

**In-vitro-Untersuchungen zur antimikrobiellen Wirksamkeit einer  
DBD-Plasma-Quelle (TU Ilmenau)**

Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr. med.)

**vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät  
der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

von Markus Hinkelmann  
geboren am 10.11.1995 in Mönchengladbach

## Gutachter

1. PD Dr. rer. nat. et med. habil. Uta-Christina Hipler, Jena
2. Prof. Dr. med. Udo R. Markert, Jena
3. Prof. Dr. med. Uwe Wollina, Dresden

Tag der öffentlichen Verteidigung: 02.12.2019

Abschlussdatum: 11.11.2021

# Inhaltsverzeichnis

1. Abkürzungsverzeichnis.....	1
2. Zusammenfassung .....	2
3. Einleitung.....	4
3.1 Eine kurze Einführung in die Physik des kalten Atmosphärendruckplasmas ....	5
3.2 Antimikrobielle Wirkungsmechanismen und getestete Mikroorganismen .....	7
3.3 Plasmaquellen – Technische Umsetzung .....	9
3.4 Einsatzmöglichkeiten für KAPs.....	11
3.5 Medizinische Plasmaquellen .....	12
4. Fragestellungen und Ziele der Arbeit.....	13
5. Material.....	14
6. Methodik .....	18
6.1 DBD-Plasmaquelle .....	18
6.2 Herstellung der Schüttelkultur .....	20
6.3 Verwendete Mikroorganismen.....	21
6.4 Agardiffusionstest.....	22
6.5 Mikroplatten-Laser-Nephelometrie (MLN) .....	25
6.5.1 Herstellung der Gebrauchskulturen.....	25
6.5.2 Bestrahlung der Gebrauchskulturen.....	26
6.6 Bestimmung der Eindringtiefe von KAP .....	28
6.7 Software .....	29
7. Ergebnisse.....	30
7.1 Agardiffusionstest.....	30
7.1.1 UVB.....	30
7.1.2 Kaltes Atmosphärendruckplasma.....	32
7.1.3 Statistik zur Auswertung der Agardiffusionstests .....	39
7.1.3.1 Auswertung des Einflusses der Bestrahlungsdauer auf die Messwerte .....	40
7.1.3.2 Auswertung Minimaler Durchmesser .....	40
7.1.3.3 Auswertung Maximaler Durchmesser .....	42
7.1.3.4 Auswertung Flächeninhalt des Hemmhofs.....	44
7.2. IC <sub>50</sub> Bestimmung über MLN .....	46
7.2.1 UVB.....	46
7.2.2 Kaltes Atmosphärendruckplasma.....	46
7.2.3 Analyse der Messwerteverteilung .....	51
7.2.4 Statistische Auswertung der MLN-Ergebnisse .....	53

7.3 Eindringtiefe von KAP in biologischen Geweben am Agarmodell.....	56
8. Diskussion .....	58
8.1 UVB.....	58
8.2 Kaltes Atmosphärendruckplasma.....	60
8.2.1 Agardiffusionstest.....	60
8.2.2 Mikroplattenlasernephelometrie .....	63
8.3 Zusammenfassung der Wirkungsmechanismen des KAP.....	65
8.4 Eindringtiefe .....	66
8.5 Beurteilung der Plasmaquelle.....	67
8.5.1 Reliabilität der Plasmaquelle .....	67
8.5.2 Ergonomie der Plasmaquelle .....	68
8.5.3 Praxistauglichkeit und Anwendungsmöglichkeiten.....	68
9. Schlussfolgerungen .....	70
10. Literatur und Quellenverzeichnis .....	72
11. Anhang .....	81
11.1 GEE-Modell .....	81
11.1.1 GEE-Modell: Geringster Durchmesser.....	81
11.1.2 GEE-Modell „Maximaler Durchmesser“ .....	84
11.1.3 GEE-Modell „Fläche“.....	87
11.2 Tabellenverzeichnis.....	90
11.3 Abbildungsverzeichnis.....	92
11.4 Danksagung .....	93
11.5 Ehrenwörtliche Erklärung .....	94

## 1. Abkürzungsverzeichnis

ATCC	American Type Culture Collection
cm	Zentimeter
COS-Agar	Columbia-Schafsblut-Agar
DBD	Dielectric Barrier Discharge
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
KAP	Kaltes Atmosphärendruckplasma
LTCC	Low Temperature Cofired Ceramic
MHE-Agar	Mueller-Hinton-E-Agar
mJ	Millijoule
mm	Millimeter
mW	Milliwatt
nm	Nanometer
PBS	Phosphat Buffered Saline
RNU	Relative Nephelometric Units
SD	Standardabweichung
SDA-Agar	Sabouraud-Dextrose-Agar
SGB	Sabouraud-Glukose-Bouillon
TSB	Trypton-Soja-Bouillon
UVB	Ultraviolettstrahlung (280nm – 315nm)
<i>C. albicans</i>	Candida albicans
<i>E. coli</i>	Escherichia coli
<i>E. coli NDM-1</i>	Escherichia coli New Delhi metallo-beta- lactamase-1
MRSA	Methicillin resistenter Staphylokokkus aureus
<i>S. aureus</i>	Staphylokokkus aureus

## 2. Zusammenfassung

Kaltes Atmosphärendruckplasma (KAP) ist ein seit einigen Jahren schnell wachsendes Forschungsgebiet. KAP ist ionisiertes Gas, das durch seine vielfältige Wirkung verschiedene Anwendungsmöglichkeiten verspricht. Seit man physikalisches Plasma bei Raumtemperatur und Atmosphärendruck herstellen kann, sind alle Möglichkeiten vorhanden, um Plasmaquellen für einen verbreiteten Einsatz am Patienten zu entwickeln. KAP ist antimikrobiell wirksam, kann hitzesensible Oberflächen, Flüssigkeiten und biologisches Material desinfizieren, zeigt Wirkung bei der Tumorbehandlung und wurde bereits mit ersten vielversprechenden Ergebnissen zur Therapie des chronisch-venösen Ulcus cruris am Patienten eingesetzt.

Der genaue Mechanismus, der der antimikrobiellen Wirkung des KAP zugrunde liegt, ist Gegenstand aktueller Forschung. Als wichtige Bestandteile konnten reaktive Stickstoff – und Sauerstoffspezies, Ionen und Elektronen sowie UVB-Strahlung identifiziert werden, die bei der Generierung des KAP entstehen.

In der vorliegenden Studie wurde die antimikrobielle Wirksamkeit einer DBD-Plasmaquelle der TU Ilmenau an den grampositiven Keimen *Staphylokokkus aureus* und *Methicillin Resistenter Staphylokokkus aureus (MRSA)*, den gramnegativen Keimen *Escherichia Coli* und *Escherichia Coli New Delhi metallo-beta-lactamase-1 (E. coli NDM-1)*, sowie der Hefe *Candida albicans in-vitro* getestet. UVB-Strahlung wurde als Vergleichsagenz eingesetzt, da vermutet wird, dass UVB einen Teil der mikrobioziden Wirkung des KAP vermittelt.

Zum Einsatz kam der Agardiffusionstest zur Hemmhofbestimmung und die Mikroplattenlasernephelometrie (MLN) zur Aufnahme von Wachstumskurven und Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration ( $IC_{50}$ ). Zudem wurde ein Verfahren zur Bestimmung der Eindringtiefe von KAP in biologische Gewebe am Agarmodell mittels Gieß-Reagenz entwickelt.

UVB-Strahlung in Dosen zwischen  $2,5 \text{ mJ/cm}^2$  und  $150 \text{ mJ/cm}^2$  wies sowohl gegenüber Mikroorganismen in Flüssigkeit als auch an isolierten Mikroorganismen eine vergleichbare antimikrobielle Wirkung auf. UVB erzielte gegen *S. aureus*, *MRSA* und *E. coli* einen bakteriziden Effekt, nur *E. coli NDM-1* wurde nicht von UVB gehemmt. Die Untersuchungen mit UVB an *C. albicans* zeigten eine fungistatische Wirkung.

Die DBD-Plasmaquelle der TU Ilmenau zeigte eine gute bis sehr gute antimikrobielle Wirkung gegen die getesteten Bakterien. Das physikalische Plasma wirkte bakterizid

gegenüber allen Mikroorganismen. Die Hefe *C. albicans* war in den Agardiffusionstests bei niedrigen Bestrahlungszeiten (2 Sekunden und 10 Sekunden) resistenter gegenüber der Bestrahlung mit KAP als die Bakterien. Für *C. albicans* konnte eine durchschnittliche Hemmhofläche von 9,28 mm<sup>2</sup> gemessen werden, während der durchschnittliche Flächeninhalt der Bakterien bei 37,9 mm<sup>2</sup> lag. Bei längeren Bestrahlungszeiten (60s) konnte kein signifikanter Unterschied mehr zwischen der Hefe und den Bakterien festgestellt werden (*C. albicans*: 154 mm<sup>2</sup>, Bakterien: 165 mm<sup>2</sup>). Die Untersuchung mit UVB-Bestrahlung zeigte erst nach 10 Minuten eine mikrobiozide Wirkung.

Mittels MLN-Messung konnten die Unterschiede der Wirkung zwischen UVB- und KAP-Bestrahlung bestätigt werden. Die IC<sub>50</sub>-Werte der KAP-Bestrahlung lagen zwischen 1 Minute und 2 Minuten, die IC<sub>50</sub>-Werte der UVB-Bestrahlung zwischen 5 Minuten und 7 Minuten. Im Gegensatz zu UVB-Strahlung konnte keine Wirkung des physikalischen Plasmas gegenüber Mikroorganismen in Flüssigkeit festgestellt werden: Es war ein direkter Kontakt des KAP mit den Mikroorganismen erforderlich, um eine Hemmung des Wachstums der Keime messen zu können.

Um die Wirkungstiefe des KAP in den durchgeführten Tests qualitativ zu evaluieren, wurde Grieß-Reagenz mit Agar gemischt. Das Reagenz wurde als Indikator für die reaktiven Stickstoffspezies des KAP verwendet. Nach 5 Minuten Bestrahlungszeit mit KAP wurden 2,5 Millimeter bis 3 Millimeter Eindringtiefe gemessen.

Die verminderte Sensibilität der Hefe *C. albicans*, die in dieser Studie festgestellt wurde, konnte auf die Unterschiede im Aufbau der Zellwand aus dicken Glucan- und Mannanschichten zurückgeführt werden. Die Wirkung des KAP zeigte keine Unterschiede hinsichtlich der verminderten Sensibilität gegenüber grampositiver Keime aufgrund Ihrer dicken Zellwand oder gegenüber gramnegativer Keime mit nur einer dünnen Mureinschicht und zwei Plasmamembransystemen.

Die Wirksamkeit von KAP kann u.a. auf reaktive Spezies zurückgeführt werden. Daher ist ein enger Kontakt zwischen Plasmaquelle und behandeltem Material erforderlich. Zusammenfassend war die Plasmaquelle der TU Ilmenau gegen alle getesteten Mikroorganismen gut bis sehr gut wirksam. Es wurden signifikante Unterschiede zu der vergleichend eingesetzten UVB-Bestrahlung festgestellt. In weiterführenden *in-vivo* Studien muss jetzt gezeigt werden, dass sich dieses mikrobiozide Potential auch in praxisnahen Szenarien am Patienten einsetzen lässt.

### 3. Einleitung

Kaltes Atmosphärendruckplasma (KAP) hat in den letzten Jahren viel Aufmerksamkeit erregt. Die Suche nach „Cold Atmospheric Pressure Plasma“ im „Web of Science“ (<https://apps.webofknowledge.com>) zeigte am 23.03.2018 eine konstant steigende Zahl der Publikationen seit dem Jahr 2005 (15 Treffer) bis zum Jahr 2017 (180 Treffer, verwendete Datenbank: Web of Science Core Collection). Seit einigen Jahren hat sich der Begriff der „Plasmamedizin“ als Bezeichnung eines eigenen Forschungsgebietes durchgesetzt, das die Schnittstelle zwischen Medizin, Physik und Technik beschreibt (Kong et al. 2009, Wiegand et al. 2014). Einschlägige Zeitschriften sind „Plasma Medicine“, „Plasma Processes and Polymers“ oder „IEEE Transactions on Plasma Science“. Der Direktor der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Venerologie der Universitätsmedizin Rostock, Univ.-Prof. Steffen Emmert, schrieb 2018 im „Journal of the German Society of Dermatology“ ein Editorial, in dem er der deutschen Forschung für Plasmamedizin einen führenden Status einräumte und die Technologie an der Schwelle zum klinischen Alltag sah (Emmert 2018).



### 3.1 Eine kurze Einführung in die Physik des kalten Atmosphärendruckplasmas

Physikalisches Gas-Plasma wird in der Literatur häufig als der „4. Aggregatzustand“ der Materie bezeichnet. Dies ist zwar aus physikalischer Sicht nicht ganz korrekt (Burm 2012), die Umwandlung von Gas in Plasma wird aber durch Energiezufuhr ähnlich induziert, wie zum Beispiel der Übergang eines Feststoffs in seinen flüssigen Aggregatzustand. Wird Gas durch Energiezufuhr, meist ein elektrisches Feld, ionisiert, entsteht physikalisches Plasma (Conrads und Schmidt 2000). Dieses Plasma besteht aus einem Gemisch verschiedener Teilchen: Hauptbestandteile sind freie Elektronen und Ionen, Strahlung vom ultravioletten bis zum sichtbaren Wellenlängenbereich, sowie freie Radikale, welche während des Ionisierungsprozess freigesetzt werden (von Woedtke et al. 2013). Auf die genaue Zusammensetzung des Plasmas wird im Verlauf des Kapitels eingegangen.

In der Industrie gehört der Einsatz physikalischen Plasmas zum Alltag, z.B. in der Beleuchtungstechnik, zum Schweißen oder zur Oberflächenbehandlung (Kogelschatz 2003). Diese industriellen Gas-Plasmen gehören zu den „Thermischen Plasmen“. Sie sind sehr heiß, da sie auf Techniken wie der Bogenentladung basieren, bei denen Temperaturen zwischen 5000 Kelvin und 50000 Kelvin (4700°C – 49000°C) erreicht werden (Kogelschatz 2004). Kaltes Atmosphärendruckplasma gehört zu den „Nichtthermischen Plasmen“, die bei Raumtemperatur und Atmosphärendruck erzeugt werden (Fridman et al. 2005). Andere nichtthermische Plasmen gehören zu der Gruppe der Niederdruckplasmen, die bei sehr niedrigen Luftdrücken in Vakuum entstehen.

Die Möglichkeit Plasma bei Umgebungsluftdruck zu erzeugen, ermöglicht insbesondere an hitzesensiblen Oberflächen, zu denen die meisten biologischen Materialien gehören, einen variablen Einsatz in vielen Anwendungsgebieten (Shimizu et al. 2014, Daeschlein et al. 2012b).

In kaltem Atmosphärendruckplasma werden die Elektronen des Gasgemisches angeregt und nehmen viel Energie auf. Dabei erreichen die Elektronen Temperaturen bis zu  $10^5$  Kelvin. Sie sind der einzige „heiße“ Bestandteil kalten Atmosphärendruckplasmas. Allen anderen Teilchen wird primär nur wenig Energie zugeführt, sodass sich der restliche Teil des Gases nicht erwärmt. Dadurch wird das Gasgemisch nicht wärmer als die Umgebungstemperatur (Wagner et al. 2003, Moreau et al. 2008).

In Tab. 1 ist eine Übersicht über verschiedene Formen physikalischen Plasmas dargestellt (Frei nach (Weltmann und von Woedtke 2011, Wagner et al. 2003)).

Tab. 1: Verschiedenen Formen physikalischen Plasmas und ihre Temperaturverhältnisse

	Nichtthermisches Plasma		Thermisches Plasma
Temperatur	$T = \text{Umgebungstemperatur}$ $T_e \text{ (Temp. der Elektronen)} \gg T_{\text{neutraler Gasanteil}}$ $= T_{\text{ges}} \text{ (Temp. des Plasmas)}$		$T > 5000 \text{ K}$ $T_e = T_{\text{neutr. G.}} = T_{\text{ges}}$
Unterteilung	Niederdruckplasma	Atmosphärendruckplasma	

Stoßen die angeregten Elektronen auf Moleküle, übertragen sie einen Teil Ihrer Energie auf diese und führen so zu der Bildung reaktiver Spezies. Die Menge an reaktiven Spezies, ihre Art und ihr Anteil am Plasma unterscheiden sich je nach verwendetem Arbeitsgas (Edelgas oder Umgebungsluft, zusammengefasst von (Liao et al. 2017)). Hauptsächlich kommt es zur Bildung radikaler Sauerstoff- und Stickstoffspezies. Unterschieden wird zwischen kurzlebigen Spezies wie z.B.  $\text{N}_2^*$ ,  $\text{O}_2^*$ , O, und langlebigeren Radikalen, zu denen unter anderem OH,  $\text{O}_3$  und  $\text{NO}_2$  gehören (Lu et al. 2016, Rehman et al. 2016, Vatansever et al. 2013). Kaltes Atmosphärendruckplasma enthält neben radikaler Spezies zudem UV-Strahlung, Ionen und Elektronen (O'Connor et al. 2014).

### 3.2 Antimikrobielle Wirkungsmechanismen und getestete Mikroorganismen

Getestet wurden die grampositiven Bakterien *S. aureus* und *MRSA*, die gramnegativen Bakterien *E. coli* und *E. coli NDM-1*, sowie die Hefe *C. albicans*.

Die Mikroorganismen wurden ausgewählt, um sowohl grampositive, als auch gramnegative Bakterien, sowie eine Hefe zu testen, um die Wirkung des KAP auf verschiedene Zellwandmorphologien zu beurteilen. Zudem wurden die multiresistenten Bakterien *MRSA* und *E. coli NDM-1* zum Vergleich hinzugefügt, um die Plasmid-induzierten Antibiotikaresistenzen gegen  $\beta$ -Lactamse-Antibiotika dieser Bakterien der Wirkung des KAP gegenüberzustellen. Während *MRSA* ein seit langer Zeit bestehendes Problem der Krankenhaushygiene ist, an dessen Lösung mit einer Vielzahl von Sicherheits- und Screening Maßnahmen gearbeitet wird (Warnke et al. 2014, Wertheim et al. 2004), stellt die *Neu-Delhi Metallo-Beta-Laktamase (NDM-1)* die Krankenhaushygieniker und Wundmanager vor neue Probleme. In Neu-Delhi wurde das Plasmid NDM-1 entdeckt, welches in der Familie der Enterobakterien (u.a. *Klebsiella*, *Enterobacter* und *Escherichia*) übertragen wird. Nach der erstmaligen Beschreibung der Resistenz 2009 (Yong et al. 2009) breitete sich das Plasmid rasch aus und erreichte unter anderem Europa und die Vereinigten Staaten von Amerika (Moellering 2010, Kumarasamy et al. 2010, Logan und Weinstein 2017).

Die einzelnen Komponenten des kalten Atmosphärendruckplasmas generieren eine Mischung verschiedener Bestandteile, die stark antimikrobiell wirksam ist (Lackmann und Bandow 2014):

UVB-Strahlung, die zu DNA-Schädigungen führt (Brandenburg et al. 2009), (Boudam et al. 2006);

Reaktive Spezies, freie Elektronen und Ionen, die die Zellwand und die Zellmembran angreifen (Laroussi und Leipold 2004, Gaunt et al. 2006, Helmke et al. 2011);

sowie sichtbares Licht, elektromagnetische Felder und Wärme (Deng et al. 2006).

Es werden drei Prozesse definiert, durch welche Plasma Mikroorganismen hemmt (Moisan et al. 2001): Erstens die direkte Schädigung des genetischen Materials durch Bestrahlung mit UV-Licht, zweitens die Schädigung der Zellstrukturen durch das Aufbrechen von Wechselwirkungen durch UV-Strahlen und drittens die Schädigung der Zellstrukturen durch reaktive Spezies, sowohl durch Diffusion in das Zellinnere als auch durch Schädigung der Zellmembran und -wand (ergänzt nach (Stoffels et al.

2008, Wiegand et al. 2014)). Noch ist das Zusammenspiel der einzelnen Inaktivierungsmechanismen nicht vollständig aufgeklärt (s. Diskussion, S. 65 ff.). Eine Darstellung verschiedener Wirkungsmechanismen kann Abb. 1 entnommen werden.

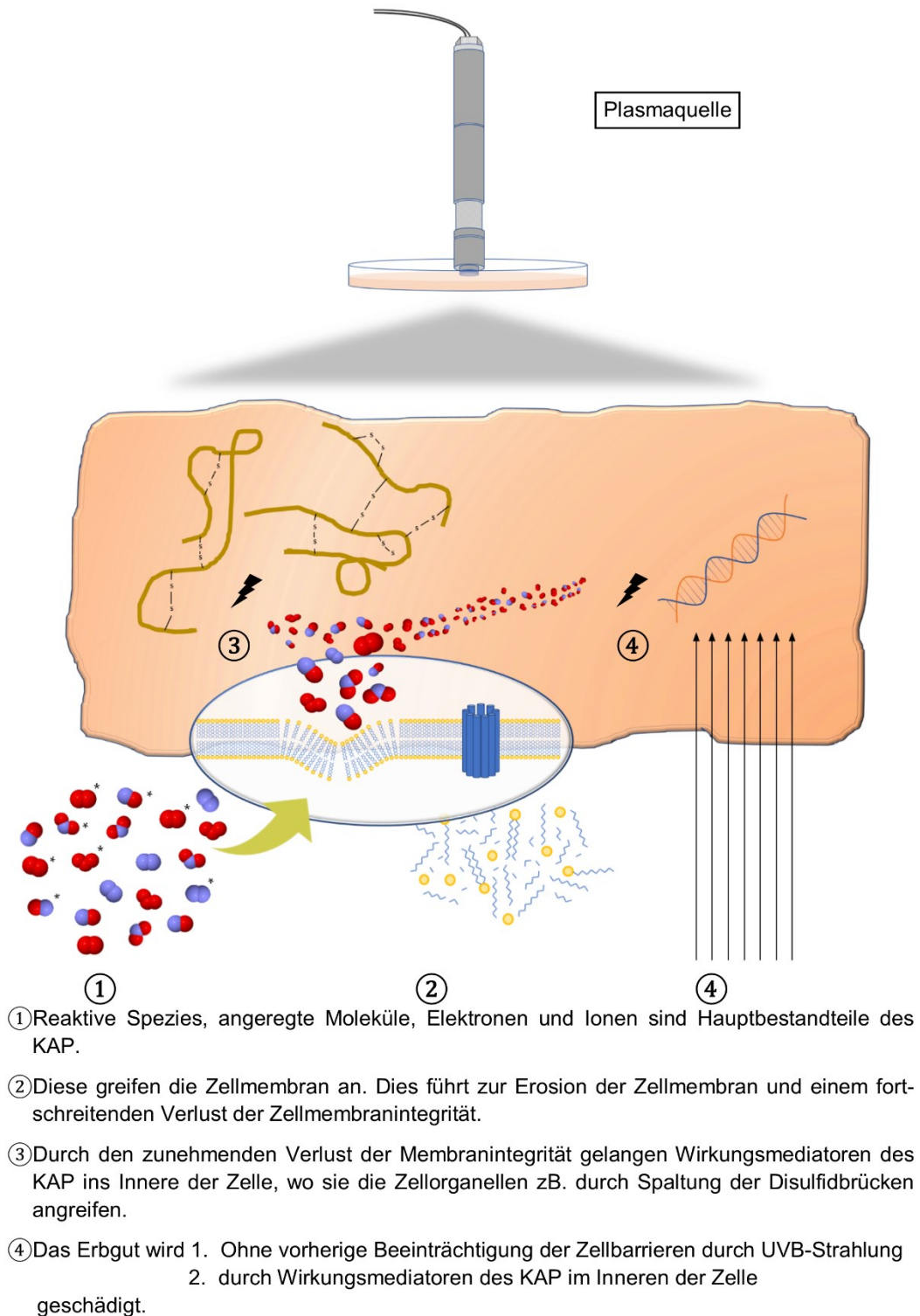


Abb. 1: Darstellung verschiedener zellulärer Wirkungsmechanismen durch KAP

### 3.3 Plasmaquellen – Technische Umsetzung

Geräte zur Erzeugung von kaltem Atmosphärendruckplasma verfolgen verschiedene technische Ansätze. Grundsätzlich wird zwischen direkten und indirekten Plasmaquellen unterschieden. Bei direkten Plasmaquellen wird das behandelte Objekt zu einem Teil des Stromkreises. Bei indirekten Plasmaquellen geschieht dies nicht. Die behandelte Oberfläche wird zwar von Plasma getroffen, durch sie fließt aber kein Strom (Abb. 2)

In diese Unterteilung fallen die beiden aktuell für die medizinische Anwendung wesentlichen Gerätesysteme, die Dielectric-Barrier-Discharge (DBD)-Quelle, oder Dielektrisch-Behinderte-Entladung (DBE)-Quelle, und der Plasmajet.

