solvents allowed us to obtain a wide range of compounds in the samples. Additionally, from the practical preparation way, this method seems to be for us the most proper.

The conducted experiment confirmed that each of the disintegration methods allows obtaining similar metabolites in samples of the same strains. The obtained differences are likely due to the different cell wall structures. As described above, the difference in the cell wall structure between gram-negative and gram-positive bacteria is obvious and influences mechanical resistance²⁶. If we compare these two groups of bacteria, gram-negative bacteria have a relatively thin layer of peptidoglycan, and the cell wall can be destroyed by the action of pressure^{30,31}.

It is hard to define if a given disintegration method the best for a specific bacteria strain. Among all investigated strains, the identified metabolites concentrations were different for different disruption methods. In all cases, most metabolites' level was the highest for one of the disruption methods, but there is no strain in which we obtained the highest concentration for one disruption method. For example, in *E. faecalis*, almost 87% of metabolites had the highest concentration when the sand mill was used, but some had the highest concentration after sonication or tissue lyser use. We can observe in *B. cereus* in the analogical situation that almost 74% of the highest concentrations were obtained with tissue lyser (Tables S2 and S3). These results can be helpful in targeted analysis, where a specific group of compounds or individual metabolites should be studied. If one specific compound should be investigated, it is worth checking if some commonly used disintegration methods can yield the highest concentration. In many cases, the differences between obtained concentrations are not significant, but these differences are essential for some compounds and can influence the analysis. This fact clearly showed the importance, in metabolomics studies, of correct and consistent sample preparation. During data interpretation, we must remember about a limited number of biological repetitions. It is possible that experimenting with more repetitions for each sample would give a more accurate result.

Multivariate data analyses are typical for metabolomics studies. The untargeted method (PCA) performed on all microorganism samples, allowed us to obtain the natural strains grouping (Fig. 3). The analogical results were obtained, where the disintegration methods were compared separately. In all cases, the distinction of bacteria strains is possible (Fig. 4). These results and many published results indicate that NMR can be useful for identifying and distinguishing bacterial strains; however, MS is currently more widely used^{2,10,39}. This finding indicates that each bacterial strain has its metabolomic qualitative profile regardless of the disruption method (only the metabolite concentrations change).

The same results—clearly natural grouping of samples for each strain—can be observed when gram-positive and gram-negative strains are compared (regardless of the disintegration method chosen) (Figure S4). Besides the comparison of different bacteria strains depending on the disruption methods, the PCA models comparing the disintegration methods for each strain were performed (Fig. 5). Among all comparisons only in *E. coli* showed a clear grouping of samples depending on the disruption methods, where the most metabolites showed statistical importance. These results showed that all from the used disruption method can be useful for untargeted metabolomics analysis. Additionally, these results can allow the selection of the best method of sample preparation to analyze specific compounds, which are important in targeted metabolomics.

Conclusions

The performed experiments provide results that can be used in different areas of microbial metabolomics experiments and demonstrated the importance of accurately chosen sample preparing protocols. Our findings confirms that the disintegration method impacts the extraction quality (thus, comparing samples prepared by different methods may lead to false results) and should be selected for specific bacterial microorganisms. It is worth to mention that the disintegration methods do not influence the qualitative profile of intracellular microbial metabolites changing only their concentration.

Received: 8 February 2021; Accepted: 13 September 2021

Published online: 21 October 2021

References

- Mielko, K. A. *et al.* Metabolomic studies of *Pseudomonas aeruginosa*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **35**(11), 1–11 (2019).
- Gupta, A., Dwivedi, M., Mahdi, A. A., Khetrapal, C. L. & Bhandari, M. Broad identification of bacterial type in urinary tract infection using 1H NMR spectroscopy. *J. Proteome Res.* **11**(3), 1844–1854 (2012).
- Halouska, S. *et al.* Revisiting protocols for the NMR analysis of bacterial metabolomes. *J. Integr. OMICS.* **3**(2), 120 (2013).
- Varshavi, D. *et al.* A guide to the identification of metabolites in NMR-based metabolomics/metabonomics experiments. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* **14**, 135–153 (2016).
- Duportet, X., Aggio, R. B. M., Carneiro, S. & Villas-Bóas, S. G. The biological interpretation of metabolomic data can be misled by the extraction method used. *Metabolomics* **8**(3), 410–421 (2012).
- Han, M.-L. *et al.* Comparative metabolomics and transcriptomics reveal multiple pathways associated with polymyxin killing in *Pseudomonas aeruginosa*. *mSystems* **4**(1), e00149-18 (2019).
- Frimmersdorf, E., Horatzek, S., Pelnikevich, A., Wiehlmann, L. & Schomburg, D. How *Pseudomonas aeruginosa* adapts to various environments: A metabolomic approach. *Environ. Microbiol.* **12**(6), 1734–1747 (2010).
- Klockgether, J. *et al.* Intracolon diversity of the *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis airway isolates TBCF10839 and TBCF121838: Distinct signatures of transcriptome, proteome, metabolome, adherence and pathogenicity despite an almost identical genome sequence. *Environ. Microbiol.* **15**(1), 191–210 (2013).
- De Smet, J. *et al.* High coverage metabolomics analysis reveals phage-specific alterations to *Pseudomonas aeruginosa* physiology during infection. *ISME J.* **10**(8), 1823–1835 (2016).
- Mielko, K. A. *et al.* Possible metabolic switch between environmental and pathogenic *Pseudomonas aeruginosa* strains: 1H NMR based metabolomics study. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **188**, 113369 (2020).
- Foschi, C. *et al.* Impact of meropenem on *Klebsiella pneumoniae* metabolism. *PLoS ONE* **13**(11), e0207478 (2018).
- Wang, M., Liu, L., Fan, L. & Tan, T. CRISPRi based system for enhancing 1-butanol production in engineered *Klebsiella pneumoniae*. *Process Biochem.* **56**, 139–146 (2017).
- Low, Y. M. *et al.* Genotypic and metabolic approaches towards the segregation of *Klebsiella pneumoniae* strains producing different antibiotic resistant enzymes. *Metabolomics* **13**(5), 65 (2017).
- Ding, M. Z., Wang, X., Yang, Y. & Yuan, Y. J. Comparative metabolic profiling of parental and inhibitors-tolerant yeasts during lignocellulosic ethanol fermentation. *Metabolomics* **8**(2), 232–243 (2012).
- Ding, M.-Z., Zou, Y., Song, H. & Yuan, Y.-J. Metabolomic analysis of cooperative adaptation between co-cultured *Bacillus cereus* and *Ketogulonicigenium vulgare*. *PLoS ONE* **9**(4), e94889 (2014).
- Krömer, J. O., Sorgenfrei, O., Klopprogge, K., Heinzle, E. & Wittmann, C. In-depth profiling of lysine-producing *Corynebacterium glutamicum* by combined analysis of the transcriptome, metabolome, and fluxome. *J. Bacteriol.* **186**(6), 1769–1784 (2004).
- Buchinger, S. *et al.* A combination of metabolome and transcriptome analyses reveals new targets of the *Corynebacterium glutamicum* nitrogen regulator AmtR. *J. Biotechnol.* **140**(1–2), 68–74 (2009).
- Bartek, T., Makus, P., Klein, B., Lang, S. & Oldiges, M. Influence of L-isoleucine and pantothenate auxotrophy for L-valine formation in *Corynebacterium glutamicum* revisited by metabolome analyses. *Bioprocess Biosyst. Eng.* **31**(3), 217–225 (2008).
- Portela, C. A. F., Smart, K. F., Tumanov, S., Cook, G. M. & Villas-Bóas, S. G. Global metabolic response of *Enterococcus faecalis* to oxygen. *J. Bacteriol.* **196**(11), 2012–2022 (2014).
- Lin, Y. *et al.* Comparative metabolomics shows the metabolic profiles fluctuate in multi-drug resistant *Escherichia coli* strains. *J. Proteomics* **207**, 103468 (2019).
- Chen, L. *et al.* Metabolic characterisation of eight *Escherichia coli* strains including ‘Big Six’ and acidic responses of selected strains revealed by NMR spectroscopy. *Food Microbiol.* **88**, 2020 (2019).
- Clark, D. P. & Beard, J. P. Altered phospholipid composition in mutants of *Escherichia coli* sensitive or resistant to organic solvents. *J. Gen. Microbiol.* **113**(2), 267–274 (1979).
- Filip, C., Fletcher, G., Wulff, J. L. & Earhart, C. F. Solubilization of the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli* by the ionic detergent sodium-lauryl sarcosinate. *J. Bacteriol.* **115**(3), 717–722 (1973).
- Demchick, P. & Koch, A. L. The permeability of the wall fabric of *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **178**(3), 768–773 (1996).
- Vollmer, W. & Bertsche, U. Murein (peptidoglycan) structure, architecture and biosynthesis in *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **1778**(9), 1714–1734 (2008).
- Kelemen, M. V. & Sharpe, J. E. Controlled cell disruption: A comparison of the forces required to disrupt different micro-organisms. *J. Cell Sci.* **35**, 431–441 (1979).
- Boneca, I. G., Huang, Z.-H., Gage, D. A. & Tomasz, A. Characterization of *Staphylococcus aureus* cell wall glycan strands, evidence for a new β -N-acetylglucosaminidase activity. *J. Biol. Chem.* **275**(14), 9910–9918 (2000).
- Touhami, A., Jericho, M. H. & Beveridge, T. J. Atomic force microscopy of cell growth and division in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **186**(11), 3286–3295 (2004).
- Hayhurst, E. J., Kailas, L., Hobbs, J. K. & Foster, S. J. Cell wall peptidoglycan architecture in *Bacillus subtilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **105**(38), 14603–14608 (2008).
- Chisti, Y. & Moo-Young, M. Disruption of microbial cells for intracellular products. *Enzyme Microb. Technol.* **8**(4), 194–204 (1986).
- Gomes, T. A., Zanette, C. M. & Spier, M. R. An overview of cell disruption methods for intracellular biomolecules recovery. *Prep. Biochem. Biotechnol.* **50**(7), 635–654 (2020).
- Welker, M., Van Belkum, A., Girard, V., Charrier, J. P. & Pincus, D. An update on the routine application of MALDI-TOF MS in clinical microbiology. *Expert Rev. Proteomics* **16**(8), 695–710 (2019).
- Bujak, R., Struck-Lewicka, W., Markuszewski, M. J. & Kalisz, R. Metabolomics for laboratory diagnostics. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **113**, 108–120 (2015).
- Zhang, G. F., Sadhukhan, S., Tochtrop, G. P. & Brunengraber, H. Metabolomics, pathway regulation, and pathway discovery. *J. Biol. Chem.* **286**(27), 23631–23635 (2011).
- Schlegel, H. & Zaborosch, C. *General Microbiology* 120–149 (1993).
- Gary Keiser. 1: Fundamentals of Microbiology—Biology LibreTexts. [https://bio.libretexts.org/Bookshelves/Microbiology/Book%3A_Microbiology_\(Kaiser\)/Unit_1%3A_Introduction_to_Microbiology_and_Prokaryotic_Cell_Anatomy/1%3A_Fundamentals_of_Microbiology](https://bio.libretexts.org/Bookshelves/Microbiology/Book%3A_Microbiology_(Kaiser)/Unit_1%3A_Introduction_to_Microbiology_and_Prokaryotic_Cell_Anatomy/1%3A_Fundamentals_of_Microbiology). Accessed 23 Nov 2020.
- Nireesha, G. R. *et al.* Lyophilization/freezing—An review. *Int. J. Novel Trends Pharm. Sci.* **3**(4), 87–98 (2013).
- Shukla, S. Freeze drying process: A review. *Int. J. Pharm. Sci. Res.* **2**(12), 3061–3068 (2011).
- Palama, T. L. *et al.* Identification of bacterial species by untargeted NMR spectroscopy of the exo-metabolome. *Analyst* **141**, 4558–4561 (2016).

Author contributions

K.A.M. and S.J.: design of work, analysis, interpretation of data, wrote the main manuscript text; M.L. and P.M. supervised the research. All authors reviewed the manuscript.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41598-021-99873-x>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to P.M.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2021

Comparison of bacteria disintegration methods and their influence on data analysis in metabolomics

Karolina Anna Mielko¹, Sławomir Jabłoński², Marcin Łukaszewicz², Piotr Młynarz^{1*}

¹ Department of Biochemistry, Molecular Biology and Biotechnology, Faculty of Chemistry, Wrocław University of Science and Technology;

² Biotransformation Department, Faculty of Biotechnology, University of Wrocław

*corresponding author: piotr.mlynarz@pwr.edu.pl

SUPPLEMENTARY MATERIALS

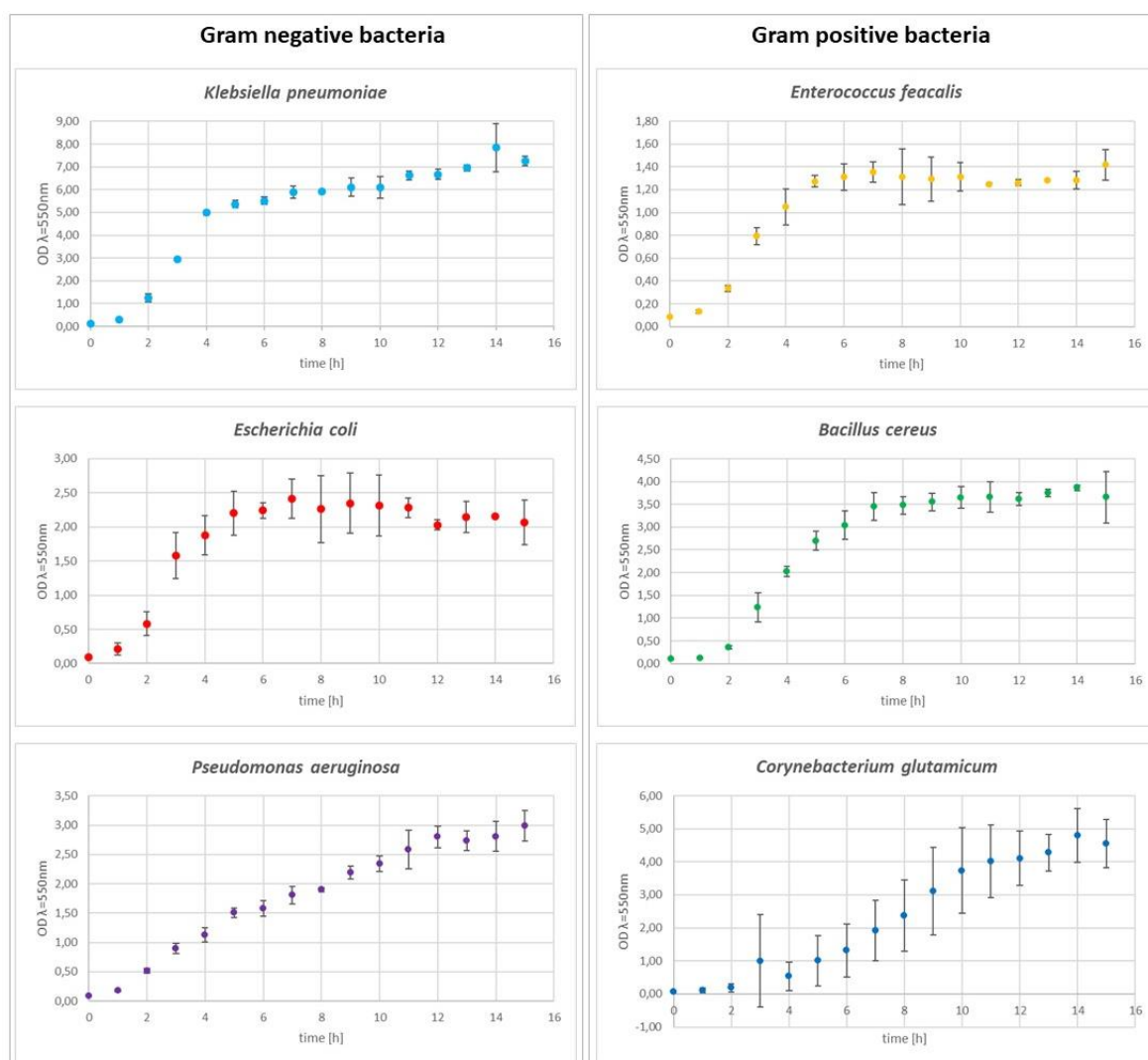


Figure S1. Growth curves of bacterial strains.

Table S1. ¹H NMR signal assignments.

L.p.	Compound	KEGG Identification number	Chemicalshift [ppm]
1.	<i>5-aminopentanoate</i>	C00431	3.0; 2.2; 1.6
2.	<i>4-Aminobutyrate</i>	C15987	2.3
3.	<i>Acetate</i>	C00036	1.9
4.	<i>Adenine</i>	C00147	8.2
5.	<i>Adenosine</i>	C00212	8.3; 6.1
6.	<i>Alanine</i>	C00041	3.8; 1.5
7.	<i>AMP</i>	C00360	8.6; 8.3; 6.1
8.	<i>Asparagine</i>	C00152	2.9
9.	<i>Aspartate</i>	C00049	2.8
10.	<i>Betaine</i>	C00719	3.9; 3.3
11.	<i>Cholate</i>	C02528	0.7
12.	<i>Formate</i>	C00058	8.4
13.	<i>Fumarate</i>	C00122	6.5
14.	<i>Glutamate</i>	C00025	3.7; 2.4; 2.3; 2.1; 2.0
15.	<i>Glutamine</i>	C00064	2.5; 2.4
16.	<i>Glycine</i>	C00037	3.6
17.	<i>Histidine</i>	C00135	7.1
18.	<i>Inosine</i>	C00294	8.2
19.	<i>Isocitrate</i>	C00311	2.6; 2.5
20.	<i>Isoleucine</i>	C00407	0.9
21.	<i>Lactate</i>	C00256	4.1; 1.3
22.	<i>Leucine</i>	C00123	1.0
23.	<i>Lysine</i>	C00047	1.7
24.	<i>Methanol</i>	C00132	3.4
25.	<i>Methionine</i>	C00073	2.6; 2.1
26.	<i>NAD+</i>	C00003	9.3; 9.1; 8.8; 8.4; 4.4
27.	<i>Nicotinate</i>	C00253	8.9
28.	<i>O-Phosphocholine</i>	C04230	3.2
29.	<i>Phenylalanine</i>	C02265	7.4; 7.3
30.	<i>Pyruvate</i>	C00022	2.4
31.	<i>Sarcosine</i>	C00213	2.7
32.	<i>Succinate</i>	C00042	2.4
33.	<i>Threonine</i>	C00188	3.6
34.	<i>Trehalose</i>	C01083	5.2; 3.8; 3.4
35.	<i>Tyramine</i>	C00483	7.2; 6.9
36.	<i>Tyrosine</i>	C00082	7.2; 6.9
37.	<i>UDP-glucose</i>	C00029	7.9; 6.0
38.	<i>Uracil</i>	C00106	7.5; 5.8
39.	<i>Uridine</i>	C00299	7.9; 5.9
40.	<i>Valine</i>	C00183	3.6; 1.0
41.	<i>β-Alanine</i>	C00099	3.2; 2.5
42.	<i>Oxypurinol</i>	C07599	8.2
43.	<i>Propylene glycol</i>	C00583	1.1

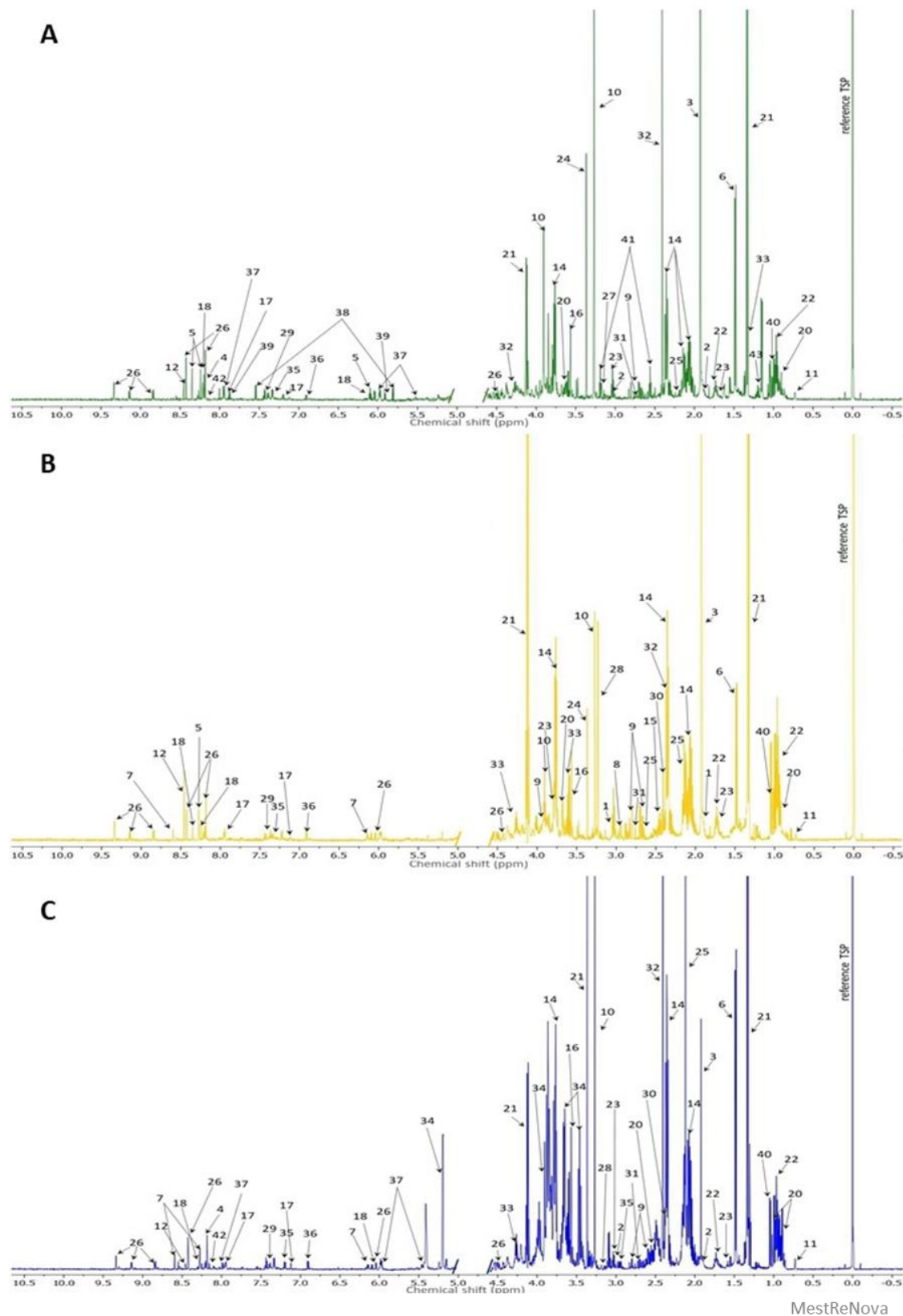


Figure S2. The representative 1D ^1H NMR spectra of gram-positive bacteria samples. **A** – *Bacillus cereus*, **B** – *Enterococcus faecalis*, **C** – *Corynebacterium glutamicum*

(1 – 5-aminopentanoate; 2 – 4-aminobutyrate; 3 – acetate; 4 – adenine; 5 – adenosine; 6 – alanine; 7 – AMP; 8 – asparagine; 9 – aspartate; 10 – betaine; 11 – cholate; 12 – formate; 13 – fumarate; 14 – glutamate; 15 – glutamine; 16 – glycine; 17 – histidine; 18 – inosine; 19 – isocitrate; 20 – isoleucine; 21 – lactate; 22 – leucine; 23 – lysine; 24 – methanol; 25 – methionine; 26 – NAD⁺; 27 – nicotinate; 28 – O-phosphocholine; 29 – phenylalanine; 30 – pyruvate; 31 – sarcosine; 32 – succinate; 33 – threonine; 34 – trehalose; 35 – tyramine; 36 – tyrosine; 37 – UDP-glucose; 38 – uracil; 39 – uridine; 40 – valine; 41 – β -alanine; 42 – oxypurinol; 43 – propylene glycol)

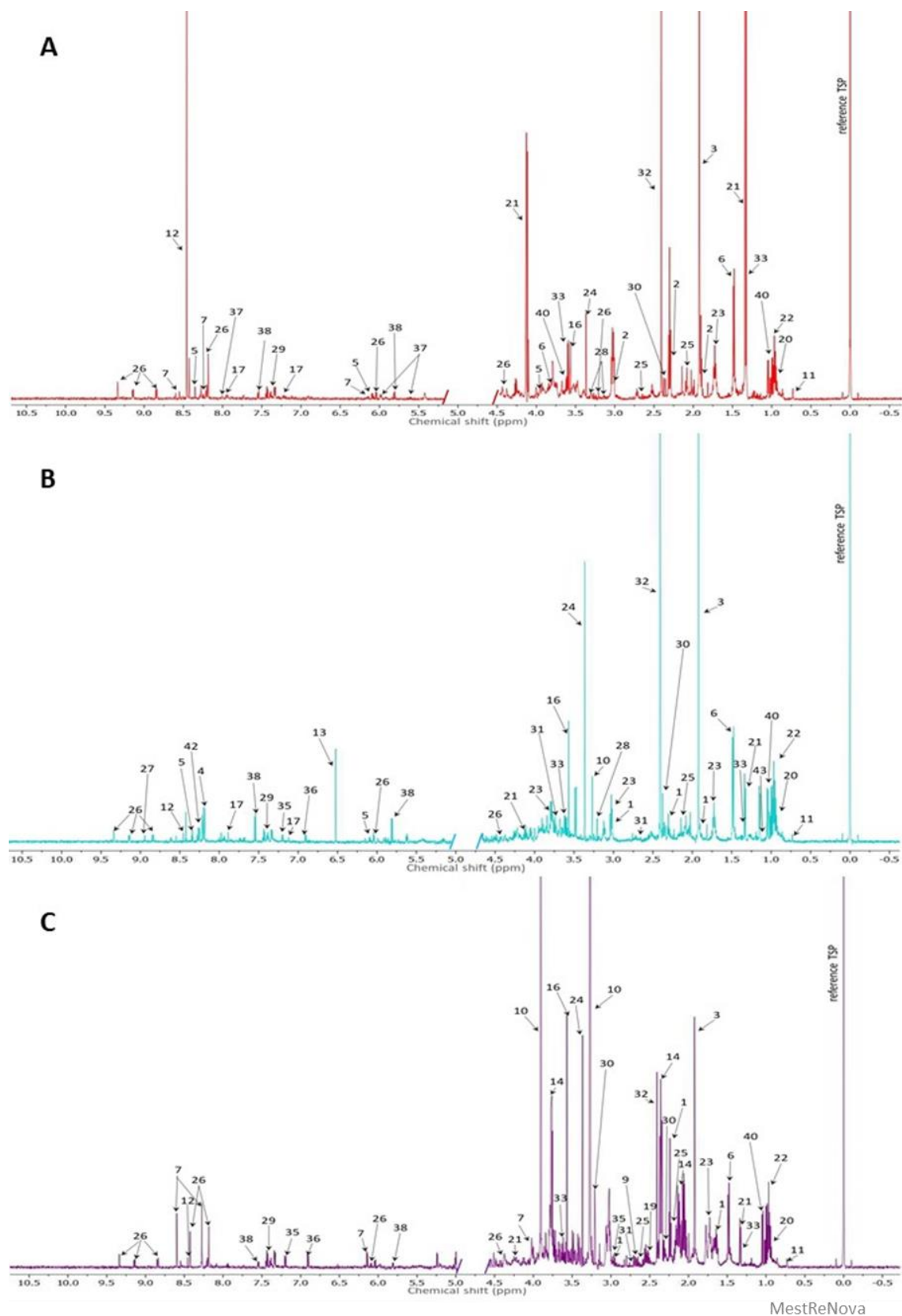


Figure S3. The representative 1D ^1H NMR spectra of gram-negative bacteria samples. A – *Escherichia coli*, B – *Klebsiella pneumoniae*, C – *Pseudomonas aeruginosa*

(1 – 5-aminopentanoate; 2 – 4-aminobutyrate; 3 – acetate; 4 – adenine; 5 – adenosine; 6 – alanine; 7 – AMP; 8 – asparagine; 9 – aspartate; 10 – betaine; 11 – cholate; 12 – formate; 13 – fumarate; 14 – glutamate; 15 – glutamine; 16 – glycine; 17 – histidine; 18 – inosine; 19 – isocitrate; 20 – isoleucine; 21 – lactate; 22 – leucine; 23 – lysine; 24 – methanol; 25 – methionine; 26 – NAD⁺; 27 – nicotinate; 28 – O-phosphocholine; 29 – phenylalanine; 30 – pyruvate; 31 – sarcosine; 32 – succinate; 33 – threonine; 34 – trehalose; 35 – tyramine; 36 – tyrosine; 37 – UDP-glucose; 38 – uracil; 39 – uridine; 40 – valine; 41 – β -alanine; 42 – oxypurinol; 43 – propylene glycol)

Table S2. Metabolites concentration with standard deviation [mM] for gram-negative strains (SM – sand mill; TL – tissue lyser; SON – sonication).