Die DBD-Quellen gehören größtenteils zu den direkten Plasmaquellen. Sie bestehen aus zwei an Wechselspannung angeschlossenen Elektroden, die durch ein elektrisch nicht leitfähiges Dielektrikum (Keramik oder Glas) von einer Gegenelektrode getrennt sind. Eine der Elektroden sitzt im Gerät, die Gegenelektrode ist z.B. die Haut, an der eine Wunde behandelt werden soll. Ein elektrischer Strom fließt dabei durch den Hautabschnitt, zwischen dem sich ein elektrisches Feld zu der Hochspannungselektrode der Quelle aufbaut. In der Luftschicht zwischen Dielektrikum und Haut entsteht das kalte Atmosphärendruckplasma (Wagner et al. 2003, Metelmann et al. 2016).

Zu den indirekten Plasmaquellen gehören Plasmajets und DBD-Quellen mit koplanarer Anordnung der Elektroden. Die Quelle, die in dieser Arbeit verwendet wurde, ist eine solche DBD-Quelle. Bei diesem Aufbau wird die Gegenelektrode am Gerät neben der Hochspannungselektrode platziert und durch das Dielektrikum getrennt. Das Plasma entsteht zwischen den Elektroden entlang des Dielektrikums. Hier entfällt die Stromleitung über das behandelte Material (Abb. 3, S. 18).

Der wesentliche Unterschied zwischen direkten und indirekten DBD-Plasmaquellen liegt in der Charakteristik ihrer Plasmaentladung (Laroussi 2002): Bei direkten Quellen entlädt sich das Plasma zwischen Hochspannungselektrode und behandeltem Objekt, welches als Gegenelektrode dient. Bei indirekten DBD-Plasmaquellen findet diese Entladung zwischen Anode und Kathode statt und nicht zwischen Quelle und Objekt. Aus diesem Grund ist die Einstellung eines minimalen Abstands zwischen Quelle und Oberfläche bei der hier verwendeten Quelle wichtiger, als bei anderen Plasmaquellen (Weltmann et al. 2010, Wagner et al. 2003).

Im Gegensatz zu DBD-Quellen nutzen Plasmajets ein Arbeitsgas, um KAP zu generieren. Hierfür werden Edelgase wie z.B. Argon (Bekeschus et al. 2016) oder Helium (Laroussi und Akan 2007) verwendet. Innerhalb eines Zylinders strömt das Gas durch ein von Elektroden erzeugtes elektrisches Feld, in dem das Plasma zündet. Durch den Gasstrom zur Spitze hin strömt das Plasma getrieben vom Gas-Fluss aus der Öffnung des Zylinders, wo sich das Plasma mit der Umgebungsluft vermischt (Abb. 2, Frei nach Abbildung 3.3 und 3.4 aus (Metelmann et al. 2016, Weltmann et al. 2010)).

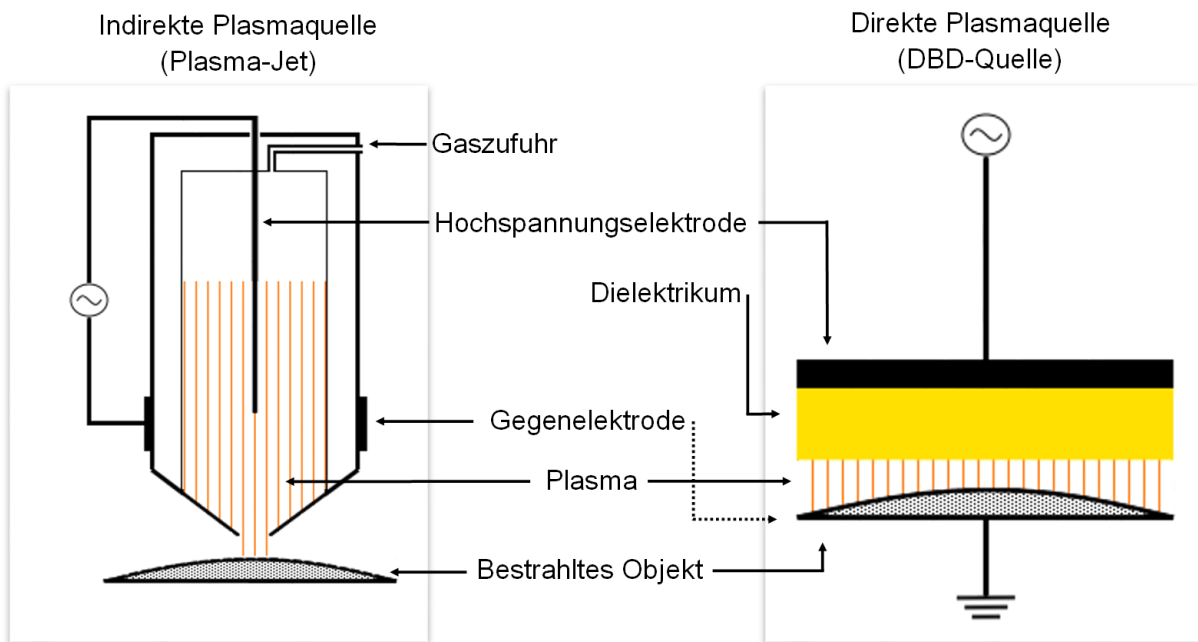


Abb. 2: Schematische Darstellung eines Plasma-Jets und einer DBD-Plasmaquelle

### 3.4 Einsatzmöglichkeiten für KAPs

Ein vielversprechender Ansatz für KAP in der Dermatologie ist, Nutzen aus der antimikrobiellen Wirkung des Plasmas zu ziehen. Dies verspricht eine effektive Desinfektion kontaminierter Haut, infizierter Wunden und beschleunigter Wundheilung (Heinlin et al. 2011, Heinlin et al. 2013, Emmert et al. 2013, Isbary et al. 2010). Erste Pilot-Studien an Patienten ergaben bei der Therapie des chronisch-venösen Ulcus cruris vielversprechende Ergebnisse mit einer Abnahme der Wundoberfläche (Brehmer et al. 2015, Fridman et al. 2008, Ulrich et al. 2015). Eine Studie stellte neben dem antimikrobiellen Effekt auch einen proliferativen Einfluss auf das die Wunde umgebende gesunde Gewebe fest (Kalghatgi et al. 2008). Die Beschichtung von Wundeinlagen und Verbandsmaterialien ist Gegenstand aktueller Forschung: Die neue Technologie ermöglicht es, Wundauflagen mit antimikrobiellen Agenzien zu beschichten, um Wundinfektionen vorzubeugen und ein optimales Wundheilungsmilieu zu schaffen (Spange et al. 2015, Zimmermann et al. 2011).

Für die Behandlung maligner Erkrankungen wird ebenfalls an Therapiestrategien mit KAP gearbeitet (Michael 2015, Yan et al. 2017). In verschiedenen Reviews wird unter anderem der Erklärungsansatz diskutiert, dass KAP besonders an Zellen in der G2/M1-Mitosephase wirkt und sich deshalb ein selektiver Effekt zwischen Tumorgewebe und gesunden Zellen einstellt (Gay-Mimbrera et al. 2016, Fridman et al. 2008). Ein weiterer Ansatz beschreibt, wie Aquaporine in der Zellmembran von Tumorzellen zu einer erhöhten Aufnahme reaktiver Spezies führen (Yan et al. 2015). In der Dermatologie wird der Behandlung des Malignen Melanoms mit KAP großes Potential zugesprochen (Pasqual-Melo et al. 2018). Auch bei der Tumorbehandlung sind die Wirkungsmechanismen des kalten Atmosphärendruckplasmas noch nicht vollständig geklärt.

### 3.5 Medizinische Plasmaquellen

Folgend werden drei für medizinische Einsatzzwecke zugelassene Plasmaquellen vorgestellt. Die Geräte sind als Medizinprodukte CE zertifiziert (Karrer und Arndt 2015):

Der Plasmajet kINPen MED (neoplas tools GmbH, Greifswald; mit Argon als Betriebsgas) und die DBD-Quelle PlasmaDerm (Cinogy GmbH, Duderstadt) stammen aus Deutschland (Daeschlein et al. 2012a, Daeschlein et al. 2014, Weltmann et al. 2009, Brehmer et al. 2015, Reuter et al. 2018).

Der SteriPlas wurde von der japanischen Firma Adtec entwickelt und arbeitet ebenfalls mit Argon als Betriebsgas. Der Vorgänger des SteriPlas war der MicroPlaSter (Isbary et al. 2012, Arndt et al. 2018, Isbary et al. 2014).

Schon länger sind Sterilisatoren mit Plasma im kommerziellen Einsatz (Lerouge et al. 2001, Moisan et al. 2001). In den zwei zitierten Studien werden Low-Pressure-Plasmen vorgestellt, die in Vakuum gezündet werden.

Gegenstand aktueller Forschung ist die Verträglichkeit des KAPs am Menschen. Verschiedene Autoren berichten von guter bis ausreichender Hautverträglichkeit, um Plasma im therapeutischen Fenster am Menschen betreiben zu können (Isbary et al. 2013, Lademann et al. 2013, Boxhammer 2014).

Die in dieser Studie verwendete Plasmaquelle der TU Ilmenau wurde miniaturisiert. Der Plasmachip, der beide Elektroden beinhaltet, ist kleiner als eine 1€-Münze und benötigt zusätzlich eine Stromversorgung. Diese soll in Zukunft mittels Akku ermöglicht werden. Ziel des Konzepts ist die Entwicklung eines Gerätes, das unkompliziert und schnell einsetzbar ist, um möglichst vielfältige Einsatzmöglichkeiten der Quelle zu erschließen. Diese Studie begleitet die ersten Entwicklungsschritte der Quelle und stellt nötige Grundlagenforschung bereit, bevor die Quelle in klinischen Tests weiter charakterisiert werden wird.



## 4. Fragestellungen und Ziele der Arbeit

In dieser Studie wurde die antimikrobielle Wirkung einer Dielectric-Barrier-Discharge (DBD)-Plasmaquelle der TU-Ilmenau auf grampositive und gramnegative Bakterien sowie deren resistente Varianten und gegenüber einer Hefe *in-vitro* untersucht werden. Im Vergleich wurde UVB-Strahlung eingesetzt.

Die getesteten Mikroorganismen waren *S. aureus*, *MRSA*, *E. coli*, *E. coli NDM-1* und *C. albicans*.

Als Verfahren kamen Agardiffusionstests und die Mikroplattenlasernephelometrie (MLN) zum Einsatz. Zusätzlich wurde die Eindringtiefe der Quelle in biologische Gewebe an einem Agarmodell mittels Reaktion von Griess-Reagenz abgeschätzt.

Ziel der Arbeit war es, erste Ergebnisse hinsichtlich der antimikrobiellen Wirksamkeit der Plasmaquelle zu sammeln. Ein wesentlicher Schwerpunkt war der Vergleich der fünf Mikroorganismen in Ihrer Sensitivität auf Plasma, um aus messbaren Mustern Rückschlüsse auf die Wirkungsweise des KAP ziehen zu können.

Zusätzlich sollte die Wirkung der Plasmaquelle und des UVB-Lichts unter verschiedenen Umgebungsbedingungen betrachtet werden: Auf Agar im Agardiffusionstest, in Flüssigkeit und auf festem Untergrund zur Charakterisierung der Plasmaquelle. Aus diesen Vergleichen sollten Rückschlüsse auf die mikrobioziden Mechanismen KAP gezogen werden.

Neben der antimikrobiellen Wirkung sollte die Studie auch zu der Geräteentwicklung beitragen. Die Version der Plasmaquelle in dieser Studie war noch ein Prototyp und soll zum Medizinprodukt weiterentwickelt werden. Deshalb wurde während der experimentellen Arbeiten auch das Verhalten der Plasmaquelle bei Belastung beobachtet. Zuverlässigkeit und Praktikabilität wurden bewertet, Fehlerquellen dokumentiert und in dieser Studie besprochen.

## 5. Material

Name	Identifikation
12-Well Platte	Cellstar, greiner bio-one, Kremsmünster, Österreich, Cat 665180
Abdeckfolie	Viewseal Sealer, Clear, Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, REF 676070
Agarplatte	<p>COS (Columbia Agar + 5% Hammelblut), REF43049, LOT 1005878660, 1005838550, 1005874230, 1006038150, 1006277430</p> <p>MHE (Mueller Hinton E Agar), REF413824, LOT 1005866320, 1006084200</p> <p>SDA (Sabouraud Dextrose Agar), REF 43555 LOT 1005863530, 1005825120, 1005966310, 1006013840, 1006111780, 1006249720</p> <p>Alle bioMèrieux SA, Marcy l'Etoile, Frankreich, Durchmesser 90mm</p>
Auslaufpipette	
Autoklav	Laboklav, SHP, Detzel Schloss/Satuelle
Blaue Schale	
Bouillon Flasche	Schott Duran 500ml, Wertheim/Mainz
Brutschrank	Brutschrank IN260, Memmert, Schwabach
Bunsenbrenner	IBS Fireboy plus, Integra, Biebertal
Desinfektionsmittel	Sekusept classic, Ecolab Deutschland GmbH, Monheim am Rhein (Pulver zum Einweichen von kontaminiertem Material)
Desinfektionsmittel	Meliseptol rapid, Braun (Sprühflasche)

Desinfektionsmittel	Meliseptol HBV Tücher, Braun (Tücher für empfindliche Elektronikteile)
Desinfektionsmittel	Desco Wipes (Tücher zur Oberflächenreinigung)
Einmalkanüle	Sterican, 1,1 x30mm, 19G x 11/4“, Braun, Emmenbrücke, REF 4665317, LOT 15C24G811, 14M1OG8851
Eismaschine	Scotsman, Milan, Italien
Eppendorf-Tubes	1,5ml; 4ml Cryo.S greiner-bio-one, Kremsmünster, Österreich REF 127277
Erlenmeyerkolben	Schott Duran 250ml, Wertheim/Mainz
Gefrierschrank	Kühlzelle 2-8°C
Handschuh	Meditrade Nitril 3000 100Stk REF1280
Impföse	
Kombipipetten + Aufsatz	Eppendorf Transfer Pipetten
Kühlschrank	Profiline, Liebherr, Biberach an der Riß
Kulturflaschen	Schott Duran 50ml, Wertheim/Mainz
Kulturzähler	Acolyte 7510/SYN, Synbiosis, Cambridge, United Kingdom
Laminarbox	MSC Advantage, ThermoFischer Scientific, Waltham, USA
Mikrotiterplatte	96-Well Cellstar, greiner bio one, Kremsmünster, Österreich REF 655161, LOT E170934K, E14123FF, E17053AX
Müllbeutel	special autoclavable bags, nerbe plus, Winsen/ LuheNo093020020
Multipipette	Multipipette M4, Eppendorf, Hamburg
Multipipettenaufsatz	Combitips advanced 5ml, Eppendorf, Hamburg

Nephelometer	Nephelostar Galaxy, BMG Labtech, Offenburg. Verwendete Geräte: Anton, Berta, Cäsar, Dora, Friedrich, Gustav
Petri Schale	Petri Dish 94mm x 16mm, greiner bio-one, Kremsmünster, Österreich REF 632181
Pinzette	
Pipettierhilfe	Pipetboy acu 2, Integra, Biebertal
Plasma Quelle	TU Ilmenau, Institut für Mikro – und Nanotechnologien, Ilmenau
Röhrchen	Cellstar Tubes, Cat. 210261 und 210267
Röhrchen Ständer	Plastibrand, Brand, Wertheim
Rührer	Ikamag REC-G, Ika, Staufen
Schere	54708 Dahle
Schüttelbad	Schüttelwasserbad 1083, GFL Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel
Spatel	
Styroporbox	
UVB-Lampe	UV109, Waldmann Medizintechnik, Villingen-Schwenningen
Vortex-Gerät	Vortex-Genie 2, Scientific Industries, New York, USA
Waage	Sartorius M-prove, Loonscher Waagen, Berlin
Zentrifuge	Eppendorf Zentrifuge 5804R, Eppendorf Deutschland, Wesseling-Berzdorf

Agar Bacteriological (Agar No. 1)	Oxoid Ltd., Basingstoke, England LOT 1445789-02 Zur Herstellung von MHE-Agar
Griess Reagenz	Griess Reagent System, Promega, Madison, USA REF G2930, LOT 0000279659
Mueller-Hinton-Broth	Oxoid Ltd., Basingstoke, England LOT 724245 Zur Herstellung von Mueller-Hinton-E-Agar (MHE)
Phosphat-buffered Saline (PBS)	Dulbecco`s PBS, BioConcept AG, Allschwil, Schweiz
Sabouraud-2%-Glucose-Bouillon	Oxoid Ltd., Basingstoke, England Zur Herstellung von Sabouraud-Glukose-Bouillon (SGB)
Tryptone Soya Broth	Oxoid Ltd., Basingstoke, England LOT 1893637 Zur Herstellung von Trypton-Soja-Bouillon (TSB)

## 6. Methodik

### 6.1 DBD-Plasmaquelle

Die verwendete Plasmaquelle ist eine DBD-Plasmaquelle (Modus: Dielectric-Barrier-Discharge), die vom Institut für Mikro- und Nanotechnologien der TU Ilmenau bereitgestellt wurde. Sie besteht aus der Stromversorgung und einem Haltestück, an dessen Ende der Plasma-Chip (Größe ca. 1 cm x 1 cm) angebracht ist. Dieser wurde in einem Du Pont 951 Tape-System mittels LTCC-Technologie (Low Temperature Cofired Ceramic) hergestellt, in den die Elektroden gedruckt wurden. Das Dielektrikum ist 40  $\mu\text{m}$  dick. (Fischer et. al, 5. Workshop Plasmamedizin 2017, Rostock). Die Elektroden auf dem Plasma-Chip sind koplanar nebeneinander angeordnet (Abb. 3 bis Abb. 5). Die Leistung beträgt 5 Watt. Das Kalte Atmosphärenplasma (KAP) entsteht an der Oberfläche des Plasmachips zwischen den Elektroden (Abb. 3, Frei nach (Wagner et al. 2003)). Aufgrund dessen muss die Plasma-Quelle in möglichst geringem Abstand zur zu bestrahlenden Oberfläche positioniert werden (1 Millimeter oder weniger). Im Gegensatz zu anderen DBD-Plasmaquellen wird durch diesen Aufbau kein Strom über das behandelte Objekt geleitet. Eine Erdung der bestrahlten Flächen war deswegen in keinem der Experimente erforderlich.