Metabolite	<i>E. coli</i>			<i>K. pneumoniae</i>			<i>P. aeruginosa</i>		
	SM	TL	SON	SM	TL	SON	SM	TL	SON
5-aminopentanoate	-	-	-	-	-	-	0.197±0.023	0.159±0.019	0.207±0.033
4-Aminobutyrate	0.259±0.046	0.306±0.123	0.290±0.006	0.124±0.054	0.084±0.012	0.163±0.031	-	-	-
Acetate	2.386±0.175	1.801±0.175	1.818±0.026	2.216±0.132	1.252±0.378	1.472±0.265	0.188±0.017	0.111±0.019	0.151±0.017
Adenine	-	-	-	0.088±0.024	0.063±0.016	0.079±0.020	-	-	-
Adenosine	0.031±0.003	0.008±0.002	0.022±0.000	0.007±0.001	0.012±0.006	0.013±0.002	-	-	-
Alanine	0.166±0.004	0.145±0.017	0.148±0.003	0.128±0.021	0.106±0.005	0.138±0.025	0.068±0.006	0.055±0.008	0.081±0.009
AMP	0.012±0.002	0.004±0.003	0.011±0.000	-	-	-	0.085±0.005	0.091±0.015	0.082±0.009
Aspartate	-	-	-	-	-	-	0.056±0.009	0.05±0.0130	0.060±0.010
Betaine	-	-	-	0.063±0.078	0.068±0.076	0.088±0.102	0.942±0.022	0.893±0.138	1.035±0.070
Cholate	0.010±0.000	0.010±0.001	0.011±0.000	0.007±0.001	0.005±0.001	0.006±0.001	0.008±0.001	0.010±0.001	0.008±0.000
Formate	0.739±0.063	0.862±0.247	1.124±0.018	0.107±0.141	0.034±0.034	0.026±0.017	0.019±0.001	0.011±0.001	0.024±0.004
Fumarate	-	-	-	0.015±0.008	0.024±0.024	0.022±0.029	-	-	-
Glutamate	-	-	-	-	-	-	0.812±0.061	0.788±0.085	0.859±0.048
Glycine	0.081±0.003	0.072±0.017	0.054±0.001	0.120±0.021	0.084±0.004	0.088±0.022	0.196±0.017	0.181±0.022	0.192±0.005
Histidine	0.012±0.002	0.014±0.006	0.013±0.000	0.017±0.001	0.017±0.002	0.021±0.004	-	-	-
Isocitrate	-	-	-	-	-	-	0.097±0.002	0.095±0.028	0.162±0.018
Isoleucine	0.039±0.002	0.036±0.012	0.029±0.000	0.049±0.006	0.039±0.004	0.048±0.010	0.033±0.002	0.033±0.007	0.035±0.005
Lactate	1.047±0.137	1.250±0.255	1.329±0.013	0.275±0.235	0.247±0.170	0.350±0.267	0.036±0.007	0.036±0.009	0.044±0.010
Leucine	0.076±0.005	0.082±0.024	0.067±0.003	0.099±0.017	0.086±0.010	0.106±0.026	0.077±0.006	0.070±0.015	0.087±0.008
Lysine	0.377±0.024	0.287±0.053	0.312±0.007	0.196±0.070	0.135±0.018	0.251±0.049	0.215±0.010	0.143±0.034	0.280±0.021
Methionine	0.020±0.003	0.020±0.001	0.020±0.000	0.025±0.011	0.023±0.007	0.031±0.015	0.036±0.003	0.033±0.003	0.041±0.002
NAD+	0.062±0.006	0.068±0.009	0.087±0.001	0.055±0.012	0.037±0.010	0.050±0.004	0.062±0.002	0.065±0.007	0.065±0.004
Nicotinate	-	-	-	0.011±0.003	0.026±0.017	0.022±0.017	-	-	-
O-Phosphocholine	0.002±0.000	0.0020	0.002±0.000	0.005±0.003	0.017±0.013	0.019±0.016	0.013±0.003	0.017±0.003	0.020±0.003
Oxypurinol	-	-	-	0.586±0.197	0.475±0.122	0.640±0.235	-	-	-
Phenylalanine	0.040±0.008	0.0410±0.006	0.042±0.001	0.050±0.008	0.044±0.007	0.054±0.017	0.053±0.005	0.051±0.010	0.060±0.010
Propyleneglycol	-	-	-	0.089±0.043	0.029±0.020	0.081±0.067	-	-	-
Pyruvate	0.042±0.007	0.026±0.001	0.018±0.000	0.034±0.015	0.023±0.001	0.026±0.010	0.020±0.001	0.019±0.002	0.020±0.001
Sarcosine	-	-	-	0.003±0.001	0.002±0.000	0.003±0.001	0.002±0.000	0.002±0.001	0.002±0.000
Succinate	0.266±0.008	0.232±0.048	0.215±0.004	0.388±0.224	0.247±0.187	0.287±0.198	0.065±0.008	0.058±0.006	0.062±0.007
Threonine	0.189±0.003	0.205±0.019	0.193±0.003	0.139±0.060	0.120±0.038	0.152±0.067	0.041±0.008	0.054±0.011	0.055±0.014
Tyramine	-	-	-	0.024±0.004	0.022±0.002	0.027±0.007	0.026±0.004	0.024±0.003	0.028±0.003
Tyrosine	-	-	-	0.023±0.004	0.020±0.002	0.025±0.007	0.027±0.002	0.027±0.004	0.029±0.003
UDP-glucose	0.015±0.002	0.013±0.001	0.017±0.000	-	-	-	-	-	-
Uracil	0.040±0.002	0.040±0.013	0.029±0.001	0.061±0.021	0.063±0.018	0.06±0.019	0.016±0.004	0.011±0.003	0.013±0.003
Valine	0.065±0.007	0.064±0.019	0.054±0.001	0.080±0.010	0.062±0.002	0.08±0.015	0.064±0.004	0.061±0.007	0.068±0.006

*the concentrations calculated for 4 biological replicates are marked in gray (the Dixon test was used to reject mismatched samples)

Table S3. Metabolites concentration with standard deviation [mM] for gram-positive strains (SM – sand mill; TL – tissue lyser; SON – sonication).

Metabolite	<i>B. cereus</i>			<i>E. faecalis</i>			<i>C. glutamicum</i>		
	SM	TL	SON	SM	TL	SON	SM	TL	SON
4-Aminobutyrate	0.130±0.028	0.125±0.007	0.121±0.019	0.180±0.031	0.117±0.021	0.124±0.026	0.092±0.014	0.080±0.004	0.076±0.004
Acetate	1.086±0.343	0.855±0.252	0.728±0.277	1.271±0.218	0.626±0.120	0.735±0.266	0.238±0.038	0.214±0.062	0.185±0.044
Adenine	0.152±0.020	0.170±0.009	0.164±0.003	-	-	-	0.119±0.012	0.150±0.017	0.145±0.011
Adenosine	0.041±0.013	0.038±0.011	0.054±0.003	0.019±0.003	0.008±0.006	0.015±0.004	-	-	-
Alanine	0.321±0.048	0.252±0.038	0.219±0.023	0.203±0.022	0.148±0.017	0.148±0.021	0.406±0.040	0.421±0.057	0.424±0.039
AMP	-	-	-	0.008±0.003	0.012±0.002	0.015±0.005	0.022±0.009	0.028±0.010	0.034±0.004
Asparagine	-	-	-	0.073±0.017	0.054±0.008	0.070±0.015	-	-	-
Aspartate	0.117±0.036	0.137±0.017	0.125±0.032	0.213±0.020	0.202±0.039	0.168±0.033	0.086±0.011	0.079±0.018	0.076±0.018
Betaine	0.252±0.092	0.281±0.080	0.245±0.071	0.049±0.020	0.041±0.010	0.047±0.014	0.155±0.010	0.154±0.010	0.164±0.020
Cholate	0.009±0.002	0.012±0.002	0.011±0.002	0.007±0.000	0.006±0.001	0.006±0.001	0.010±0.001	0.013±0.001	0.014±0.000
Formate	0.023±0.007	0.014±0.006	0.029±0.010	0.131±0.009	0.093±0.036	0.134±0.048	0.011±0.001	0.008±0.001	0.016±0.001
Glutamate	0.779±0.179	0.829±0.069	0.776±0.102	1.275±0.147	1.229±0.246	1.085±0.089	1.766±0.311	1.610±0.152	1.776±0.178
Glutamine	-	-	-	0.084±0.024	0.073±0.011	0.077±0.027	-	-	-
Glycine	0.069±0.020	0.073±0.008	0.060±0.003	0.075±0.000	0.066±0.008	0.063±0.013	0.132±0.012	0.137±0.021	0.141±0.010
Histidine	0.014±0.005	0.014±0.002	0.013±0.002	0.018±0.005	0.010±0.007	0.018±0.001	0.029±0.003	0.012±0.006	0.032±0.004
Inosine	0.023±0.008	0.042±0.012	0.027±0.013	0.021±0.004	0.009±0.006	0.017±0.006	0.006±0.001	0.006±0.002	0.010±0.000
Isoleucine	0.035±0.008	0.039±0.004	0.032±0.004	0.059±0.010	0.050±0.008	0.048±0.012	0.055±0.007	0.058±0.006	0.059±0.004
Lactate	0.500±0.0350	0.611±0.158	0.550±0.089	1.890±0.324	1.704±0.250	1.711±0.299	1.008±0.170	0.940±0.101	1.208±0.042
Leucine	0.076±0.021	0.085±0.012	0.076±0.009	0.129±0.005	0.105±0.016	0.107±0.029	0.109±0.009	0.111±0.015	0.122±0.005
Lysine	0.153±0.035	0.154±0.011	0.142±0.024	0.222±0.012	0.149±0.028	0.153±0.037	0.134±0.013	0.133±0.014	0.135±0.004
Methionine	0.029±0.006	0.036±0.004	0.031±0.005	0.060±0.007	0.052±0.006	0.046±0.007	0.444±0.033	0.420±0.009	0.445±0.007
NAD+	0.089±0.012	0.099±0.004	0.094±0.004	0.081±0.007	0.071±0.007	0.073±0.014	0.071±0.008	0.088±0.012	0.088±0.007
O-Phosphocholine	0.002±0.001	0.003±0.000	0.002±0.001	0.046±0.017	0.039±0.008	0.041±0.011	0.002±0.000	0.002±0.000	0.002±0.000
Oxypurinol	1.202±0.100	0.992±0.383	0.599±0.393	-	-	-	0.892±0.096	1.121±0.125	1.104±0.091
Phenylalanine	0.04±0.0100	0.047±0.007	0.041±0.006	0.024±0.006	0.025±0.006	0.023±0.004	0.050±0.005	0.052±0.007	0.052±0.004
Propyleneglycol	0.093±0.033	0.034±0.009	0.070±0.024	-	-	-	-	-	-
Pyruvate	0.016±0.004	0.018±0.002	0.015±0.002	0.029±0.003	0.025±0.004	0.023±0.000	0.057±0.007	0.054±0.004	0.058±0.005
Sarcosine	0.005±0.001	0.025±0.008	0.003±0.001	0.004±0.001	0.003±0.001	0.006±0.001	0.004±0.001	0.004±0.000	0.004±0.001
Succinate	0.095±0.033	0.113±0.034	0.097±0.038	0.030±0.007	0.026±0.004	0.027±0.002	0.585±0.151	0.531±0.109	0.633±0.081
Threonine	0.112±0.042	0.116±0.022	0.107±0.028	0.177±0.024	0.177±0.031	0.171±0.018	0.348±0.019	0.336±0.035	0.362±0.038
Trehalose	-	-	-	-	-	-	0.452±0.124	0.525±0.180	0.398±0.033
Tyramine	0.012±0.003	0.013±0.003	0.013±0.004	0.025±0.004	0.024±0.004	0.022±0.003	0.029±0.001	0.029±0.003	0.028±0.002
Tyrosine	0.013±0.004	0.015±0.002	0.012±0.003	0.025±0.004	0.023±0.003	0.022±0.003	0.031±0.002	0.031±0.004	0.031±0.002
UDP-glucose	0.051±0.009	0.054±0.007	0.050±0.004	-	-	-	0.041±0.012	0.046±0.008	0.048±0.009
Uracil	0.033±0.013	0.024±0.010	0.026±0.015	-	-	-	-	-	-
Uridine	0.015±0.004	0.030±0.006	0.023±0.009	-	-	-	-	-	-
Valine	0.055±0.012	0.060±0.007	0.049±0.006	0.117±0.016	0.103±0.018	0.099±0.018	0.108±0.011	0.110±0.007	0.115±0.009
β-Alanine	0.045±0.013	0.042±0.016	0.041±0.015	-	-	-	-	-	-

*the concentrations calculated for 4 biological replicates are marked in gray (the Dixon test was used to reject mismatched samples)

Table S4. Variation of metabolite concentration between gram-negative bacteria within disruption method.
(*Ec* – *E. coli*; *Kp* – *K. pneumoniae*; *Pa* – *P. aeruginosa*)

Metabolite	Statistical comparison						Average concentration relation		
	Sonication		Sand mill		Tissue Lyser		Sonication	Sand mill	Tissue Lyser
	p-value	Interpretation	p-value	Interpretation	p-value	Interpretation			
Acetate	1,93E-03 [#]	<u>Ec>Kp>Pa</u>	5,25E-03 [#]	<u>Ec>Kp = Pa</u>	2,43E-03 [#]	<u>Ec>Kp>Pa</u>	Ec>Kp>Pa	Ec>Kp>Pa	Ec>Kp>Pa
Alanine	9,00E-03 [#]	<u>Ec>Kp = Pa</u>	1,93E-03 [#]	<u>Ec>Kp>Pa</u>	9,78E-08	<u>Ec>Kp>Pa</u>	Ec>Kp>Pa	Ec>Kp>Pa	Ec>Kp>Pa
Cholate	1,93E-03 [#]	<u>Ec>Pa>Kp</u>	8,02E-03 [#]	<u>Ec = Pa>Kp</u>	9,31E-06	<u>Ec>Kp = Pa</u>	Ec>Pa>Kp	Ec>Pa>Kp	Ec>Pa>Kp
Formate	7,97E-03 [#]	Ec = Pa >Kp	1,71E-02 [#]	Ec = Pa >Kp	8,06E-03 [#]	Ec = Pa >Kp	Ec>Kp>Pa	Ec>Kp>Pa	Ec>Kp>Pa
Glycine	3,07E-03 [#]	<u>Pa >Kp>Ec</u>	3,07E-03 [#]	<u>Pa >Kp>Ec</u>	1,01E-06	<u>Pa >Ec = Kp</u>	Pa>Kp>Ec	Pa>Kp>Ec	Pa>Kp>Ec
Isoleucine	9,75E-03 [#]	<u>Inconclusive</u>	3,03E-03 [#]	<u>Kp>Ec>Pa</u>	5,80E-01	<u>Pa = Kp = Ec</u>	<u>Kp>Pa>Ec</u>	<u>Kp>Ec>Pa</u>	<u>Kp>Ec>Pa</u>
Lactate	3,06E-03 [#]	Ec>Kp>Pa	1,93E-03 [#]	Ec>Kp>Pa	1,93E-03 [#]	Ec>Kp>Pa	Ec>Kp>Pa	Ec>Kp>Pa	Ec>Kp>Pa
Leucine	6,81E-03 [#]	<u>Kp>Ec = Pa</u>	9,00E-03 [#]	<u>Pa >Ec = Kp</u>	3,47E-01	<u>Pa = Kp = Ec</u>	Kp>Pa>Ec	Kp>Pa>Ec	Kp>Ec>Pa
Lysine	2,99E-02 [#]	<u>Pa = Kp = Ec</u>	8,65E-03 [#]	<u>Ec = Pa >Kp</u>	4,44E-05	<u>Ec = Pa >Kp</u>	Ec>Pa>Kp	Ec>Pa>Kp	Ec>Pa>Kp
Methionine	5,85E-03 [#]	<u>Kp>Ec = Pa</u>	4,79E-03 [#]	<u>Pa >Kp>Ec</u>	8,65E-03 [#]	<u>Kp>Ec = Pa</u>	Pa>Kp>Ec	Pa>Kp>Ec	Pa>Kp>Ec
NAD	9,00E-09	<u>Ec>Pa>Kp</u>	2,49E-01 [#]	<u>Pa = Kp = Ec</u>	1,84E-04	<u>Ec>Kp = Pa</u>	Ec>Pa>Kp	Ec>Pa>Kp	Ec>Pa>Kp
o-Phosphocholine	8,58E-03 [#]	<u>Kp>Ec = Pa</u>	9,12E-03 [#]	<u>Kp = Pa >Ec</u>	1,83E-02 [#]	<u>Kp>Ec = Pa</u>	Pa>Kp>Ec	Pa>Kp>Ec	Pa>Kp>Ec
Phenylalanine	1,21E-01 [#]	<u>Pa = Kp = Ec</u>	3,46E-02	<u>Inconclusive</u>	1,72E-01	<u>Pa = Kp = Ec</u>	Pa>Kp>Ec	Pa>Kp>Ec	Pa>Kp>Ec
Pyruvate	1,73E-01 [#]	<u>Pa = Kp = Ec</u>	3,47E-02 [#]	<u>Inconclusive</u>	6,05E-05	<u>Ec>Kp>Pa</u>	<u>Kp>Pa>Ec</u>	<u>Ec>Kp>Pa</u>	<u>Ec>Kp>Pa</u>
Succinate	8,65E-03 [#]	Kp = Pa >Ec	1,06E-02 [#]	Kp = Pa >Ec	8,65E-03 [#]	Kp = Pa >Ec	Kp>Ec>Pa	Kp>Ec>Pa	Kp>Ec>Pa
Threonine	1,22E-02 [#]	<u>Ec>Kp = Pa</u>	1,06E-02 [#]	<u>Ec>Kp = Pa</u>	2,64E-06	<u>Ec>Kp>Pa</u>	Ec>Kp>Pa	Ec>Kp>Pa	Ec>Kp>Pa
Uracil	1,93E-03 [#]	<u>Kp>Ec>Pa</u>	6,99E-03 [#]	<u>Kp = Pa >Ec</u>	4,47E-03 [#]	<u>Kp = Pa >Ec</u>	Kp>Ec>Pa	Kp>Ec>Pa	Kp>Ec>Pa
Valine	6,81E-03 [#]	<u>Kp>Ec = Pa</u>	7,86E-03	<u>Kp = Pa >Ec</u>	9,46E-01 [#]	<u>Pa = Kp = Ec</u>	<u>Kp>Pa>Ec</u>	<u>Kp>Ec>Pa</u>	<u>Ec>Kp>Pa</u>

[#] -Kruskal-Wallis test; grey background – results with p-value < 0.05; table cells that are in bold and underlined – statistical interpretation or average relation is different for each disintegration method

Table S5. Variation of metabolite concentration between gram-positive bacteria within disruption method. (Ef – *E. feacalis*; Bc – *B. cereus*; Cg – *C. glutamicum*)

Metabolite	Statistical comparison						Average concentration relation		
	Sonication		Sand mill		Tissue Lyser		Sonication	Sand mill	Tissue Lyser
	p-value	Interpretation	p-value	Interpretation	p-value	Interpretation			
4-aminobutyrate	9,19E-03 [#]	Ef = Bc>Cg	5,13E-04	Ef = Bc>Cg	8,15E-03 [#]	Ef = Bc>Cg	Ef>Bc>Cg	Ef>Bc>Cg	Ef>Bc>Cg
Acetate	9,19E-03 [#]	Ef = Bc>Cg	6,81E-03 [#]	Ef = Bc>Cg	5,25E-03 [#]	Ef = Bc>Cg	<u>Ef>Bc>Cg</u>	<u>Ef>Bc>Cg</u>	<u>Bc>Ef>Cg</u>
Alanine	9,91E-09	Cg>Bc>Ef	9,36E-06	Cg>Bc>Ef	7,56E-07	Cg>Bc>Ef	Cg>Bc>Ef	Cg>Bc>Ef	Cg>Bc>Ef
Aspartate	1,00E-03	<u>Ef>Bc = Cg</u>	9,19E-06	<u>Ef = Bc>Cg</u>	3,58E-05	<u>Ef>Bc>Cg</u>	Ef>Bc>Cg	Ef>Bc>Cg	Ef>Bc>Cg
Betaine	3,74E-03 [#]	<u>Bc = Cg>Ef</u>	4,47E-03 [#]	<u>Bc = Cg>Ef</u>	1,93E-03 [#]	<u>Bc>Cg>Ef</u>	Bc>Cg>Ef	Bc>Cg>Ef	Bc>Cg>Ef
Cholate	4,04E-03 [#]	<u>Cg>Bc>Ef</u>	2,61E-02 [#]	Inconclusive	7,71E-03 [#]	<u>Bc = Cg>Ef</u>	Cg>Bc>Ef	Cg>Bc>Ef	Cg>Bc>Ef
Formate	1,93E-03 [#]	Ef>Bc>Cg	3,07E-03 [#]	Ef>Bc>Cg	1,93E-03 [#]	Ef>Bc>Cg	Ef>Bc>Cg	Ef>Bc>Cg	Ef>Bc>Cg
Glutamate	1,28E-07	Cg>Ef>Bc	6,04E-05	Cg>Ef>Bc	4,39E-05	Cg>Ef>Bc	Cg>Ef>Bc	Cg>Ef>Bc	Cg>Ef>Bc
Glycine	1,32E-08	<u>Ef>Bc = Cg</u>	6,99E-03 [#]	<u>Cg>Ef = Bc</u>	5,28E-06	<u>Bc = Cg>Ef</u>	<u>Cg>Ef>Bc</u>	<u>Cg>Ef>Bc</u>	<u>Cg>Bc>Ef</u>
Histidine	1,91E-03 [#]	<u>Cg>Ef>Bc</u>	3,49E-04	<u>Ef>Bc = Cg</u>	2,21E-01 [#]	<u>Cg = Bc = Ef</u>	<u>Cg>Ef>Bc</u>	<u>Cg>Ef>Bc</u>	<u>Bc>Cg>Ef</u>
Inosine	1,12E-02 [#]	<u>Cg = Bc = Ef</u>	8,15E-03 [#]	<u>Ef = Bc>Cg</u>	8,65E-03 [#]	<u>Bc>Ef = Cg</u>	Bc>Ef>Cg	Bc>Ef>Cg	Bc>Ef>Cg
Isoleucine	3,12E-04	Ef = Cg>Bc	1,19E-03	Ef = Cg>Bc	1,35E-03	Ef = Cg>Bc	<u>Cg>Ef>Bc</u>	<u>Ef>Cg>Bc</u>	<u>Cg>Ef>Bc</u>
Lactate	1,93E-03 [#]	Ef>Cg>Bc	3,07E-03 [#]	Ef>Cg>Bc	1,80E-06	Ef>Cg>Bc	Ef>Cg>Bc	Ef>Cg>Bc	Ef>Cg>Bc
Leucine	1,61E-02 [#]	Inconclusive	4,35E-04	<u>Ef = Cg>Bc</u>	3,93E-02	Inconclusive	<u>Cg>Ef>Bc</u>	<u>Ef>Cg>Bc</u>	<u>Cg>Ef>Bc</u>
Lysine	8,10E-01 [#]	<u>Cg = Bc = Ef</u>	4,52E-04	<u>Ef = Bc>Cg</u>	2,21E-01	<u>Cg = Bc = Ef</u>	<u>Ef>Bc>Cg</u>	<u>Ef>Bc>Cg</u>	<u>Bc>Ef>Cg</u>
Methionine	4,47E-03 [#]	<u>Bc = Cg>Ef</u>	7,23E-06	<u>Cg>Bc>Ef</u>	8,06E-03 [#]	<u>Bc = Cg>Ef</u>	<u>Cg>Bc>Ef</u>	<u>Cg>Bc>Ef</u>	<u>Bc>Cg>Ef</u>
NAD	1,11E-02	Inconclusive	3,21E-02	Inconclusive	9,75E-03 [#]	Inconclusive	<u>Bc>Cg>Ef</u>	<u>Bc>Ef>Cg</u>	<u>Bc>Cg>Ef</u>
o-Phosphocholine	3,74E-03 [#]	<u>Ef>Bc = Cg</u>	9,19E-03 [#]	<u>Ef>Bc = Cg</u>	1,93E-03 [#]	<u>Ef>Bc>Cg</u>	Ef>Bc>Cg	Ef>Bc>Cg	Ef>Bc>Cg
Phenylalanine	7,73E-07	<u>Cg>Bc>Ef</u>	3,20E-04	<u>Cg>Ef = Bc</u>	5,44E-05	<u>Cg>Ef = Bc</u>	Cg>Bc>Ef	Cg>Bc>Ef	Cg>Bc>Ef
Pyruvate	3,03E-03 [#]	Cg>Ef>Bc	7,56E-08	Cg>Ef>Bc	1,38E-09	Cg>Ef>Bc	Cg>Ef>Bc	Cg>Ef>Bc	Cg>Ef>Bc
Sarcosine	2,01E-03	<u>Ef = Bc>Cg</u>	4,17E-01	<u>Cg = Bc = Ef</u>	6,04E-03 [#]	<u>Bc>Ef = Cg</u>	<u>Ef>Cg>Bc</u>	<u>Bc>Ef>Cg</u>	<u>Bc>Cg>Ef</u>
Succinate	1,93E-03 [#]	Cg>Bc>Ef	1,93E-03 [#]	Cg>Bc>Ef	1,93E-03 [#]	Cg>Bc>Ef	Cg>Bc>Ef	Cg>Bc>Ef	Cg>Bc>Ef
Threonine	2,64E-08	Cg>Ef>Bc	1,05E-07	Cg>Ef>Bc	1,95E-07	Cg>Ef>Bc	Cg>Ef>Bc	Cg>Ef>Bc	Cg>Ef>Bc
Tyramine	2,04E-05	<u>Cg>Ef>Bc</u>	1,06E-05	<u>Ef = Cg>Bc</u>	5,05E-05	<u>Ef = Cg>Bc</u>	Cg>Ef>Bc	Cg>Ef>Bc	Cg>Ef>Bc
Tyrosine	3,48E-07	Cg>Ef>Bc	6,04E-06	Cg>Ef>Bc	1,06E-05	Cg>Ef>Bc	Cg>Ef>Bc	Cg>Ef>Bc	Cg>Ef>Bc
Valine	5,43E-06	Ef = Cg>Bc	1,54E-05	Ef = Cg>Bc	4,41E-05	Ef = Cg>Bc	<u>Cg>Ef>Bc</u>	<u>Ef>Cg>Bc</u>	<u>Cg>Ef>Bc</u>

[#] - Kruskal-Wallis test; grey background – results with p-value < 0.05; table cells that are in bold and underlined – statistical interpretation or average relation is different for each disintegration method

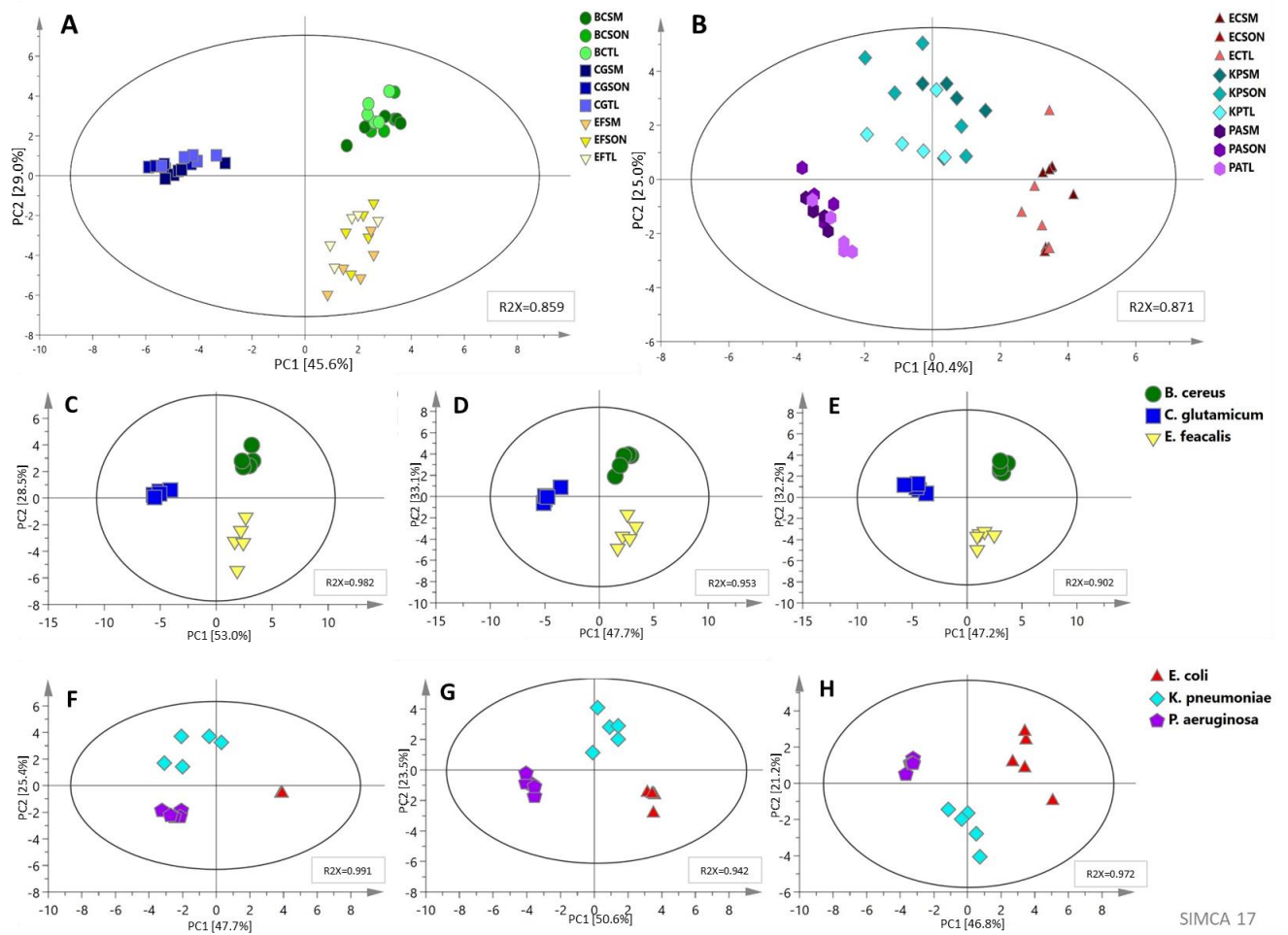


Figure S4. PCA score plots for separate analysis of gram-positive and gram-negative strains. A – gram-positive strains, all disintegration methods; B – gram-negative strains, all disintegration methods; C - gram-positive strains, sonication; D - gram-positive strains, sand mill; E - gram-positive strains, tissue lyser; F - gram-negative strains, sonication; G - gram-negative strains, sand mill; H - gram-negative strains, tissue lyser.

((*BCSM* – *B. cereus* (*sand mill*); *BCSON* – *B. cereus* (*sonication*); *BCTL* – *B. cereus* (*tissue lyser*); *CGSM* – *C. glutamicum* (*sand mill*); *CGSON* – *C. glutamicum* (*sonication*); *CGTL* – *C. glutamicum* (*tissue lyser*); *ECSM* – *E. coli* (*sand mill*); *ECSON* – *E. coli* (*sonication*); *ECTL* – *E. coli* (*tissue lyser*); *EFSM* – *E. feacalis* (*sand mill*); *EFSO* – *E. feacalis* (*sonication*); *EFTL* – *E. feacalis* (*tissue lyser*); *KPSM* – *K. pneumoniae* (*sand mill*); *KPSON* – *K. pneumoniae* (*sonication*); *KPTL* – *K. pneumoniae* (*tissue lyser*); *PASM* – *P. aeruginosa* (*sand mill*); *PASON* – *P. aeruginosa* (*sonication*); *PATL* – *P. aeruginosa* (*tissue lyser*))

5.4. Possible metabolomic switch between environmental and pathogenic *Pseudomonas aeruginosa* strains: ¹H NMR based metabolomics study

5.4.1. Skrótowe omówienie publikacji

Szczepy *P. aeruginosa* bardzo szybko nabywają cechy umożliwiające przetrwanie w trudnych warunkach bytowania, co w praktyce klinicznej oznacza nabywanie wielolekowej oporności mikroorganizmów szpitalnych i problemy w leczeniu infekcji. Problem ten jest szczególnie istotny dla osób z obniżoną odpornością. Poszukiwanie różnic pomiędzy szczepami może pozwolić na identyfikację szlaków zaangażowanych w metabolizm prowadzący do patogenności drobnoustrojów.

W pracy „*Possible metabolomic switch between environmental and pathogenic Pseudomonas aeruginosa strains: ¹H NMR based metabolomics study*” przedstawiono wyniki analizy porównawczej dwóch grup szczepów *P. aeruginosa*. Pierwsza z nich to szczepy izolowane ze środowiska naturalnego (rzeki, jeziora, owoce) zdeponowane w Zakładzie Biotransformacji Uniwersytetu Wrocławskiego. Drugą grupę stanowiły szczepy izolowane z płwociny pacjentów chorych na mukowiscydozę, dostępne do badań dzięki współpracy z Instytutem Matki i Dziecka w Warszawie. Analizy metabolomiczne dotyczyły w sumie 29 szczepów, wśród których 11 to szczepy izolowane ze środowiska, a 18 to szczepy izolowane od pacjentów. Charakterystyka wykorzystanych w badaniu szczepów pałeczki ropy błękitnej została zawarta w tabeli S2 materiałów dodatkowych publikacji.

Eksperyment polegał na wykonaniu typowego badania metabolomicznego – w pierwszej kolejności przeprowadzono hodowlę szczepów. Następnie biomasa komórkowa została oddzielona od medium za pomocą wirowania. Do ekstrakcji przy użyciu metanolu, chloroformu i wody wykorzystano 300 mg mokrej masy komórkowej. Kolejnym krokiem było wykonanie pomiarów ¹H NMR oraz przeprowadzenie identyfikacji metabolitów wraz z analizą statystyczną i chemometryczną

W wyniku przeprowadzonych analiz udało się zidentyfikować 31 metabolitów oraz 6 sygnałów rezonansowych nieprzypisanych do konkretnych związków niskocząsteczkowych. W materiałach dodatkowych w tabeli S1 dostępne są przesunięcia chemiczne, natomiast w pracy na rysunku 1 dostępne jest również reprezentatywne widmo 1D ¹H NMR. Wyniki potwierdziły, że istnieją istotne statystycznie różnice pomiędzy szczepami pochodzącymi z różnych środowisk (szczegółowe wyniki jednowymiarowych analiz danych przedstawiono w tabeli 1), a nienadzorowane i nadzorowane wielowymiarowe analizy danych potwierdziły ten trend – na wykresach PCA i OPLS-DA (rysunek 2) widzimy grupowanie się próbek.

Wykazano, że szczepy izolowane ze środowiska mają zwiększone stężenia kwasu glutaminowego i bursztynianu, podczas gdy stężenia pozostałych istotnych statystycznie metabolitów (walina, alanina, leucyna, izoleucyna, N-acetyl tyrozyna, histydyna, glicyna, malonian, niacynamid, UMP i kwas 5-aminopentanowy) były zwiększone w szczepach izolowanych od pacjentów. Wyniki te przedstawiono na wykresie słupkowym uwzględniając odchylenie standardowe (rysunek 3).

Analiza otrzymanych danych wykazała, że szczepy izolowane z różnych środowisk mają zmienione profile metabolomiczne. Szczepy izolowane od pacjentów chorych na mukowiscydozę mają przyspieszony (w stosunku do szczepów pochodzących ze środowiska) metabolizm aminokwasów. Świadczy o tym akumulacja aminokwasów, zmieniony poziomy związków przenoszących energię w komórce i zburzone przemiany cyklu TCA. Rezultaty omawianego eksperymentu potwierdzają, że metabolizm szczepów *P. aeruginosa* zależy od środowiska, w jakim bytują i sugerują dalszy kierunek badań.

5.4.2. Publikacja



Short communication

Possible metabolic switch between environmental and pathogenic *Pseudomonas aeruginosa* strains: ¹H NMR based metabolomics study



Karolina Anna Mielko^a, Sławomir Jan Jabłoński^c, Wojciech Wojtowicz^a,
Justyna Milczewska^b, Dorota Sands^b, Marcin Łukaszewicz^c, Piotr Młynarz^{a,*}

^a Department of Biochemistry, Molecular Biology and Biotechnology, Faculty of Chemistry, Wrocław University of Science and Technology, Wybrzeże Wyspiańskiego 27, 50-370 Wrocław, Poland

^b Cystic Fibrosis Department, Institute of Mother and Child, Kasprzaka 17a, 01-211 Warszawa, Poland

^c Biotransformation Department, University of Wrocław, Plac Uniwersytecki 1, 50-137 Wrocław Poland

ARTICLE INFO

Article history:

Received 20 January 2020

Received in revised form 11 May 2020

Accepted 14 May 2020

Available online 25 May 2020

Keywords:

Metabolomics

Pseudomonas aeruginosa

Microbiology

¹H NMR spectroscopy

ABSTRACT

The study aimed to assess whether *Pseudomonas aeruginosa* strains from different sources can be distinguished by the metabolomic fingerprint and to check whether antibiotic susceptibility distinctions are available through metabolomic analysis.

¹H NMR spectroscopy analysis of the bacteria metabolites was performed. Twenty-nine strains were tested (18 isolated from cystic fibrosis patients and 11 environmental). Thirty-one metabolites were identified, 12 were up-regulated in strains from CF patients, while 2 were higher level in strains from the environment. Changed carbohydrate catabolic metabolism and the metabolic shift toward the utilization of amino acids is suggested in strains from CF patients.

© 2020 The Author(s). Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

1. Introduction

Pseudomonas aeruginosa is a Gram-negative aerobic bacteria common in the environment, being present in the water environment and on the surface of plants and vegetables. Individual strains can produce a variety of extracellular enzymes and other bioactive molecules, such as biosurfactants and siderophores [1,2]. However, in certain circumstances, this bacteria may become an opportunistic human pathogen causing a wound and burn infections [3]. *P. aeruginosa* is also known to be responsible for respiratory tract infections among patients suffering from cystic fibrosis (CF). Due to its natural resistance to some antibiotics and the ability to biofilm formation, *P. aeruginosa* infection is challenging to cure. Especially when its treatment is not sufficient, chronic disease may develop, which constitutes a severe problem among CF patients since it concerns up to 80 % of adult patients, and it is associated with increased morbidity and mortality rate [4].

Recent publications describe a series of adaptations abilities of *P. aeruginosa* strains causing chronic infection in CF patients in comparison to bacteria isolated at an early stage

of the disease. Changes were observed in their morphology, metabolism, and genome sequence. Strains causing chronic infection were able to live in reduced oxygen level conditions and used preferentially amino acids for growth [5]. They also produced an increased amount of alginate (polymer building matrix of the biofilm) and had reduced expression of virulence factors [4].

Detailed analysis of *P. aeruginosa* was usually performed on a limited number of strains, where the environmental isolates often were not represented. Thus, the predisposition of strains for lung colonization and adaptive evolution from environment isolates to clinical strains is poorly understood.

Therefore, in this study, we decided to compare the collection of *P. aeruginosa* strains isolated from the environment and microorganisms from CF patients using metabolomics based on ¹H NMR [6].

2. Objectives

The research was aimed at checking whether *Pseudomonas aeruginosa* pathogenic (isolated from cystic fibrosis patients) and environmental (water, fruits, anaerobic digestion) strains can be distinguished based on the metabolomic fingerprint.

* Corresponding author.

E-mail address: piotr.mlynarz@pwr.edu.pl (P. Młynarz).

3. Material and methods

3.1. Bacterial strains and culture conditions

In this study, twenty-nine pure strains isolated from single colonies of *P. aeruginosa* were tested. Eleven of them were isolated from the environment; the remaining eighteen were isolated from patients with cystic fibrosis (CF). A table with detailed data is available in supplementary materials – Table S2.

In the first step, the samples were routinely grown on Miller's LB Broth agar (BioShop) [7], which provided growth suitable for the collection of the inoculum. To evaluate the differences and biodiversity between strains, bacteria were cultured in 10 cm Petri dishes for 24 h at 37 °C. After this, pre-culture was prepared by inoculation of the bacterial culture in 5 mL of liquid LB Broth medium and incubated for 24 h at 37 °C with shaking (180 rpm). Next, 100 mL of the culture was prepared and again incubated for 24 h at the same conditions. After this time, the culture was centrifuged (13,500 rpm, 5 min, 4 °C), and the bacterial pellet was washed with 0.9 % NaCl solution and stored at –80 °C.

3.2. Extraction and samples preparation

300 mg of wet weight cells were suspended in 500 µL of methanol and 100 µL of water. Samples were vortexed for 10 min, then 800 µL of chloroform and 400 µL of water were added to each sample and again vortexed for 10 min. After the disintegration, samples were centrifuged (13,500 rpm, 5 min, 4 °C), and 1 mL of clarified upper phase was transferred into a new tube. The extracts were evaporated in a vacuum centrifuge (Christ RVC 2–25 CDplus) (40 °C, 1500 rpm, 8 h). In the next step, 600 µL of PBS buffer (0.5 M, 10 % D₂O, pH = 7.0) were added to each sample and mixed for 3 min. The obtained samples were centrifuged (12,000 rpm, 10 min, 4 °C) and 550 µL were transferred into 5-mm NMR-tubes (5SP, Armar Chemicals) for ¹H NMR measurements.

3.3. ¹H NMR spectroscopy analysis of the bacterial metabolites

Standard one dimensional ¹H NMR experiments were performed on a Bruker AVANCE II 600.58 MHz spectrometer equipped with a 5 mm TBO probe at 300 K. All 1D ¹H NMR spectra were carried out using the *cpmgpr1d* (in Bruker notation) pulse sequence with suppression of water resonance by presaturation. Acquisition parameters were as follows: spectral width, 20.01 ppm; the number of scans, 128; acquisition time, 2.72 s per scan; relaxation delay, 3.5 s; O1P = 4.712 ppm was set for residual water signal presaturation; 0.001 s spin echo delay and 64 K time-domain points. Before Fourier transformation, the FIDs were multiplied by an exponential function equivalent to that of a 0.3 Hz line-broadening factor. The spectra were referenced to the TSP resonance at 0.0 ppm and manually corrected for phase and baseline (MestReNova v. 11.0.3). For ¹H NMR signal identification the Chenomx NMR Analysis Software (v. 8.5, Chenomx Inc.) was used. For statistical analysis only one signal for each metabolite was used. A table with NMR assignment is available in supplementary materials – Table S1.

3.4. Data processing and multivariate statistical data analysis

All spectra were exported to Matlab (Matlab v. 8.3.0.532) for pre-processing. Regions affected by solvent suppression were excluded (4.56–5.15 ppm). Signals alignment was performed by the correlation of optimized warping (COW) and interval correlation shifting (icoshift) algorithms [8,9]. The spectra consisted of 8.910 data points and were normalized using the probabilistic quotient method (PQN) to overcome the issue of dilution, where the all spectra were used as reference group [10].

The multivariate and statistical data analysis was performed on a set of the 31 (+6 unknown) assigned metabolites. The relative concentration of metabolite measured by NMR was obtained as the sum of data points in data matrix for the no overlapping resonances (or a part of partly overlapping resonances) range. The input for SIMCA software (v 15.02, Sartorius Stedim Data Analytics AB) was a transformed data matrix. The data sets were scaled using Pareto scaling before the chemometric analysis. For bacteria strains, principal component analysis (PCA), and orthogonal partial least square discriminant analysis (OPLS-DA) were carried out. The graphical representation of the metabolite and bacteria strains PCA biplot was constructed from the first two components and OPLS-DA from one prediction and one orthogonal components. The OPLS-DA model reliability was tested with CV-ANOVA at the level of significance of $\alpha < 0.05$. Univariate analysis was performed by the use of MATLAB software (v R2019a, Mathworks Inc.) with use of Student's *t*-test (equal/unequal variance) for data originated from a normal distribution and using Mann–Whitney–Wilcoxon test for data that does not meet these requirements. Normality of distribution was assessed by Shapiro–Wilk test. The correction for multiple comparisons was preceded with Benjamini–Hochberg procedure (FDR). All univariate statistics were carried out at the level of significance of $\alpha < 0.05$.

4. Results

In total, 31 metabolites were identified (NAD⁺, niacinamide, NADP⁺, formate, AMP, NADPH, uracil, UMP, histidine, phenylalanine, tyrosine, phenylacetate, fumarate, N-acetyltyrosine, betaine, glycine, methanol, o-phosphocholine, malonate, glutamate, succinate, aspartate, methionine, leucine, acetate, isoleucine, 5-aminopentanoate, valine, lactate, alanine and cholate) (Fig. 1). Also, 6 signals were assigned on the ¹H NMR spectrum as unknown (these, which cannot be attributed to metabolites based on data appearing in spectroscopic databases). However, these metabolites have significant signal intensities and they were also used in all analyzes.

All assignments were verified using the following databases (A Database of Metabolic Pathways in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (PseudoCyc), *Pseudomonas aeruginosa* Metabolome Database (PAMDB), KEGG Pathways, PubChem).

4.1. Multivariate analysis of the metabolite fingerprinting and antibiotic resistance

PCA plot revealed the natural grouping of the different bacterial isolates (Fig. 2A). The first and second principal component (PC) accounted respectively for 29.2 % and 20.4 % of the total variance in the data (R²X = 0.663, four PC's). Supervised analysis OPLS-DA model (one prediction and orthogonal component) (Fig. 2B) passed validation test (CV-ANOVA *p* value = 4.345e-05) and showed statistically important separation between environment and patients bacteria strains. Main OPLS-DA model parameters were R²X = 0.371, R²Y = 0.875 and Q² equal to 0.653.

4.2. Statistical analysis of the metabolite fingerprinting

Of all the identified metabolites 31 (+6 unknown), 14 showed statistically significant difference between clinical and environmental strains (*p* < 0.05) (glycine, UMP, histidine, malonate, glutamate, niacinamide, 5-aminopentanoate, isoleucine, leucine, alanine, N-acetyltyrosine, valine, succinate and Unk.5). A detailed statistical data are available in Table 1.

Among the differentiating metabolites, the relative concentration of glycine, UMP, histidine, malonate, niacinamide, 5-aminopentanoate, isoleucine, leucine, alanine, N-acetyltyrosine,

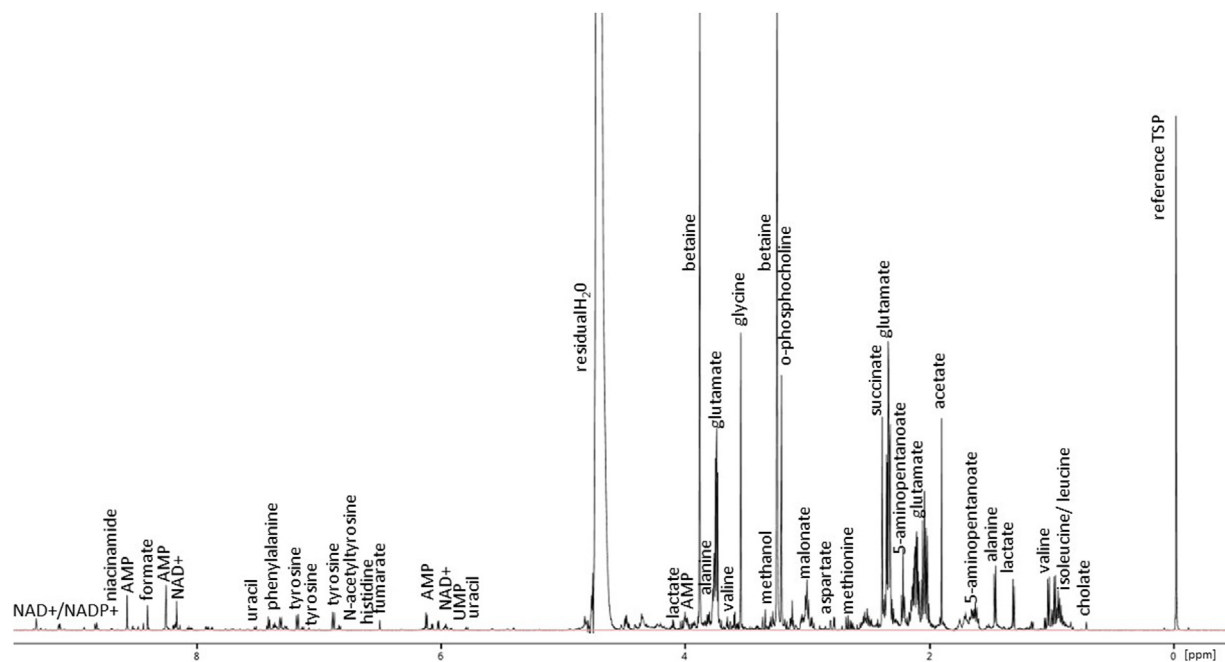


Fig. 1. Representative 1D ^1H NMR spectrum obtained from extracts of an *Pseudomonas aeruginosa* sample comes from the patients.

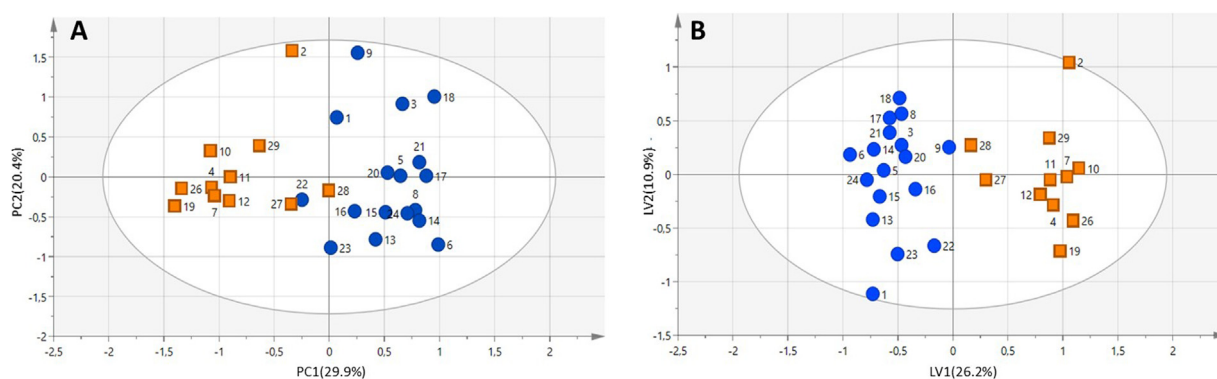


Fig. 2. PCA (A) and OPLS-DA (B) score plot of ^1H NMR data of *P. aeruginosa* strains isolated from CF patients (blue circles) and from the environment (orange squares). The numbers on the chart correspond to the strain numbers according to Table 1 in supplementary materials.

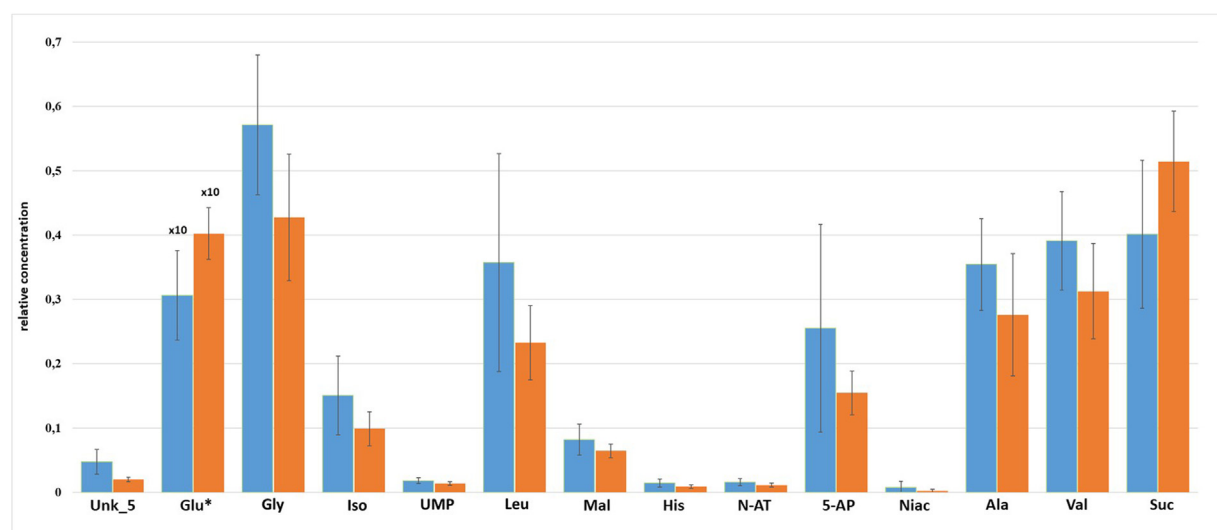


Fig. 3. Statistically significant metabolites. Strains from the environment (orange), strains from CF patients (blue) (Mal – malonate, N-AT – N-acetyltyrosine, 5-AP – 5-aminopentanoate, Niac – niacinamide, Suc – succinate). *the relative concentration of glutamate was presented in 10^{-1} value.

Table 1
Summary of univariate analysis of intracellular endometabolites *Pseudomonas aeruginosa* strains.