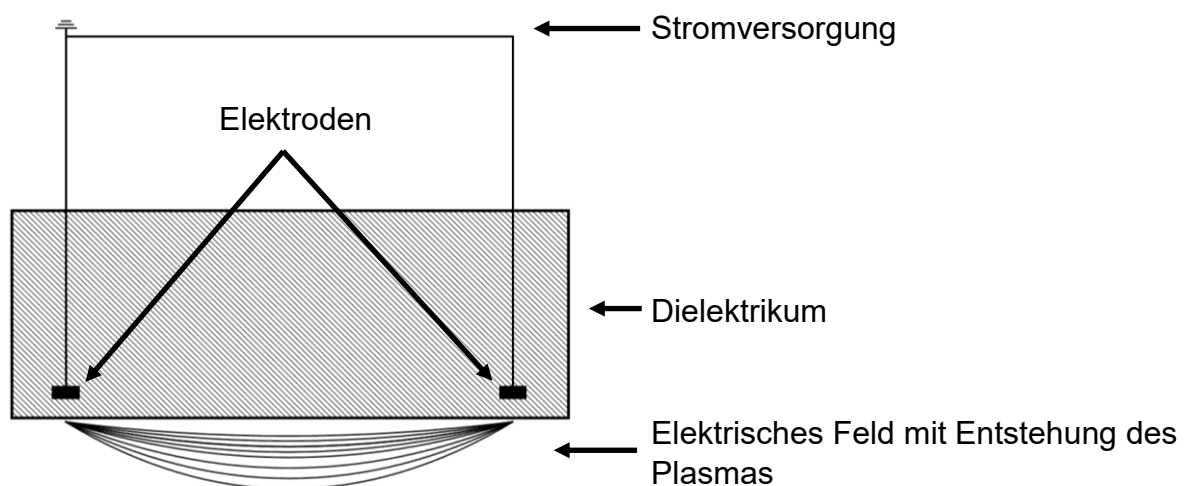


Abb. 3: Plasma-Chips und zugehöriger Elektronik

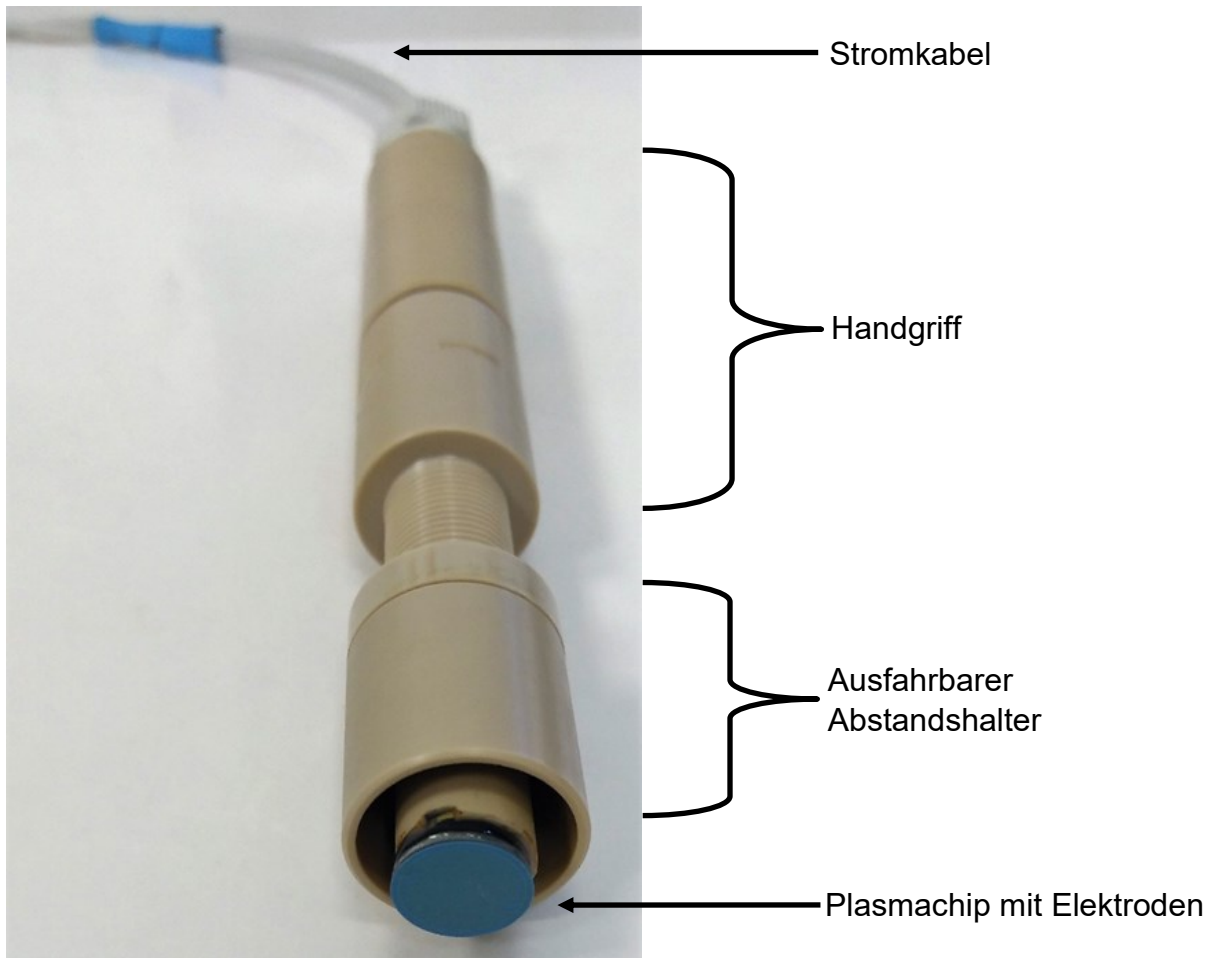


Abb. 4: Plasmaquelle der TU Ilmenau, früher Prototyp

Der Plasmachip aus Keramik mit eingelassenen Elektroden ist in hellblau zu erkennen. In ihn sind Anode und Kathode eingelassen (Abb. 4). Der Plasmachip hat einen Durchmesser von ca. 1 cm. Am vorderen Ende ist der Abstandshalter positioniert, der heruntergeschraubt werden kann. Durch den Griff werden die Stromkabel zum Plasmachip geführt.



Abb. 5: Koplanare Anordnung des Elektrodenfelds auf dem Plasmachip

## 6.2 Herstellung der Schüttelkultur

Die zu bestrahlenden Keime wurden den Röhrchen der Mikrobank (Mikrobank<sup>TM</sup>, Pro-Lab Diagnostics, Richmond Hill ON, Canada) entnommen und auf einem jeweils geeigneten Nährboden ausgestrichen, um anschließend im Inkubationsschrank bei 37°C inkubiert zu werden (Finger 2011). Für die Bakterien wurde COS-Agar (Columbia Agar + 5% Hammelblut), für die Hefe SDA-Agar (Sabouraud Dextrose Agar) verwendet (Beide bioMérieux SA, Marcy l'Etoile, Frankreich, Durchmesser 90mm). Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die beimpften Agarplatten zum weiteren Gebrauch als Stammkulturen im Kühlschrank bei 2-8°C gelagert. Etwa alle 14 Tage wurden die Stammkulturen auf frische Agarplatten mittels Vereinzelausstrich überimpft. Dies geschah bis zu 10mal, bevor eine neue Stammkultur aus der Mikrobank angelegt wurde (siehe Qualitätsmanagement Universitätsklinik Jena, Klinik für Hautkrankheiten, Arbeitsanweisung Stammhaltung von Bakterien, Version 01, 10.12.2012).



### 6.3 Verwendete Mikroorganismen

Untersucht wurden die Bakterien *Escherichia coli* DSM5923 (Abkürzung *E. coli*), *Escherichia coli* NDM-1 ATCC2452 (Abkürzung *E. coli* NDM-1), *Staphylococcus aureus* ATCC6538 (Abkürzung *S. aureus*), *Methicillin Resistenter Staphylococcus aureus* ATCC33591 (Abkürzung *MRSA*) und die Hefe *Candida albicans* DSM 1386 (Abkürzung *C. albicans*).

Die Mikroorganismen wurden von der Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) bezogen. Zur Herstellung einer Gebrauchskultur wurden am Tag vor dem geplanten Experiment von der jeweiligen Stammkultur mithilfe einer Impföse 2 bis 3 Kolonien des Keims in eine Kulturflasche mit 20 ml Trypton-Soja-Bouillon (TSB) für Bakterien oder 20 ml Sabouraud-Glukose-Bouillon (SGB) für die Hefe gegeben. Im Anschluss wurden die Kulturen 18 – 24h in einem Schüttelbad (Schüttelwasserbad 1083, GFL Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel) bei 37°C im Wasserbad inkubiert und zu Beginn der Arbeiten bis zur weiteren Verwendung in einer Styroporbox auf Eis gestellt. Die Gebrauchskulturen wurden nach ihrer Verwendung in einem Kanister entsprechend der Entsorgung von Mikroorganismen der Risikogruppe 2 nach Infektionsschutzgesetz entsorgt und die Kulturflaschen über Nacht in Sekusept-Lösung (Ecolab Deutschland GmbH, Monheim am Rhein) entsprechend des QM-Dokuments eingeweicht.

## 6.4 Agardiffusionstest

Aus der Gebrauchskultur wurden jeweils 100  $\mu\text{L}$  Bakterienlösung auf MHE-Agarplatten (Mueller Hinton E Agar, bioMérieux SA, Durchmesser 90 mm) mit einem sterilen Spatel ausplattiert.

Für die UVB-Bestrahlung wurde die Agarplatte ohne Deckel in einen Kasten auf ein Stativ mit einem voreingestellten Abstand von 16 cm zur UVB-Lampe (Waldmann Medizintechnik, Villingen-Schwenningen, Leistung am Wellboden:  $0,25 \text{ mW/cm}^2$ ) gesetzt. Im Anschluss erfolgte die Bestrahlung für 10s, 30s, 1min, 5min oder 10min. Dies entsprach einer Dosis von  $2,5 \text{ mJ/cm}^2$ ,  $7,5 \text{ mJ/cm}^2$ ,  $15 \text{ mJ/cm}^2$ ,  $75 \text{ mJ/cm}^2$  und  $150 \text{ mJ/cm}^2$ . Nach anschließenden 24h Inkubationszeit wurden die Platten fotografiert und entsorgt. Alle Tests wurden pro Versuchsdurchgang in Doppelbestimmung durchgeführt und jeder Versuch dreimal wiederholt.

Für den Versuch mit KAP wurde die Mikroplasmaquelle der TU Ilmenau unter der Arbeitsbox in ein Stativ eingespannt und ein Abstand von 1 Millimeter zur Agarplatte eingestellt. Anschließend wurde die Plasmaquelle mittig über der Agarplatte ausgerichtet. Die Bestrahlungszeiten betragen 2s, 10s, 30s und 1min. Alle Bestrahlungen wurden pro Versuchsdurchgang in Doppelbestimmung durchgeführt und jeder Versuch mindestens sechsmal wiederholt. Nach 24h Inkubation wurden die Platten fotografiert (s. Abb. 6) und anschließend entsorgt.



Abb. 6: Mit Plasma behandelter E. coli auf MHE-Agarplatten

In Abb. 6 sind zwei MHE-Agarplatten nach 24h Inkubationszeit so fotografiert worden, wie es standardmäßig zur Auswertung durchgeführt wurde. Die Bestrahlungszeit in diesem Beispiel betrug 30s. Links ist der zentrale Hemmhof mit vollständiger Hemmung zu erkennen, sowie im Anschluss daran ein Bereich mit vereinzelt Kolonien. Um diese Flächen vollständig zu erfassen, wurden 4 Messwerte (Einheit: Millimeter, bzw. Quadratmillimeter) pro Agarplatte erfasst: Zwei Durchmesser: Je ein maximaler und ein minimaler Wert in möglichst rechtem Winkel zueinander, sowie zwei Flächeninhalte für die vollständige und die partielle Hemmung (Beispiel in Abb. 7). Rechts ist beispielhaft der minimale und der maximale Durchmesser eingezeichnet. Die Durchmesser beziehen sich immer auf den bakteriziden Anteil der Hemmung. Auf den 2. Flächeninhalt wurde verzichtet, wenn auf der Agarplatte ausschließlich eine bakterizide Hemmung zu erkennen war.

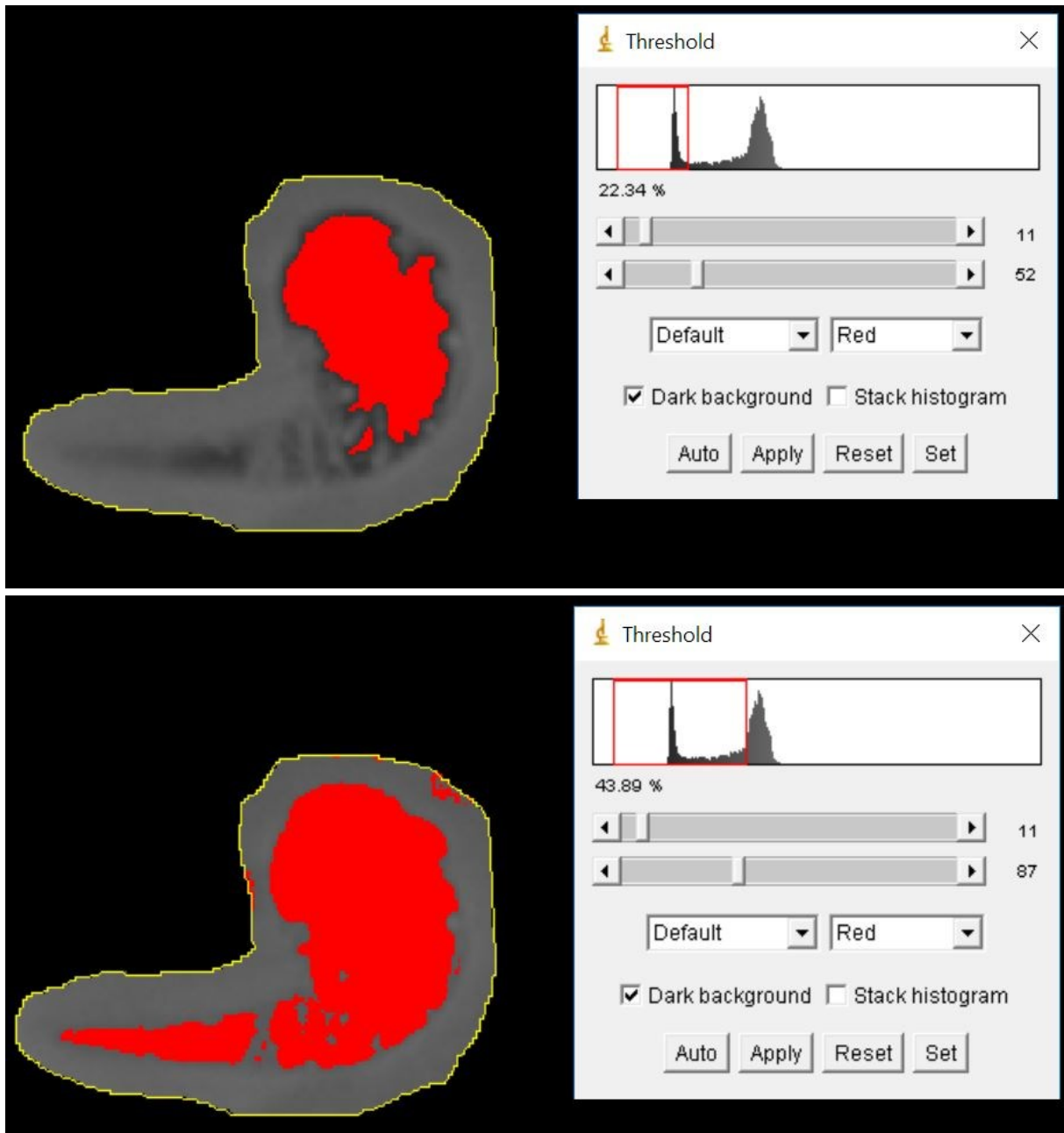


Abb. 7: Ausschnitt der Agarplatte aus Abbildung 4

In Image J wurde mittels „[Image]; [Type]: 8-bit; und [Image]; [Adjust]: Threshold...“ die Fläche markiert und anschließend über „[Analyze]: Analyze Particles...“ ausgemessen (Durchgeführt in Abb. 7). Abb. 7 oben: Hemmfläche der bakteriziden Hemmung. Unten: Gesamtwirkungsfläche inklusive des bakteriostatischen Anteils.

## 6.5 Mikroplatten-Laser-Nephelometrie (MLN)

Im Nephelometer wird die Streuung einer Lichtquelle (Hier: Laser mit einer Wellenlänge von 635nm) durch Flüssigkeit hindurch registriert. Durch die voranschreitende Trübung der zu untersuchenden Flüssigkeit durch mikrobielles Wachstum wird das Licht zunehmend gestreut und mithilfe einer Ulbricht-Kugel auf einen Photodetektor reflektiert (s. Abb. 8). Die Intensität an diesem Detektor kann stündlich gemessen werden (Finger 2011). Die 24 (Bakterien) bzw. 48 (*C. albicans*) Messergebnisse eines Versuchsdurchgangs gibt das Nephelometer in der Einheit Relative Nephelometrische Einheiten (relative nephelometric units, RNU) aus. Diese wurden mit MARS (Version 2.10 R3) in Excel (Version 1708) exportiert.

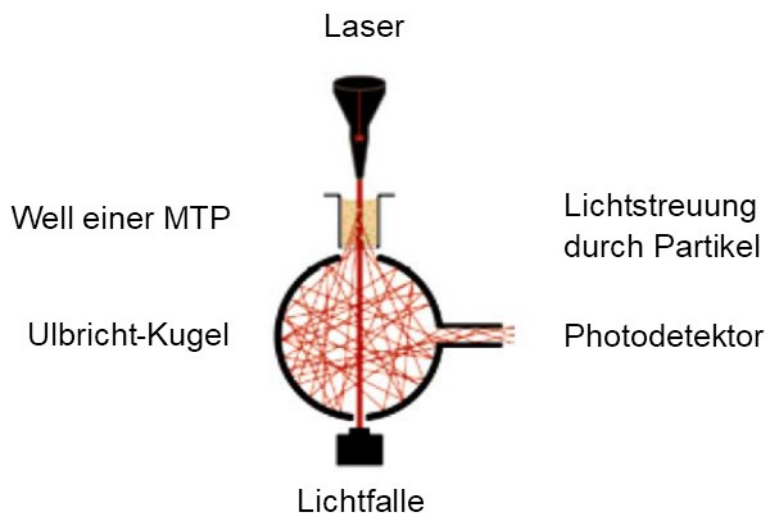


Abb. 8: Messtechnik der Mikroplatten-Laser-Nephelometrie (nach (Finger 2011))

### 6.5.1 Herstellung der Gebrauchskulturen

Als Vorlage dient das Dokument „Qualitätsmanagement Universitätsklinik Jena, Klinik für Hautkrankheiten, Arbeitsanweisung Nephelometerplatten V01, 03.12.2012“.

Zur Bestimmung der Zellzahl wurde aus einer 18-24h Gebrauchskulturkultur (s.o.) eine Verdünnungsreihe hergestellt. Dazu wurden die Bakterien in folgende Verdünnungen pipettiert:  $1:10^6$ ,  $1:10^7$ ,  $1:10^8$ , respektive für die Hefe:  $1:10^5$ ,  $1:10^6$ ,  $1:10^7$  und von jeder Verdünnungsstufe 100  $\mu\text{L}$  auf einer geeigneten Agarplatte (siehe oben) ausplattiert. Diese wurden für 24h bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert und anschließend die Kolonien ausgezählt. Ausgewertet wurden Zellzahlen zwischen 30 und 300 Kolonien.

Zur Herstellung einer Testlösungen wurden 10 µL einer 18-24h Schüttelkultur mit PBS (Phosphat-buffered Saline, Dulbecco`s PBS, BioConcept AG, Allschwil, Schweiz) auf 1:10<sup>7</sup> (Bakterien) bzw. 1:10<sup>6</sup> (*Candida Albicans*) verdünnt, um eine Zelldichte von 5-7x10<sup>3</sup> KBE/mL bzw. 6-8x10<sup>3</sup> KBE/mL zu erreichen. Je 1000 µL dieser Verdünnung wurden in einen Well einer 12 Well Kultur Platte (greiner bio-one, Kremsmünster, Österreich) pipettiert. Alle Bestrahlungszeiten wurden pro Versuchsdurchgang in Doppelbestimmung erfasst und jeder Versuch mindestens dreimal wiederholt.

### 6.5.2 Bestrahlung der Gebrauchskulturen

Für die UVB-Bestrahlung wurde wie für die Agardiffusionstest ein Abstand von 16 cm zwischen Well-Boden und UV-Lampe eingestellt. Die UVB-Dosis betrug 0,25 mW/cm<sup>2</sup>. Um eine gleichmäßige Bestrahlungsleistung senkrecht zur UVB-Lampe zu gewährleisten, wurden maximal 2 nebeneinanderliegende Wells gleichzeitig bestrahlt. Die Proben wurden für 10s, 30s, 1min, 5min und 10min bestrahlt. Dies entsprach einer Dosis von 2,5 mJ/cm<sup>2</sup>, 7,5 mJ/cm<sup>2</sup>, 15 mJ/cm<sup>2</sup>, 75 mJ/cm<sup>2</sup> und 150 mJ/cm<sup>2</sup>. Für die Bestrahlung mit KAP wurde die Plasmaquelle in einem Abstand von 1 mm zur Probe mithilfe eines Stativs justiert und die Bestrahlung entsprechend der Vorgaben durchgeführt: Die Bestrahlungszeiten betragen 2s, 10s, 30s, 1min und 3min. Die Mikroorganismen *MRSA*, *E. coli NDM-1* und *C. albicans* wurden für maximal 5 Minuten behandelt.

Für die Bestrahlung der Mikroorganismen kamen zwei Verfahren zum Einsatz: Zum einen wurden die Proben in 1000 µL Flüssigkeit bestrahlt. Im zweiten Verfahren wurde die 12-Well Kultur Platte mit je 1000 µL Bakteriensuspension pro Well für 15 Minuten bei 3750 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert (Eppendorf Centrifuge 5804 R, Eppendorf Deutschland, Wesseling-Berzdorf) und anschließend der Flüssigkeitsüberstand abpipettiert. Anschließend fand die Bestrahlung des Sediments statt, welches danach in 1000 µL PBS resuspendiert wurde.

Die mit UVB oder KAP behandelten Proben wurden für die Mikroplatten-Laser-Nephelometrie in eine 96 Well Platte (greiner bio-one GmbH) überführt: In die vorgegebenen Wells wurden je 100 µL behandeltes bzw. unbehandeltes Inokulum pipettiert und anschließend mit einer Multipipette (M4, Eppendorf) 100 µL TSB für Bakterien bzw. SGB für *Candida albicans* hinzu pipettiert. In die Blank-Wells wurden je 100 µL TSB (SGB) und 100 µL PBS pipettiert. Anschließend wurde die 96-Well

Platte mit einer lichtdurchlässigen Folie (Viewseal Sealer, Clear, Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen) verschlossen und, um ein aerobes Wachstum der Mikroorganismen zu ermöglichen, mit einer Kanüle (Sterican, 1,1 x30 mm, 19G x 11/4“, Braun, Emmenbrücke) Löcher in die Folie gestochen.

Die so vorbereitete 96-Well Platte wurde in das Mikroplatten-Laser-Nephelometer (NEPHELOstar Galaxy, BMG Labtech, Offenburg) eingefahren und über 24h (Bakterien) respektive 48h (*C. albicans*) wurden stündlich Messergebnisse aufgenommen. Der Laser beam focus war auf 2.5 mm eingestellt, die Laser Intensität betrug 1%. Die Nephelometer besaßen einen Inkubator, der auf 37°C eingestellt war. Zwischen den Messungen wurde die Probe orbital geschüttelt (Weite: 5 mm). Zur Auswertung wurden mit Excel Mittelwerte und Standardabweichung berechnet. Die Daten wurden zur Bestimmung der Mittleren Inhibitorischen Bestrahlungsdauer (IC<sub>50</sub>) in Origin (Version 7.0220) übertragen und eine Ausgleichskurve mit der Formel

$$y = \frac{A1+A2}{1+(\frac{x}{x_0})^p} + A2$$

berechnet. Der Wert (x<sub>0</sub>) entspricht der IC<sub>50</sub>.

Um eine ausreichend sigmoidale Kurve zu erstellen, musste in manchen Fällen die Wirksamkeit mathematisch extrapoliert werden. In diesen Fällen wurde bei der 10fachen Bestrahlungszeit eine vollständige Hemmung angenommen, wenn bei der längsten getesteten Bestrahlungszeit eine mindestens 80%ige Hemmung erreicht wurde. Ansonsten wurde nach der 10fachen Bestrahlungszeit die größte erreichte Hemmung erneut eingesetzt.

## 6.6 Bestimmung der Eindringtiefe von KAP

Zur qualitativen Bestimmung der Eindringtiefe des Plasmas wurde Griess-Reagenz (Promeda, USA) als Indikator in einem Agarmodell verwendet. Griess-Reagenz besteht aus den beiden Komponenten 0.1% N-1-Naphthylethylenediaminedihydrochlorid und 1% Sulfanilamid, die bei Anwesenheit von  $\text{NO}_2^-$  zu einem Azo-Farbstoff (rot) reagiert (Abb. 9, Aus: Promega: Technical Bulletin; Griess Reagent System: Instructions for use of product G2930 Version 6/09. Mit freundlicher Genehmigung der PROMEGA Corporation, Madison, USA.). Anhand der Verfärbung des mit Indikator versetzten Agars konnte annäherungsweise die Eindringtiefe der reaktiven Spezies des KAP am Beispiel von  $\text{NO}_2^-$  gemessen werden. Diese Methodik wurde eingesetzt, um in einen zweiten Ansatz den Wirkungsradius des KAPs zu quantifizieren (Sanaei und Ayan 2015).