Metabolite	Mean/median relative concentration Patients	Mean/median relative concentration Environment	RSD Patients [%]	RSD Environment [%]	Fold change	p-value	FDR*
Unk.5 ($\delta = 7.94$ ppm) ^a	0.051	0.020	37.8	17.2	0.051	2.82E⁻⁰⁶	1.04E⁻⁰⁴
glutamate ^a	3.095	4.064	22.4	9.9	3.095	2.62E⁻⁰⁴	4.85E⁻⁰³
glycine ^a	0.574	0.425	19.0	23.1	0.574	1.04E⁻⁰³	1.28E⁻⁰²
isoleucine ^a	0.165	0.106	37.2	25.0	0.165	1.53E⁻⁰³	1.42E⁻⁰²
UMP ^a	0.019	0.014	24.2	20.1	0.019	2.76E⁻⁰³	2.00E⁻⁰²
leucine ^b	0.357	0.233	41.8	22.7	0.405	3.24E⁻⁰³	2.00E⁻⁰²
malonate ^b	0.082	0.064	27.7	16.4	0.087	4.32E⁻⁰³	2.28E⁻⁰²
histidine ^a	0.014	0.009	45.9	28.8	0.014	5.64E⁻⁰³	2.42E⁻⁰²
N-acetyltyrosine ^a	0.016	0.012	32.9	27.0	0.016	6.29E⁻⁰³	2.42E⁻⁰²
5-aminopentanoate ^b	0.255	0.155	56.3	20.6	0.287	6.54E⁻⁰³	2.42E⁻⁰²
niacinamide ^b	0.009	0.002	100.7	84.9	0.009	7.49E⁻⁰³	2.52E⁻⁰²
alanine ^a	0.367	0.280	19.4	33.8	0.367	8.79E⁻⁰³	2.56E⁻⁰²
valine ^a	0.387	0.306	19.7	24.1	0.387	8.99E⁻⁰³	2.56E⁻⁰²
succinate ^a	0.397	0.501	28.9	15.6	0.397	1.30E⁻⁰²	3.45E⁻⁰²
methanol ^a	0.034	0.051	31.9	40.3	0.034	2.29E ⁻⁰²	5.37E ⁻⁰²
formate ^b	0.008	0.003	62.2	61.8	0.008	2.32E ⁻⁰²	5.37E ⁻⁰²
Unk.2 ($\delta = 9.34$ ppm) ^a	0.003	0.005	39.2	28.2	0.003	2.81E ⁻⁰²	6.11E ⁻⁰²
lactate ^b	0.181	0.300	59.8	38.2	0.224	3.66E ⁻⁰²	7.30E ⁻⁰²
NADP ⁺ ^a	0.008	0.010	47.6	15.9	0.008	3.75E ⁻⁰²	7.30E ⁻⁰²
NAD ⁺ ^a	0.043	0.055	43.4	20.6	0.043	6.78E ⁻⁰²	1.25E ⁻⁰¹
Unk.3 ($\delta = 8.54$ ppm) ^b	0.008	0.007	45.8	53.8	0.009	1.01E ⁻⁰¹	1.78E ⁻⁰¹
cholate ^a	0.025	0.029	36.8	15.4	0.025	1.15E ⁻⁰¹	1.88E ⁻⁰¹
AMP ^a	0.083	0.070	26.5	26.4	0.083	1.17E ⁻⁰¹	1.88E ⁻⁰¹
phenylacetate ^b	0.034	0.031	22.8	18.6	0.036	1.32E ⁻⁰¹	2.00E ⁻⁰¹
Unk.6 ($\delta = 5.92$ ppm) ^a	0.021	0.018	20.0	34.1	0.021	1.35E ⁻⁰¹	2.00E ⁻⁰¹
betaine ^b	1.268	1.369	34.5	22.6	1.418	1.44E ⁻⁰¹	2.05E ⁻⁰¹
tyrosine ^a	0.125	0.111	25.2	20.9	0.125	1.89E ⁻⁰¹	2.60E ⁻⁰¹
Unk.1 ($\delta = 9.42$ ppm) ^b	0.002	0.002	72.5	45.7	0.003	3.57E ⁻⁰¹	4.72E ⁻⁰¹
fumarate ^b	0.019	0.015	44.3	41.4	0.019	4.32E ⁻⁰¹	5.51E ⁻⁰¹
NADPH ^b	0.010	0.009	78.2	21.1	0.014	4.86E ⁻⁰¹	5.99E ⁻⁰¹
uracil ^a	0.013	0.015	44.9	40.5	0.013	6.12E ⁻⁰¹	7.31E ⁻⁰¹
aspartate ^b	0.112	0.108	29.3	34.2	0.112	7.02E ⁻⁰¹	8.12E ⁻⁰¹
phenylalanine ^a	0.127	0.122	33.3	23.6	0.127	7.59E ⁻⁰¹	8.35E ⁻⁰¹
Unk.4 ($\delta = 8.56$ ppm) ^a	0.013	0.013	32.2	19.5	0.013	7.67E ⁻⁰¹	8.35E ⁻⁰¹
o-phosphocholine ^b	0.128	0.132	75.5	18.5	0.181	8.40E ⁻⁰¹	8.88E ⁻⁰¹
acetate ^a	0.793	0.807	33.1	27.3	0.793	8.83E ⁻⁰¹	9.07E ⁻⁰¹
methionine ^a	0.049	0.049	19.6	19.7	0.049	9.43E ⁻⁰¹	9.43E ⁻⁰¹

*FDR – Q values from False Discovery Rate control by Benjamini–Hochberg procedure^a – mean for data with a normal distribution; p-value calculated using parametric test
^b – median for data without a normal distribution; p-value calculated using the nonparametric test

valine, and Unk.5 were upregulated in the group of *P. aeruginosa* strains from patients compared vs. environment strains. The relative concentrations of only two metabolites were higher in samples from the environment (these are: glutamate and succinate) (Fig. 3).

5. Discussion

¹H NMR-based metabolomics approach was applied in this study for the analysis of the biodiversity of *P. aeruginosa* originated from patients and from the environment (water, fruits, anaerobic digestion). According to our results, each of the tested groups of strains cultured in the same growth conditions demonstrated a specific metabolite profile revealing encoded metabolic preferences. The CF patients' *P. aeruginosa* strains, showed higher amino acid content except for glutamate. Besides this amino acid, significantly lower content was found only for succinate. Pathogenic strains accommodate achievable amino acids, which can be originated from medium and/or protein breakdown and show higher level of 5-aminopentanoate [11,12]. This finding can be associated with the high amino-acid content of sputum from cystic fibrosis patients [13,14]. The metabolic switch to amino acids as carbon sources is essential in antibiotic resistance [15]. Catabolism of organic nitrogen compounds such as amino acids might be regulated by succinate and glutamate [16,17], that could be the reason of their lower content in pathogenic strains.

The study confirms that the metabolism of CF patient stains and environmental strains are different and can be distinguished by ¹H NMR. The differences in relative concentrations of specific metabolites imply different general metabolic patterns for clinical and environmental strains. Significant differences were observed in the level of metabolites involved in primary carbon and amino acid metabolism. The general metabolome shifts for clinical isolates may involve:

- intensified amino acid metabolism (including uptake and/or protein turnover), suggested by the elevated level of specific amino acids (Ile, Leu, Gly, His, Ala, Val), and amino acids (Lys, Pro) degradation product (5-aminopentanoate),
- intensification of alternative pathways for cofactors regeneration suggested by the elevated level of malonate,
- altered cell energy reserve, implied by increased relative concentration of UMP,
- altered intensity of the TCA cycle promoting amino acid catabolism, indicated by decreased relative concentration of succinate and glutamate (amino acid-derived form α -ketoglutarate).

Observed changes may result from reduced activity of the oxidative chain. Shunting of the TCA, together with the shift toward the utilization of amino acids, was shown to decrease antibiotic susceptibility in *P. aeruginosa* from CF patients. These findings may

lead to new treatment strategies. The primary metabolism may be exploited for search of specific molecular targets [18] and selection of synergistically acting compounds with antibiotics. For more detailed metabolomic analysis, LC-MS measurements are required. Better detection limit allows identification of additional metabolites and may facilitate interpretation of observed differences. Also, proteome and transcriptome studies would help link the observed metabolic profile with enzymatic activity.

Ethical standards

All data is anonymized and meets with appropriate ethical standards for this type of experiment.

CRediT authorship contribution statement

Karolina Anna Mielko: Conceptualization, Methodology, Formal analysis, Investigation, Writing - original draft, Visualization. **Sławomir Jan Jabłoński:** Conceptualization, Methodology, Investigation, Writing - original draft, Project administration. **Wojciech Wojtowicz:** Software, Validation, Formal analysis, Writing - review & editing. **Justyna Milczewska:** Resources, Writing - review & editing. **Dorota Sands:** Resources, Writing - review & editing. **Marcin Łukaszewicz:** Conceptualization, Methodology, Writing - review & editing, Supervision. **Piotr Młynarz:** Conceptualization, Methodology, Validation, Writing - review & editing, Supervision.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgements

This study was supported by WUST internal subsidy K13/8201003902.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary material related to this article can be found, in the online version, at doi:<https://doi.org/10.1016/j.jpba.2020.113369>.

References

- [1] J.M. Janda, E.J. Bottone, *Pseudomonas aeruginosa* enzyme profiling: predictor of potential invasiveness and use as an epidemiological tool, *J. Clin. Microbiol.* 14 (1) (1981) 55–60 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6790569>.
- [2] R.M. Maier, G. Soberón-Chávez, *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids: biosynthesis and potential applications, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 54 (5) (2000) 625–633, <http://dx.doi.org/10.1007/s002530000443>.
- [3] S. Lindsay, A. Oates, K. Bourdillon, The detrimental impact of extracellular bacterial proteases on wound healing, *Int. Wound J.* 14 (6) (2017) 1237–1247, <http://dx.doi.org/10.1111/iwj.12790>.
- [4] C. Winstanley, S. O'Brien, M.A. Brockhurst, *Pseudomonas aeruginosa* evolutionary adaptation and diversification in cystic fibrosis chronic lung infections, *Trends Microbiol.* 24 (5) (2016) 327–337, <http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2016.01.008>.
- [5] K.S. Kamath, C. Krisp, J. Chick, D. Pascovici, S.P. Gygi, M.P. Molloy, *Pseudomonas aeruginosa* proteome under hypoxic stress conditions mimicking the cystic fibrosis lung, *J. Proteome Res.* 16 (10) (2017) 3917–3928, <http://dx.doi.org/10.1021/acs.jproteome.7b00561>.
- [6] K.A. Mielko, S.J. Jabłoński, J. Milczewska, D. Sands, M. Łukaszewicz, P. Młynarz, Metabolomic studies of *Pseudomonas aeruginosa*, *World J. Microb. Biot.* 35 (11) (2019) 178, <http://dx.doi.org/10.1007/s11274-019-2739-1>.
- [7] V. Behrends, B. Ryall, J.E.A. Zlosnik, D.P. Speert, J.G. Bundy, H.D. Williams, Metabolic adaptations of *Pseudomonas aeruginosa* during cystic fibrosis chronic lung infections, *Env. Microbiol.* 15 (2) (2013) 398–408, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1462-2920.2012.02840.x>.
- [8] F. Savorani, G. Tomasi, S.B. Engelsen, Icoshifft: a versatile tool for the rapid alignment of 1D NMR spectra, *J. Magn. Reson.* 202 (22) (2010) 190–202, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmr.2009.11.012>.
- [9] G. Tomasi, F. van den Berg, C. Andersson, Correlation optimized warping and dynamic time warping as preprocessing methods for chromatographic data, *J. Chemom.* 18 (5) (2004) 231–241, <http://dx.doi.org/10.1002/cem.859>.
- [10] F. Dieterle, A. Ross, T.Z. Schlotterbeck, H. Senn, F. Hoffman, Probabilistic quotient normalization as robust method to account for dilution of complex biological mixtures. Application in ¹H NMR metabolomics, *Anal. Chem.* 73 (13) (2006) 4281–4290, <http://dx.doi.org/10.1021/ac051632c>.
- [11] J.C. Fothergill, J.R. Guest, Catabolism of L-lysine by *Pseudomonas aeruginosa*, *J. Gen. Microbiol.* 99 (1) (1977) 139–155, <http://dx.doi.org/10.1099/00221287-99-1-139>.
- [12] L.C. Reimer, S.E. Will, D. Schomburg, The fate of lysine: Non-targeted stable isotope analysis reveals parallel ways for lysine catabolization in *Phaeobacter inhibens*, *PLoS One* 12 (10) (2017), e0186395, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0186395>.
- [13] A.L. Barth, T.L. Pitt, The high amino-acid content of sputum from cystic fibrosis patients promotes growth of auxotrophic *Pseudomonas aeruginosa*, *J. Med. Microbiol.* 45 (2) (1996) 110–119, <http://dx.doi.org/10.1099/00222615-45-2-110>.
- [14] J.P. Pearson, E.C. Pesci, B.H. Iglewski, Roles of *Pseudomonas aeruginosa* las and rhl quorum-sensing systems in control of elastase and rhamnolipid biosynthesis genes, *J. Bacteriol.* 179 (18) (1997) 5756–5767, <http://dx.doi.org/10.1128/jb.179.18.5756-5767.1997>.
- [15] S. Meylan, C.B.M. Porter, J.H. Yang, P. Belenky, A. Gutierrez, M.A. Lobritz, J.J. Collins, Carbon sources tune antibiotic susceptibility in *Pseudomonas aeruginosa* via tricarboxylic acid cycle control, *Cell Chem. Biol.* 24 (2) (2017) 195–206, <http://dx.doi.org/10.1016/j.chembiol.2016.12.015>.
- [16] D.B. Janssen, P.M. Herst, H.M.L.J. Joosten, C. Van Der Drift, Nitrogen control in *Pseudomonas aeruginosa*: a role for glutamine in the regulation of the synthesis of NADP-dependent glutamate dehydrogenase, urease and histidase, *Arch. Microbiol.* 128 (4) (1981) 398–402, <http://dx.doi.org/10.1007/bf00405920>.
- [17] F. Diab, T. Bernard, A. Bazire, D. Haras, C. Blanco, M. Jebbar, Succinate-mediated catabolite repression control on the production of glycine betaine catabolic enzymes in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 under low and elevated salinities, *Microbiology* 152 (5) (2006) 1395–1406, <http://dx.doi.org/10.1099/mic.0.28652-0>.
- [18] J.A. Shapiro, A.R. Kaplan, W.M. Wuest, From general to specific: can *Pseudomonas* primary metabolism be exploited for narrow-spectrum antibiotics? *ChemBioChem* 20 (1) (2019) 34–39, <http://dx.doi.org/10.1002/cbic.201800383>.

SUPPLEMENTARY MATERIALS

Table 1. ¹H NMR singal assignments in alphabetical order.

Metabolite	Chemical shift [ppm]
5-aminopentanoate	2.22
acetate	1.91
alanine	1.47
AMP	8.57
aspartate	2.67
betaine	3.89
cholate	0.91
formate	8.44
fumarate	6.51
glutamate	2.08
glycine	3.55
histidine	7.10
isoleucine	1.00
lactate	1.31
leucine	0.95
malonate	3.12
methanol	3.35
methionine	2.60
N-acetyltyrosine	7.15
NAD+	9.32
NADP+	9.09
NADPH	8.49
niacinamide	8.70
o-phosphocholine	3.21
phenylacetate	7.29
phenylalanine	7.42
succinate	2.39
tyrosine	7.18
UMP	5.96
Unk_1	9.42
Unk_2	9.34
Unk_3	8.54
Unk_4	8.56
Unk_5	7.94
Unk_6	5.92
uracil	5.79
valine	0.98

Tab. 2. Information about origin *P. aeruginosa* strains used in this experiment.

L.P.	Origin	Name of sample	Source	MALDI	MALDI probability
1	PAT	PAW1	2012/912-1	<i>P. aeruginosa</i> 19955_1 CHB	2.370
2	ENV	PAB1	Odra river	<i>P. aeruginosa</i>	2.050
3	PAT	PAW3	2012/5978-2	<i>P. aeruginosa</i> DSM 1117	2.274
4	ENV	PAB3	well	<i>P. aeruginosa</i>	2.117
5	PAT	PAW4	2012/3705-3	<i>P. aeruginosa</i> DSM 1117	2.274
6	PAT	PAW5	2012/2684-1	<i>P. aeruginosa</i> 8147_2 CHB	2.350
7	ENV	PAB5	fermented cucumbers water	<i>P. aeruginosa</i>	2.186
8	PAT	PAW6	2012/610-2	<i>P. aeruginosa</i> A07_08_Pudu FLR	2.315
9	PAT	PAW7	2012/6827-3	<i>P. aeruginosa</i> DSM 1117	2.131
10	ENV	PAB6	fermented cucumbers water	<i>P. aeruginosa</i>	2.186
11	ENV	PAB7	Widawa river	<i>P. aeruginosa</i>	2.157
12	ENV	PAB8	Widawa river	<i>P. aeruginosa</i>	2.157
13	PAT	PAW8	2012/2183-1	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 THL	1.559
14	PAT	PAW9	2012/2475-3	<i>P. aeruginosa</i> DSM 1117	2.460
15	PAT	PAW10	2012/4342-2	<i>P. aeruginosa</i> DSM 1117	2.153
16	PAT	PAW11	2012/835-1	<i>P. aeruginosa</i> DSM 1117	2.372
17	PAT	PAW12	2012/3100-1	<i>P. aeruginosa</i> A07_08_Pudu FLR	2.296
18	PAT	PAW13	2012/6545-2	<i>P. aeruginosa</i> DSM 1117	2.206
19	ENV	PAB13	strawberries	<i>P. aeruginosa</i>	2.306
20	PAT	PAW14	2012/4066-2	<i>P. aeruginosa</i> DSM 1117	2.274
21	PAT	PAW15	2012/3710-2	<i>P. aeruginosa</i> DSM 1117	2.182
22	PAT	PAW16	2012/2603-1	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 THL	2.396
23	PAT	PAW17	2012/5183-1	<i>P. aeruginosa</i> DSM 1117	2.211
24	PAT	PAW18	2012/1005-1	<i>P. aeruginosa</i> DSM 1117	2.347
25	PAT	PAW19	2012/1005-2	<i>P. aeruginosa</i> 8147_2 CHB	2.426
26	ENV	PAB14	strawberries	<i>P. aeruginosa</i>	2.455
27	ENV	PAB15	orchid water	<i>P. aeruginosa</i>	2.156
28	ENV	PAB17	activated sludge	<i>P. aeruginosa</i>	2.518
29	ENV	PAB18	bioreactor	<i>P. aeruginosa</i>	2.517

PAT - strains isolated from the patients with CF

ENV – strains isolated from the environment

5.5. Metabolomics comparison of drug-resistant and drug-susceptible *Pseudomonas aeruginosa* strains (intra- and extracellular analysis)

5.5.1. Skrótowe omówienie publikacji

Oporność na antybiotyki drobnoustrojów stanowi poważny problem globalny, skutkujący nieefektywnym leczeniem infekcji, a co za tym idzie, prowadzącym do śmierci pacjentów. *Pseudomonas aeruginosa* należy do grupy patogenów ESKAPE. Są to mikroorganizmy, które charakteryzują się wielolekową opornością na antybiotyki. Oporność ta jest spowodowana m.in. mutacjami będącymi wynikiem wpływu czynników zewnętrznych na bakterie. Czynniki takimi mogą być stosowane środki dezynfekcyjne, czy podawanie zbyt dużej ilości antybiotyków, ale również zmiany środowiska bytowania drobnoustrojów. Znalazienie nowych sposobów zwalczania infekcji bakteryjnych jest kluczowe dla ogólnie pojętej medycyny.

W pracy „*Metabolomics comparison of drug-resistant and drug-susceptible Pseudomonas aeruginosa strains (intra- and extracellular analysis)*” porównano profile metabolomiczne szczepów klinicznych, izolowanych od dzieci chorych na mukowiscydozę. Szczepy oraz informacje o antybiotykooporności otrzymano dzięki współpracy z Instytutem Matki i Dziecka w Warszawie. Do analiz wybrano dwa szczepy – jeden z nich odporny na wybrane antybiotyki, natomiast drugi wrażliwy na testowane antybiotyki. Charakterystyka antybiotykooporności znajduje się w tabeli 1.

Protokół postępowania w eksperymentach metabolomicznych jest zazwyczaj zbliżony, dlatego w tym przypadku etapy przeprowadzonych badań są analogiczne do tych w poprzednio omawianej pracy. W pierwszej kolejności przygotowano hodowle mikrobiologiczne, które następnie odwirowano. Do analiz zebrano zarówno komórki bakteryjne, jak i pożywkę pohodowlaną, co pozwoliło na stworzenie pełnego obrazu przemian w szlakach biochemicznych. Komórki bakteryjne były dodatkowo ekstrahowane przy pomocy metanolu i wody, natomiast pożywka pohodowlana została odparowana, a następnie rozpuszczona w buforze PBS. Jako metodę pomiarową wybrano ^1H NMR. Podobnie jak w poprzednim eksperymencie wykonano analizy statystyczne i chemometryczne uzyskanych danych. Identyfikacja metabolitów pozwoliła na zidentyfikowanie w sumie 39 metabolitów, z czego 19 było wspólnych dla komórek i pożywki, 13 kolejnych zidentyfikowano jako metabolity wewnątrzkomórkowe, a pozostałe 8 zostały zidentyfikowane tylko w pożywce pohodowlanej. Widma reprezentatywne 1D ^1H NMR są przedstawione w pracy (na rysunku 1 i 2), natomiast przesunięcia chemiczne sygnałów rezonansowych są dostępne w materiałach dodatkowych w tabeli S1 i S2.

Analizy metabolitów wewnątrzkomórkowych pozwoliły na zidentyfikowanie 16 metabolitów istotnych statystycznie (p -value < 0.05 oraz VIP > 1.0), których relatywne stężenia zostały przedstawione na rysunku 6. Szczegółowe wyniki analizy statystycznej dostępne są w tabeli nr 2. Wśród nich większość dotyczyła szlaków przemian aminokwasów i to właśnie ich stężenie było większe w szczepie opornym na antybiotyki. Są to: histydyna, alanina, walina, izoleucyna, leucyna, treonina, homoseryna, histamina, sarkozyna, bursztynian, mleczan oraz betaina. Wyniki nienadzorowanych wielowymiarowych analiz danych pokazują grupowanie się prób, co wskazuje na odmienne profile metabolomiczne obu szczepów.

Do porównań metabolitów zewnątrzkomórkowych, oprócz podłoży pochodowlanych szczepów *P. aeruginosa*, wykorzystano również czyste podłoże LB, co pozwoliło na obserwację zmian ilościowych i jakościowych stężeń związków po hodowli. Zarówno wyniki analiz statystycznych, jak i chemometrycznych, pokazują różnice w stężeniach zidentyfikowanych związków niskocząsteczkowych po hodowli i między szczepami. Porównanie statystyczne pożywek pochodowlanych pomiędzy sobą pozwoliło na zidentyfikowanie 9 istotnie różnicujących metabolitów. W medium po hodowli obu szczepów znacząco zmalało szczególnie stężenie glicyny, leucyny i pirogronianu, natomiast wzrosły stężenia octanu oraz izomaślanu. Graficzne przedstawienie relatywnych stężeń zewnątrzkomórkowych, niskocząsteczkowych związków istotnych statystycznie jest dostępne na rysunku 7. Szczegóły porównań statystycznych przeprowadzonych dla metabolitów zewnątrzkomórkowych są zawarte w tabeli 3. Analizy wykazały, że glutaminian, asparaginian i kwas asparaginowy nie były obecne w medium po hodowli, co oznacza, że były one wykorzystane przez metabolizm bakterii szybciej w porównaniu do pozostałych metabolitów, dla których uzyskano sygnały rezonansowe na widmie również w próbkach po hodowli. W pracy dostępne są również graficzne reprezentacje ścieżek metabolomicznych (rysunek 8 i 9), które zostały wykonane przez jednego ze współautorów.

Przedstawione badanie wykazało, że profile metabolomiczne testowanych szczepów znacząco się od siebie różnią. Wyniki potwierdzają, że szczep oporny na antybiotyki wykorzystuje bardziej efektywnie ścieżki przetwarzania aminokwasów, co może być kluczowe dla rozwoju szczepów szpitalnych. Wyniki te są zbliżone do wyników uzyskanych w poprzedniej pracy. Przedstawione rezultaty ukazują potencjał metabolomiki jako narzędzia służącego do charakterystyki próbek biologicznych na tym poziomie molekularnym oraz stanowią podstawę do dalszych badań nad adaptacją szczepów *P. aeruginosa* do zmienionych środowisk i nabywania przez nie oporności na antybiotyki.

5.5.2. Publikacja



Article

Metabolomics Comparison of Drug-Resistant and Drug-Susceptible *Pseudomonas aeruginosa* Strain (Intra- and Extracellular Analysis)

Karolina Anna Mielko¹, Sławomir Jan Jabłoński², Łukasz Pruss^{1,3} , Justyna Milczewska⁴ , Dorota Sands⁴, Marcin Łukaszewicz² and Piotr Młynarz^{1,*}

- ¹ Department of Biochemistry, Molecular Biology and Biotechnology, Faculty of Chemistry, Wrocław University of Science and Technology, 50-373 Wrocław, Poland; karolina.mielko@pwr.edu.pl (K.A.M.); lukasz.pruss@pwr.edu.pl (Ł.P.)
- ² Biotransformation Department, Faculty of Biotechnology, University of Wrocław, 50-383 Wrocław, Poland; slawomir.jablonski@uwr.edu.pl (S.J.J.); marcin.lukaszewicz@uwr.edu.pl (M.Ł.)
- ³ Ardigen, 30-394 Kraków, Poland
- ⁴ Cystic Fibrosis Department, Institute of Mother and Child, 01-211 Warsaw, Poland; justyna.milczewska@imid.med.pl (J.M.); dorota.sands@imid.med.pl (D.S.)
- * Correspondence: piotr.mlynarz@pwr.edu.pl



Citation: Mielko, K.A.; Jabłoński, S.J.; Pruss, Ł.; Milczewska, J.; Sands, D.; Łukaszewicz, M.; Młynarz, P. Metabolomics Comparison of Drug-Resistant and Drug-Susceptible *Pseudomonas aeruginosa* Strain (Intra- and Extracellular Analysis). *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 10820. <https://doi.org/10.3390/ijms221910820>

Academic Editor: Giovanna Batoni

Received: 24 August 2021

Accepted: 2 October 2021

Published: 6 October 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: *Pseudomonas aeruginosa* is a common human pathogen belonging to the ESKAPE group. The multidrug resistance of bacteria is a considerable problem in treating patients and may lead to increased morbidity and mortality rate. The natural resistance in these organisms is caused by the production of specific enzymes and biofilm formation, while acquired resistance is multifactorial. Precise recognition of potential antibiotic resistance on different molecular levels is essential. Metabolomics tools may aid in the observation of the flux of low molecular weight compounds in biochemical pathways yielding additional information about drug-resistant bacteria. In this study, the metabolisms of two *P. aeruginosa* strains were compared—antibiotic susceptible vs. resistant. Analysis was performed on both intra- and extracellular metabolites. The ¹H NMR method was used together with multivariate and univariate data analysis, additionally analysis of the metabolic pathways with the FELLA package was performed. The results revealed the differences in *P. aeruginosa* metabolism of drug-resistant and drug-susceptible strains and provided direct molecular information about *P. aeruginosa* response for different types of antibiotics. The most significant differences were found in the turnover of amino acids. This study can be a valuable source of information to complement research on drug resistance in *P. aeruginosa*.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*; metabolomics; antibiotic resistance; NMR spectroscopy

1. Introduction

Pseudomonas aeruginosa is a Gram-negative opportunistic human pathogen [1], which causes infections in chronic wounds and in the urinary tract. Moreover, it is responsible for respiratory tract infections in cystic fibrosis (CF), obstructive lung disease, or mechanically ventilated patients [2]. As a part of the ESKAPE pathogens group (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Enterobacter species*), *P. aeruginosa* is a significant cause of nosocomial infections. In some *P. aeruginosa* strains, antibiotic therapy is not successful, despite its sensitivity in laboratory tests [3,4]. Due to the increasing number of multidrug-resistant (MDR) isolates, the WHO has recognized *P. aeruginosa* as a priority pathogen for antibiotic research [5]. The development of new antibacterial therapies and understanding antibiotic resistance mechanisms is crucial for clinical practice and finding new treatment possibilities [6–8].

Multidrug resistance of *P. aeruginosa* relies on several mechanisms: (i) antibiotic molecules may be neutralized by specialized enzymes (β -lactams, aminoglycosides),

(ii) therapeutic compounds may also be removed from the cell by efflux pumps (β -lactams, quinolones, and some aminoglycosides), (iii) alteration of the antibiotic target molecule, (iv) modifications in the penicillin-binding proteins (PBPs), and (v) changes in OPRD porin [4,9–12].

An important factor affecting drug efficiency is drug accessibility for targeted microorganisms. Biofilm produced by *P. aeruginosa* is a physical barrier protecting bacteria from antibiotics [13]. Some *P. aeruginosa* strains exhibit decreased expression of genes encoding the porins (outer membrane channel proteins) used by certain types of antibiotics (e.g., rifamycins and quinolones) to enter the cell [11]. Antibiotic intake may also be reduced due to reduced membrane potential [14]. These *P. aeruginosa* attributes are important factors that should be considered during the development of an efficient antibiotic therapy.

Bacterial cells can become antibiotic-resistant when stringent response (SR) is activated due to the nutrient limitation resulting in reduced bacterial multiplication. The correct activity of SR is also crucial for biofilm development and stability [15].

The drug resistance phenomenon is analyzed on many levels: genomic, transcriptomic, proteomic, and metabolomics. The last link of this omics chain may provide information on antibiotic resistance mechanisms [16]. Metabolomics is focused on the analysis and monitoring of low molecular weight compounds involved in cell metabolism. Metabolomic studies performed on microorganisms so far usually rely on chromatographic techniques coupled with mass spectrometry (MS) and nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR) [17,18].

Metabolomics experiments have enabled the identification of new metabolic pathways [18], the recognition of bacterial strain origin [19], the identification of microorganism species [20,21], and the analysis of the influence of different external factors on bacteria [22]. Moreover, metabolomic and genomic analysis helped explain *P. aeruginosa* polymyxin resistance [23]. Metabolome analysis techniques are also considered an advanced diagnostic tool for bacterial infections [24].

The presence of some antibiotic resistance mechanisms may be correlated with changes in metabolite concentration (inside and outside the cell). Resistance to some antibiotics is associated with the presence and activity of proteins involved in the processing of certain metabolites in the cell (oprD protein required for carbapenem uptake is an amino acid transporter [10] and activator of SR, which results in changes in the expression of the enzymes involved in the main metabolic pathways including amino acid synthesis [25]). Metabolome analysis would give additional information alongside antibiotic sensitivity tests. This may help in the choice of appropriate antibiotic therapy, as well as enabling research in new therapeutic strategies [26].

The metabolomics comparison of strains with different antibiotic resistance could give information about the differences in the phenotype of both strains and may show the direction of further (more detailed) investigations. The analysis of intra- and extracellular metabolites allows us to observe the differences in intracellular machinery of the bacteria, but also the association with the bacterial environment. All these reasons can give additional information for transcriptomics and genomics studies and may enable the recognition of more antibiotic resistance mechanisms in *P. aeruginosa*. This study aimed to delineate metabolic differences between two *P. aeruginosa* strains isolated from CF patients: a strain resistant to the majority of available antibiotics (except colistin and ciprofloxacin) and an antibiotic susceptible strain, by use of metabolomics tools using the ^1H NMR method together with univariate and multivariate analysis of intra- and extracellular metabolites and the application of bioinformatics metabolic pathway analysis software (FELLA).

2. Results

2.1. Antibiotic Resistance Test

The results of antibiotic resistance tests are presented in Table 1. In this experiment, antibiotics from the following groups: aminoglycoside (disrupting protein synthesis by binding to the 30S ribosomal subunit), beta-lactams (disrupting peptidoglycan biosynthesis), quinolone (disrupting DNA replication), and polymyxin (disrupting cell membrane)

were used. Strain PAW17 was susceptible to all tested antibiotics. Strain PAW23 was susceptible only to two antibiotics: ciprofloxacin and colistin.

Table 1. Antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* strains (S—susceptible, R—resistant).

Antibiotic Name	Class	PAW17	PAW23
amikacin	aminoglycoside	S	R
gentamicin	aminoglycoside	S	R
netilmicin	aminoglycoside	S	R
tobramycin	aminoglycoside	S	R
imipenem	beta-lactam	S	R
meropenem	beta-lactam	S	R
piperacillin	beta-lactam	S	R
piperacillin/tazobactam	beta-lactam	S	R
ticarcillin/clavulanic acid	beta-lactam	S	R
ceftazidime	beta-lactam	S	R
cefepime	beta-lactam	S	R
ciprofloxacin	quinolone	S	S
levofloxacin	quinolone	S	R
colistin	polymyxin (peptide)	S	S

2.2. Metabolites Identification

2.2.1. Intracellular Metabolites

In total, 32 intracellular metabolites were identified (5-aminopentanoate, acetate, adenine, alanine, AMP, aspartate, betaine, ethanol, formate, glucose, glutamate, glycine, histamine, histidine, homoserine, isobutyrate, isocitrate, isoleucine, lactate, leucine, methionine, NAD⁺, oxypurinol, phenylalanine, pyruvate, sarcosine, succinate, threonine, tyrosine, UMP, uracil, and valine). Information about the chemical shift for each metabolite is available in Supplementary Materials (Table S1). The set of identified metabolites was identical for both strains.

The representative ¹H NMR spectrum of intracellular metabolites is presented below (Figure 1).

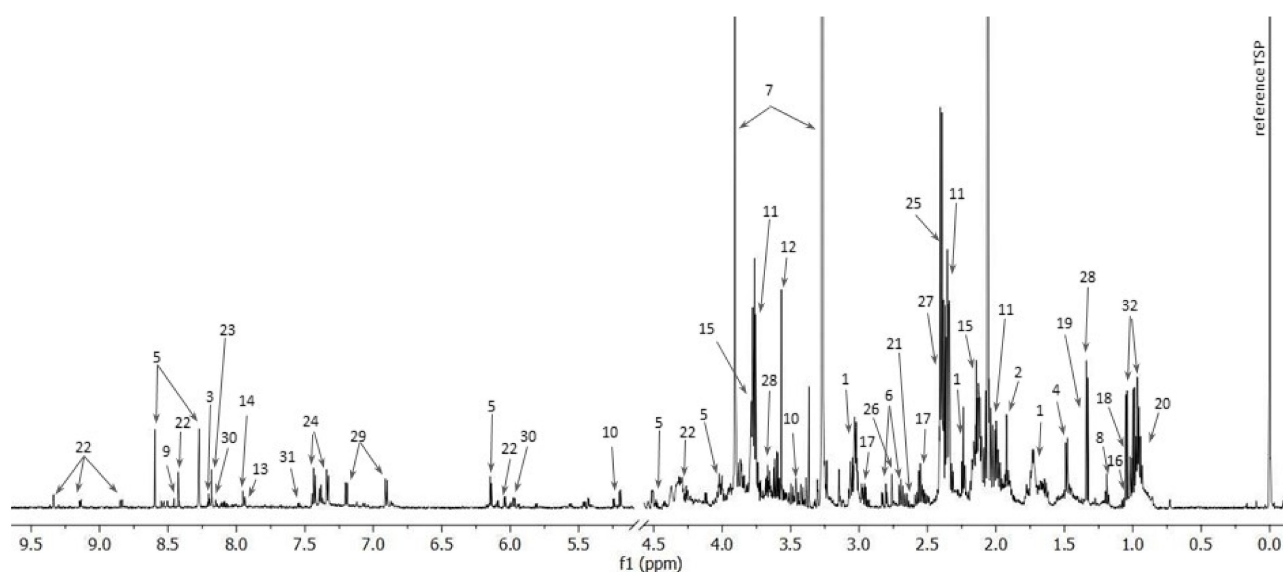


Figure 1. The representative 1D ¹H NMR spectrum of intracellular metabolites of drug-susceptible *Pseudomonas aeruginosa* strain. (1—5-aminopentanoate, 2—acetate, 3—adenine, 4—alanine, 5—AMP, 6—aspartate, 7—betaine, 8—ethanol, 9—formate, 10—glucose, 11—glutamate, 12—glycine, 13—histamine, 14—histidine, 15—homoserine, 16— isobutyrate, 17— isocitrate, 18— isoleucine, 19— lactate, 20— leucine, 21— methionine, 22— NAD⁺, 23— oxypurinol, 24— phenylalanine, 25— pyruvate, 26— sarcosine, 27— succinate, 28— threonine, 29— tyrosine, 30— UMP, 31— uracil, 32— valine).

2.2.2. Intracellular Metabolites

In total, 27 extracellular metabolites were identified (6-hydroxynicotinate, acetate, alanine, betaine, formate, glycine, histamine, histidine, imidazole, isobutyrate, glutamate, aspartate, asparagine, pyroglutamate, isoleucine, leucine, lysine, methanol, methionine, oxypurinol, phenylalanine, pyruvate, threonine, trehalose, tryptophan, tyrosine, and valine). Four metabolites were not present in the post-culture medium (glutamate, aspartate, asparagine, and pyroglutamate). Information about the chemical shift for each metabolite is available in Supplementary Materials (Table S2).

The representative ^1H NMR spectrum of intracellular metabolites is presented in (Figure 2).

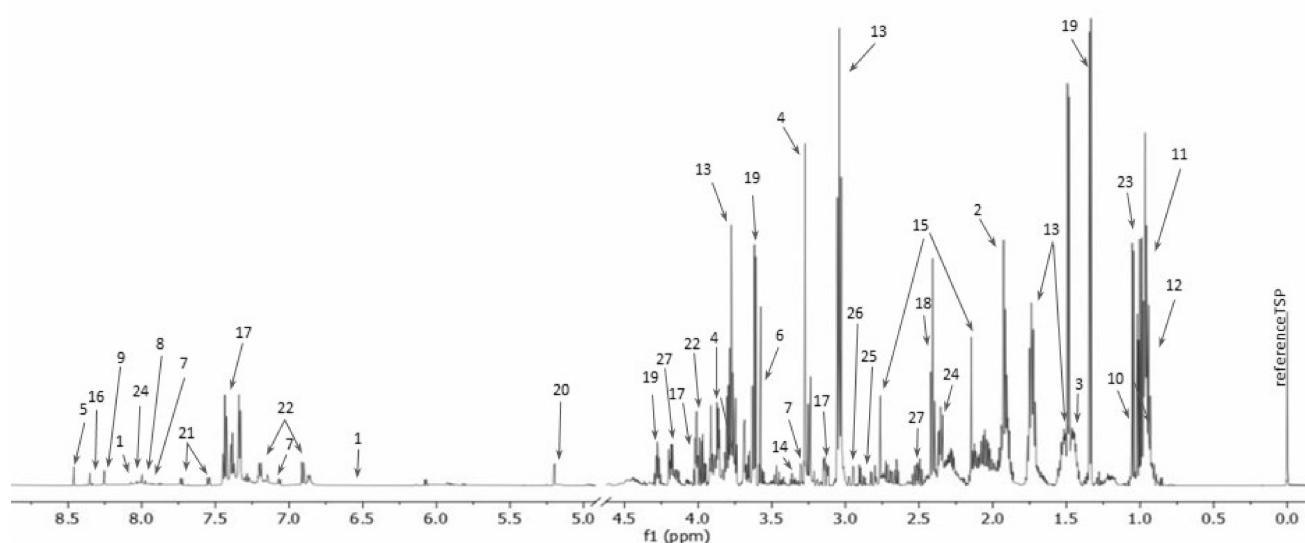


Figure 2. The representative 1D ^1H NMR spectrum of extracellular metabolites of drug-susceptible *Pseudomonas aeruginosa* strain (1—6-hydroxynicotinate; 2—acetate; 3—alanine; 4—betaine; 5—formate; 6—glycine; 7—histamine; 8—histidine; 9—imidazole; 10— isobutyrate; 11— isoleucine; 12— leucine; 13— lysine; 14— methanol; 15— methionine; 16— oxypurinol; 17— phenylalanine; 18— pyruvate; 19— threonine; 20— trehalose; 21— tryptophan; 22— tyrosine; 23— valine; 24— glutamate; 25— aspartate; 26— asparagine; 27— pyroglutamate).

The total number of intra- and extracellular metabolites identified was 39. Among these, 19 metabolites were common to intra- and extracellular environments (histidine, aspartate, glutamate, histamine, alanine, pyruvate, valine, isoleucine, leucine, betaine, methionine, formate, glycine, threonine, phenylalanine, tyrosine, isobutyrate, oxypurinol, and acetate); 13 metabolites were identified in cell extracts (succinate, homoserine, lactate, UMP, sarcosine, ethanol, isocitrate, adenine, glucose, NAD⁺, AMP, 5-aminopentanoate, and uracil) and eight were identified only in the culture medium (imidazole, asparagine, methanol, 6-hydroxynicotinate, pyroglutamate, tryptophan, lysine, and trehalose).

2.3. Multivariate Data Analysis

The performed PCA—multivariate unsupervised analysis between drug-resistant and drug-susceptible isolates revealed the natural grouping between bacterial intra- and extracellular metabolites (Figure 3). Direct comparison of intracellular metabolites revealed a more similar metabolomics profile than between extracellular metabolites. The first three principal components (PC) accounted respectively for 84.7%, 8.74%, and 2.56% of the total variance in the data ($R^2X = 0.998$). The obtained loading plots analysis showed three metabolites differentiated between bacteria cells and medium, which are: glycine, betaine, and pyruvate.

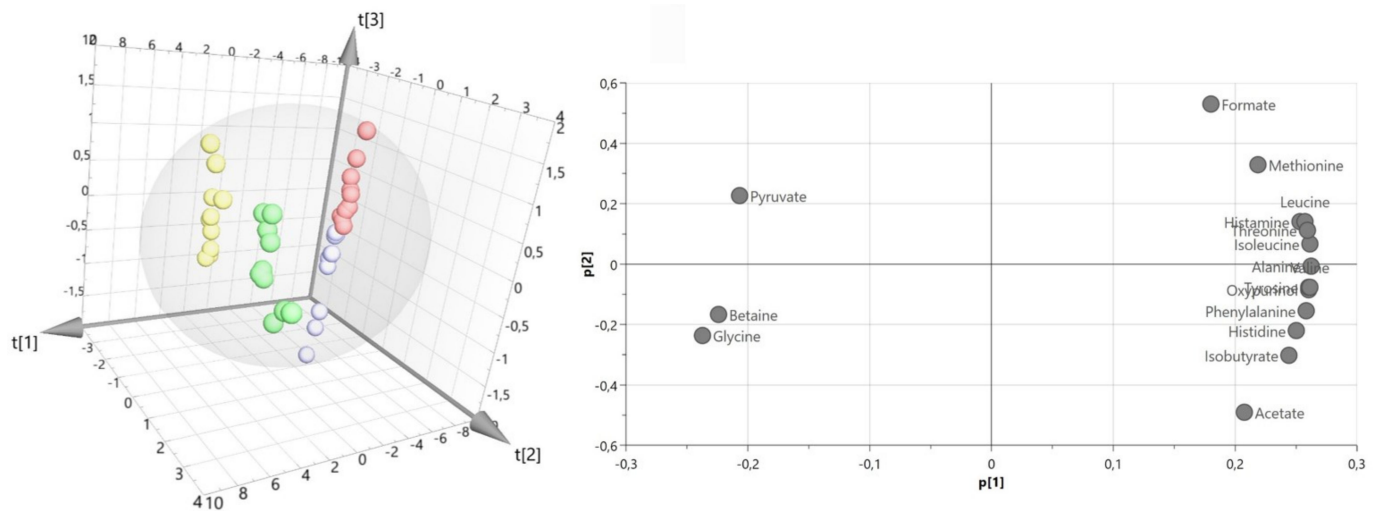


Figure 3. PCA model plot and corresponding loading plot for of ^1H NMR data of all metabolites of *P. aeruginosa* strains (drug-resistant extracellular (green), drug-susceptible extracellular (yellow), drug-resistant intracellular (blue), and drug-susceptible intracellular (red)). Symbols in the same color represent biological repetitions.

Supervised analysis OPLS-DA analysis provides the strain's grouping. The CV-ANOVA test of this model gave statistically important results (model with parameters are available in Supplementary Materials (Figure S1)).

2.3.1. Intracellular Metabolites

PCA score plot revealed the clustering of bacterial isolates with and without antibiotic resistance (Figure 4). The first and second principal components (PC) accounted, respectively, for 41.6% and 21.5% of the total variance in the data ($R^2X = 0.631$).

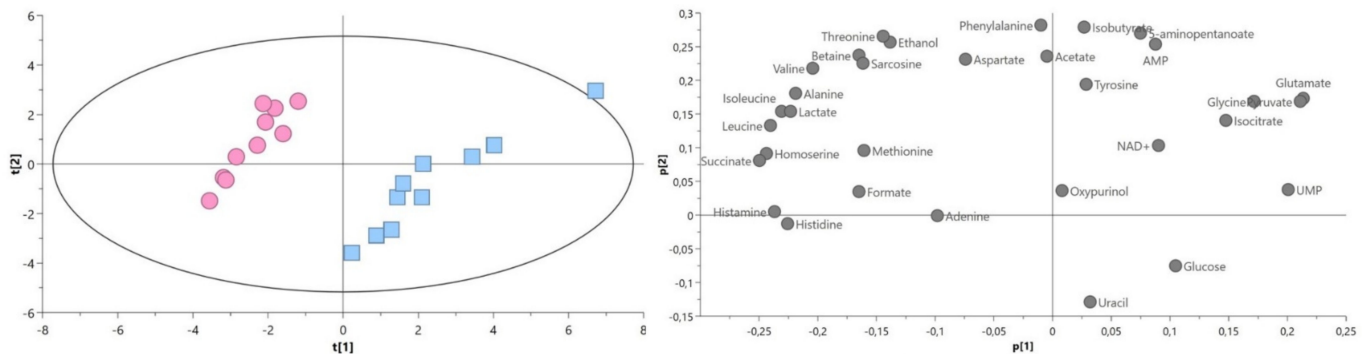


Figure 4. PCA model plot and corresponding loading plot of ^1H NMR data of intracellular metabolites of drug-resistant (blue squares) and drug-susceptible (red circle) *P. aeruginosa* strains. Symbols in the same color represent biological repetitions.

Supervised OPLS-DA analysis provides the strain's grouping. The CV-ANOVA test of this model gave statistically important results (model with parameters are available in Supplementary Materials (Figure S2)).

2.3.2. Extracellular Metabolites

For the PCA extracellular metabolites analysis, in addition to two types of bacterial strain isolates, a control group was also taken into consideration (the entire content of medium before bacterial cultivation).

The PCA score plot showed the difference between sample distributions for bacteria isolates with different antibiotic resistance, while the control group formed a separate

data set. In a comparison of both *P. aeruginosa* strains with control, the first and second principal components (PC) accounted for 56.0% and 19.7% of the total variance in the data, respectively, ($R^2X = 0.996$) (Figure 5A). The score plot showed the differences between the amino acids (glycine, alanine, tryptophan, leucine, lysine, methionine, threonine, and histidine), pyruvate, isobutyrate, acetate, tyrosine, and 6-hydroxynicotinate.

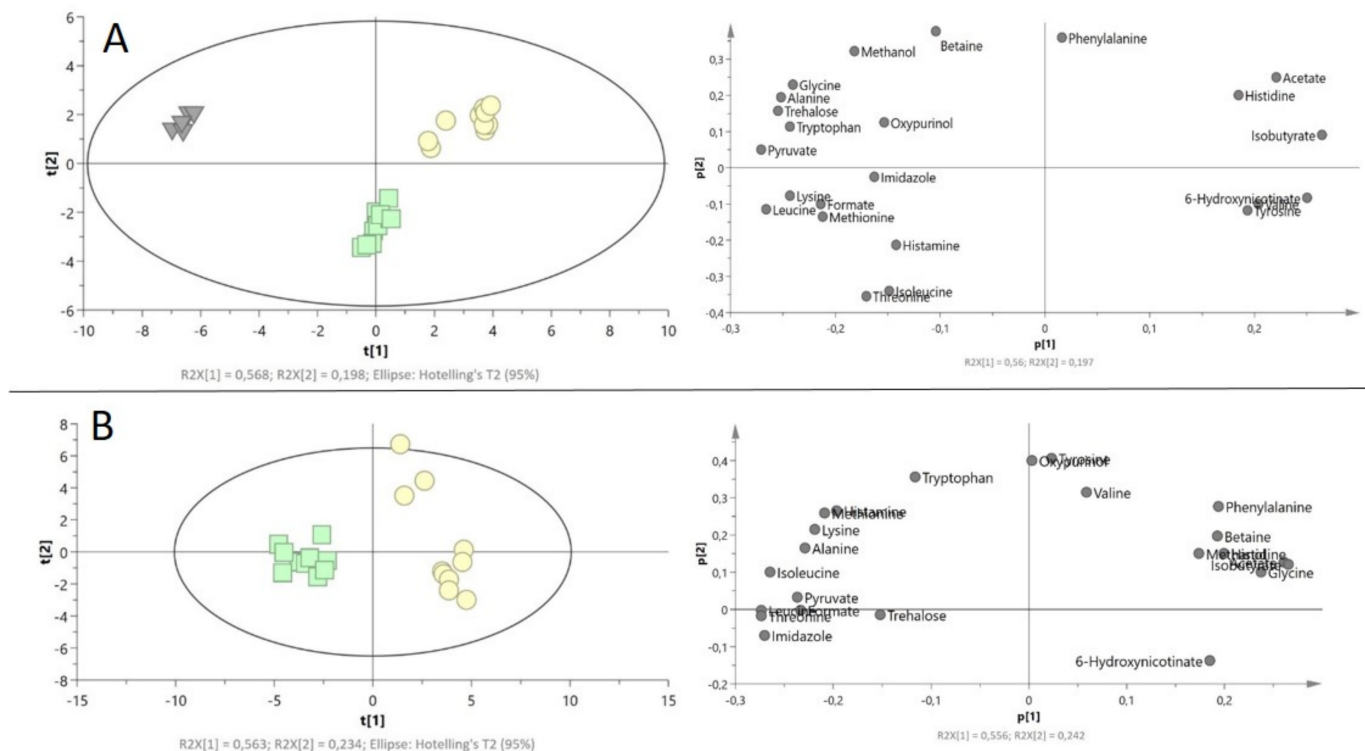


Figure 5. PCA model plots and corresponding loading plots for ^1H NMR data of extracellular metabolites of *P. aeruginosa* strains. (A) Both *P. aeruginosa* strains with control; (B) both *P. aeruginosa* strains. Drug-resistant extracellular (green squares), drug-susceptible extracellular (yellow circle), control—LB medium (gray triangles). Symbols in the same color represent biological repetitions.

The direct comparison between the *P. aeruginosa* strains showed a clear separation between the studied groups. The first and second principal components (PC) accounted, respectively, for 55.6% and 23.2% of the total variance. Differences were mainly observed in amino acid levels (Figure 5B).

For each comparison, the supervised OPLS-DA analysis provides the strain's grouping. The CV-ANOVA test of this model gave statistically important results (model with parameters are available in Supplementary Materials (Figure S3)). Information concerning an additional PCA single comparison of the drug-resistant *P. aeruginosa* strain with control and drug-susceptible *P. aeruginosa* strain with control is available in Supplementary Materials (Figure S4).

2.4. Statistical Analysis

2.4.1. Intracellular Metabolites

Among all the identified metabolites, 20 showed a statistically significant difference between susceptible and resistant strains ($p < 0.05$) (succinate, homoserine, histidine, histamine, lactate, alanine, glutamate, pyruvate, UMP, valine, isoleucine, leucine, betaine, methionine, formate, glycine, sarcosine, threonine, ethanol, and isocitrate).

In the same comparison, VIP scores greater than 1.00 were obtained for 16 overlapped metabolites (all statistically important metabolites, without glycine, threonine, succinate, and lactate). Detailed statistical data are shown in Table 2.

Table 2. The VIP score for discrimination OPLS with univariate analysis results for quantified metabolites in comparisons for intracellular metabolites *Pseudomonas aeruginosa* strains.

Compound Group	Metabolite	VIP Score for OPLS-DA Model	Mean/Median * Relative Concentration R	Mean/Median * Relative Concentration S	RSD R [%]	RSD S [%]	Fold Change R/S	p Value	FDR **
Amino acids	Histidine	1.238	0.030	0.022	7.096	12.502	1.376	6.22×10^{-7}	6.63×10^{-6}
	Alanine	1.282	0.206	0.152	11.021	8.278	1.358	3.23×10^{-6}	1.72×10^{-5}
	Glutamate	1.247	0.308	0.371	10.271	5.964	0.830	6.48×10^{-5}	2.71×10^{-4}
	Valine	1.246	0.185	0.140	13.759	9.833	1.323	1.06×10^{-4}	3.40×10^{-4}
	Isoleucine	1.322	0.095 #	0.056 #	18.228	11.873	1.692	1.83×10^{-4}	4.87×10^{-4}
	Leucine	1.359	0.383 #	0.203 #	18.323	8.907	1.887	1.83×10^{-4}	4.87×10^{-4}
	Methionine	0.912	0.022	0.015	25.325	20.409	1.453	3.18×10^{-3}	7.27×10^{-3}
	Glycine	1.029	0.202	0.229	10.051	7.502	0.881	4.38×10^{-3}	8.76×10^{-3}
	Threonine	1.034	0.042	0.038	10.142	5.496	1.109	1.62×10^{-2}	2.88×10^{-2}
	Aspartate	0.707	0.068	0.062	15.953	14.564	1.093	2.11×10^{-1}	2.81×10^{-1}
Amino acid metabolism	Phenylalanine	0.705	0.113 #	0.121 #	14.269	7.127	0.933	5.21×10^{-1}	6.02×10^{-1}
	Tyrosine	0.508	0.115	0.118	10.702	10.218	0.970	5.26×10^{-1}	6.02×10^{-1}
	Homoserine	1.358	0.619	0.392	9.718	5.487	1.578	1.85×10^{-7}	2.96×10^{-6}
	Histamine	1.300	0.016	0.009	16.267	16.722	1.725	1.50×10^{-6}	1.13×10^{-5}
	Sarcosine	1.048	0.022	0.016	19.383	28.508	1.386	5.94×10^{-3}	1.12×10^{-2}
	5-aminopentanoate	0.786	0.266	0.279	11.883	8.474	0.954	3.22×10^{-1}	3.96×10^{-1}
	Succinate	1.382	0.669	0.401	9.236	7.523	1.669	1.43×10^{-8}	4.57×10^{-7}
	Pyruvate	1.231	0.199	0.238	10.392	5.611	0.834	7.63×10^{-5}	2.71×10^{-4}
	Isocitrate	0.885	0.169	0.193	16.536	3.586	0.873	2.18×10^{-2}	3.51×10^{-2}
	Glucose	0.602	0.031	0.036	25.176	14.910	0.864	1.22×10^{-1}	1.77×10^{-1}
Cofactor	NAD+	0.559	0.031	0.034	7.776	11.658	0.938	1.71×10^{-1}	2.38×10^{-1}
	UMP	1.104	0.009	0.012	13.476	6.289	0.799	7.52×10^{-5}	2.71×10^{-4}
Nucleotide processing pathways	Adenine	0.54	0.011 #	0.010 #	8.239	13.275	1.103	1.21×10^{-1}	1.77×10^{-1}
	AMP	0.797	0.067	0.072	12.569	12.192	0.932	2.21×10^{-1}	2.83×10^{-1}
	Uracil	0.364	0.010	0.010	26.399	19.769	0.964	7.31×10^{-1}	8.06×10^{-2}
	Lactate	1.284	0.274	0.186	12.175	11.863	1.471	1.76×10^{-6}	1.13×10^{-5}
Others	Betaine	1.083	8.428	7.200	11.685	7.209	1.171	2.63×10^{-3}	6.47×10^{-3}
	Formate	0.908	0.009	0.007	13.181	16.178	1.237	4.33×10^{-3}	8.76×10^{-3}
	Ethanol	0.991	0.075	0.065	14.898	6.110	1.153	2.19×10^{-2}	3.51×10^{-2}
	Isobutyrate	0.711	0.018 #	0.017 #	19.107	12.686	1.078	8.50×10^{-1}	9.07×10^{-1}
	Oxypurinol	0.1	0.034 #	0.034 #	9.793	9.363	0.997	9.10×10^{-1}	9.39×10^{-1}
	Acetate	0.59	0.066	0.065	13.588	25.511	1.006	9.48×10^{-1}	9.48×10^{-1}

R—drug-resistant *P. aeruginosa* strains. S—drug-susceptible *P. aeruginosa* strains; VIP (variable importance in projection) > 1.00 and statistically important metabolites are marked on the grey background;

* mean—samples with normal distribution; median (marked with #)—samples without normal distribution; ** FDR—Q values from false discovery rate control by Benjamini–Hochberg procedure.