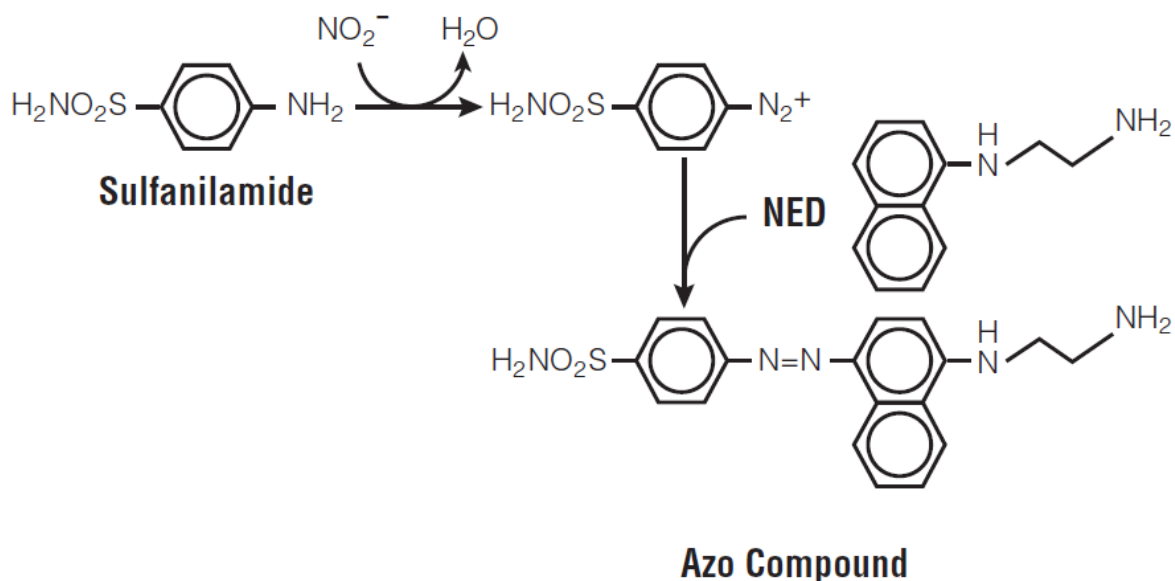


Abb. 9: Reaktion der Bestandteile des Griess-Reagenzes

Im Experiment wurden im Well einer 12-Well-Platte zu 4000  $\mu\text{L}$  flüssigem MHE Agar je 500  $\mu\text{L}$  NED und 500  $\mu\text{L}$  Sulfanilamid gegeben. Anschließend wurde das Griess-Reagenz mit einer Impföse mit dem Agar vermischt und auf Zimmertemperatur abgekühlt, damit sich der Agar erhärtete. Vor jeder Bestrahlung mit KAP wurde überprüft, ob bereits eine Indikatorreaktion stattgefunden hatte. War dies der Fall, wurde der Wellinhalt verworfen.



Anschließend wurden die Wells für 2s, 10s, 30s, 1min und 5min mit KAP bestrahlt. Nach der Bestrahlung wurde 20 Minuten bis 30 Minuten gewartet, bis die Agar-Zylinder aus der Well-Platte entfernt, in der Mitte durchgeschnitten und die Eindringtiefe dokumentiert wurde. Die Eindringtiefe wurde in Doppelbestimmung durchgeführt. Das Experiment wurde mit zwei Chargen MHE-Agars durchgeführt.

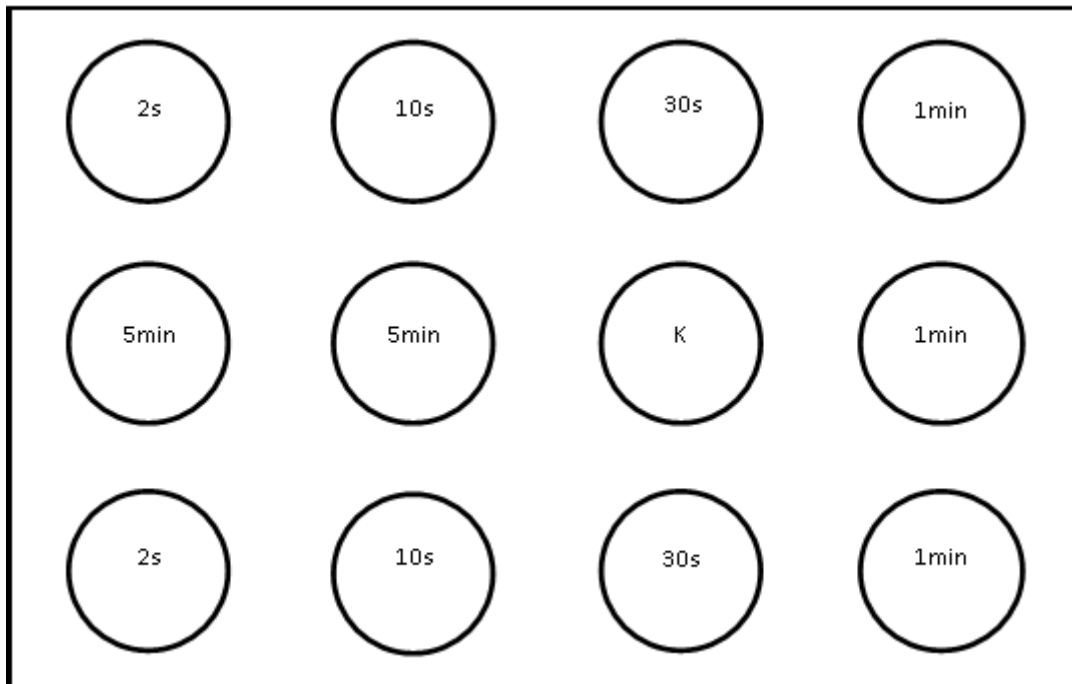


Abb. 10: 12-Well-Layout der Testung der Eindringtiefe des Plasmas mit Gieß-Reagenz

## 6.7 Software

Für die deskriptive Statistik wurde Excel 2016 (Version 1708) verwendet. Die restlichen statistischen Analysen wurden mit SPSS durchgeführt. Dazu gehörten Mann-Whitney-U-Tests und Generalized Estimating Equation Modelle (GEE). Cohens`d wurde für non-parametrische Tests berechnet (Lenhard und Lenhard 2016).

Grafiken wurden selbstständig mit paint.net (Version 4.0.21) erstellt, falls nicht anders angegeben. Graphen wurden mit Origin (Version 7.022) erstellt.


















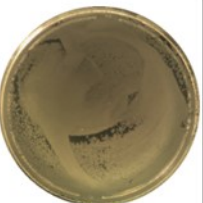





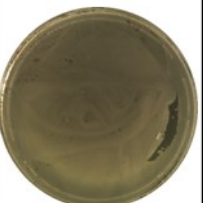

## 7. Ergebnisse

### 7.1 Agardiffusionstest

#### 7.1.1 UVB

Die Bestrahlung der Agarplatten mit UVB-Licht erzielte eine Abnahme der Koloniedichte nach 5 Minuten, die aber erst nach 10 Minuten zu einer Vereinzelnung der Kolonien führte (Tab. 2). Die Mikroorganismen *S. aureus*, *MRSA* und *E. coli* zeigten eine deutliche Hemmung nach 10 Minuten (150 mJ/cm<sup>2</sup>) Bestrahlungszeit. Die Keime *E. coli NDM-1* und *C. albicans* wiesen dagegen eine geringere Sensibilität gegenüber der UVB-Bestrahlung auf. Die Hefe *C. albicans* zeigte nach 10 Minuten Bestrahlungszeit eine Vereinzelnung der Kolonien, die bei den anderen Keimen bereits nach 5 Minuten (75 mJ/cm<sup>2</sup>) auftrat. *E. coli NDM-1* wurde am schlechtesten durch UVB-Licht gehemmt. Hier war nach 10 Minuten Bestrahlungszeit nur in wenigen Bereichen der Agarplatte eine Vereinzelnung der Kolonien zu erkennen.

Tab. 2: Ergebnisübersicht des Agardiffusionstests nach Bestrahlung mit UVB-Licht





















Bestrah- lungszeit (Dosis)	<i>S. aureus</i>	<i>MRSA</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i> <i>NDM-1</i>	<i>C. albicans</i>
10s (2,5)					
30s (7,5)					
1min (15)					
5min (75)					
10min (150)					

### 7.1.2 Kaltes Atmosphärendruckplasma

Die antimikrobielle Wirkung der Plasmaquelle gegen die Bakterien trat bereits nach einer Bestrahlungszeit von 2s auf (Tab. 3). Es zeigte sich ein deutlichen Hemmhof auf den Agarplatten.

Die Hefe *C. albicans* wurde bei 2s Bestrahlungszeit nicht zuverlässig gehemmt. Mittelwerte Durchmesser (1):  $1,4 \pm 1,8$  und (2):  $2,4 \pm 3,8$  (Tab. 4). Teilweise konnte bei dieser kürzesten Bestrahlungszeit nur eine fungistatische Wirkung oder überhaupt keine Hemmung nachgewiesen werden.

Tab. 3: Ergebnisübersicht des Agardiffusionstests nach Bestrahlung mit KAP

Keim/ Bestrah- lungszeit	<i>S. aureus</i>	<i>MRSA</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i> <i>NDM-1</i>	<i>C. albicans</i>
2s					
10s					
30s					
1min					

In Tab. 4 sind die Mittelwerte des Minimalen und Maximalen Durchmessers zusammengefasst. Die Hefe *C. albicans* wies die geringste Hemmung nach 2s Bestrahlungszeit auf. Die Messwerte nach 2s Bestrahlungszeit bewegten sich innerhalb der Standardabweichung des Minimalen Durchmessers zwischen 0mm (SD: -0,4 mm) und 3,14 mm bzw. zwischen 0 mm (SD: -1,34 mm) und 6,2 mm des Maximalen Durchmessers. *C. albicans* wurde nach 2s Bestrahlung demnach nicht zuverlässig gehemmt. Mit längerer Bestrahlungsdauer stieg der Durchmesser der Hemmhöfe. Dies geschah bei allen Keimen. Nach 60s Bestrahlungszeit wurde die Hefe *C. albicans* so stark gehemmt wie die Bakterien.

Tab. 4: KAP: Minimale und maximale Durchmesser [mm]. Mittelwert  $\pm$  SD

Keim/ Bestrahlungsdauer	2s	10s	30s	60s
<b>Minimaler Durchmesser</b>				
<i>S. aureus</i>	5,11 ( $\pm$ 3,56)	9,50 ( $\pm$ 3,89)	11,12 ( $\pm$ 3,26)	12,66 ( $\pm$ 2,81)
<i>MRSA</i>	5,40 ( $\pm$ 3,31)	8,70 ( $\pm$ 3,88)	11,64 ( $\pm$ 4,10)	11,34 ( $\pm$ 4,30)
<i>E. coli</i>	4,14 ( $\pm$ 3,32)	8,85 ( $\pm$ 2,81)	11,11 ( $\pm$ 2,52)	12,61 ( $\pm$ 2,42)
<i>E. coli NDM-1</i>	4,54 ( $\pm$ 2,70)	7,73 ( $\pm$ 3,47)	10,57 ( $\pm$ 3,30)	12,03 ( $\pm$ 2,29)
<i>C. albicans</i>	1,37 ( $\pm$ 1,77)	6,82 ( $\pm$ 2,93)	9,39 ( $\pm$ 3,10)	12,14 ( $\pm$ 2,55)
<b>Maximaler Durchmesser</b>				
<i>S. aureus</i>	9,36 ( $\pm$ 3,95)	14,71 ( $\pm$ 5,85)	18,42 ( $\pm$ 3,78)	20,11 ( $\pm$ 3,62)
<i>MRSA</i>	8,66 ( $\pm$ 3,41)	13,62 ( $\pm$ 5,28)	16,99 ( $\pm$ 4,34)	16,21 ( $\pm$ 4,24)
<i>E. coli</i>	6,72 ( $\pm$ 4,44)	15,73 ( $\pm$ 4,90)	17,30 ( $\pm$ 4,35)	19,47 ( $\pm$ 4,89)
<i>E. coli NDM-1</i>	7,80 ( $\pm$ 2,95)	12,39 ( $\pm$ 4,53)	15,50 ( $\pm$ 4,04)	18,01 ( $\pm$ 3,65)
<i>C. albicans</i>	2,43 ( $\pm$ 3,77)	11,50 ( $\pm$ 4,61)	15,39 ( $\pm$ 2,98)	16,90 ( $\pm$ 1,80)

In Abb. 11, S. 34 sind die Werte des Minimalen Durchmessers nach 2 Sekunden und 60 Sekunden Bestrahlungsdauer aus Tab. 4 zum Vergleich aufgetragen. Deutlich zu erkennen ist die oben beschriebene Entwicklung des Hemmhofs der Hefe *C. albicans*. Alle anderen Keime zeigen ähnliche Hemmhofdurchmesser. Abb. 12, S. 34 stellt am Beispiel des Vergleichs zwischen *S. aureus* und *C. albicans* anhand einer Trendlinie die Entwicklung des Hemmhofdurchmessers über die Bestrahlungszeiten dar. Der minimale Durchmesser wurde gegen die Bestrahlungszeit aufgetragen. Es wurde eine Ausgleichskurve durch die Messpunkte gelegt, die eine Abflachung der Kurve bei längerer Bestrahlungszeit erkennen lässt.

Abb. 13 und Abb. 14 verdeutlichen dieselben Zusammenhänge für den Messpunkt „Maximaler Hemmhofdurchmesser“.

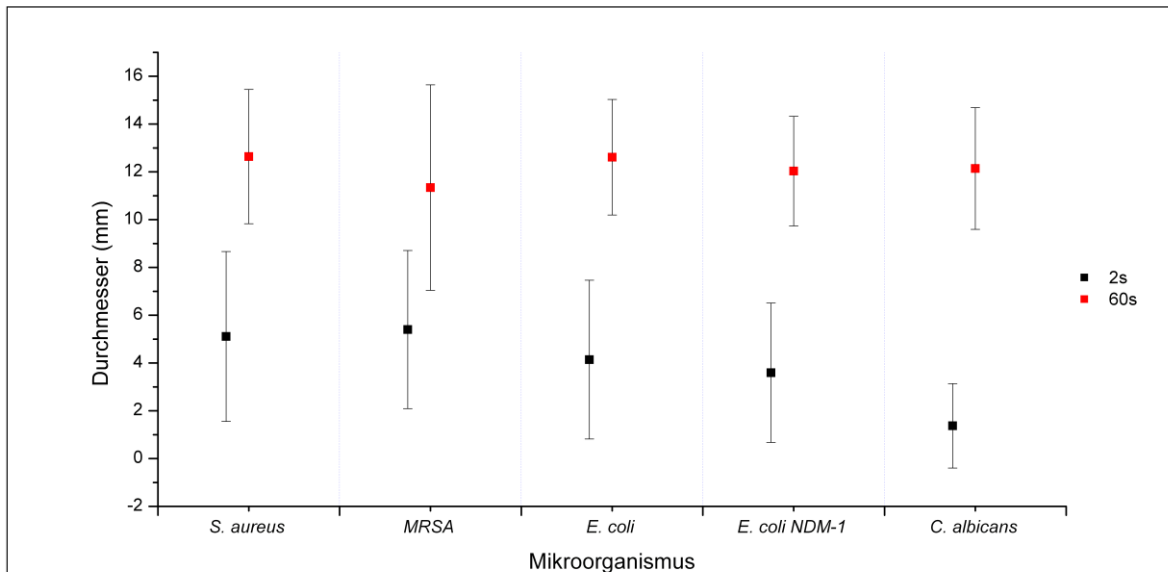


Abb. 11: KAP: Minimaler Hemmhofdurchmesser [mm]  $\pm$  SD

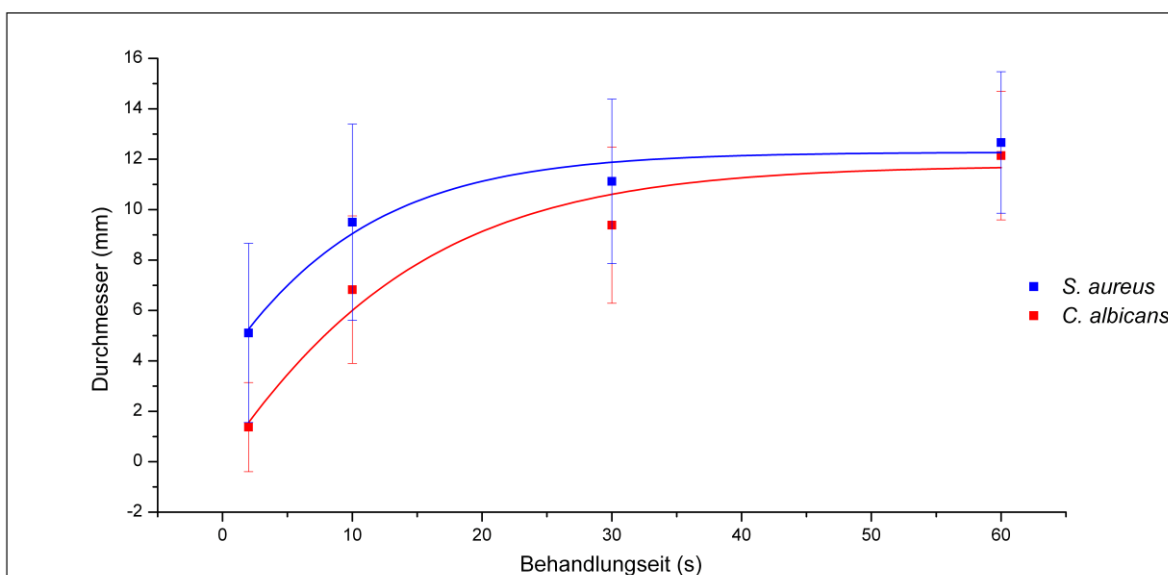


Abb. 12: KAP: Minimaler Durchmesser [mm]  $\pm$  SD und Ausgleichskurve

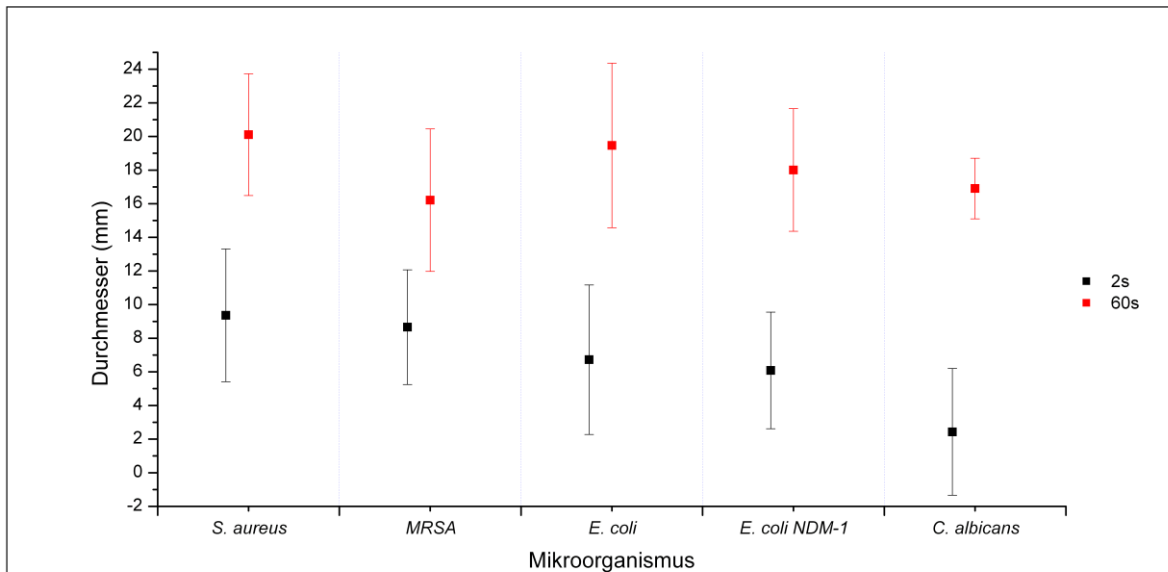


Abb. 13: KAP: Maximaler Hemmhofdurchmesser [mm] ± SD

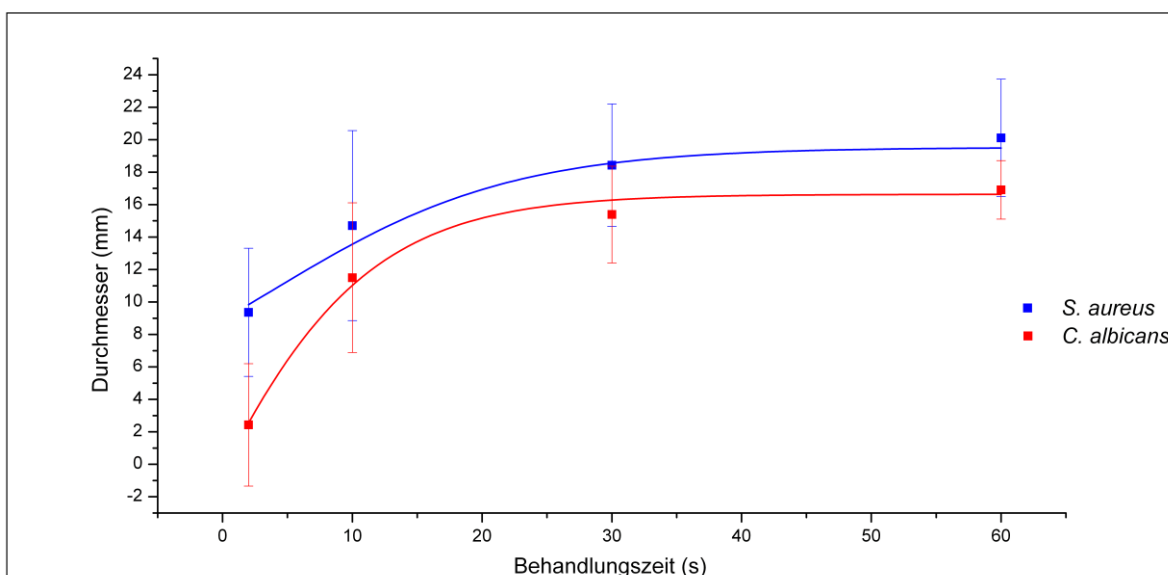


Abb. 14: KAP: Maximaler Durchmesser [mm] ± SD und Ausgleichskurve

Tab. 5 zeigt die Messwerte, die für den Flächeninhalt ermittelt wurden. Der Flächeninhalt des Hemmhofs (In  $\text{mm}^2$  gemessen) verhielt sich sehr ähnlich zu den Durchmessern. Bei einer Bestrahlungszeit von 2s überdeckten die Standardabweichungen der Keime *E. coli* und *C. albicans* den Wert Null. Innerhalb der Versuche kam es zu einer breiten Streuung der Messwerte der Flächendurchmesser. Die geringste, nach 2s Bestrahlungszeit für *S. aureus* gemessene (bakterizide) Fläche betrug  $3,45 \text{ mm}^2$ , die größte Fläche  $151,24 \text{ mm}^2$ , wogegen die Messungen von MRSA sich zwischen  $2,012 \text{ mm}^2$  und  $13,226 \text{ mm}^2$  bewegten. Für alle anderen Keime (2s

Bestrahlungszeit): *E. coli* 0 mm<sup>2</sup> bis 135,697 mm<sup>2</sup>; *E. coli NDM-1* 0 mm<sup>2</sup> bis 95,168 mm<sup>2</sup>; *C. albicans* 0 mm<sup>2</sup> bis 67,5 mm<sup>2</sup>.

Der maximale Flächeninhalt, also der Flächeninhalt der bakteriziden und bakteriostatischen Hemmung, gilt nur als Orientierungspunkt. In nicht allen Messungen (z.B. *S. aureus* 72 von 86 Messungen, *MRSA* 38 von 86 Messungen, *C. albicans* 18 von 48 Messungen) war ein solcher vergrößerter Hemmhof zu erkennen. Dann wurde nur ein Wert gemessen und der „Minimalen Fläche“ zugeordnet. Diese Messungen wurden bei der Mittelwertberechnung nicht berücksichtigt – Hier ist die Grundgesamtheit kleiner als bei den übrigen Messwerten. Aufgrund dieses Umstands und der hohen Variabilität wurde die Maximale Fläche ausschließlich deskriptiv analysiert und nicht weitergehend statistisch ausgewertet. Die Maximale Fläche nach 2s Bestrahlungszeit der Hefe *C. albicans* konnte nur einmal ermittelt werden. Deshalb ist die Standardabweichung 0. Der Wert wurde bei der Betrachtung der Ergebnisse ausgeklammert.

Tab. 5: KAP: Minimaler und maximaler Flächeninhalt [mm<sup>2</sup>] ± SD

Keim/ Bestrahlungsdauer	2s	10s	30s	60s
<b>Minimale Fläche</b>				
<i>S. aureus</i>	45,44 (±44,99)	102,79 (±72,49)	151,13 (±71,59)	168,27 (±57,62)
<i>MRSA</i>	42,32 (±32,98)	90,96 (±46,91)	143,59 (±57,29)	157,53 (±76,36)
<i>E. coli</i>	32,76 (±40,65)	99,90 (±59,67)	133,70 (±61,06)	186,68 (±59,61)
<i>E. coli NDM-1</i>	32,75 (±32,63)	79,20 (±48,41)	123,88 (±63,05)	145,65 (±39,08)
<i>C. albicans</i>	9,28 (±18,29)	60,02 (±39,02)	107,76 (±49,16)	153,98 (±37,49)
<b>Maximale Fläche</b>				
<i>S. aureus</i>	118,45 (±54,46)	192,04 (±70,23)	281,83 (±57,62)	290,25 (±59,38)
<i>MRSA</i>	113,08 (±26,52)	166,52 (±81,20)	247,59 (±85,58)	260,79 (±77,52)
<i>E. coli</i>	63,98 (±24,40)	187,51 (±81,20)	219,15 (±58,74)	243,63 (±69,45)
<i>E. coli NDM-1</i>	74,21 (±47,30)	118,91 (±62,95)	182,49 (±74,96)	216,75 (±70,48)
<i>C. albicans</i>	42,18 (±0)	86,17 (±44,05)	144,05 (±19,61)	165,18 (±29,52)

Beide Flächeninhalte verhielten sich wie die Durchmesser: Sie stiegen mit der Bestrahlungszeit konstant an. Auch hier war ein Trend zu erkennen, nachdem die Zunahme der Fläche des Hemmhofs mit zunehmender Bestrahlungsdauer stagnierte (Abb. 15 - Abb. 18).



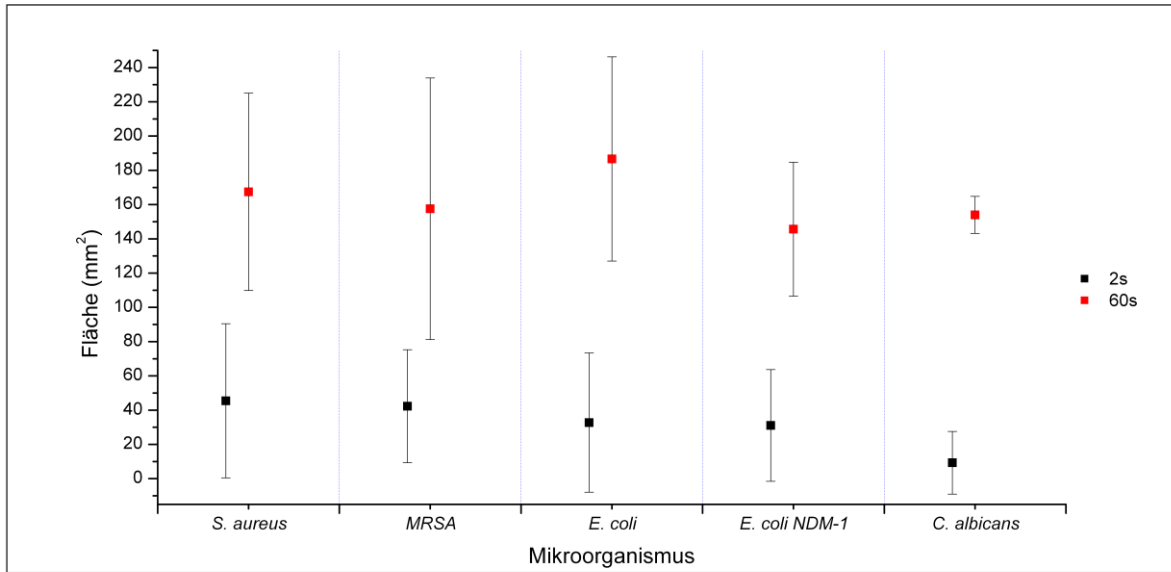


Abb. 15: KAP: Flächeninhalt des Hemmhofs [mm<sup>2</sup>] ± SD

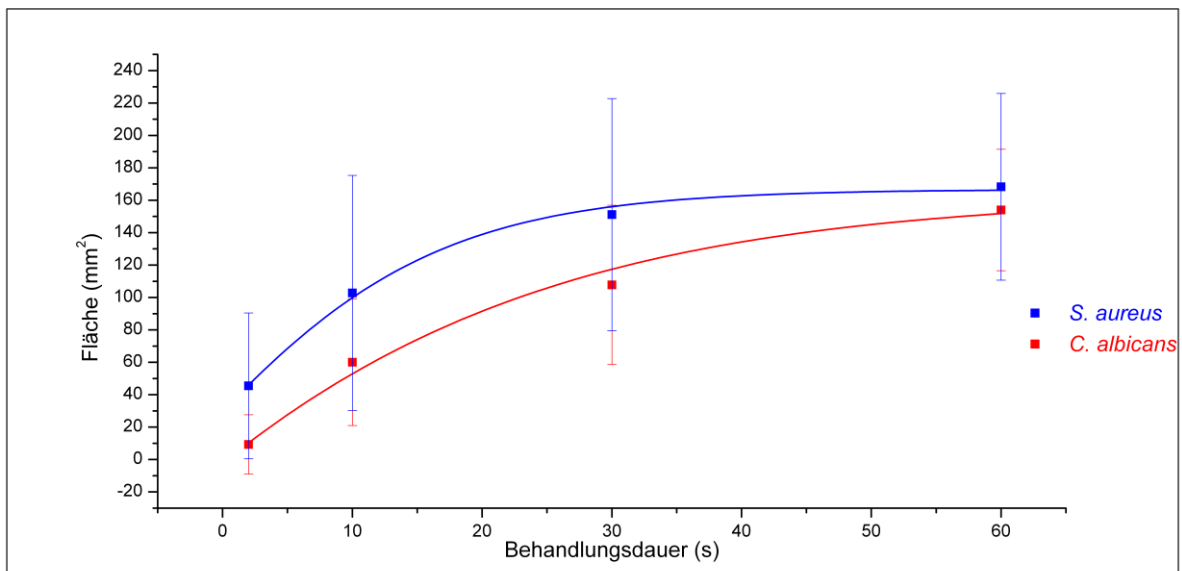


Abb. 16: KAP: Flächeninhalt des minimalen Hemmhofs [mm<sup>2</sup>] ± SD und Ausgleichskurve

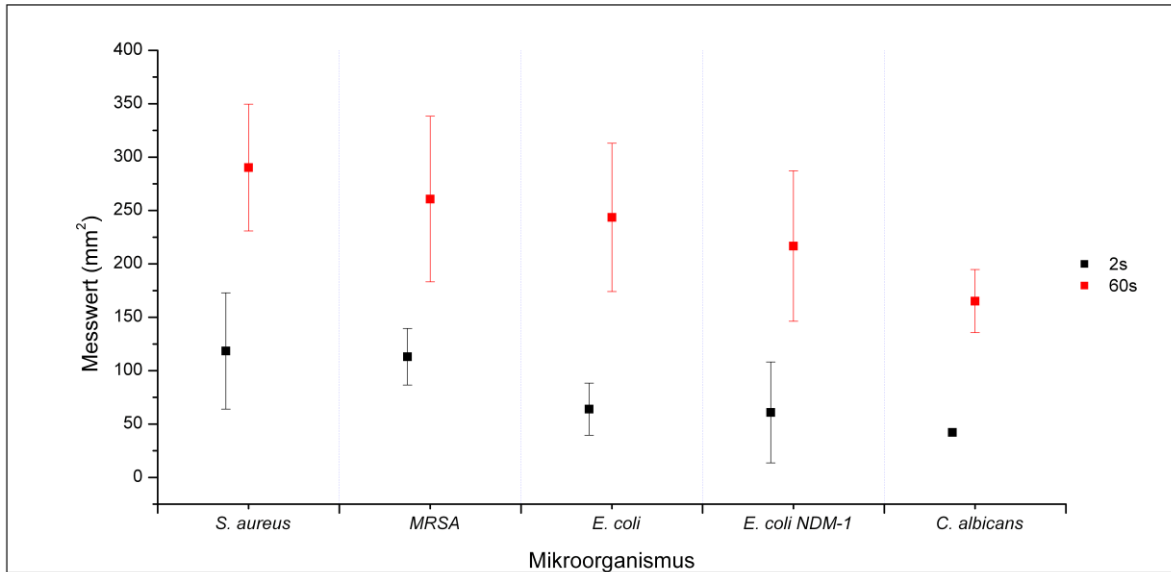


Abb. 17: KAP: Flächeninhalt des maximalen Hemmhofs [mm<sup>2</sup>] ± SD

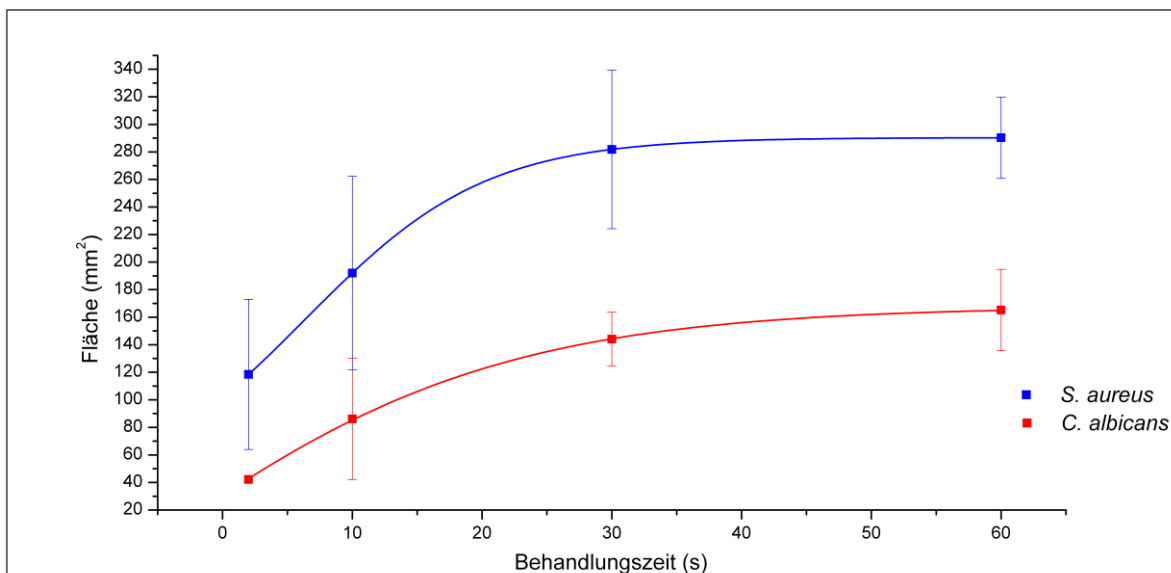


Abb. 18: Flächeninhalt des maximalen Hemmhofs [mm<sup>2</sup>] ± SD und Ausgleichskurve

### 7.1.3 Statistik zur Auswertung der Agardiffusionstests

Für die statistische Analyse des Agardiffusionstests mit KAP wurde in SPSS ein Generalized Estimating Equation Modell (GEE-Modell) erstellt. Jeder Messung wurde eine Zahl als Subjektvariable zugeordnet. Die Bestrahlungsdauer diente als Innersubjektvariable. Die Arbeitskorrelationsmatrix wurde auf den Typ „Austauschbar“ gestellt, um ein möglichst robustes Modell zu erstellen. Die Abhängige Variable war der Messwert (mm). Als Faktoren flossen der verwendete Mikroorganismus und die Bestrahlungsdauer in das Modell ein. Das Modell selbst bestand jeweils aus den beiden einzelnen Faktoren und zusätzlich aus der Interaktion dieser beiden Faktoren. Für alle drei Modelleffekte (Verwendeter Keim, Bestrahlungsdauer, Verwendeter Keim \* Bestrahlungsdauer) wurden die geschätzten Randmittel ausgegeben (s. Tab. 24-Tab. 35 S. 81-89). Um der Alphafehler-Kumulierung vorzubeugen, wurden die p-Werte nach Bonferroni korrigiert.

Um das Modell übersichtlich zu gestalten, wurde nur die geringste Bestrahlungszeit (2s) und die längste Bestrahlungszeit (60s) betrachtet. Ein Informationsverlust durch diese Vereinfachung wurde durch einen Vergleich der deskriptiven Analyse der Messwerte mit den Ergebnissen des Modells ausgeschlossen. Hier zeigte sich eine hinreichende Übereinstimmung der Modellergebnisse mit den ermittelten Messwerten. Das Modell wurde jeweils für die Messpunkte 1 bis 3 (Minimaler Durchmesser, Maximaler Durchmesser, Flächeninhalt des Hemmhofs mit bakterizider Hemmung) erstellt. Der vierte Messpunkt, der die Fläche einschließlich der nur wachstumsgehemmten Bereiche angibt, wurde aufgrund größerer Abweichungen und hoher Standardfehler ausschließlich deskriptiv analysiert.

Ausgewertet wurden paarweise Vergleiche, die angaben, wie sich die einzelnen Mikroorganismen in dem Modell zueinander verhalten. Das bedeutet, dass zum Beispiel beim Vergleichen der getesteten Interaktionen jeder einzelne Keim zu beiden Bestrahlungszeiten mit jeweils den anderen 4 Keimen verglichen wurde. Ergänzende Tabellen sind im Anhang abgebildet (s. S. 81-89).

Jede Messung wurde mindestens sechsmal wiederholt.

### 7.1.3.1 Auswertung des Einflusses der Bestrahlungsdauer auf die Messwerte

Der Modelleffekt Verwendeter Keim \* Bestrahlungsdauer ergab für alle Mikroorganismen bei allen Messpunkten einen signifikanten Unterschied des Messwerts zwischen den Bestrahlungszeiten 2 Sekunden und 60 Sekunden (Tab. 6).

Tab. 6: p-Werte des GEE-Modells der Bestrahlungsdauer (2s und 60s)

Messpunkt	<i>S. aureus</i>	<i>MRSA</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli NDM-1</i>	<i>C. albicans</i>
Minimaler Durchmesser	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001
Maximaler Durchmesser	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001
Hemmhofgröße	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001

### 7.1.3.2 Auswertung Minimaler Durchmesser

Für die Betrachtung der Rolle des verwendeten Keims zu identischen Bestrahlungszeiten in der Interaktion „Verwendeter Keim \* Bestrahlungsdauer“, zeigte sich, dass die Hefe *C. albicans* nach 2 Sekunden Bestrahlungsdauer signifikant schlechter gehemmt wurde, als die beiden Staphylokokken *S. aureus* ( $p=0,0015$ ) und *MRSA* ( $p=0,0015$ ), wogegen das Modell bei *E. coli* ( $p=0,1372$ ) und *E. coli NDM-1* ( $p=0,4980$ ) gegen *C. albicans* keinen signifikanten Unterschied feststellen konnte. Eine explorativ durchgeführte Vergleichsanalyse ohne Korrektur nach Bonferroni ergab für die beiden *E. coli*-Spezies signifikante p-Werte ( $p<0,05$ ). Nach 60 Sekunden Bestrahlungszeit unterschieden sich die Mikroorganismen nicht mehr signifikant voneinander (Tab. 7 - Tab. 9).

Den Tab. 24 bis Tab. 27 im Anhang können weitere Ergebnisse des GEE-Modells sowie die geschätzten Randmittel entnommen werden.

Tab. 7: Konfidenzintervalle des Messpunkts „Minimaler Durchmesser“

Mikroorganismus	Bestrahlungsdauer	Mittelwert (± Std.-Fehler)	95% Wald-Konfidenzintervall	
			Unterer Wert	Oberer Wert
<i>S. aureus</i>	2s	5,11 (±0,74)	3,66	6,56
	60s	12,64 (±0,61)	11,44	13,84
MRSA	2s	5,4 (±0,83)	3,78	7,02
	60s	11,34 (±1,08)	9,23	13,45
<i>E. coli</i>	2s	4,14 (±0,78)	2,61	5,68
	60s	12,61 (±0,57)	11,50	13,73
<i>E. coli</i> NDM-1	2s	3,59 (±0,71)	2,20	4,99
	60s	12,03 (±0,53)	11,00	13,06
<i>C. albicans</i>	2s	1,37 (±0,51)	0,37	2,37
	60s	12,14 (±0,74)	10,70	13,58

Tab. 8: p-Werte der GEE-Analyse des Minimalen Durchmessers (2s Bestrahlungszeit)

2s	Mikroorganismus	<i>S. aureus</i>	MRSA	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i> NDM-1	<i>C. albicans</i>
	<i>S. aureus</i>		1,0000	1,0000	1,0000	0,0015
	MRSA			1,0000	1,0000	0,0015
	<i>E. coli</i>				1,0000	0,1372
	<i>E. coli</i> NDM-1					0,4980
	<i>C. albicans</i>					

Tab. 9: p-Werte der GEE-Analyse des Minimalen Durchmessers (60s Bestrahlungszeit)

60s	Mikroorganismus	<i>S. aureus</i>	MRSA	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i> NDM-1	<i>C. albicans</i>
	<i>S. aureus</i>		1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
	MRSA			1,0000	1,0000	1,0000
	<i>E. coli</i>				1,0000	1,0000
	<i>E. coli</i> NDM-1					1
	<i>C. albicans</i>					

### 7.1.3.3 Auswertung Maximaler Durchmesser

Für die Betrachtung der Rolle des verwendeten Keims zu identischen Bestrahlungszeiten in der Interaktion „Verwendeter Keim \* Bestrahlungsdauer“, zeigte sich, dass die Hefe *C. albicans* nach 2 Sekunden Bestrahlungsdauer signifikant schlechter gehemmt wurde, als die beiden Staphylokokken *S. aureus* ( $p=0,0001$ ) und *MRSA* ( $p=0,0003$ ), wogegen das Modell bei *E. coli* ( $p=0,2008$ ) und *E. coli NDM-1* ( $p=0,5084$ ) gegen *C. albicans* keinen signifikanten Unterschied feststellen konnte. Eine explorativ durchgeführte Analyse ohne Korrektur nach Bonferroni ergab für die beiden *E. coli* -Spezies signifikante p-Werte ( $p<0,05$ ). Nach 60s Bestrahlungszeit unterschied sich nur *S. aureus* signifikant von *C. albicans* ( $p=0,0308$ ) (Tab. 12).

Den Tab. 28 bis Tab. 31 im Anhang können weitere Ergebnisse des GEE-Modells sowie die geschätzten Randmittel entnommen werden.

Tab. 10: Konfidenzintervalle des Messpunkts „Maximaler Durchmesser“

Verwendeter Mikroorganismus	Bestrahlungsdauer	Mittelwert ( $\pm$ Std.-Fehler)	95% Wald-Konfidenzintervall	
			Unterer Wert	Oberer Wert
<i>S. aureus</i>	2s	9,36 ( $\pm$ 0,82)	7,75	10,98
	60s	20,11 ( $\pm$ 0,79)	18,57	21,65
MRSA	2s	8,66 ( $\pm$ 0,85)	6,99	10,33
	60s	16,21 ( $\pm$ 1,06)	14,13	18,29
<i>E. coli</i>	2s	6,72 ( $\pm$ 1,05)	4,67	8,78
	60s	19,47 ( $\pm$ 1,15)	17,21	21,73
<i>E. coli</i> NDM-1	2s	6,08 ( $\pm$ 0,95)	4,23	7,94
	60s	18,01 ( $\pm$ 0,84)	16,37	19,65
<i>C. albicans</i>	2s	2,43 ( $\pm$ 1,09)	0,30	4,56
	60s	16,90 ( $\pm$ 0,52)	15,89	17,92

Tab. 11: p-Werte der GEE-Analyse des Maximalen Durchmessers (2s Bestrahlungszeit)

2s	Mikroorganismus	<i>S. aureus</i>	MRSA	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i> NDM-1	<i>C. albicans</i>
	<i>S. aureus</i>		1,0000	1,0000	0,4047	0,0001
	MRSA			1,0000	1,0000	0,0003
	<i>E. coli</i>				1,0000	0,2008
	<i>E. coli</i> NDM-1					0,5084
	<i>C. albicans</i>					

Tab. 12: p-Werte der GEE-Analyse des Maximalen Durchmessers (60s Bestrahlungszeit)

60s	Mikroorganismus	<i>S. aureus</i>	MRSA	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i> NDM-1	<i>C. albicans</i>
	<i>S. aureus</i>		0,1414	1,0000	1,0000	0,0308
	MRSA			1,0000	1,0000	1,0000
	<i>E. coli</i>				1,0000	1,0000
	<i>E. coli</i> NDM-1					1
	<i>C. albicans</i>					

#### 7.1.3.4 Auswertung Flächeninhalt des Hemmhofs

Für die Betrachtung der Rolle des verwendeten Mikroorganismus zu identischen Bestrahlungszeiten in der Interaktion „Verwendeter Keim \* Bestrahlungsdauer“, zeigte sich, dass die Hefe *C. albicans* nach 2 Sekunden Bestrahlungsdauer signifikant schlechter gehemmt wurde, als die beiden Staphylokokken *S. aureus* ( $p=0,0352$ ) und *MRSA* ( $p=0,0333$ ), wogegen das Modell bei *E. coli* ( $p=1,000$ ) und *E. coli NDM-1* ( $p=1,000$ ) gegenüber *C. albicans* keinen signifikanten Unterschied feststellen konnte. Eine explorativ durchgeführte Analyse ohne Korrektur nach Bonferroni ergab für die beiden Escherichia-Spezies signifikante  $p$ -Werte ( $p<0,05$ ). Nach 60 Sekunden Bestrahlungszeit unterschieden sich die Mikroorganismen nicht mehr signifikant voneinander (Tab. 13 - Tab. 15).