Among the differentiating metabolites the relative concentration of succinate, homoserine, lactate, alanine, valine, isoleucine, leucine, betaine, histidine, histamine, methionine, formate, sarcosine, threonine, and ethanol were upregulated in the group of drug-resistant *P. aeruginosa*, while only five metabolites were at the higher-level for drug-sensitive samples—glutamate, pyruvate, UMP, glycine, isocitrate (Figure 6).

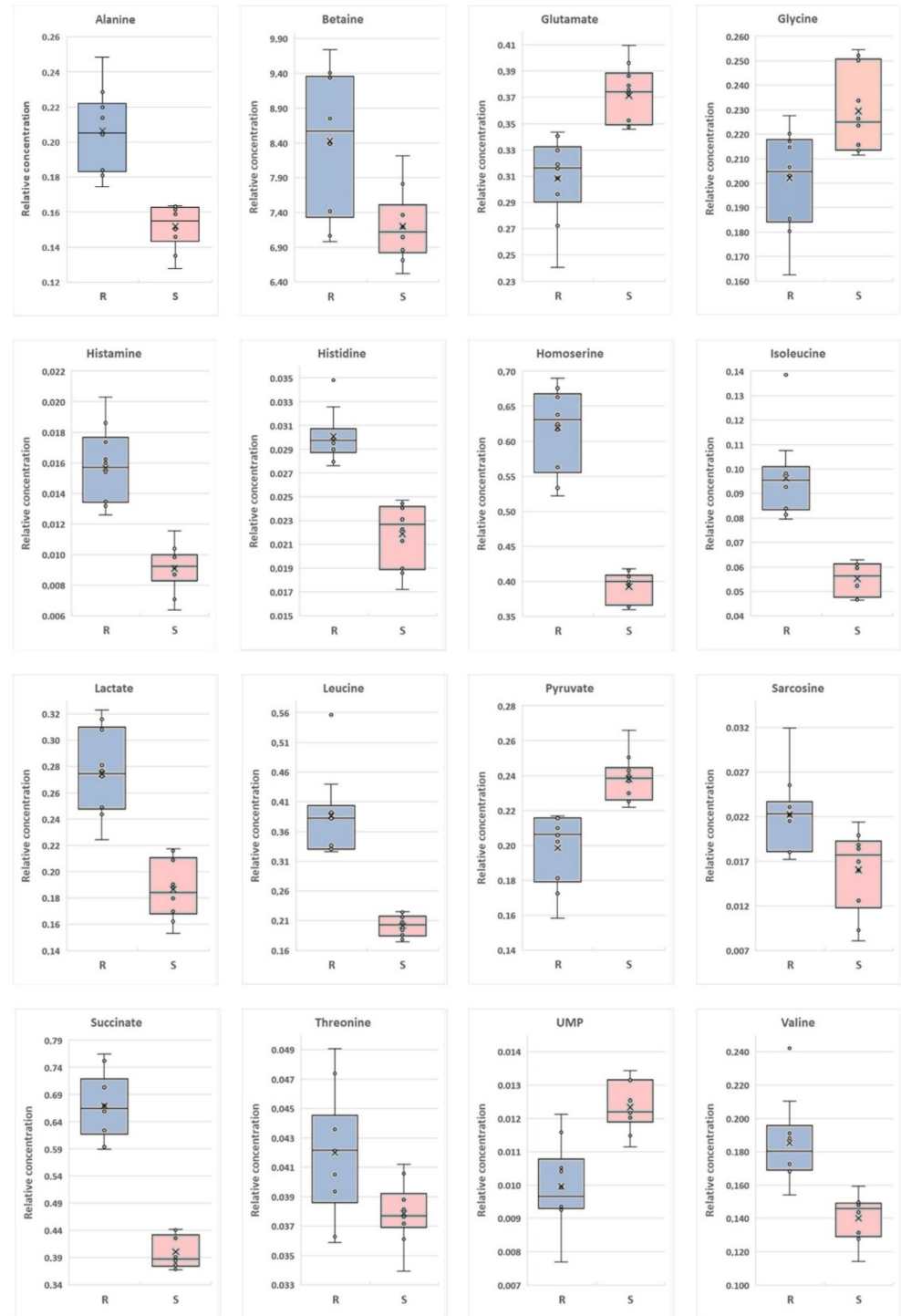


Figure 6. Boxplots for intracellular metabolites with VIP (Variable Importance in Projection) scores above 1.00 are statistically important after p -value adjustment ($q < 0.05$). Red bars—S—drug-susceptible strain; blue bars—R—drug-resistant strain.

2.4.2. Extracellular Metabolites

The comparison of the drug-resistant *P. aeruginosa* strain with the drug-susceptible strain enabled the identification of 16 statistically significant metabolites ($p < 0.05$) (acetate, alanine, betaine, glycine, formate, histidine, imidazole, isobutyrate, isoleucine, leucine, lysine, methanol, phenylalanine, pyruvate, threonine and 6-hydroxynicotinate), while a VIP scores greater than 1.00 were found for nine metabolites (acetate, glycine, imidazole, isobutyrate, isoleucine, leucine, phenylalanine, pyruvate, and threonine).

The comparison of the drug-resistant *P. aeruginosa* strain with the control (LB medium) enabled the identification of 17 statistically significant metabolites ($p < 0.05$) (acetate, alanine, betaine, glycine, isobutyrate, leucine, lysine, methanol, methionine, phenylalanine, pyruvate, trehalose, threonine, tryptophan, tyrosine, valine and 6-hydroxynicotinate). In this case, VIP scores greater than 1.00 were obtained for 15 metabolites (all statistically important metabolites, without acetate, and threonine).

The comparison of the drug-susceptible *P. aeruginosa* strain with the control (LB medium) identified 19 statistically significant metabolites ($p < 0.05$) (acetate, alanine, betaine, glycine, histidine, isobutyrate, isoleucine, leucine, lysine, methanol, methionine, phenylalanine, pyruvate, trehalose, threonine, tryptophan, tyrosine, valine and 6-hydroxynicotinate). 14 metabolites had VIP score greater than 1.00 (all statistically significant metabolites, without isoleucine, histidine, methionine, imidazole, and betaine). Detailed statistical data are available in Table 3.

Among the differentiating metabolites, the relative concentration of alanine, formate, imidazole, isoleucine, leucine, lysine, pyruvate, and threonine was upregulated in the group of drug-resistant *P. aeruginosa* vs. drug-susceptible strains. Eight metabolites were at a higher level in drug-susceptible samples—6-hydroxynicotinate, acetate, betaine, glycine, histidine, isobutyrate, methanol, and phenylalanine. The relative concentration of three metabolites was lower in bacterial culture media than the control medium—glycine, leucine, and pyruvate. The concentrations of isobutyrate and acetate were higher in cell culture media than in control samples (Figure 7).

2.5. Bioinformatics Analysis

Bioinformatics analysis was used to produce a graphical representation of compounds, enzymes, reactions, modules, and pathways with information on how the input metabolites found in the statistical analysis reach the suggested pathways and on how these pathways cross-talk. An interactive version of the graphic for analysis is also available. For this analysis metabolites with statistical importance and VIPs greater than 1.00 were chosen.

2.5.1. Intracellular Metabolites

The graphical representation of compounds, enzymes, reactions, modules, pathways, with information on how the input metabolites reach the suggested pathways, and on how these pathways cross-talk for intracellular metabolites is shown in Figure 8.

The main pathways connected with these compounds are ABC transporters, vancomycin metabolism pathway, and amino acids pathways, especially glycine, serine, threonine, alanine, and pyruvate metabolism.

Table 3. The VIP score for discrimination OPLS with univariate analysis results for quantified metabolites in comparisons for extracellular metabolites *Pseudomonas aeruginosa* strains (RC -relative concentration).

Group	Metabolites	Mean/ Median RC		Mean/ Median RC C ⁺	RSD R [%]	RSD R [%]	RSD K [%]	R vs. S				C vs. R				C vs. S			
		Mean/ Median RC	S ⁺					VIP Score	Fold Change R/S	p Value	FDR **	VIP Score	Fold Change C/R	p Value	FDR **	VIP Score	Fold Change C/S	p Value	FDR **
Amino acids (AA)	Theanine	6.583	4.868	6.128	3.623	5.620	1.900	1.197	1.352	1.37 × 10 ⁻¹¹	8.24 × 10 ⁻¹¹	8.86	0.931	1.57 × 10 ⁻³	2.22 × 10 ⁻³	1.083	1.259	2.49 × 10 ⁻⁷	7.46 × 10 ⁻⁷
	Leucine	8.607	6.050	10.65	2.352	8.221	5.513	1.201	1.423	4.14 × 10 ⁻⁹	1.99 × 10 ⁻⁸	1.133	1.237	1.03 × 10 ⁻³	1.54 × 10 ⁻³	1.118	1.76	6.48 × 10 ⁻⁸⁰	2.22 × 10 ⁻⁹
	Isoleucine	2.676	2.191	2.516	4.134	8.724	8.159	1.115	1.221	1.75 × 10 ⁻⁶	6.00 × 10 ⁻⁶	0.584	0.94	6.76 × 10 ⁻²	8.54 × 10 ⁻²	0.881	1.148	9.65 × 10 ⁻³	1.22 × 10 ⁻²
	Glycine	0.093	0.138	1.155	16.681	11.456	1.660	1.080	0.678	5.93 × 10 ⁻⁶	1.78 × 10 ⁻⁵	1.203	12.563	5.73 × 10 ⁻²¹	4.93 × 10 ⁻²⁰	1.14	8.387	1.10 × 10 ⁻²⁰	1.78 × 10 ⁻¹⁹
	Phenylalanine	2.015	2.407	2.352	2.981	8.182	2.468	1.078	0.837	9.95 × 10 ⁻⁵	2.39 × 10 ⁻⁴	1.146	1.167	1.22 × 10 ⁻⁷	2.94 × 10 ⁻⁷	0.696	0.977	4.31 × 10 ⁻¹	4.50 × 10 ⁻¹
	Histidine	0.155	0.195	0.142	14.571	11.601	4.770	0.944	0.796	9.54 × 10 ⁻⁴	1.76 × 10 ⁻³	0.376	0.916	1.19 × 10 ⁻¹	1.36 × 10 ⁻¹	0.947	0.729	2.15 × 10 ⁻⁵	4.68 × 10 ⁻⁵
	Alanine	1.993	1.835	6.954	3.342	5.546	1.453	0.974	1.086	2.20 × 10 ⁻³	3.78 × 10 ⁻³	1.204	3.489	6.17 × 10 ⁻²¹	4.93 × 10 ⁻²⁰	1.139	3.79	6.66 × 10 ⁻⁴	9.40 × 10 ⁻⁴
	Lysine	10.993	10.17	11.918	2.894	6.608	1.520	0.949	1.081	4.00 × 10 ⁻³	6.00 × 10 ⁻³	1.042	1.084	4.71 × 10 ⁻⁵	8.69 × 10 ⁻⁵	1.026	1.172	8.28 × 10 ⁻⁶	1.99 × 10 ⁻⁵
	Valine	3.985	4.177 [#]	3.493	3.649	5.396	4.115	0.752	0.954	8.90 × 10 ⁻²	1.19 × 10 ⁻¹	1.038	0.877	3.23 × 10 ⁻⁵	6.45 × 10 ⁻⁵	1.031	0.836	6.66 × 10 ⁻⁴	9.40 × 10 ⁻⁴
	Methionine	0.949	0.202 [#]	1.205	5.045	97.014	1.313	0.943	4.706	1.40 × 10 ⁻¹	1.61 × 10 ⁻¹	1.154	1.27	2.82 × 10 ⁻⁹	9.66 × 10 ⁻⁹	0.943	5.977	1.27 × 10 ⁻²	1.52 × 10 ⁻²
Tryptophan	0.078	0.026 [#]	0.212	6.533	97.715	2.961	0.752	2.959	1.40 × 10 ⁻¹	1.61 × 10 ⁻¹	1.200	2.719	1.31 × 10 ⁻¹⁵	7.85 × 10 ⁻¹⁵	1.041	8.046	6.66 × 10 ⁻⁴	9.40 × 10 ⁻⁴	
Tyrosine	0.861	0.861 [#]	0.599	4.827	15.001	0.640	0.817	1.000	4.73 × 10 ⁻¹	4.73 × 10 ⁻¹	1.160	0.696	6.50 × 10 ⁻⁹	1.73 × 10 ⁻⁸	1.022	0.696	6.66 × 10 ⁻⁴	9.40 × 10 ⁻⁴	
AA metabolism	Histamine	0.283	0.167 [#]	0.273	4.487	38.007	2.349	0.900	1.700	1.40 × 10 ⁻¹	1.61 × 10 ⁻¹	0.518	0.965	1.30 × 10 ⁻¹	1.42 × 10 ⁻¹	0.809	1.641	2.54 × 10 ⁻¹	2.78 × 10 ⁻¹
Others	Imidazole	0.078	0.047	0.055 [#]	3.930	5.241	72.63	1.221	1.672	1.63 × 10 ⁻¹⁵	3.91 × 10 ⁻¹⁴	0.463	0.712	5.94 × 10 ⁻¹	5.94 × 10 ⁻¹	0.681	1.119	6.66 × 10 ⁻⁴	9.40 × 10 ⁻⁴
	Oxypurinol	0.096	0.100	0.226 [#]	3.293	11.458	52.044	0.768	0.961	3.22 × 10 ⁻¹	3.52 × 10 ⁻¹	0.690	2.347	5.94 × 10 ⁻¹	5.94 × 10 ⁻¹	0.662	2.255	5.94 × 10 ⁻¹	5.94 × 10 ⁻¹
	Isobutyrate	0.436	0.692	0.204	6.416	3.999	19.06	1.221	0.630	5.94 × 10 ⁻¹⁴	7.12 × 10 ⁻¹³	1.164	0.468	5.73 × 10 ⁻⁹	1.72 × 10 ⁻⁸	1.134	0.295	4.70 × 10 ⁻¹³	2.82 × 10 ⁻¹²
	Acetate	3.486	10.284	2.589	32.191	7.080	2.005	1.200	0.339	4.04 × 10 ⁻¹²	3.23 × 10 ⁻¹¹	0.522	0.743	3.24 × 10 ⁻²	4.32 × 10 ⁻²	1.135	0.252	6.94 × 10 ⁻¹¹	2.77 × 10 ⁻¹⁰
	Pyruvate	0.184	0.153	0.256	5.221	5.938	1.400	1.131	1.203	7.16 × 10 ⁻⁷	2.86 × 10 ⁻⁶	1.178	1.388	7.05 × 10 ⁻¹⁰	2.82 × 10 ⁻⁹	1.129	1.669	3.91 × 10 ⁻¹²	1.88 × 10 ⁻¹¹
	Betaine	5.167	5.667	6.108	4.576	4.925	1.544	0.970	0.912	4.17 × 10 ⁻⁴	9.10 × 10 ⁻⁴	1.111	1.182	1.26 × 10 ⁻⁶	2.74 × 10 ⁻⁶	0.818	1.078	4.91 × 10 ⁻³	6.55 × 10 ⁻³
	Formate	0.048	0.017	0.092 [#]	40.445	24.975	49.725	0.989	2.816	6.25 × 10 ⁻⁴	1.25 × 10 ⁻³	0.58	1.924	7.53 × 10 ⁻²	9.03 × 10 ⁻²	0.94	5.419	7.53 × 10 ⁻²	8.60 × 10 ⁻²
	Trehalose	0.121 [#]	0.084	0.317	27.213	7.319	3.308	0.744	1.444	3.85 × 10 ⁻¹	4.01 × 10 ⁻¹	1.174	2.613	6.66 × 10 ⁻⁴	1.07 × 10 ⁻³	1.137	3.773	8.92 × 10 ⁻¹⁷	7.14 × 10 ⁻¹⁶
	Methanol	0.035	0.043	0.062	6.492	13.301	2.112	0.859	0.826	2.45 × 10 ⁻³	3.92 × 10 ⁻³	1.193	1.741	5.12 × 10 ⁻¹²	2.46 × 10 ⁻¹¹	1.03	1.439	9.90 × 10 ⁻⁷	2.64 × 10 ⁻⁶
	6-Hydroxynicotinate	0.113	0.126	0.054 [#]	3.153	10.280	35.106	0.813	0.899	1.28 × 10 ⁻²	1.80 × 10 ⁻²	1.078	0.478	6.66 × 10 ⁻⁴	1.07 × 10 ⁻³	1.038	0.43	6.66 × 10 ⁻⁴	9.40 × 10 ⁻⁴

R—drug-resistant *P. aeruginosa* strains. S—drug-susceptible *P. aeruginosa* strains; VIP (variable importance in projection) > 1.00 and statistically important metabolites are marked on the grey background; * mean—samples with normal distribution; median (marked with #)—samples without normal distribution; ** FDR—Q values from false discovery rate control by Benjamini–Hochberg procedure.

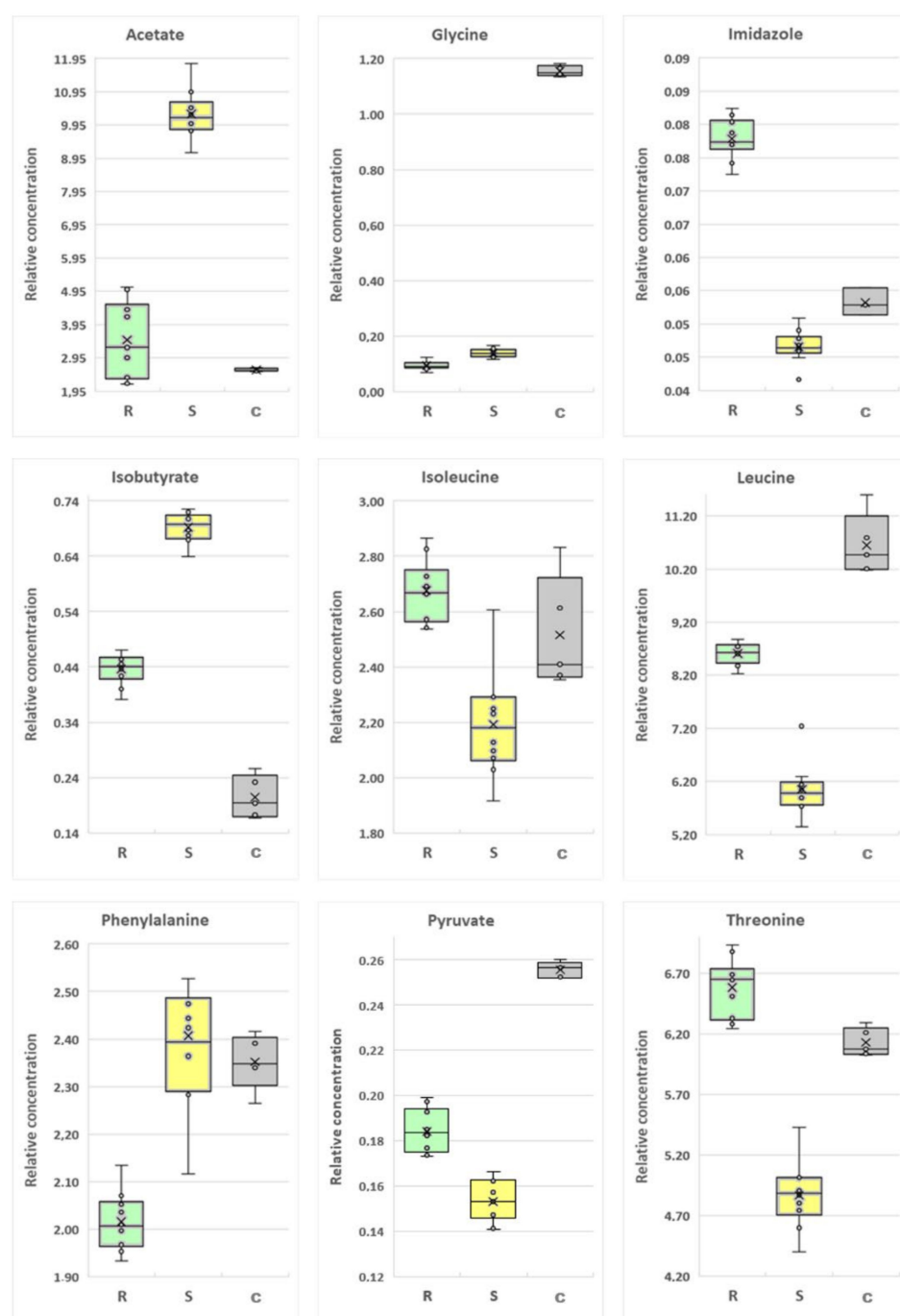


Figure 7. Boxplots for extracellular metabolites with VIP (Variable Importance in Projection) scores above 1.00 and statistically important after p -value adjustment ($q < 0.05$). Yellow bars—S—drug-susceptible strain, green bars—R—drug-resistant strain, gray bars—C—control (medium LB).

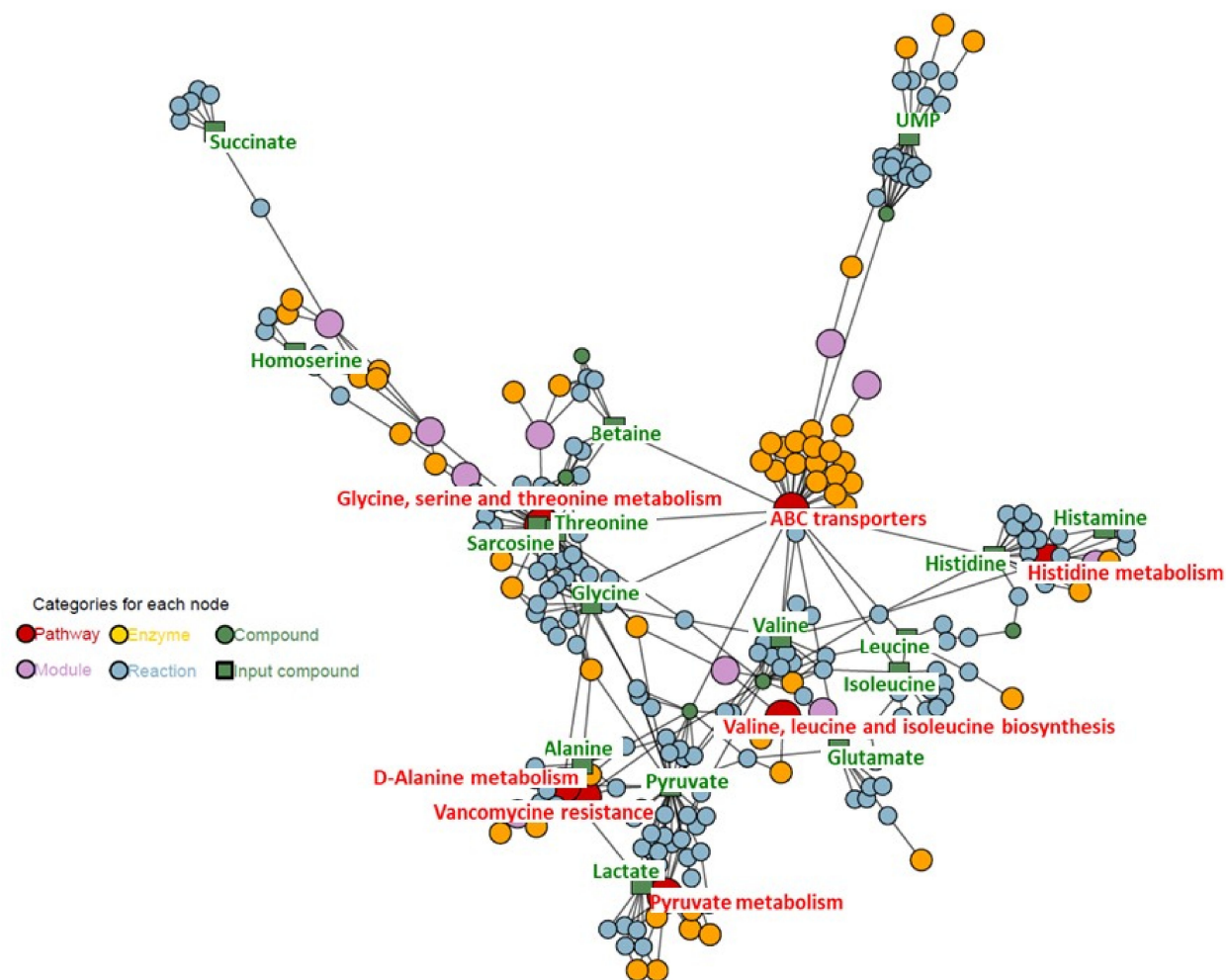


Figure 8. Results of the node prioritization by FELLA in the *Pseudomonas aeruginosa* strain (intracellular analysis).

2.5.2. Extracellular Metabolites

The graphical representation of compounds, enzymes, reactions, modules, pathways, and information on how the input metabolites reach the suggested pathways, and on how these pathways cross-talk for extracellular metabolites is shown in Figure 9.

The main pathways connected with these compounds are ABC transporters, vancomycin metabolism pathway, and amino acids pathways.

The interactive versions of Figures 8 and 9 are available in Supplementary Materials (Files S1 and S2).

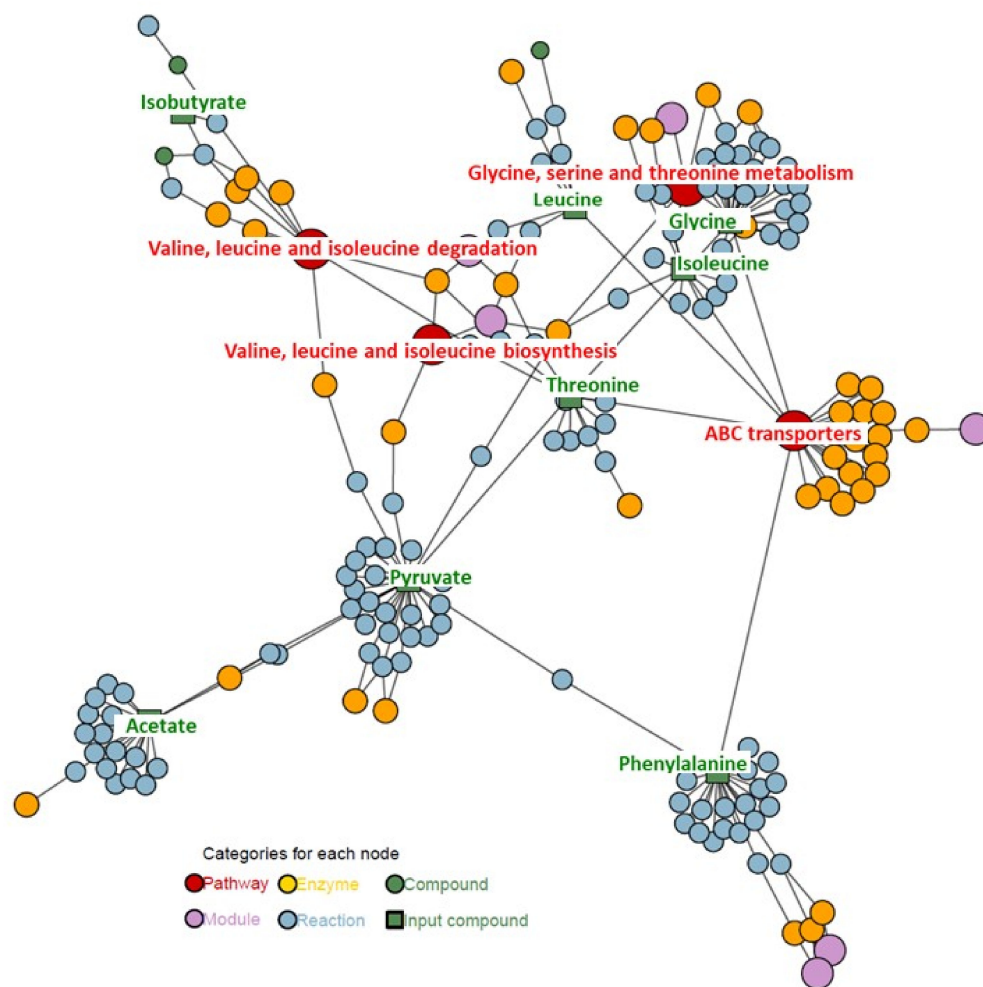


Figure 9. Results of the node prioritization by FELLA in the *Pseudomonas aeruginosa* strain (extracellular analysis).