Den Tab. 33 bis Tab. 35 im Anhang können weitere Ergebnisse des GEE-Modells sowie die geschätzten Randmittel entnommen werden.



Tab. 13: Konfidenzintervalle des Messpunkts „Flächeninhalt des Hemmhofs“

Verwendeter Mikroorganismus	Bestrahlungsdauer	Mittelwert Std.-Fehler	95% Wald-Konfidenzintervall	
			Unterer Wert	Oberer Wert
<i>S. aureus</i>	2s	45,44 (± 9,38)	27,06	63,83
	60s	167,46 (± 12,47)	143,03	191,90
MRSA	2s	42,32 (± 8,24)	26,16	58,48
	60s	157,53 (± 19,09)	120,11	194,94
<i>E. coli</i>	2s	32,76 (± 9,58)	13,98	51,53
	60s	186,68 (± 14,05)	159,14	214,21
<i>E. coli NDM-1</i>	2s	26,18 (± 7,34)	11,78	40,57
	60s	145,65 (± 8,96)	128,08	163,22
<i>C. albicans</i>	2s	9,28 (± 5,28)	-1,06	19,63
	60s	153,98 (± 10,82)	132,77	175,19

Tab. 14: p-Werte der GEE-Analyse der Fläche des Hemmhofs (2s Bestrahlungszeit)

2s	Mikroorganismus	<i>S. aureus</i>	MRSA	<i>E. coli</i>	<i>E. coli NDM-1</i>	<i>C. albicans</i>
	<i>S. aureus</i>		1,0000	1,0000	1,0000	0,0352
	MRSA			1,0000	1,0000	0,0333
	<i>E. coli</i>				1,0000	1,0000
	<i>E. coli NDM-1</i>					1,0000
	<i>C. albicans</i>					

Tab. 15: p-Werte der GEE-Analyse der Fläche des Hemmhofs (60s Bestrahlungszeit)

60s	Mikroorganismus	<i>S. aureus</i>	MRSA	<i>E. coli</i>	<i>E. coli NDM-1</i>	<i>C. albicans</i>
	<i>S. aureus</i>		1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
	MRSA			1,0000	1,0000	1,0000
	<i>E. coli</i>				0,6229	1,0000
	<i>E. coli NDM-1</i>					1
	<i>C. albicans</i>					

## 7.2. IC<sub>50</sub> Bestimmung über MLN

### 7.2.1 UVB

Die Wirkung der Bestrahlung mit UVB zeigte keine Unterschiede in der Bestrahlung der Mikroorganismen in Flüssigkeit oder bei der Bestrahlung des Sediments. UVB-Strahlung wirkte bakterizid auf die Bakterien *S. aureus*, *MRSA* und *E. coli* und entfaltete bei *C. albicans* eine mikrobiostatische Wirkung. Bei dem Bakterienstamm *E. coli* NDM-1 konnte keine ausreichend zuverlässig reproduzierbare wachstumshemmende Wirkung durch die Bestrahlung mit UVB festgestellt werden. Bei der Hefe *C. albicans* zeigte sich eine deutliche Wachstumsverzögerung nach 5 und nach 10 Minuten Bestrahlungszeit, die dann aber nach 48h Wachstum eine ähnlich hohe Trübung in den Wells der 96-Well Platte aufwies, wie die unbehandelten Kontrollen. Die IC<sub>50</sub>-Werte nach UVB-Bestrahlung lagen zwischen 5,58 Minuten (*C. albicans*) und 6,88 Minuten (*MRSA*), entsprechend einer Dosis zwischen 84 mJ/cm<sup>2</sup> und 103 mJ/cm<sup>2</sup>.

Anhand der Tab. 16 und der Tab. 17 können beispielhafte Messungen nachvollzogen werden: Als MLN-Daten wurden die Rohdaten des Nephelometers in [RNU] (relative nephelometric units) gegen die Zeit (24h Inkubationszeit bei Bakterien, 48h Inkubationszeit bei *C. albicans*) aufgetragen. Aus ihnen ergab sich die Dosis-Wirkungskurve. Die prozentuale Hemmung wurde gegen die Bestrahlungszeit aufgetragen. Der Wendepunkt dieser Kurve ergab den zugehörigen IC<sub>50</sub>-Wert.

### 7.2.2 Kaltes Atmosphärendruckplasma

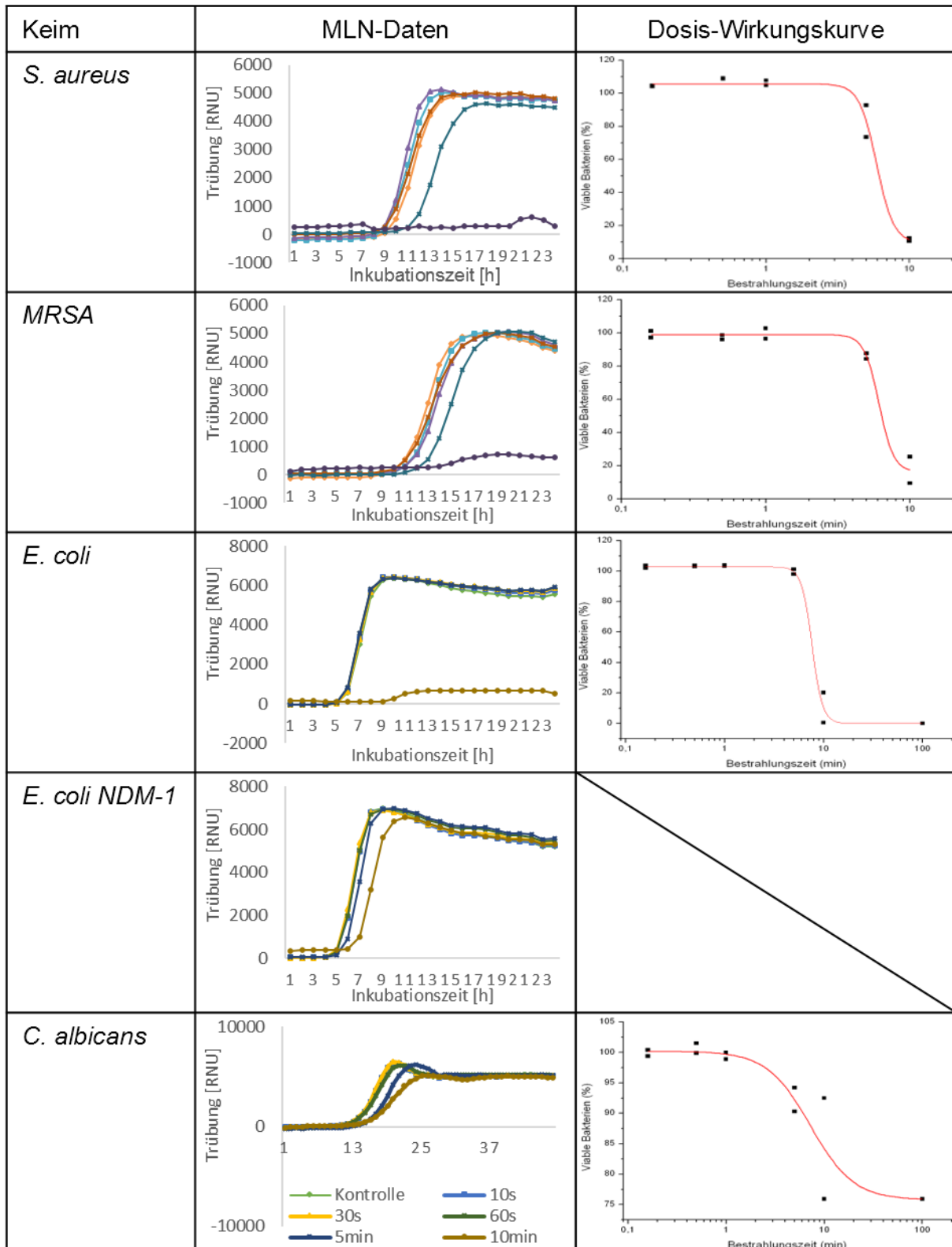
Bei den Untersuchungen zeigte KAP keine Wirkung auf die Mikroorganismen Flüssigkeit (s. Tab. 18): Wurden die Mikroorganismen in 1000 µL Puffer bestrahlt, kam es zu keiner messbaren Hemmung des Bakterienwachstums. Nach 60s Bestrahlung kam es zu einem gleichstarken 24h Wachstum, wie in den unbehandelten Vergleichsgruppen. Eine Bestimmung des IC<sub>50</sub>-Wertes war nicht möglich. Eine Bestrahlung der Hefe *C. albicans* wurde aufgrund dieser Erkenntnisse nicht mehr durchgeführt. Nur die Bestrahlung des Sediments mit KAP erzielte bei allen Mikroorganismen eine mikrobiozide Wirkung.

Die Messungen sind beispielhaft in den Tabellen Tab. 18 und Tab. 19 dargestellt.

Tab. 16: Wachstumskurvenauswertung nach Bestrahlung mit UVB in 1000µL Flüssigkeit

Keim	MLN-Daten	Dosis-Wirkungskurve
<i>S. aureus</i>		
MRSA		
<i>E. coli</i>		
<i>E. coli NDM-1</i>		
<i>C. albicans</i>		

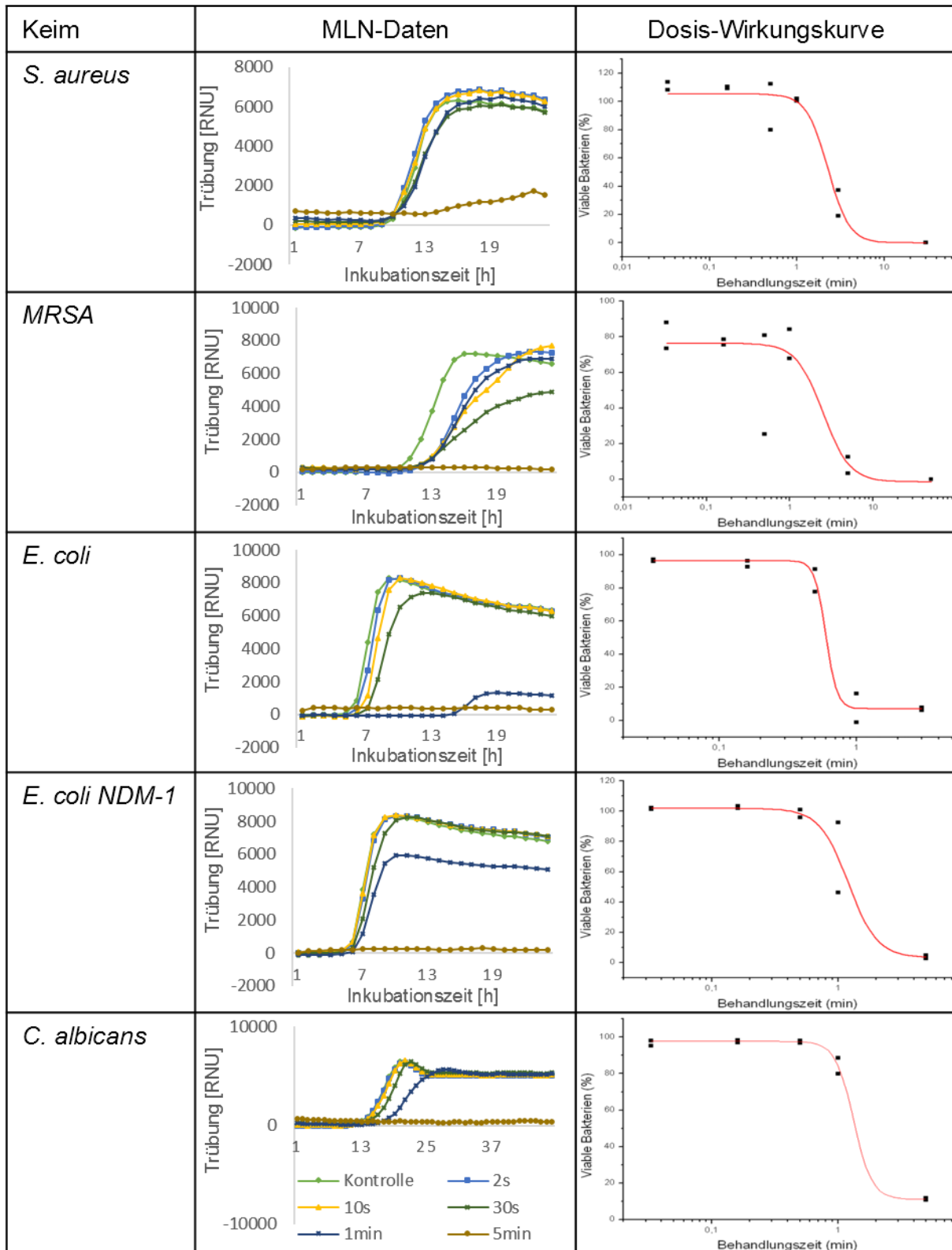
Tab. 17: Wachstumskurvenauswertung nach Bestrahlung des Sediments mit UVB



Tab. 18: Wachstumskurvenauswertung nach Bestrahlung mit KAP in 1000µL Flüssigkeit

Keim	MLN-Daten
<i>S. aureus</i>	<p>Trübung [RNU]</p> <p>Inkubationszeit [h]</p>
MRSA	<p>Trübung [RNU]</p> <p>Inkubationszeit [h]</p>
<i>E. coli</i>	<p>Trübung [RNU]</p> <p>Inkubationszeit [h]</p>
<i>E. coli NDM-1</i>	<p>Trübung [RNU]</p> <p>Inkubationszeit [h]</p> <p>— Kontrolle — 2s — 10s — 30s — 60s</p>

Tab. 19: Wachstumskurven nach Bestrahlung des Sediments mit KAP



Die aus den Messungen gemittelten IC<sub>50</sub> Werte können Tab. 20 entnommen werden. Die Werte nach Bestrahlung mit KAP lagen zwischen 1,24 Minuten (*S. aureus*) und 2,21 Minuten (*MRSA*). Eine Visualisierung der Tabelle kann Abb. 19 entnommen werden.

Wie in Material und Methoden beschrieben, wurde der IC<sub>50</sub>-Wert teilweise mittels mathematischer Interpolation errechnet, falls es die Messreihe nicht anders zuließ.

Tab. 20: Tabelle IC<sub>50</sub>-Werte [min]; Mittelwert ± SD und Dosisangabe der UVB-Messwerte

	UVB	UVB Dosisäquivalent	KAP
<i>S. aureus</i>	6,28 (±0,54)	~ 94 mJ/cm <sup>2</sup>	1,24 (±0,58)
<i>MRSA</i>	6,88 (±0,92)	~ 103 mJ/cm <sup>2</sup>	2,21 (±0,90)
<i>E. coli</i>	5,84 (±1,05)	~ 88 mJ/cm <sup>2</sup>	1,42 (±0,81)
<i>E. coli NDM-1</i>			2,14 (±1,45)
<i>C. albicans</i>	5,58 (±1,30)	~ 84 mJ/cm <sup>2</sup>	1,54 (±0,71)

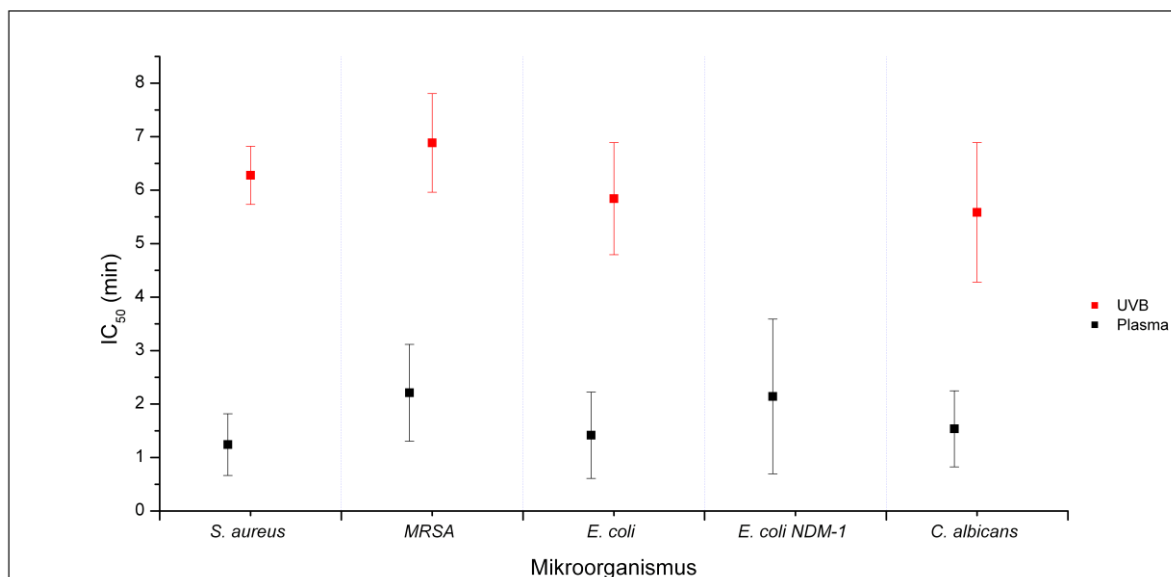


Abb. 19: IC<sub>50</sub> Werte [min]; Mittelwert ± SD

### 7.2.3 Analyse der Messwerteverteilung

Abb. 20 und Abb. 21 zeigen eine Analyse der Werteverteilung der Einzelmessungen mittels eines Boxplots. Eine Legende ist jeweils in der Grafik angegeben. *E. coli NDM-1* wurde nicht gehemmt (n.b. – nicht bestimmbar).

Die Betrachtung des Boxplots der UVB-Messungen (Abb. 20) ließ keinen Hinweis auf unterschiedliche Sensibilitäten der untersuchten Keime hinsichtlich der UVB-Bestrahlung zu und bestätigte somit die Analyse der Mittelwerte.

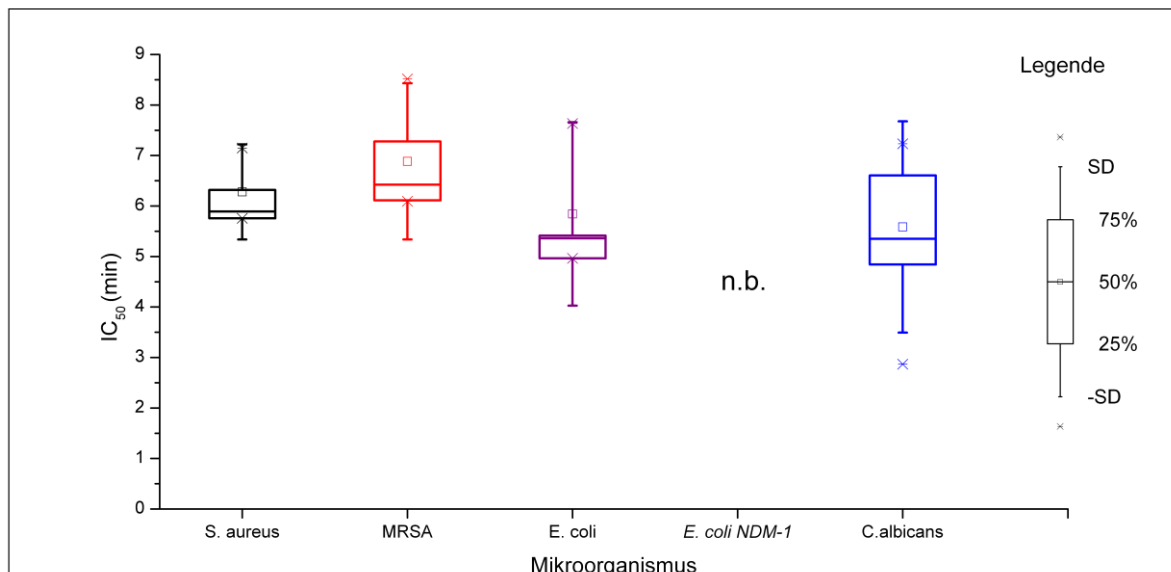


Abb. 20: Boxplot der IC<sub>50</sub> Werte nach Bestrahlung mit UVB

Im Vergleich bestätigte sich die Analyse der Mittelwerte für die Bestrahlung mit KAP (Abb. 21). Die Mikroorganismen unterschieden sich nicht wesentlich voneinander. Bei *E. coli NDM-1* gab es einen Ausreißer nach oben: Hier wurde einmalig ein IC<sub>50</sub> von 4,9min ermittelt. Die übrigen Messwerte schwanken zwischen 0,7min und 2,9min.

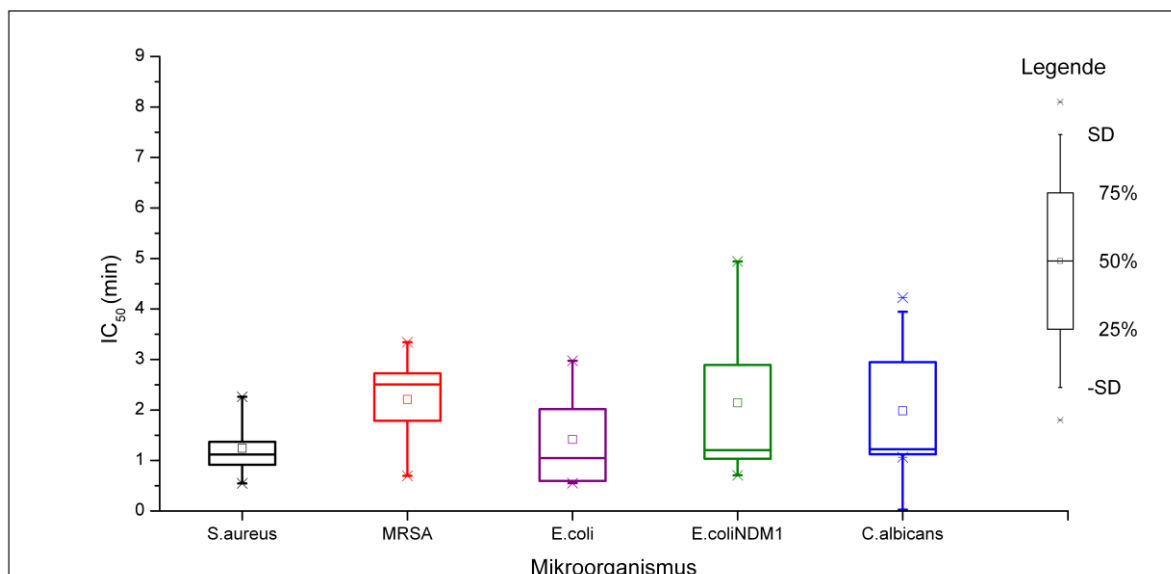


Abb. 21: Boxplot der IC<sub>50</sub> Werte nach Bestrahlung mit KAP



#### 7.2.4 Statistische Auswertung der MLN-Ergebnisse

Für die Bestimmung, ob die IC<sub>50</sub> Werte der Mikroorganismen bei der Bestrahlung mit KAP und UVB innerhalb derselben Stichprobenvarianz lagen ( $p < 0,05$  für ein signifikantes Ergebnis), wurde der Mann-Whitney-U-Test angewendet und die Ergebnisse in Tab. 21 und Tab. 22 eingetragen. In Tab. 21 sind die Werte für die UVB-Bestrahlung, in Tab. 22 die Werte für die KAP-Bestrahlung zusammengefasst. Jeder Versuch wurde mindestens viermal wiederholt.