3. Discussion

Increasing antibiotic resistance leads to the development of alternative chemotherapeutics dedicated to treating bacterial infections. In the case of *P. aeruginosa* infections, treatment with β -lactams, fluoroquinolones, and aminoglycosides is widely used. In multi-drug resistant strains, ceftolozan/tazobactam and colistin could also be administered, but these can cause toxic and adverse side effects [3,4,12]. New therapeutic strategies may involve the addition of compounds improving the activity of traditional antibiotics [27]. Understanding the exact mechanisms of action of currently used drugs could support this process, which is why it is so important to perform analyses at various molecular levels [8]. Insights about differences between drug-resistant and drug-sensitive strains can be given by metabolomics studies, where the differences in the low-molecular-weight compounds' regulation reflect the changes in biochemical pathways [28]. This approach may be helpful for the delineation of molecular targets and drug design [29]. In addition, bacteriostatic compounds based on new structures and mechanisms of action are being designed [30]. Information regarding the prevalence of antibiotic resistance mechanisms would support the development process.

However, these strategies will probably not be universal. In such a situation, selection of effective therapy should be based on a detailed analysis of resistance mechanisms present in an individual clinical strain. Treatment of antibiotic-resistant bacteria is likely to require an individual approach. Therefore, the development of a fast and accurate diagnostic tool

seems to be necessary. Our results show that the metabolomics approach with the use of ^1H NMR spectroscopy may establish new horizons in this area [29].

The analysis of all accessible sources of data may provide an interesting insights into the evolutionary adaptation of *P. aeruginosa*. Among intracellular metabolites there is an interesting relationship between pyruvate and its reduction product—lactate. In the antibiotic resistant strain, the level of pyruvate was decreased while the level of lactate is increased, in comparison to antibiotic-susceptible strain. This may be the result of a more intense reduction reaction of pyruvate in the drug-resistant strain since none of the strains secreted these compounds to the culture medium. However, research in cystic fibrosis (CF) patients' samples shows that lactate is a major component in sputum, and could be an important infection factor [31]. Pyruvate seems also to be associated with BCAA biosynthesis (valine, leucine, and isoleucine), which were upregulated in the drug-resistant strain [32]. Moreover, significant differences were observed in the intracellular concentrations of isocitrate (lower in the resistant strain) and succinate (higher in the resistant strain).

In the majority of cases, the identified intracellular amino acids were at the higher level in the case of the antibiotic-resistant strain. The exceptions were glycine, glutamate, and tyrosine whose concentrations were significantly higher in the antibiotic-resistant strain. According to literature data, the amino acid conversion pathways are more efficient in antibiotic-resistant strains [33]. Our results have shown clearly changes in amino acids in both strains. Furthermore, the metabolic modification to amino acids as carbon sources is essential in antibiotic resistance [14,34,35].

In the antibiotic resistance strain, the relative concentration of UMP was lower. The synthesis of UMP has been shown to play an important role in sustaining virulence, biofilm formation, and antibiotic resistance in *P. aeruginosa* [14,27]. The production of biofilm in bacteria creates a physical barrier and reduces the effectiveness of treatment with various antibiotics. Furthermore, biofilm-formation is a critical mechanism of adaptive resistance [2]. Our results seem to confirm this observation.

Analysis of culture media revealed that the tested strains differed in amino acid turnover patterns. Both strains used all available glutamate, aspartate, asparagine, and pyroglutamate. However, for the susceptible strain, some of metabolites were taken from the medium at a higher level: alanine, leucine, lysine, and methionine, while threonine, histamine, and isoleucine were mostly utilized only by the antibiotic susceptible strain. The common metabolite for both types of isolates is glycine which was drained from the cultivation medium and seems to be one of the crucial nutrients. Different amino acid utilization patterns may result from reduced expression of transport proteins. The FELLA analysis results suggest that amino acid uptake may be interrupted. The KEGG database includes only information regarding amino acid ABC-transporters localized in the inner membrane [36]. These proteins are not considered antibiotic transporters; however, their activity depends on the presence of porins transporting amino acids from the environment into the periplasmic space (these relations are not included in KEGG). Porins (such as OprD) are recognized as structures necessary for antibiotic uptake. Our results suggest that resistance of a strain to some β -lactams may depend on the reduced expression of porin, also resulting in reduced amino acid uptake. Elevated glycine uptake in the case of the antibiotic-resistant strain may result from a lack of threonine absorption. To satisfy the cell threonine demand, the antibiotic-resistant strain probably synthesizes this amino acid from glycine [35,37]. Moreover, in *P. aeruginosa* enzymes required for sarcosine synthesis from glycine were identified [38]. The different amino acid metabolism could originate for three reasons: different protein turnover, influx–outflux equilibrium, or bacteria amino acid biosynthesis. This last phenomenon can be caused by all the bacterial organism biochemical machinery for proteinogenic amino acid synthesis [33,37].

In the culture medium, acetate and isobutyrate were also present. The concentration of both compounds was higher in the case of the antibiotic-susceptible strain. These compounds are products of the catabolic metabolism of amino acids. Increased concentration

of acetate and isobutyrate may indicate more intense metabolic activity of the antibiotic susceptible strain. The concentration of acetate in the cultivation medium showed a negative correlation with infection length in CF patients [34]. Reduced production of acetate is considered a sign of adaptation of a pathogen to the environment in the respiratory tracts of CF patients.

Observed metabolic differences between examined strains may result from starvation response (SR) activation in the drug-resistant strain. SR relies on the presence of the ppGpp molecule produced by two enzymes relA and spoT. RelA becomes active when the cell suffers amino acid limitation. SpoT produces ppGpp in response to sugar, iron, and fatty acid deficiency. Both proteins were identified in *P. aeruginosa* [15]. SR activation influences gene expression involved in glycolysis, the TCA cycle, and the amino acid synthesis pathway. In *E. coli*, expression of the majority of enzymes for amino acid synthesis is upregulated [25]. Moreover, the expression of glyoxalate-producing enzymes is also increased. On the other hand, expression of enzymes producing oxalacetate from succinate is reduced. If SR mechanisms in *P. aeruginosa* cause a transcriptional response similar to the one observed in *E. coli*, altered enzyme expression may explain the observed changes in intracellular metabolite concentration.

4. Conclusions

The treatment of bacterial infections is a significant problem, especially when in pathogens form biofilm structures. Despite novel pharmacotherapy restoring CFTR functionality being available, CF patients still suffer from bacterial infections [39]. Therefore, research focused on the treatment of bacterial lung infections is still needed.

Our results show that the metabolic differences between antibiotic-resistant and antibiotic-susceptible bacteria strains may be linked with the activity of antibiotic resistance mechanisms. Comparison of intracellular and extracellular metabolite profiles showed differences between drug-resistant and drug-susceptible *P. aeruginosa* strains within the intracellular amino acid pool. The intracellular free amino acid concentration results from the balance between different processes: protein synthesis, uptake from the environment, and their biosynthesis and degradation. This information may be helpful in the selection of the most effective therapy and targets for future drugs.

5. Materials and Methods

5.1. Bacterial Strains and Culture Conditions

In this study, two *P. aeruginosa* strains were analyzed: PAW17 (antibiotic susceptible) and PAW23 (antibiotic resistant). The strains were isolated from patients suffering from CF in the Mother and Child Institute in Warsaw. For long-term storage, strains were kept as glycerol preserved suspensions at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

After thawing from $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, the bacteria were grown on Miller's LB Broth agar (BioShop) overnight at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. In the next step, pre-culture was prepared. 5 mL of liquid LB medium in a test tube was inoculated with a single colony from the agar plate and incubated for 24 h at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ with shaking (180 r.p.m.). After that, 100 mL of the culture in a 300 mL conical flask was prepared (initial $\text{OD}_{600\text{nm}} = 0.1$) and incubated for 24 h under the same conditions. The strains' breeding for metabolomics analysis was performed without antibiotic treatment. After 24 h of cultivation, both strains were in the stationary phase.

To collect bacterial cells the culture was centrifuged (19,000 r.c.f., 5 min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$) (sigma 3-18 KS, Polygen), and the bacterial pellet was washed with 0.9% NaCl solution. Culture medium samples were stored at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. The bacterial pellets were lyophilized (Scanvac-Coolsave, Labogene) and stored at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Before extraction, each sample was weighted in tubes (Eppendorf). The entire protocol was repeated for each strain in ten biological repetitions. Additionally, to compare the levels of extracellular metabolites with fresh medium, five technical repetitions of fresh LB medium samples were analyzed.

5.2. Antibiotic Resistance

The susceptibility of *P. aeruginosa* strains to most antibiotics was determined by the disc diffusion method. The bacterial suspension with a density equal to 0.5 McFarland was inoculated with a swab on Mueller–Hinton II Agar. The following antibiotic discs were placed on the seeded medium: amikacin (30 µg), netilmicin (10 µg), tobramycin (10 µg), gentamicin (10 µg), ceftazidime (10 µg), cefepime (30 µg), imipenem (10 µg), meropenem (10 µg), levofloxacin (5 µg), piperacillin (30 µg), piperacillin / tazobactam (30/6 µg), ticarcillin / clavulanic acid (75/10 µg) (all Emapol antibiotic discs). The cultivation was carried out for 18 ± 2 h at $35 \text{ °C} \pm 1 \text{ °C}$ under aerobic conditions. The results were interpreted following the current recommendations of the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) [40].

5.3. Extraction and Samples Preparation

5.3.1. Intracellular Metabolites

20 mg of lyophilized cells were suspended in 600 µL of methanol and samples were disrupted for 5 min in TissueLyser (Tissue Lyser II, Qiagen, Venlo, Netherlands). Then 600 µL of water was added to each sample and again vortexed for 10 min. After the disintegration, samples were centrifuged for 10 min, at 12000 rpm at 4 °C (Micro 220R, Hettich), and 0.9 mL of clarified upper phase was transferred into a new tube. The extracts were evaporated in a vacuum centrifuge (WP-03, JW Electronic, United States) (40 °C, 1500 rpm, 10 h). In the next step, 600 µL of PBS buffer (0.1 M, 10% D₂O, pH = 7.0, TSP = 0.3 mM) was added to each sample and mixed for 1 min and 550 µL was transferred into NMR-tubes (SP, 5mm, Armar Chemicals, Germany) for measurements. Until the measurements were taken, the samples were stored at 4 °C.

5.3.2. Extracellular Metabolites

After breeding, 1.5 mL medium were evaporated in a vacuum centrifuge (40 °C, 1500 rpm, 12 h). In the next step, 600 µL of PBS buffer (0.1 M (NaH₂PO₄/Na₂HPO₄), 10% D₂O, pH = 7.0, TSP = 0.5 mM) was added to each sample and mixed for 3 min and 550 µL was transferred into 5-mm NMR-tubes (5SP, Armar Chemicals, Germany) for measurements. Until the measurements were taken, the samples were stored at 4 °C.

5.4. ¹H NMR Spectroscopy Analysis of the Bacterial Metabolites

Standard ¹H NMR experiments were performed on a Bruker AVANCE II 600.58 MHz spectrometer (Bruker, GmBH, Germany) equipped with a 5 mm TBO probe at 298 K. All one-dimensional ¹H NMR spectra were carried out using the cpmgpr1d (in Bruker notation) pulse sequence by suppression of water resonance by presaturation. Acquisition parameters were as follows: spectral width, 10 ppm; the number of scans, 128; acquisition time, 2.72 s per scan; relaxation delay, 3.5 s; and time-domain points, 64 K. The spectra were referenced to the TSP resonance at 0.0 ppm and manually corrected for phase and baseline (MestReNova v. 11.0.3, Qingdao, China).

5.5. Data Processing and Multivariate Statistical Data Analysis

All spectra were exported to Matlab (Matlab R2014a, v. 8.3.0.532, Natick, MA, USA) for preprocessing. Regions affected by solvent suppression were excluded (4.55–5.10 ppm for intracellular analysis and 4.58–4.90 ppm for extracellular analysis) and alignment procedures involving the correlation of optimized warping (COW) and interval correlation shifting (icoshift) algorithms were applied [41,42]. The spectra consisted of 8910 data points and were normalized using the probabilistic quotient method to overcome the issue of dilution [43].

The multivariate and statistical data analysis was performed on a set of the 32 assigned metabolites for intracellular metabolites and 27 metabolites for extracellular metabolites. All assignments were verified using the following databases: KEGG Pathways, PubChem, PAMDB, and ChemomX software (Chemomx Inc., Edmonton, AB, Canada). The concen-

tration of metabolite measured by NMR was obtained as the sum of the intensities of the no overlapping resonances (or a part of partly overlapping resonances). The input for SIMCA-P software was a transformed data matrix (v 15.02, Umetrics, Umeå, Sweden). For additional analysis, Matlab was used. The data sets were unit variance scaled before the chemometric analysis. For bacteria strain classification, principal component analysis (PCA), and partial least square analysis (OPLS) were carried out. The multivariate data visualization marked an ellipse with Hotelling's T² range (95%). The OPLS-DA model reliability was tested with CV-ANOVA at the level of significance of $\alpha < 0.05$. The most important variable was discrimination between comparisons, which was selected based on the variable importance in projection (VIP) value with a cutoff value of 1.00. Univariate analysis was performed using MATLAB software with Student's *t*-test (equal/unequal variance) for data originating from a normal distribution and using Mann–Whitney–Wilcoxon test for data that did not meet this requirement. Normality of distribution was assessed by the Shapiro–Wilk test. The correction for multiple comparisons was preceded by the Benjamini–Hochberg procedure (FDR). All univariate statistics were carried out at the level of significance of $\alpha < 0.05$.

5.6. Bioinformatics Analysis

After preprocessing, both, extra- and intracellular metabolite sets from two phenotypically different strains of *Pseudomonas aeruginosa* (antibiotic-resistant strain and antibiotic-susceptible strain) were used to perform metabolic pathway enrichment in the FELLA package [26]. FELLA is an R-package (public software) available in under the GPL-3 license [44]. To perform pathways, metabolites with statistical importance and VIP value > 1.00 were used. Firstly, KEGG-based hierarchical representations of biochemistry (knowledge graph) were built using *P. aeruginosa* PAO1 (T00035, Release 97.0+/03–04, Mar 21). Later, a list of metabolites from examined strains was separately mapped to the internal representation, creating an enriched object, and then subsequently the propagation algorithm was run using the diffusion method (undirected heat diffusion model) to score graph nodes. Additionally, the parametric z-score was computed using normality approximations for statistical normalization.

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/ijms221910820/s1>. Table S1: ¹H NMR signal assignments for intracellular metabolites. Table S2: ¹H NMR signal assignments for extracellular metabolites. Figure S1: OPLS-DA score plot of ¹H NMR data of *P. aeruginosa* strains. Drug-resistant extracellular (green), drug-susceptible extracellular (yellow), drug-resistant intracellular (blue), drug-susceptible intracellular (red). Figure S2: OPLS-DA score plot of ¹H NMR data of intracellular metabolites of drug-resistant (blue squares) and drug-susceptible (red circle) *P. aeruginosa* strains. Figure S3: OPLS-DA models for ¹H NMR data of extracellular metabolites of *P. aeruginosa* strains. (A) both *P. aeruginosa* strains with control; (B) both *P. aeruginosa* strains; (C) drug-resistant *P. aeruginosa* strain with control; (D) drug-susceptible *P. aeruginosa* strain with control. (drug-resistant extracellular (green squares), drug-susceptible extracellular (yellow circle), control—LB medium (gray triangles)). Figure S4: PCA model plots and corresponding loading plot for ¹H NMR data of extracellular metabolites of *P. aeruginosa* strains. (A) drug-resistant *P. aeruginosa* strain with control (the first and second principal component (PC) accounted respectively for 67.6% and 11.8% of the total variance in the data (R²X = 0.864)); (B) drug-susceptible *P. aeruginosa* strain with control (the first and second principal component (PC) accounted respectively for 69.9% and 14.5% of the total variance in the data (R²X = 0.845)), (drug-resistant extracellular (green squares), drug-susceptible extracellular (yellow circle), control—LB medium (gray triangles)). File S1: Interactive version of results of the node prioritization by FELLA in the *Pseudomonas aeruginosa* strain (intracellular analysis). File S2: Interactive version of results of the node prioritization by FELLA in the *Pseudomonas aeruginosa* strain (extracellular analysis).

Author Contributions: Conceptualization. K.A.M. and S.J.J.; Software. K.A.M. and Ł.P.; methodology. K.A.M. and S.J.J.; validation. S.J.J., M.Ł. and P.M.; formal analysis. K.A.M.; investigation. K.A.M. and S.J.J.; resources. D.S. and J.M.; writing—original draft preparation. K.A.M. and J.M.;

writing—review and editing. M.Ł. and P.M.; visualization. K.A.M. and Ł.P.; supervision. M.Ł. and P.M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: Statutory project of WUST; Faculty of Chemistry; Department of Biochemistry, Molecular Biology and Biotechnology (2021).

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: MDPI Research Data Policies.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Paterson, D.L.; Kim, B.N. *Pseudomonas aeruginosa*. In *Antimicrobial Drug Resistance*; Humana Press: Totowa, NJ, USA, 2009; pp. 811–817.
2. Ciofu, O.; Tolker-Nielsen, T. Tolerance and Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms to Antimicrobial Agents—How *P. aeruginosa* Can Escape Antibiotics. *Front. Microbiol.* **2019**, *10*, 913. [CrossRef]
3. Behzadi, P.; Barath, Z.; Gajdacs, M. It's not easy being green: A narrative review on the microbiology, virulence and therapeutic prospects of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Antibiotics* **2021**, *10*, 42. [CrossRef]
4. Bonomo, R.A.; Szabo, D. Mechanisms of multidrug resistance in *Acinetobacter* species and *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin. Infect. Dis.* **2006**, *43*, 49–56. [CrossRef] [PubMed]
5. WHO Report. Available online: <https://www.who.int/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed> (accessed on 20 May 2021).
6. De Oliveira, D.M.P.; Forde, B.M.; Kidd, T.J.; Harris, P.N.A.; Schembri, M.A.; Beatson, S.A.; Paterson, D.L.; Walker, M.J. Antimicrobial resistance in ESKAPE pathogens. *Clin. Microbiol. Rev.* **2020**, *33*. [CrossRef]
7. Tiwari, V. Post-translational modification of ESKAPE pathogens as a potential target in drug discovery. *Drug Discov. Today* **2019**, *24*, 814–822. [CrossRef] [PubMed]
8. Santajit, S.; Indrawattana, N. Mechanisms of Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. *Biomed Res. Int.* **2016**, *2016*, 2475067. [CrossRef] [PubMed]
9. Morita, Y.; Tomida, J.; Kawamura, Y. Responses of *Pseudomonas aeruginosa* to antimicrobials. *Front. Microbiol.* **2014**, *4*, 1–8. [CrossRef]
10. Livermore, D.M. Of *Pseudomonas*, porins, pumps and carbapenems. *J. Antimicrob. Chemother.* **2001**, *47*, 247–250. [CrossRef] [PubMed]
11. Lambert, P.A. Bacterial resistance to antibiotics: Modified target sites. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2005**, *57*, 1471–1485. [CrossRef]
12. Gajdacs, M. Carbapenem-resistance but cephalosporin susceptible *Pseudomonas aeruginosa* in urinary tract infections: Opportunity for colistin sparing. *Antibiotics* **2020**, *9*, 153. [CrossRef]
13. Ishida, H.; Ishida, Y.; Kurosaka, Y.; Otani, T.; Sato, K.; Kobayashi, H. In Vitro and In Vivo Activities of Levofloxacin against Biofilm-Producing *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1998**, *42*, 1641–1645. [CrossRef]
14. Meylan, S.; Porter, C.B.M.; Yang, J.H.; Belenky, P.; Gutierrez, A.; Lobritz, M.A.; Park, J.; Kim, S.H.; Moskowitz, S.M.; Collins, J.J. Carbon Sources Tune Antibiotic Susceptibility in *Pseudomonas aeruginosa* via Tricarboxylic Acid Cycle Control. *Cell Chem. Biol.* **2017**, *24*, 195–206. [CrossRef]
15. Nguyen, D.; Joshi-Datar, A.; Lepine, F.; Bauerle, E.; Olakanmi, O.; Beer, K.; McKay, G.; Siehnel, R.; Schafhauser, J.; Wang, Y.; et al. Active Starvation Responses Mediate Antibiotic Tolerance in Biofilms and Nutrient-Limited Bacteria. *Science* **2011**, *334*, 982–986. [CrossRef] [PubMed]
16. Aldridge, B.B.; Rhee, K.Y. Microbial metabolomics: Innovation, application, insight. *Curr. Opin. Microbiol.* **2014**, *19*, 90–96. [CrossRef] [PubMed]
17. Tang, J. Microbial Metabolomics. *Curr. Genomics* **2011**, *12*, 391–403. [CrossRef]
18. Patti, G.J.; Yanes, O.; Siuzdak, G. Metabolomics: The apogee of the omics trilogy. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2012**, *13*, 263–269. [CrossRef]
19. Mielko, K.A.; Jabłoński, S.J.; Wojtowicz, W.; Milczewska, J.; Sands, D.; Łukaszewicz, M.; Młynarz, P. Possible metabolic switch between environmental and pathogenic *Pseudomonas aeruginosa* strains: 1H NMR based metabolomics study. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2020**, *188*, 113369. [CrossRef] [PubMed]
20. Welker, M.; Van Belkum, A.; Girard, V.; Charrier, J.P.; Pincus, D. An update on the routine application of MALDI-TOF MS in clinical microbiology. *Expert Rev. Proteom.* **2019**, *16*, 695–710. [CrossRef] [PubMed]
21. Palama, T.L.; Canard, I.; Rautureau, G.J.P.; Mirande, C.; Chatellier, S.; Elena-Herrmann, B. Identification of bacterial species by untargeted NMR spectroscopy of the exo-metabolome. *Analyst* **2016**, *141*, 4558–4561. [CrossRef]
22. Zhao, X.; Shen, M.; Jiang, X.; Shen, W.; Zhong, Q.; Yang, Y.; Tan, Y.; Agnello, M.; He, X.; Hu, F.; et al. Transcriptomic and Metabolomics Profiling of Phage–Host Interactions between Phage PaP1 and *Pseudomonas aeruginosa*. *Front. Microbiol.* **2017**, *8*, 1–10. [CrossRef]

23. Han, M.-L.; Zhu, Y.; Creek, D.J.; Lin, Y.-W.; Anderson, D.; Shen, H.-H.; Tsuji, B.; Gutu, A.D.; Moskowitz, S.M.; Velkov, T.; et al. Alterations of Metabolic and Lipid Profiles in Polymyxin-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2018**, *62*. [CrossRef]
24. Gupta, A.; Bansal, N.; Houston, B. Metabolomics of urinary tract infection: A new uroscope in town. *Expert Rev. Mol. Diagn.* **2012**, *12*, 361–369. [CrossRef]
25. Traxler, M.F.; Summers, S.M.; Nguyen, H.-T.; Zacharia, V.M.; Hightower, G.A.; Smith, J.T.; Conway, T. The global, ppGpp-mediated stringent response to amino acid starvation in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **2008**, *68*, 1128–1148. [CrossRef]
26. Picart-Armada, S.; Fernández-Albert, F.; Vinaixa, M.; Yanes, O.; Perera-Lluna, A. FELLA: An R package to enrich metabolomics data. *BMC Bioinform.* **2018**, *19*, 538. [CrossRef]
27. Guo, Q.; Wei, Y.; Xia, B.; Jin, Y.; Liu, C.; Pan, X.; Shi, J.; Zhu, F.; Li, J.; Qian, L.; et al. Identification of a small molecule that simultaneously suppresses virulence and antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa*. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 1–15. [CrossRef]
28. La Rosa, R.; Johansen, H.K.; Molin, S. Adapting to the Airways: Metabolic Requirements of *Pseudomonas aeruginosa* during the Infection of Cystic Fibrosis Patients. *Metabolites* **2019**, *9*, 234. [CrossRef]
29. Nicholson, J.K.; Wilson, I.D. Understanding “global” systems biology: Metabonomics and the continuum of metabolism. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2003**, *2*, 668–676. [CrossRef]
30. Wang, Y.; Han, B.; Xie, Y.; Wang, H.; Wang, R.; Xia, W.; Li, H.; Sun, H. Combination of gallium III with acetate for combating antibiotic resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Chem. Sci.* **2019**, *10*, 6099–6106. [CrossRef]
31. Palmer, K.L.; Aye, L.M.; Whiteley, M. Nutritional cues control *Pseudomonas aeruginosa* multicellular behavior in cystic fibrosis sputum. *J. Bacteriol.* **2007**, *189*, 8079–8087. [CrossRef]
32. Amorim Franco, T.M.; Blanchard, J.S. Bacterial Branched-Chain Amino Acid Biosynthesis: Structures, Mechanisms, and Drugability. *Biochemistry* **2017**, *56*, 5849–5865. [CrossRef]
33. Aliashkevich, A.; Alvarez, L.; Cava, F. New insights into the mechanisms and biological roles of D-amino acids in complex eco-systems. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 683. [CrossRef]
34. Behrends, V.; Ryall, B.; Zlosnik, J.E.A.; Speert, D.P.; Bundy, J.G.; Williams, H.D. Metabolic adaptations of *Pseudomonas aeruginosa* during cystic fibrosis chronic lung infections. *Environ. Microbiol.* **2013**. [CrossRef]
35. Liu, Y.; Yang, K.; Zhang, H.; Jia, Y.; Wang, Z. Combating Antibiotic Tolerance Through Activating Bacterial Metabolism. *Front. Microbiol.* **2020**, *11*, 577564. [CrossRef]
36. Kanehisa, M.; Furumichi, M.; Tanabe, M.; Sato, Y.; Morishima, K. KEGG: New perspectives on genomes, pathways, diseases and drugs. *Nucleic Acids Res.* **2017**, *45*, D353–D361. [CrossRef]
37. Radkov, A.D.; Moe, L.A. Bacterial synthesis of d-amino acids. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2014**, *98*, 5363–5374. [CrossRef]
38. Nyssölä, A.; Reinikainen, T.; Leisola, M. Characterization of Glycine Sarcosine N-Methyltransferase and Sarcosine Dimethylglycine N-Methyltransferase. *Appl. Environ. Microbiol.* **2001**, *67*, 2044–2050. [CrossRef]
39. Favia, M.; Gallo, C.; Guerra, L.; De Venuto, D.; Diana, A.; Polizzi, A.M.; Montemurro, P.; Mariggiò, M.A.; Leonetti, G.; Manca, A.; et al. Treatment of Cystic Fibrosis Patients Homozygous for F508del with Lumacaftor-Ivacaftor (Orkambi®) Restores Defective CFTR Channel Function in Circulating Mononuclear Cells. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 2398. [CrossRef]
40. Biemer, J.J. Antimicrobial susceptibility testing by the Kirby-Bauer disc diffusion method. *Ann. Clin. Lab. Sci.* **1973**, *3*, 135–140.
41. Savorani, F.; Tomasi, G.; Engelsen, S.B. icoshift: A versatile tool for the rapid alignment of 1D NMR spectra. *J. Magn. Reson.* **2010**, *202*, 190–202. [CrossRef]
42. Tomasi, G.; van den Berg, F.; Andersson, C. Correlation optimized warping and dynamic time warping as preprocessing methods for chromatographic data. *J. Chemom.* **2004**, *18*, 231–241. [CrossRef]
43. Dieterle, F.; Ross, A.; Schlotterbeck, G.; Senn, H.; Hoffman, F. Probabilistic Quotient Normalization as Robust Method to Account for Dilution of Complex Biological Mixtures. Application in 1 H NMR Metabonomics. *Anal. Chem.* **2006**. [CrossRef] [PubMed]
44. FELLA in R-package. Available online: <https://github.com/b2slab/FELLA> (accessed on 23 September 2021).