Nach UVB-Bestrahlung unterschieden sich nur die IC<sub>50</sub>-Werte des Keims *E. coli* von den IC<sub>50</sub> Ergebnissen des Keims *MRSA*. Alle anderen Werte waren unauffällig. Bis auf die Ausnahme von *E. coli* reagierten alle Mikroorganismen gleich sensibel auf die Bestrahlung mit UVB. *E. coli NDM-1* wurde nicht gehemmt.

Auf die Plasma-Bestrahlung reagierten ebenfalls alle Mikroorganismen gleich sensibel. Es sind keine signifikanten p-Werte ermittelt worden. Alle untersuchten Mikroorganismen zeigten dieselbe Sensibilität auf die Bestrahlung mit der DBD-Plasma-Quelle.

Tab. 21: p-Werte des Mann-Whitney-U-Tests der IC<sub>50</sub>-Werten

Verwendeter Mikroorganismus	UVB Bestrahlung	<i>S. aureus</i>	MRSA	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i> NDM-1	<i>C. albicans</i>
	<i>S. aureus</i>		0,2000	0,0500		0,1905
	MRSA			0,0286		0,0571
	<i>E. coli</i>					0,4524
	<i>E. coli</i> NDM-1					
	<i>C. albicans</i>					

Tab. 22: p-Werte des Mann-Whitney-U-Tests der IC<sub>50</sub>-Werten

Verwendeter Mikroorganismus	Plasma Bestrahlung	<i>S. aureus</i>	MRSA	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i> NDM-1	<i>C. albicans</i>
	<i>S. aureus</i>		0,0754	0,4381	0,2143	0,1645
	MRSA			0,1010	0,4654	0,3961
	<i>E. coli</i>				0,2226	0,1474
	<i>E. coli</i> NDM-1					0,4091
	<i>C. albicans</i>					

Für den statistischen Vergleich der UVB- gegen KAP-Bestrahlung wurde erneut der Mann-Whitney-U-Test mit denselben Annahme- und Ablehnungsgrenzwerten für die Signifikanz p durchgeführt. Die p-Werte sind in Tab. 23 zusammengefasst. Zusätzlich wurde Cohen`s d für non-parametrische Tests berechnet. Hierfür wurden folgende Grenzen übernommen: Kleiner Effekt d=0,2; Mittlerer Effekt d= 0,5 Großer Effekt d=0,8 (Lenhard und Lenhard 2016), (Rasch 2010).

Bei allen Keimen führte die Bestrahlung der Proben mit Plasma zu einem signifikant niedrigeren IC<sub>50</sub>-Wert und damit zu einer signifikant schnelleren Hemmung, als die Bestrahlung mit UVB. Das zusätzlich angegebene Maß für die Effektstärke, „Cohen`s d“, gab bei allen Keimen einen starken Effekt aus. Die Bestrahlung mit KAP war bei allen Keimen signifikant stärker mikrobiozid wirksam als die Bestrahlung mit UVB-Licht.

Tab. 23: Ergebnis des Mann-Whitney-U-Tests und Cohen`s d der IC<sub>50</sub>-Werte

	p-Wert (einseitig)	Cohen`s d
<i>S. aureus</i>	0,0179	1,49
<i>MRSA</i>	0,0079	1,96
<i>E. coli</i>	0,0083	1,75
<i>E. coli NDM-1</i>		
<i>C. albicans</i>	0,0043	2,08

### 7.3 Eindringtiefe von KAP in biologischen Geweben am Agarmodell

Um erste Voraussagen über die Anwendungsmöglichkeiten der Quelle im klinischen Alltag zu treffen, wurde die Eindringtiefe in einem Agarmodell getestet. Die Ergebnisse lieferten weitere Hinweise über die Leistungsfähigkeit und den Wirkungsradius der Plasmaquelle. Als Indikator wurde Grieß-Reagenz verwendet, dass, in Anwesenheit der in KAP produzierten radikalen Stickstoffspezies, zu einem rot leuchtenden Azo-Farbstoff reagierte (Seite 29: Abb. 9, Abb. 10). In entsprechend eingefärbten Bereichen hatte Grieß-Reagenz bei Anwesenheit reaktiver Stickstoffspezies reagiert (Abb. 22). Die Bestrahlungszeiten können Abb. 22 entnommen werden (K= Kontrolle, unbehandelter Agar).

Die Ergebnisse des Grieß-Reagenzes zeigten eine Eindringtiefe von maximal 2 mm nach 5 Minuten Bestrahlungszeit und bestätigten gleichzeitig die rasche Diffusion von Radikalen über das unmittelbare Wirkungsumfeld des Plasmachips hinaus (Abb. 22). Alle Fotos wurden 20 Minuten bis 30 Minuten nach der Bestrahlung aufgenommen. Zu diesem Zeitpunkt zeigte der Indikator den kräftigsten Farbumschlag.

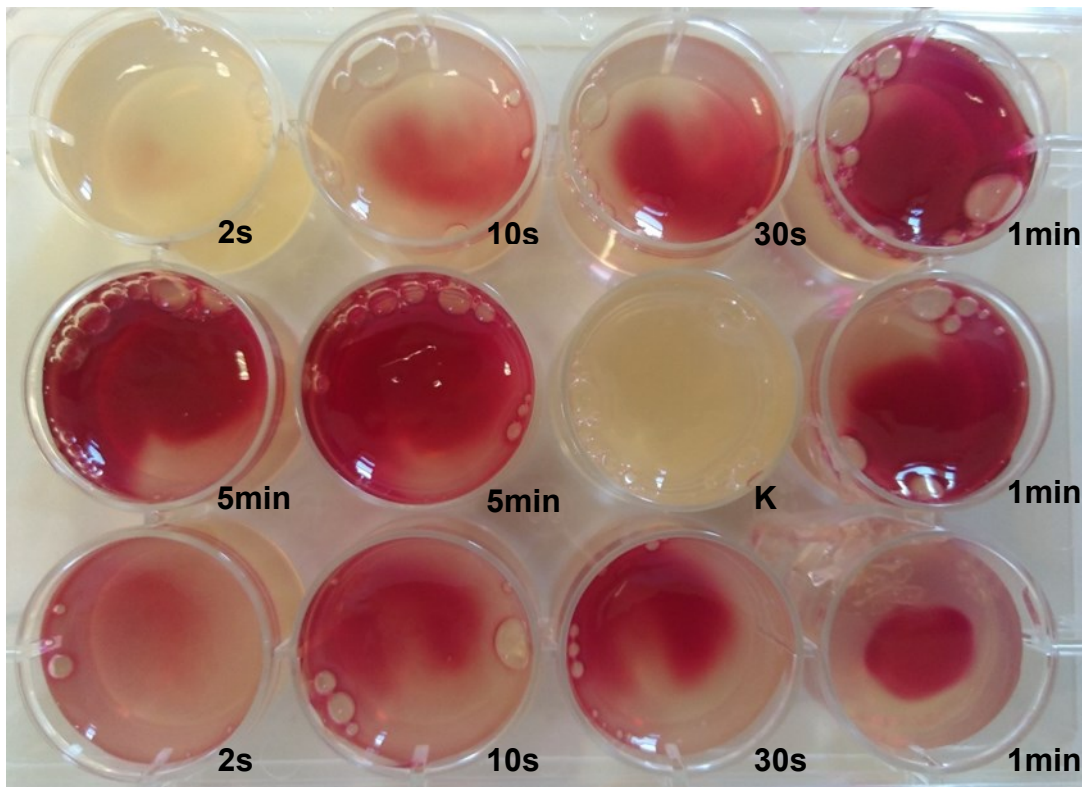


Abb. 22: 12-Well Platte mit MHE Agar welcher mit Grieß-Reagenz versetzt wurde

Der Inhalt der Wells aus Abb. 22 wurde anschließend entnommen und zur Messung der Eindringtiefe aufgeschnitten. Das Ergebnis wurde fotografiert (Abb. 23). Die Eindringtiefe war in keinem Beispiel mit der hier verwendeten Grieß-Reagenz-Konzentration tiefer als 3 mm. Zur Überprüfung einer eventuellen ungleichmäßigen Verteilung des Grieß-Reagenzes im Agar wurden einzelne MHE-Agar Zylinder auch von anderen Seiten bestrahlt. Es wurde kein Anhaltspunkt auf eine ungleichmäßige Verteilung der Reagenzien aufgrund von z.B. Dichteunterschieden gefunden.

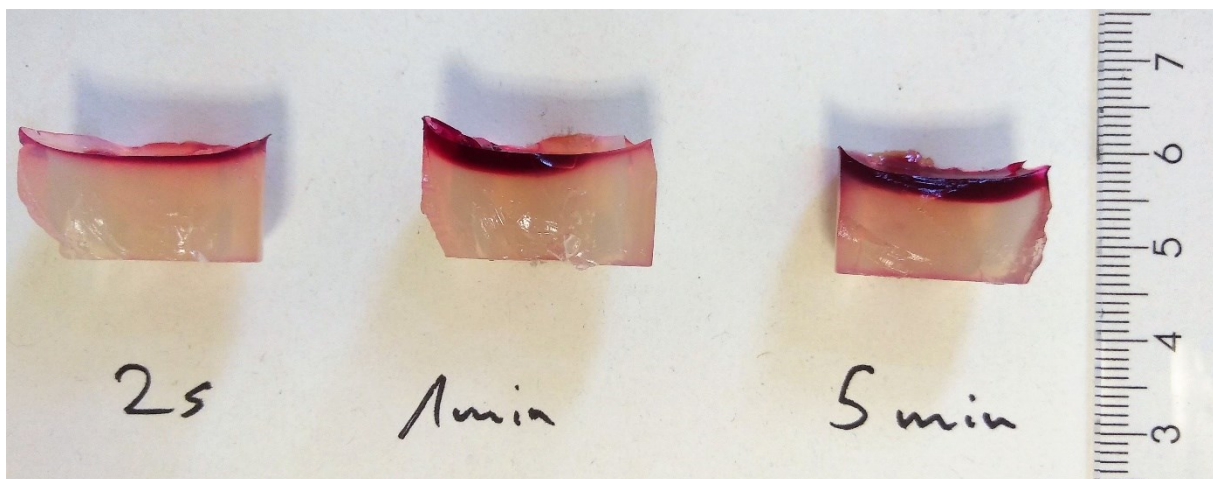


Abb. 23: Querschnitt des MHE-Agar mit Grieß-Reagenz KAP-Bestrahlung

## 8. Diskussion

KAP steht an der Schwelle eines breiten klinischen Einsatzes. Die intensiviertere Forschung hat zahlreiche vielversprechende Einsatzgebiete der neuen Technologie aufgezeigt, die nun nach und nach von Medizinprodukten besetzt werden.

Nachfolgend wird die antimikrobielle Wirkung der Plasmaquelle der TU Ilmenau charakterisiert und diskutiert, in wie weit das Gerät mit den bereits auf dem Markt befindlichen Produkten vergleichbar ist.

### 8.1 UVB

UVB-Strahlung wurde als Vergleichsagenz eingesetzt, da die Strahlung bei der Erzeugung von KAP entsteht und ihre Rolle bei der mikrobioziden Wirkung von KAP weiterhin umstritten ist (Shimizu et al. 2010, Jablonowski et al. 2015). In der Dermatologie wird UVB-Strahlung zum Beispiel bei der Therapie des Atopischen Ekzems eingesetzt (Ring et al. 2012).

Die in dieser Studie verwendeten Dosen lagen zwischen  $2,5 \text{ mJ/cm}^2$  und  $150 \text{ mJ/cm}^2$ . Zum Vergleich: In einer Studie aus Bochum wurden minimale Erythemdosen in einem kleinen Patientenkollektiv untersucht. Es wurde eine mittlere MED von  $70,4 \text{ mJ/cm}^2$  gefunden (Moussa 2008). Die gesetzlich vorgeschriebene Standarddosis zur Trinkwasserdesinfektion liegt bei  $40 \text{ mJ/cm}^2$  (Liste der Aufbereitungsmittel und Desinfektionsverfahren gemäß §11 TrinkwV 2001, Stand Dezember 2017, [www.umweltbundesamt.de](http://www.umweltbundesamt.de)).

In dieser Studie hemmte die UVB-Strahlung die Mikroorganismen *S. aureus*, *MRSA*, *E. coli* und *C. albicans*. Nicht gehemmt werden konnte *E. coli NDM-1*. In einer Arbeit von 2011 wurde das *mucAB*-Gen auf einem *NDM-1*-Plasmid identifiziert, welches eine Resistenz gegen UV-Strahlung verursachte (Ho et al. 2011). Allerdings wurde keine Dosis-Angabe in der zitierten Arbeit angeführt. Die UVB-Quelle der Arbeit von Ho und Kollegen hatte eine Leistung von  $3,3 \text{ mW/cm}^2$ . Ein Vergleich der Wirkung erfolgt deshalb unter Vorbehalt. Eine Analyse der Gene wurde im Rahmen dieser Studie nicht durchgeführt. Trotzdem ist das Vorliegen eines UVB-Resistenzen kodierenden Gens eine mögliche Hypothese, die das Verhalten des getesteten *E. coli NDM-1* erklären könnte.

Weitere Erklärungshypothesen für die verringerte Wirkung des UVB-Lichts im Agardiffusionstest kann die Morphologie der Bakterienkolonien auf der Agarplatte sein. Die großen Kolonien führten zu einer sehr dichten und dicken Überwachsung der Agarplatte mit *E. coli* NDM-1, die die Bestrahlungsintensität, der die Bakterien ausgesetzt waren, verringerte.

In einer weiteren Arbeit wurden 5 verschiedene *E. coli* Spezies mit UVB behandelt (Mofidi et al. 2002). Diese verschiedenen Spezies zeigten ebenfalls signifikant unterschiedliche Resistenzen auf die Bestrahlung mit UVB.

## 8.2 Kaltes Atmosphärendruckplasma

In der Studie konnte die gute bis sehr gute antimikrobielle Wirkung der Plasma-Quelle bewiesen werden. Im Vergleich zu bereits in der Praxis am Patienten getesteten und zugelassenen Systemen, z.B. dem Plasma-Jet kINPen MED (Daeschlein et al. 2014, Weltmann und von Woedtke 2017), erreicht die untersuchte Quelle der TU Ilmenau durch ihre Bauweise große Wirkungsradien, die bei Jet-Systemen mit aufwendigen Verfahren erkauft werden muss, bei denen mehrerer Plasmajets nebeneinander zusammengefügt werden (Shimizu et al. 2008, Weltmann und von Woedtke 2017).

### 8.2.1 Agardiffusionstest

In den Ergebnissen, die durch die Bestrahlung von *Candida albicans* mit KAP im Vergleich zu den getesteten Bakterien erhalten wurden, konnte der Agardiffusionstest zeigen, dass die Bakterien signifikant schlechter auf die Plasmabestrahlung ansprechen. Nach 2s Bestrahlungszeit wurde die Hefe noch nicht zuverlässig gehemmt. Durch Steigerung der Bestrahlungsdauer konnte ein ähnlicher Hemmhof gegen *C. albicans* wie gegen die Bakterien erreicht werden. Diese Ergebnisse decken sich mit Ergebnissen anderer Studien (Wiegand et al. 2014, Klampfl et al. 2012). Die Unterschiede in der Wirksamkeit lassen sich durch die Zellwandmorphologie erklären. Der Zerstörung der Zellwand und Zellmembran wird ein großer Teil der Wirkung des KAP zugesprochen (Moisan et al. 2001). Zwar zeigte der subjektive Vergleich der Hemmhöfe im Labor in den unteren Bestrahlungszeiten 2s und 10s vergleichbar deutliche Unterschiede zwischen den *E. coli* – Spezies und *C. albicans*, wie zwischen den Staphylokokken und der Hefe. Das GEE-Modell errechnete aber nicht-signifikante Unterschiede zwischen den *E. coli* -Spezies und *C. albicans*. Dies war auf die konservative Korrektur nach Bonferroni zurückzuführen, die aus Sicherheitsgründen zur Vermeidung einer Alphafehler-Kumulierung durchgeführt wurde. Der subjektive Verdacht einer unterschiedlichen Sensibilität der Mikroorganismen *E. coli* und *C. albicans* nach 2s und 10s Bestrahlungszeit mit KAP konnte demnach statistisch nicht bewiesen werden.



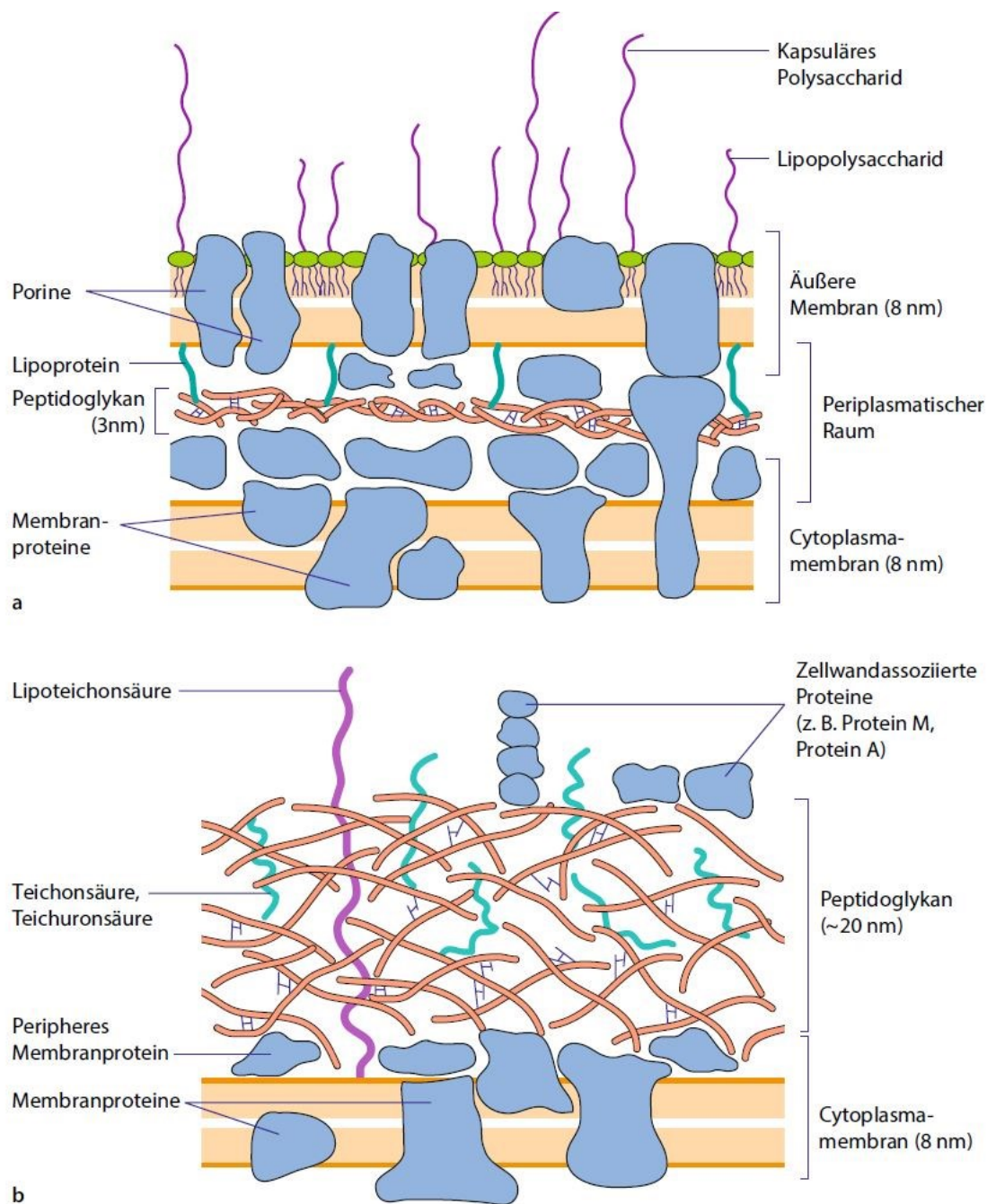


Abb. 24: Vergleich gramnegativer (oben) und grampositiver Bakterienzellwände (Munk 2001)

Grampositive und gramnegative Bakterien unterscheiden sich grundsätzlich im Aufbau ihrer Zellwände (Abb. 24). Grampositive Bakterien haben über ihrer Zellmembran eine dicke Mureinschicht aus N-Acetyl-Glucosamin und N-Acetyl-Muraminsäure. Diese Schicht aus Glykopeptiden ist bei gramnegativen Bakterien deutlich schwächer ausgeprägt, diese haben jedoch eine zusätzliche Schicht aus Lipoproteinen und eine zweite, äußere, Zellmembran (Buselmaier 2012). In der Literatur finden sich Erklärungsansätze, die aufgrund dieser morphologischen Unterschiede gramnegativen Keimen ein höheres Hemmpotential bei Plasmabestrahlung zuordnen

als grampositiven Keimen (Kong et al. 2009, Lu et al. 2014). Die Studie von (Laroussi et al. 2003) fand nach Plasmabestrahlung gramnegative Keime mit deutlich veränderter Zellwandmorphologie bis zum Verlust der Zellwandintegrität gegenüber einem grampositiven Keim ohne Zellwandveränderungen. Zusätzlich werden Pilze abgegrenzt, die mit Ihren Zellwänden aus  $\beta$ -D-Glucan und Chitin eine DNA Schädigung erschweren könnten (Wiegand et al. 2014). Während in der vorliegenden Studie deutliche Unterschiede zwischen der Hefe und den übrigen Bakterien gefunden wurden, geben die Ergebnisse keinen Anhaltspunkt für systematische Unterschiede zwischen den grampositiven Keimen (*S. aureus*, *MRSA*) und den gramnegativen Keimen (*E. coli*, *E. coli NDM-1*). In anderen Arbeiten wurden für *C. albicans* die höchste Resistenz der untersuchten Mikroorganismen nachgewiesen und zusätzlich ein gramnegativer Keim (*E. coli*) mit deutlich schwächerem Ansprechen auf die Plasmabestrahlung als zum Beispiel *S. aureus* (Klampfl et al. 2012, Daeschlein et al. 2010, Daeschlein et al. 2014).