Supporting information

Table S1. ¹H NMR signal assignments for intracellular metabolites.

L.p.	Metabolites	KEGG number	Chemical shift [ppm]
1.	5-aminopentanoate	C00431	2.20 (t)
2.	Acetate	C00033	1.90 (s)
3.	Adenine	C00147	8.20 (d)
4.	Alanine	C00133	1.50 (d)
5.	AMP	C00360	8.60 (s)
6.	Aspartate	C00049	2.70 (dd)
7.	Betaine	C00719	3.30 (s)
8.	Ethanol	C00469	1.20 (t)
9.	Formate	C00058	8.40 (s)
10.	Glucose	C00031	5.20 (d)
11.	Glutamate	C00025	2.30 (m)
12.	Glycine	C00037	3.60 (s)
13.	Histamine	C00263	7.10 (s)
14.	Histidine	C00135	7.90 (s)
15.	Homoserine	C00065	2.00 (m)
16.	Isobutyrate	C06001	1.10 (d)
17.	Isocitrate	C00311	2.60 (m)
18.	Isoleucine	C00407	1.00 (d)
19.	Lactate	C00256	1.30 (d)
20.	Leucine	C00123	0.90 (t)
21.	Methionine	C00073	2.10 (s)
22.	NAD ⁺	C00003	9.30 (s)
23.	Oxypurinol	C07599	8.20 (s)
24.	Phenylalanine	C00079	7.40 (t)
25.	Pyruvate	C00022	2.40 (s)
26.	Sarcosine	C00213	2.70 (s)
27.	Succinate	C00042	2.40 (s)
28.	Threonine	C00188	3.60 (d)
29.	Tyrosine	C00082	7.20 (d)
30.	UMP	C00105	8.10 (m)
31.	Uracil	C00106	5.80 (d)
32.	Valine	C00183	1.00 (d)

Table S2. ¹H NMR signal assignments for extracellular metabolites.

L.p.	Metabolites	KEGG number	Chemical shift [ppm]
1.	6-Hydroxynicotinate	C01020	8.10 (m)
2.	Acetate	C00033	1.90 (s)
3.	Alanine	C00133	1.50 (d)
4.	Betaine	C00719	3.30 (s)
5.	Formate	C00058	8.40 (s)
6.	Glycine	C00037	3.60 (s)
7.	Histamine	C00263	8.00 (s)
8.	Histidine	C00135	8.05 (s)
9.	Imidazole	C05568	8.20 (s)
10.	Isobutyrate	C06001	1.10 (d)
11.	Isoleucine	C00407	1.00 (d)
12.	Leucine	C00123	0.95 (t)
13.	Lysine	C00047	1.70 (m)
14.	Methanol	C00132	3.40 (s)
15.	Methionine	C00073	2.10 (s)
16.	Oxypurinol	C07599	8.25 (s)
17.	Phenylalanine	C00079	7.40 (m)
18.	Pyruvate	C00022	2.40 (s)
19.	Threonine	C00188	3.60 (d)
20.	Trehalose	C00689	5.20 (d)
21.	Tryptophan	C00078	7.70 (d)
22.	Tyrosine	C00082	6.90 (dd)
23.	Valine	C00183	1.05 (d)
24.	Glutamate	C00025	2.28 (m)
25.	Aspartate	C00049	2.82 (dd)
26.	Asparagine	C00152	2.99 (dd)
27.	Pyroglutamate	C01879	2.45 (m)

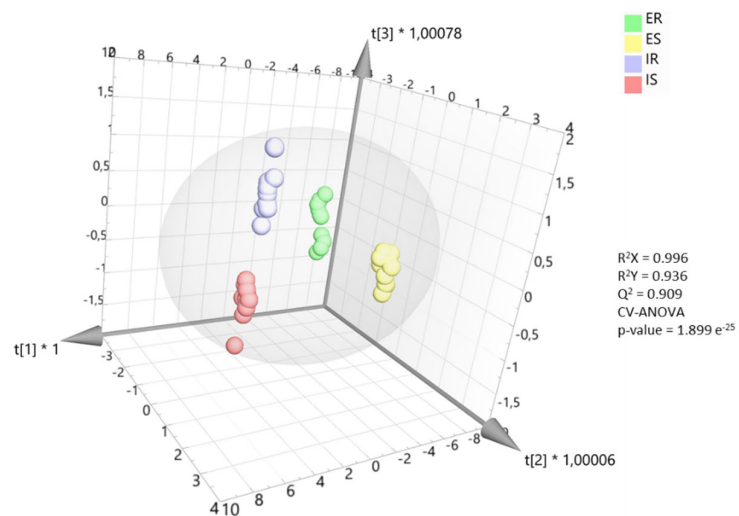


Figure S1. OPLS-DA score plot of ^1H NMR data of *P. aeruginosa* strains. (drug-resistance extracellular (green), drug-susceptible extracellular (yellow), drug-resistance intracellular (blue), drug-susceptible intracellular (red)).

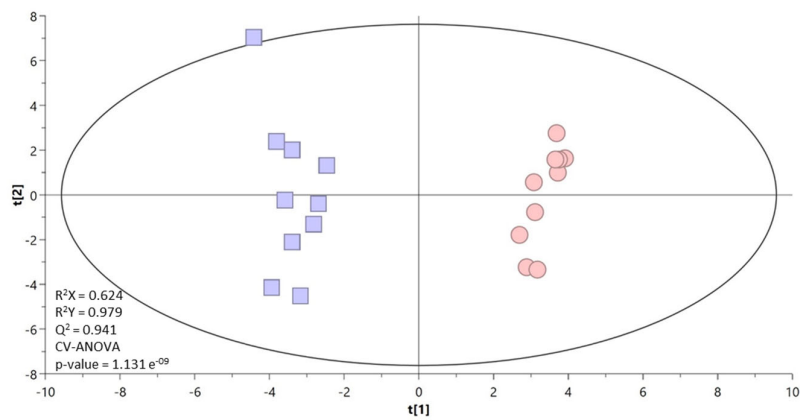


Figure S2. OPLS-DA score plot of ^1H NMR data of intracellular metabolites of drug-resistance (blue squares) and drug-susceptible (red circle) *P. aeruginosa* strains.

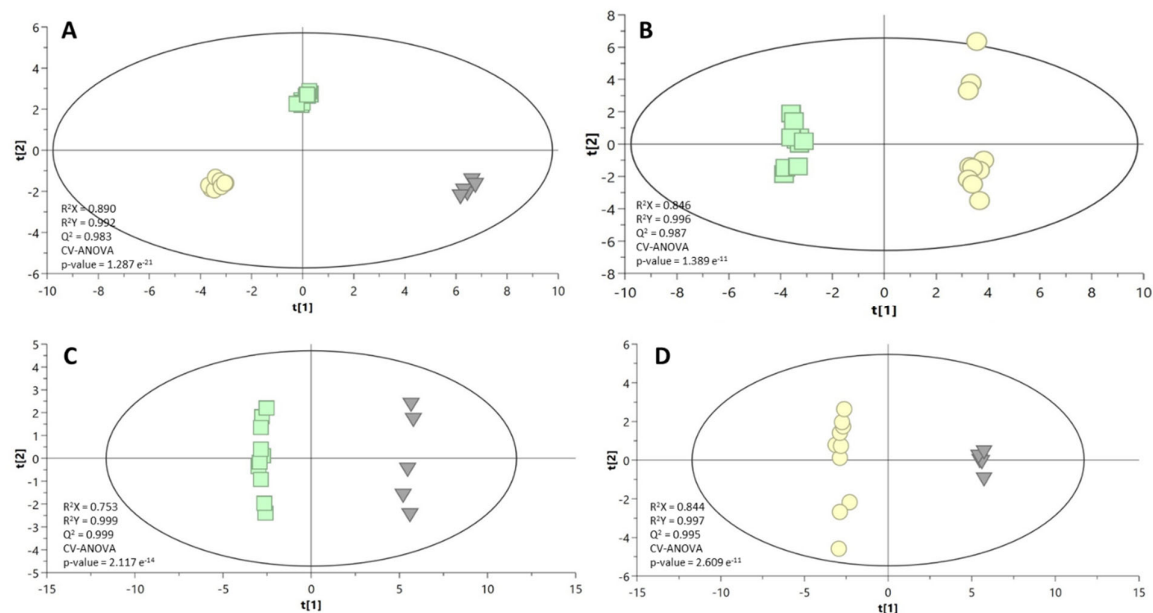
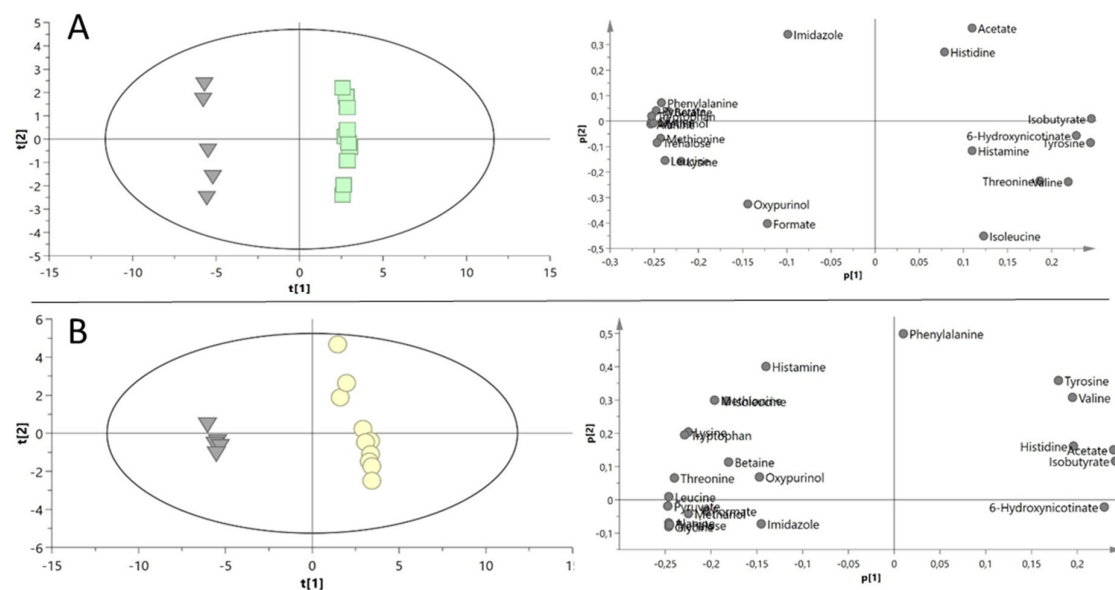


Figure S3. OPLS-DA models for ^1H NMR data of extracellular metabolites of *P. aeruginosa* strains. (A) both *P. aeruginosa* strains with control; (B) both *P. aeruginosa* strains; (C) drug-resistance *P. aeruginosa* strain with control; (D) drug-susceptible *P. aeruginosa* strain with control. (drug-resistance extracellular (green squares), drug-susceptible extracellular (yellow circle), control – LB medium (gray triangles))



6. Podsumowanie i wnioski

Metabolomika jest dziedziną nauki, która pozwala na scharakteryzowanie szlaków biochemicznych drobnoustrojów i dostarcza informacji o aktualnym stanie komórki. Cecha ta sprawia, że badania prowadzone w tym kierunku określają różnice pomiędzy próbkami na tym poziomie molekularnym. W przedstawionej rozprawie doktorskiej skupiono się na bakterii *Pseudomonas aeruginosa*, której szczepy z jednej strony powszechnie bytują w środowisku naturalnym, z drugiej stanowią niebezpieczny patogen oportunistyczny człowieka. Analiza metabolomiczna tego drobnoustroju dostarcza informacji o potencjalnych biomarkerach jego zjadliwości i możliwości adaptacyjnych.

Przeprowadzone badania pozwoliły na zrealizowanie zamierzonych celów i wyciągnięcie następujących wniosków:

1. Metoda dezintegracji jest ważnym elementem przygotowania próbek do analiz i ma wpływ na efektywność ekstrakcji, a co za tym idzie, powinna być dobrana do konkretnego eksperymentu. Różnice te wynikają najprawdopodobniej z różnej budowy ściany komórkowej mikroorganizmu.
2. Profil metabolomiczny uzyskany przy pomocy ^1H NMR jest wystarczający do rozróżniania i identyfikacji różnych rodzajów drobnoustrojów, ale również szczepów tego samego gatunku, co wskazuje na potencjał tej metody analitycznej w badaniach przesiewowych mikroorganizmów.
3. Badania potwierdzają, że szczepy *P. aeruginosa* pochodzące z od pacjentów chorych na mukowiscydozę mają inny profil metaboliczny niż szczepy izolowane ze środowiska naturalnego i mogą być rozróżniane przy pomocy ^1H NMR. Wyższe stężenia metabolitów w szczepach pochodzących od pacjentów świadczą o zwiększonej intensywności przemian aminokwasów i zmniejszonej intensywności cyklu TCA.
4. Analizy szczepów *P. aeruginosa* posiadające odmienne cechy wrażliwości na antybiotyki posiadają różne profile metaboliczne zarówno wewnątrz- jak i zewnątrzkomórkowe. Zmiany dotyczą szczególnie ścieżek syntezy/degradacji aminokwasów, transporterów ABC oraz cyklu TCA.
5. Uzyskane wyniki badań stanowią kierunek przyszłych badań, które powinny dostarczyć jeszcze bardziej szczegółowych informacji o zmianach w niskocząsteczkowych związkach szczepów *P. aeruginosa* opornych na antybiotyki.

Dorobek naukowy

Publikacje wchodzące w skład rozprawy doktorskiej:

1. *Metabolomic studies of Pseudomonas aeruginosa*, **K. A. Mielko**, S. J. Jabłoński, J. Milczewska, D. Sands, M. Łukaszewicz, P. Młynarz, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2019, 35(11):178, doi: 10.1007/s11274-019-2739-1 (IF₂₀₁₉ = 2.477, 70 pkt MNiSW₂₀₁₉₋₂₀₂₁)
2. *Comparison of bacteria disintegration methods and their influence on data analysis in metabolomics*, **K. A. Mielko**, S. Jabłoński, M. Łukaszewicz, P. Młynarz, *Scientific Reports*, 2021, 11:20859, doi: 10.1038/s41598-021-99873-x (IF₂₀₂₀ = 4.380, 140 pkt MNiSW₂₀₁₉₋₂₀₂₁)
3. *Possible metabolic switch between environmental and pathogenic Pseudomonas aeruginosa strains: ¹H NMR based metabolomics study*, **K. A. Mielko**, S. Jabłoński, W. Wojtowicz, J. Milczewska, D. Sands, M. Łukaszewicz, P. Młynarz, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2020, 188 (113369), doi: 10.1016/j.jpba.2020.113369 (IF₂₀₂₀ = 3.935, 100 pkt MNiSW₂₀₁₉₋₂₀₂₁)
4. *Metabolomics comparison of drug-resistant and drug-susceptible Pseudomonas aeruginosa strains (intra- and extracellular analysis)*, **K. A. Mielko**, S. Jabłoński, Ł. Pruss, J. Milczewska, D. Sands, M. Łukaszewicz, P. Młynarz, *International Journal of Molecular Science*, 2021, 22(19):10820, doi: 10.3390/ijms221910820 (IF₂₀₂₀ = 5.924, 140 pkt MNiSW₂₀₁₉₋₂₀₂₁)

Publikacje nie będące częścią rozprawy doktorskiej:

1. *NMR spectroscopy as a „green analytical method” in metabolomics and proteomics studies*, **K. A. Mielko**, N. Pudelko-Malik, A. Tarczewska, P. Młynarz, *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, 2021, 22 (100474), doi: 10.1016/j.scp.2021.100474 (IF₂₀₂₀ = 4.508, 40 pkt MNiSW₂₀₁₉₋₂₀₂₁)

2. *The oxidative stress and metabolic response of Acinetobacter baumannii for aPDT multiple photosensitization*, E. Wanarska, **K. A. Mielko**, I. Maliszewska, P. Młynarz, *Scientific Reports*, 2022, 12:1913, s. 1-13, doi: 10.1038/s41598-022-05650-9 (IF₂₀₂₀ = 4.380, 140 pkt MNiSW₂₀₁₉₋₂₀₂₁)
3. *Gender-specific metabolomics approach to kidney cancer*, S. Deja, A. Litarski, **K. A. Mielko**, N. Pudełko-Malik, W. Wojtowicz, A. Ząbek, T. Szydełko, P. Młynarz, *Metabolites*, 2021, 11:767, doi: 10.3390/metabo11110767 (IF₂₀₂₀ = 4.932, 100 pkt MNiSW₂₀₁₉₋₂₀₂₁)
4. *Brain-dead and coma patients exhibit different serum metabolic profiles: preliminary investigation of a novel diagnostic approach in neurocritical care*, T. Dawiskiba, W. Wojtowicz, B. Qasem, M. Łukaszewski, **K. A. Mielko**, A. Dawiskiba, M. Banasik, J. P. Skóra, D. Janczak, P. Młynarz, *Scientific Reports*, 2021, 11:15519, doi: 10.1038/s41598-021-94625-3 (IF₂₀₂₀ = 4.380, 140 pkt MNiSW₂₀₁₉₋₂₀₂₁)
5. *Disease differentiation and monitoring of anti-TNF treatment in rheumatoid arthritis and spondyloarthropathies*, K. Bogunia-Kubik, W. Wojtowicz, J. Świerkot, **K. A. Mielko**, B. Qasem, J. Wielińska, R. Sokolik, Ł. Pruss, P. Młynarz, *International Journal of Molecular Science*, 2021, 22(14):7389, doi: 10.3390/ijms22147389 (IF₂₀₂₀ = 5.924, 140 pkt MNiSW₂₀₁₉₋₂₀₂₁)
6. *An optimization of liquid-liquid extraction of urinary volatile and semi-volatile compounds and its application for gas chromatography-mass spectrometry and proton nuclear magnetic resonance spectroscopy*, N. Drabińska, P. Młynarz, B. Costello, P. Jones, **K. A. Mielko**, J. Mielnik, R. Persad, N. M. Ratcliffe, *Molecules*, 2020, 25(16):3651, s. 1-13; doi: 10.3390/molecules25163651 (IF₂₀₂₀ = 4.412, 140 pkt MNiSW₂₀₁₉₋₂₀₂₁)
7. *Hydrogel alginate seed coating as an innovative method for delivering nutrients at the early stages of plant growth*, D. Skrzypczak, Ł. Jarzembowski, G. Izydorczyk, K. Mikula, V. Hoppe, **K. A. Mielko**, N. Pudełko-Malik, P. Młynarz, K. Chojnacka, A. Witek-Krowiak, *Polymers*, 2021, 13(23):4233, s. 1-20, doi: 10.3390/polym13234233 (IF₂₀₂₀ = 4.329, 100 pkt MNiSW₂₀₁₉₋₂₀₂₁)

8. *Micro-RNAs in response to active forms of vitamin D₃ in human leukemia and lymphoma cells*, J. J. Gleba, D. Kłopotowska, J. Banach, **K. A. Mielko**, E. Turlej, M. Maciejewska, A. Kutner, J. Wietrzyk, *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(9): 5019, doi: 10.3390/ijms23095019 (IF₂₀₂₀ = 5.924, 140 pkt MNiSW₂₀₁₉₋₂₀₂₁)
9. *Polymorphism of VDR gene determines the sensitivity of human leukemia and lymphoma cells to active forms of vitamin D*, J. Gleba, D. Kłopotowska, J. Banach, E. Turlej, **K. A. Mielko**, K. Gębura, K. Bogunia-Kubik, A. Kutner, J. Wietrzyk, *Cancers*, 2022, 14(2): 387, s. 1-19, doi: 10.3390/cancers14020387 (IF₂₀₂₀ = 6.639, 140 pkt MNiSW₂₀₁₉₋₂₀₂₁)
10. *Biotypowanie mikroorganizmów za pomocą spektrometrii mas i spektroskopii NMR*, **K. A. Mielko**, P. Młynarz, *Wiadomości Chemiczne 2020 (74) 1-2*, str. 57-70 (20 pkt MNiSW₂₀₁₉₋₂₀₂₁)
11. rozdział w monografii: *Metabolomika - przyszłość diagnostyki medycznej*, **K. A. Mielko**, *Badania i Rozwój Młodych Naukowców w Polsce. Nauki medyczne i nauki o zdrowiu. Część IV*, Poznań 2019, str. 56-62, ISBN (wydanie online 978-83-66392-20-5)

KONFERENCJE

Prezentacje ustne:

1. **K. A. Mielko**, S. Jabłoński, Ł. Pruss, M. Łukaszewicz, P. Młynarz, *Metabolomics comparison of drug-resistance and drug-susceptible Pseudomonas aeruginosa strain*, *Metabolomic Circle 2021*, zasięg międzynarodowy
2. **K. A. Mielko**, S. Jabłoński, M. Łukasiewicz, P. Młynarz, *Comparison of drug-resistant and drug-sensitive Pseudomonas aeruginosa strains - metabolomics studies*, *ChemBiotIC 2021*, zasięg międzynarodowy
3. **K. A. Mielko**, S. Jabłoński, J. Milczewska, D. Sands, M. Łukaszewicz, P. Młynarz, *Porównanie metabolomiczne szczepów Pseudomonas aeruginosa*, VI Ogólnopolska Konferencja Doktorantów Nauk o Życiu BioOpen 2021, zasięg krajowy
4. **K. A. Mielko**, P. Młynarz, *Badania mikroorganizmów za pomocą ¹H NMR*, Ogólnopolska Studencka Konferencja Naukowa „Bliżej chemii”, zasięg krajowy, 2021

5. **K. A. Mielko**, S. Jabłoński, M. Łukasiewicz, P. Młynarz, *Dezintegracja mikroorganizmów – wpływ metody na wyniki badań metabolomicznych*, e-Zjazd Zimowy Sekcji Studenckiej PTChem, zasięg krajowy, 2020
6. **K. A. Mielko**, *Metabolomika i jej potencjał w diagnostyce medycznej*, III Ogólnopolska Konferencja „Biotechnologia niejedno ma imię”, zasięg krajowy, 2020
7. **K. A. Mielko**, S. Jabłoński, M. Łukaszewicz, P. Młynarz, *Comparison of microorganisms disintegration methods for metabolomics*, Metabolomic Circle 2020, zasięg międzynarodowy
8. **K. A. Mielko**, *Badania metabolomiczne mikroorganizmów*, I Ogólnopolska Konferencja Online SSPTChem 2020, zasięg krajowy
9. **K. A. Mielko**, *Metabolomics studies of Pseudomonas aeruginosa*, International Course for PhD students, zasięg międzynarodowy, 2019, Rogów
10. **K. A. Mielko**, S. Jabłoński, D. Sands, M. Łukaszewicz, P. Młynarz, *Comparison of Pseudomonas aeruginosa strains from different sources*, Metabolomic Circle 2019, zasięg międzynarodowy, Olsztyn
11. **K. A. Mielko**, *Metabolomika jako diagnostyka medyczna przyszłości*, XV Wrocławskie Studenckie Sympozjum Chemiczne, zasięg krajowy, 2019, Wrocław
12. **K. A. Mielko**, *Dendrymery - rozgałęzione polimery wykorzystywane jako nośniki leków*, XIV Wrocławskie Studenckie Sympozjum Chemiczne, zasięg krajowy, 2019 Wrocław
13. **K. A. Mielko**, P. Młynarz, *Metabolomika - przyszłość diagnostyki medycznej*, IX Ogólnokrajowa Konferencja Naukowa Młodzi Naukowcy w Polsce - Badania i Rozwój, zasięg krajowy, 2019, Wrocław
14. **K. A. Mielko**, A. Ząbek, D. Sands, S. Jabłoński, M. Łukaszewicz, P. Młynarz, *Metabolomic studies of Pseudomonas aeruginosa*, Metabolomic Circle 2018, zasięg międzynarodowy, 2018, Toruń – Przysiek
15. **K. A. Mielko**, *Metabolomiczny odcisk palca Pseudomonas aeruginosa*, XIII Wrocławskie Studenckie Sympozjum Chemiczne, zasięg krajowy, 2018, Wrocław

Prezentacje plakatowe:

1. **K. A. Mielko**, S. Jabłoński, M. Łukasiewicz, P. Młynarz, *The influence of disintegration method to the extraction efficiency in metabolomics analysis*, ExTech2021, zasięg międzynarodowy

2. **K. A. Mielko**, S. Jabłoński, M. Łukasiewicz, P. Młynarz, *Metabolomics comparison of drug-resistant and drug-sensitive Pseudomonas aeruginosa strains (intra- and extracellular analysis)*, Metabolomics 2021 ONLINE, zasięg międzynarodowy
3. **K. A. Mielko**, S. Jabłoński, M. Łukasiewicz, P. Młynarz, *The influence of disintegration method on metabolomics analysis*, 1st European Sample Preparation e-Conference, zasięg międzynarodowy, 2021
4. **K. A. Mielko**, S. Jabłoński, D. Sands, M. Łukaszewicz, P. Młynarz, *Metabolomic studies of Pseudomonas aeruginosa – ¹H NMR analysis*, Metabolomics 2020 Online, zasięg międzynarodowy
5. **K. A. Mielko**, S. Jabłoński, P. Młynarz, M. Łukaszewicz, *¹H nuclear resonance analysis of selected species of methanogenic archaea*, 4 Wrocław Scientific Meetings, 2020, zasięg międzynarodowy
6. **K. A. Mielko**, S. Jabłoński, D. Sands, M. Łukaszewicz, P. Młynarz, *Metabolomiczne porównanie szczepów Pseudomonas aeruginosa*, I Ogólnopolska Doktorancka Konferencja Interdyscyplinarna, 2020, zasięg krajowy
7. **K. A. Mielko**, S. Jabłoński, D. Sands, M. Łukaszewicz, P. Młynarz, *Metabolomics studies of drug-sensitive and drug-resistant Pseudomonas aeruginosa strains*, Chromatographic Methods of Investigating Organic Compounds, zasięg międzynarodowy, 2019, Szczyrk
8. **K. A. Mielko**, S. J. Jabłoński, D. Sands, M. Łukaszewicz, P. Młynarz, *¹H NMR analysis of Pseudomonas aeruginosa*, 3rd Wrocław Scientific Meetings, zasięg międzynarodowy, 2019, Wrocław
9. **K. A. Mielko**, J. Trynda, A. Kutner, J. Wietrzyk, *Influence of neomycin on 1,25D3-MARRS in human colorectal carcinoma LoVo and HT-29 cells*, 2nd Wrocław Scientific Meetings, zasięg międzynarodowy, 2018, Wrocław

STAŻE NAUKOWE

1. od X 2019 – stała współpraca z Zakładem Biotransformacji Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego
2. 05.07.2021 – 02.10.2021 – Zakład Biotechnologii Medycznej, Uniwersytet w Sienie, Włochy

STYPENDIA NAUKOWE I NAGRODY

1. stypendium motywacyjne dla uczestników projektu „BioTechNan – Program Interdyscyplinarnych Środowiskowych Studiów Doktoranckich KNOW z obszaru Biotechnologii i Nanotechnologii”
2. stypendium Rektora Politechniki Wrocławskiej dla najlepszych doktorantów 2019/2020
3. stypendium Rektora Politechniki Wrocławskiej dla najlepszych doktorantów 2020/2021
4. nagroda Dziekana Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej 2020
5. I nagroda za najlepsze krótkie wystąpienie na konferencji Metabolomic Circle 2020
6. stypendium Rektora Politechniki Wrocławskiej dla najlepszych doktorantów 2020/2021
7. stypendium z własnego funduszu stypendialnego Politechniki Wrocławskiej 2022