Wie diese Studie bis hier gezeigt hat, ist eine Systematisierung der Mikroorganismen nach ihrer Plasmasensibilität schwierig: Die gefundenen Ergebnisse variieren je nach verwendeter Quelle und experimenteller Anordnung. Die Zusammensetzung des KAP ist ausschlaggebend für die Wirksamkeit und Effektivität und lässt sich durch unterschiedliche Parameter wie verwendete Leistung, Frequenz, Abstand, Modus etc. vielfach variieren (von Woedtke et al. 2013). Dies beeinträchtigt die Vergleichbarkeit verschiedener Studien stark und unterstützt die Hypothese, dass die Inaktivierungsmechanismen durch KAP bis heute nicht in Ihrer Gänze und Komplexität verstanden sind. Die Ergebnisse dieser Studie könnten ein Hinweis darauf sein, dass man den Zellwand-schädigenden Mechanismen wie Ionen, pH-Verschiebungen und reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffspezies nicht vorschnell die zentrale Rolle zusprechen sollte, da kein Unterschied zwischen gramnegativen und grampositiven Mikroorganismen nachgewiesen wurde. Dies steht im Gegensatz zu Arbeiten wie denen von Laroussi und Kollegen (Laroussi et al. 2003). Allerdings scheint auch der Wirkungsanteil der UVB-Strahlung bei dieser Plasmaquelle gering zu sein. Eine über UVB vermittelte mikrobiozide Wirkung hätte zu einer schlechten Wirkung bei *E. coli NDM-1* führen müssen, da sich *E. coli NDM-1* weitgehend resistent gegenüber UVB-Bestrahlung verhielt (s. Tab. 2, S. 31). In den durchgeführten Untersuchungen unterschied sich *E. coli NDM-1* in seiner KAP-Sensibilität jedoch nicht signifikant von den übrigen Mikroorganismen (S. Tab. 8, Tab. 9, S. 41).

## 8.2.2 Mikroplattenlasernephelometrie

Die Mikroorganismen sollten zunächst in PBS-Puffer mit KAP bestrahlt werden. Die Möglichkeit, Flüssigkeiten mit KAP zu bestrahlen und durch diese Bestrahlung zu desinfizieren, ist vielfach in der Literatur beschrieben worden (Shen et al. 2015, Liu et al. 2010, Baik et al. 2013, Oehmigen et al. 2010, Ikawa et al. 2010). Die Autoren fanden einen klaren Zusammenhang zwischen pH-Wert Verschiebungen u.a. durch die Dissoziation von Wasser-Molekülen in Hydroxid-Ionen, sowie weiterer Radikalbildung und Überlebensraten der Bakterien in Flüssigkeit (Oehmigen et al. 2011).

In den bei dieser Arbeit durchgeführten Experimenten konnte keine Hemmung bis zu Bestrahlungszeiten von maximal 5 Minuten Bestrahlungszeit festgestellt werden. In den relativ kurzen Bestrahlungszeiten wurden pH-Wert-Veränderungen weder in PBS noch in destilliertem Wasser festgestellt. Ursächlich ist die geringe Leistung der Quelle (5 Watt), die kurzen Bestrahlungszeiten und der konstruktionsbedingt geringe Kontakt zwischen KAP und Flüssigkeitsoberfläche zu nennen. Zusätzlich wurde kein Arbeitgas (z.B. Argon, Stickstoff) verwendet, dass die Bildung reaktiver Spezies gefördert hätte: In verschiedenen Studien wurde bewiesen, dass das verwendete Arbeitgas wesentlichen Einfluss auf die Zusammensetzung des KAP und die Ionenkonzentrationen in behandelten Flüssigkeiten und auf behandeltes Gewebe (Wiegand et al. 2016, Wiegand et al. 2014, Wiegand et al. 2017) hat (Baik et al. 2013, Trizio et al. 2016, Horn et al. 2017): Bei Umgebungsluft als Grundlage für das Plasma wurden vorrangig  $\text{NO}_2^-$  und  $\text{NO}_3^-$ -Ionen gefunden. Plasma, das in Stickstoff gezündet wurde, führte zur Produktion von  $\text{NH}_4^+$ -Ionen und einer größeren antimikrobiellen Wirkung in der behandelten Flüssigkeit.

Nach dieser Erkenntnis wurde die Bakterienlösung in der 12 Well Platte zentrifugiert und der Überstand abpipettiert. Folgende Erklärungen für eine unvollständige Hemmung der Mikroorganismen sind naheliegend:

1. Die Mikroorganismen wurden während der Zentrifugation an den Rand der Wells gedrückt. Der Abstandshalter, sowie Sicherheitsbedenken hinsichtlich der Schonung des Plasma-Chips, verhinderten eine Positionierung der Quelle direkt am Rand des Wells. Direkter Plasmaeinwirkung war deshalb nur die Mitte des Wells ausgesetzt, wodurch die reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffspezies, Ionen etc. erst zum Rand der Wells diffundieren mussten.

2. Es erfolgte zur anschließenden Bestrahlung eine Re-Suspendierung des behandelten Sediments zuerst in PBS und später in Nährlösung. Dies ermöglichte eine Regeneration nicht vollständig abgetöteter Keime.

Zudem wurde bei der Mikroplattenlasernephelometrie kein Unterschied zwischen der Hefe *C. albicans* und den Bakterien gefunden. Um eine wirkungsvolle Hemmung zu erreichen, mussten die Wells 3 Minuten bis 5 Minuten behandelt werden. Die Daten aus den Agardiffusionstests zeigten, dass bei diesen langen Bestrahlungszeiten bereits kein Unterschied mehr zwischen den Mikroorganismen vorlag.

Die Versuche mit UVB zeigten keinen Wirkungsunterschied mit oder ohne Zentrifugation der Proben. Daraus lässt sich schließen, dass die UVB-Strahlung die in PBS gelösten Bakterien erreichte, die reaktiven Spezies des KAP im selben Versuchsaufbau jedoch nicht. Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, dass die UVB-Strahlung dieser Plasmaquelle nur unwesentlich zur Hemmung der Bakterien beizutragen scheint.

Die Ergebnisse dieser Studie beinhalten erste Anhaltspunkte über die notwendige Bestrahlungsdauer des KAP. Die Ergebnisse der Agardiffusionstests (vgl. Abb. 12, Abb. 14, Abb. 16, Abb. 18) zeigten eine Abflachung der Kurve zwischen 30s und 60s Bestrahlungszeit. Eine weitere wesentliche Vergrößerung der Hemmhöhe über diese Bestrahlungszeiten hinaus war nicht zu erwarten. Die MLN-Messungen ergaben IC<sub>50</sub>-Werte zwischen 1min und 2min mit vollständiger Hemmung meist nach 5min Bestrahlungszeit (Abb. 19). Man kann also die Aussage treffen, dass die Quelle nach ein bis fünf Minuten Bestrahlungszeit ihre mögliche mikrobiozide Wirkung vollständig ausgereizt hat.

### 8.3 Zusammenfassung der Wirkungsmechanismen des KAP

Die beobachteten Ergebnisse dieser Studie lassen folgende Hypothesen in Bezug auf die Wirkungsmechanismen dieser Plasmaquelle zu:

Am Verhalten des Bakterienstammes *E. coli NDM-1* lässt sich folgende Hypothese zum Wirkungsanteil von UVB-Strahlung am antimikrobiellen Effekt dieser Plasmaquelle ableiten: *E. coli NDM-1* wurde in Vergleichsversuchen durch UVB-Strahlung nicht gehemmt (s. Seite 30f.). Da *E. coli NDM-1* aber genauso stark durch KAP gehemmt wurde wie die anderen Bakterien ( $p > 0,05$ , s. Seite 32ff.), lässt sich schlussfolgern, dass UVB nicht der entscheidende Mediator in der antimikrobiellen Wirkungsweise dieser Plasmaquelle ist. Die These, dass die Wirkungsweise des KAP hauptsächlich durch UVB-Strahlung vermittelt wird, ist umstritten, konnte aber von unterschiedlichen Autoren nachgewiesen werden (Brandenburg et al. 2009, Boudam et al. 2006, Schneider et al. 2012).

Ein weiterer, in der Literatur häufig beschriebener und in Reviews oft zitierter Effekt ist die bessere Wirksamkeit KAPs gegenüber gramnegativen Bakterienstämmen (David 2012, Stoffels et al. 2008). Dies konnte in den Ergebnissen dieser Arbeit nicht nachvollzogen werden. Die gramnegativen Bakterienstämme *E. coli* und *E. coli NDM-1* wurden nicht signifikant stärker gehemmt als die grampositiven Stämme *S. aureus* und *MRSA* ( $p > 0,05$ , s. 32ff. und Seite 46ff.). Daraus lässt sich die Hypothese ableiten, dass es weitere Mechanismen der mikrobioziden Wirkung des KAP dieser Plasmaquelle geben muss, die diese beiden hier nicht beobachteten Effekte des KAP überlagern (Mai-Prochnow et al. 2014, Liao et al. 2017, Jablonowski und von Woedtke 2015, Pavlovich et al. 2013). Für eine genaue Exploration des Hemmverhaltens dieser Plasmaquelle werden weitere Tests benötigt.

In dieser Arbeit konnte aus der Literatur nachvollzogen werden, dass die Hefe *C. albicans* signifikant schwächer ( $p > 0,05$ , s. 39ff.) durch KAP gehemmt wurde, als die hier verglichenen Bakterienstämme (Wiegand et al. 2014, Klampfl et al. 2012, Nishime et al. 2017).

## 8.4 Eindringtiefe

Ein weiterer wichtiger Punkt bei der Charakterisierung der Plasmaquelle der TU Ilmenau war die erreichte Eindringtiefe, die zumindest qualitativ bestimmt werden konnte. Bereits weit fortgeschrittene Geräte wie der kINPen 09 erreichen geringe Eindringtiefen in feste Oberflächen: In verschiedenen Versuchsaufbauten wurden Eindringtiefen von 36,8  $\mu\text{m}$  in *in-vitro* Untersuchungen an Tumorgewebszellen gefunden (Partecke et al. 2012) und in einer *in-vivo* Untersuchung eine Eindringtiefe bis in die oberen Schichten des Stratum corneum (Fluhr et al. 2012).

Es ist davon auszugehen, dass, wie die Wirkung des KAP auf Flüssigkeiten, auch die Eindringtiefe von KAP stark abhängig von den Eigenschaften der verwendeten Quelle und dem behandelten Material ist. Auch das Verhalten und die Langlebigkeit der reaktiven Spezies in tieferen Gewebeschichten ist Gegenstand aktueller Forschung (Szili et al. 2018).

Die quantitative Messung mit Gieß-Reagenz beinhaltete den Fehler, dass zu viel Reagenz im Agar zu einer Überschätzung des Effekts führte. Ursprüngliche Ergebnisse von 5 mm Eindringtiefe mussten verworfen werden. Eine konsequente Reduktion und Kontroll-Bestrahlungen konnten anschließend mögliche Fehlmessungen ausschließen. Die gemessenen Eindringtiefen bis maximal 3 mm nach 5 Minuten Bestrahlung mit KAP könnten für eine mögliche Anwendung an Hautmodellen und am Patienten in der Praxis darauf hinweisen, dass die Plasmaquelle oberflächliche, infizierte Oberflächen erfolgreich erreichen und desinfizieren kann, während tiefer gelegenes gesundes Gewebe von geringer Dosis mehr erreicht wird.

## 8.5 Beurteilung der Plasmaquelle

Zum Abschluss der Diskussion folgt eine Beurteilung der Plasmaquelle hinsichtlich Reliabilität und Vor – und Nachteilen, die sich während der Zeit, in der die Quelle in der Studie eingesetzt wurde, gezeigt haben.

### 8.5.1 Reliabilität der Plasmaquelle

Zu Beginn der experimentellen Phase zeigte sich der Prototyp entsprechend seinem Entwicklungsstadium noch sehr fehleranfällig. Schwachpunkt war das dünne Dielektrikum zwischen den Elektroden. Bereits geringste Abweichungen im Fertigungsprozess führten zum Durchbrennen der Quelle, die einen Austausch des blauen Plasmachips nötig machten. Die ersten beiden getesteten Chips brannten bereits nach wenigen Betriebsminuten durch. Ein einzelner getesteter Chip hielt nur 90 Sekunden durch. Der Austausch der Chips erfolgte durch das Team der TU Ilmenau. Ohne Änderungen im Aufbau des Chips war nach diesen ersten zwei Ausfällen ein einzelner Chip über fast die gesamte Bestrahlungszeit der Experimente in dieser Studie im Einsatz. Dieser war insgesamt 535 min über etwa 852 Zyklen mit Betriebszeiten zwischen 1 Sekunde und 5 Minuten im Einsatz. Dabei stellte sich der Chip als robust genug heraus, um oberflächlich mit einem Desinfektionstuch abgewischt zu werden. Auch sporadisch auftretende Kontakte mit Oberflächen fügten dem Chip keinen Schaden zu.

Nach 2 Monaten fiel das Netzteil aus und wurde durch ein neues Netzteil ersetzt. Dieses lieferte aufgrund eines Fehlers zu hohe Leistungen. Bemerkbar machte sich dies in einer Temperaturerhöhung des KAP bis hin zur sichtbaren Blasenbildung des Plastiks am Boden des Wells einer 12-Well Platte. Der normale Temperaturbereich, für den die Plasmachips ausgelegt sind (ca. 40°C), wurde überschritten. Diese Erhöhung der Leistung führte zum Ausfall des Plasma-Chips nach 5 Minuten Betriebszeit.

Abschließend kann man feststellen, dass durch exakte Fertigung das Konstruktionsprinzip in Zukunft den Bau einer Quelle möglich sein sollte, die für den Arbeitsalltag ausreichend zuverlässig sein wird. Eine verbesserte Quelle mit widerstandsfähigerer Keramik ist bereits von der TU Ilmenau geliefert worden. Sie wird in einer zweiten Studie zur Zellverträglichkeit eingesetzt.

## 8.5.2 Ergonomie der Plasmaquelle

Die modulare Bauweise der Quelle aus Plasmachip, Haltegriff mit Stromversorgung und Netzteil ermöglicht eine einfache Reparatur der Quelle. Für den Austausch des Plasmachips muss dieser von den Hochspannungskabeln im Inneren des Griiffs gelöst werden. Anschließend wird der neue Chip an den vorgefertigten Kontakten mit den Kabeln verlötet. Sind die Plasmachips vorgefertigt, dauert ein Austausch nicht länger als einen Arbeitstag.

## 8.5.3 Praxistauglichkeit und Anwendungsmöglichkeiten

Die DBD-Quelle bietet gegenüber Jet-Systemen wie dem kINPen der Firma neoplas tools GmbH einige konstruktionsbedingte Nachteile, sowie einige Vorteile. Einer der gravierendsten Nachteile der miniaturisierten Quelle in dieser Arbeit ist der benötigte geringe Abstand zum Bestrahlungsobjekt. Dieser sollte nicht mehr als 1 mm betragen. Dadurch können unregelmäßig geformte offene Wunden am Patienten, die tief in das Gewebe reichen, nicht mit diesem DBD Gerät erreicht werden. Die Wirkung der Quelle ist hochgradig vom Grad der Verschmutzung abhängig. Eine regelmäßige Säuberung ist essentiell, um eine gleichmäßige und konstante Wirkung erreichen zu können. Unter experimentellen Bedingungen konnte die Wirkung über den Agardiffusionstest engmaschig verfolgt werden, was in der Praxis nicht möglich sein wird.

Ein Vorteil der Quelle ist dagegen die Möglichkeit, große Oberflächen bestrahlen zu können. Sie ermöglicht ein großflächiges Desinfizieren in kurzer Zeit, ohne dass die Quelle bewegt werden muss. Im Vergleich zu anderen Systemen ist die Quelle der TU Ilmenau leicht und transportabel. Der Griff ist nicht dicker als ein dicker Edding-Stift, da er nur zwei dünne Stromkabel führen muss. Zusätzlich muss ein Netzteil mit Stromanschluss mitgebracht werden. An einer Version mit aufladbarem Akku wird gearbeitet, um einen unkomplizierten Einsatz am Patienten zu ermöglichen.

Vergangene Studien mit dem kINPen09 und anderen Plasmageräten zeigten, dass die Leistung, die in *in-vitro* Studien nachgewiesen wurde, nicht in diesem Maße auf *in-vivo* Studien übersetzt werden konnte. In der Studie von Daeschlein und Kollegen (Daeschlein et al. 2012a) machen die Autoren auf die Probleme der Technik im Alltag aufmerksam. Zudem schaffte es der in der Studie von Daeschlein und Kollegen verwendete Plasmajet nicht, ein künstlich mit apathogenen Mikroorganismen



besiedeltes Hautareal völlig zu desinfizieren. Generell mussten im Vergleich zu den Ergebnissen der vorliegenden Studie in der zitierten Arbeit lange Bestrahlungszeiten eingesetzt werden. Deshalb wäre es falsch, aus den erhaltenen Ergebnissen wie z.B. den großen Hemmhöfen (s. 32), die in dieser Studie gemessen wurden, davon auszugehen, dass mit ähnlich geringen Bestrahlungszeiten vergleichbar große Wundareale am Menschen behandelt werden können. Aus den *in-vitro* Ergebnissen kann nicht auf *in-vivo* Ergebnisse geschlossen werden. Dennoch: Trotz Miniaturisierung der Technik erreicht die getestete Plasmaquelle eine hohe antimikrobielle Wirkung. Diese Studie hat gezeigt, dass diese Miniaturisierung ein möglicher Weg ist, KAP in Zukunft noch vielseitiger im klinischen Alltag einsetzen zu können.

## 9. Schlussfolgerungen

In dieser Arbeit wurde die antimikrobielle Wirkung einer Plasmaquelle der TU Ilmenau anhand der 5 Mikroorganismen *S. aureus*, *MRSA*, *E. coli*, *E. coli NDM-1* und *C. albicans* evaluiert.

In einem ersten Experiment wurden die Mikroorganismen auf Agarplatten ausgestrichen und für 2s, 10s, 30s und 60s bestrahlt. Anschließend wurden nach 24h Inkubationszeit die entstandenen Hemmhöfe ausgemessen und statistisch hinsichtlich quantifizierbarer Unterschiede zwischen den Mikroorganismen ausgewertet. Als Referenzmethode wurde dabei die Bestrahlung mit UVB-Licht hinzugezogen, da UVB-Strahlung als ein Faktor der mikrobioziden Wirkungsmechanismen des kalten Atmosphärendruckplasmas (KAP) gilt (s. Seite 7f. und Seite 65ff.).

In einem zweiten Versuch wurden mittels Mikroplattenlasernephelometrie 24h Wachstumskurven der Mikroorganismen nach Bestrahlung mit KAP aufgenommen. Als Referenzmethode wurde ebenfalls UVB-Strahlung eingesetzt. Die Ergebnisse wurden statistisch hinsichtlich quantifizierbarer Unterschiede zwischen den Mikroorganismen, als auch zwischen den Methoden „KAP-Bestrahlung“ und „UVB-Bestrahlung“ ausgewertet.

Die vorliegende Studie hat die aus der Literatur bekannten Ergebnisse bestätigt: Kaltes Atmosphärendruckplasma (KAP) war auch bei der hier verwendeten DBD-Plasmaquelle der TU Ilmenau antimikrobiell wirksam. In den *in-vitro*-Versuchen dieser Arbeit wurde die antimikrobielle Wirkung gegen alle untersuchten Bakterien als sehr gut und im Fall der Hefe *C. albicans* noch als gut bewertet. Im Vergleich zur UVB-Strahlung mit praxisnahen Dosisleistungen bis  $150 \text{ mJ/cm}^2$  manifestierte sich ein deutlicher Unterschied in der Effektivität der Bestrahlung.

Resistenzen wurden nicht beobachtet.

In Bezug auf die Wirkungsmechanismen des Atmosphärendruckplasmas bieten die Ergebnisse dieser Studie nur bedingt Aufschluss. UVB konnte als Hauptmediator der mikrobioziden Wirkung ausgeschlossen werden. Eine Wirkung, die durch eine mehrheitlich von reaktiven Spezies dominierten Hemmung zu erwarten wäre, konnte allerdings ebenfalls nicht beobachtet werden. Hierzu müssen weitere Untersuchungen erfolgen.

Die Eindringtiefe der Quelle dürfte als unbedenklich gering angesehen werden. Tiefliegendes Gewebe wird voraussichtlich nicht oder nur von vernachlässigbar

geringen KAP-Bestrahlungsintensitäten erreicht werden. Jedoch sind weitergehende Versuche *in-vivo* nötig, um eine abschließende Bewertung des Risikopotentials vorzunehmen. Derzeit wird mit der Plasmaquelle eine zweite Studie zur Zellverträglichkeit durchgeführt.

Die Quelle birgt dieselben konstruktiven Nachteile wie viele andere DBD-Quellen. Sie ist auf einen möglichst niedrigen Abstand zwischen Elektroden und behandeltem Objekt angewiesen. Dies ist bei ebenen Flächen kein Problem. Bei unförmigen Wundrändern sind Geräte mit Plasma-Jets im Vorteil, da sie punktförmig wirken und deshalb gezielter in eng begrenzten Arealen eingesetzt werden können. Die Tests ergaben, dass das KAP dieser Quelle keine mikrobiozide Wirkung auf Mikroorganismen in Flüssigkeit hatte. Hier wird in nachfolgenden Studien zu prüfen sein, wie die Quelle in dünnen Flüssigkeitsfilmen wirkt, die in potentiellen Anwendungsgebieten wie der Therapie des chronisch-venösen Ulcus cruris, oder chronisch infizierter Wunden häufig vorkommen.

Der getesteten Plasmaquelle ist ein gutes Zeugnis auszustellen. In Berücksichtigung ihres sehr frühen Entwicklungsstadiums erwies sie sich als zuverlässig. Durch die koplanare Anordnung der Elektroden in der Quelle der TU Ilmenau fließt kein Strom durch die behandelten Oberflächen und das kalte Atmosphärendruckplasma entsteht nicht auf dem behandelten Objekt, sondern zwischen den Elektroden. Die Quelle muss nah genug an das zu bestrahlende Objekt herangebracht werden, damit dieses in Kontakt mit dem KAP kommt. In weiteren Studien wird weiter zu evaluieren sein, ob dieser indirekte Aufbau der Plasmaquelle die Effektivität der Plasmabestrahlung gegenüber direkten DBD-Plasmaquellen senkt.

Abschließend kann man feststellen, dass die Plasmaquelle grundsätzlich *in-vitro* auf einem vergleichbar hohen antimikrobiell wirksamen Niveau wie andere aktuelle Plasmaquellen arbeitet. Für eine realistische Einschätzung Ihrer Funktion im klinischen Alltag sind *in-vivo* Tests nötig. Derweil wird die Quelle in weiteren *in-vitro* Experimenten untersucht.

## 10. Literatur und Quellenverzeichnis

- Arndt S, Schmidt A, Karrer S, von Woedtke T. 2018. Comparing two different plasma devices kINPen and Adtec SteriPlas regarding their molecular and cellular effects on wound healing. *Clinical Plasma Medicine*, 9:24-33.
- Baik KY, Kim YH, Ryu YH, Kwon HS, Park G, Uhm HS, Choi EH. 2013. Feeding-Gas Effects of Plasma Jets on *Escherichia coli* in Physiological Solutions. *Plasma Processes and Polymers*, 10 (3):235-242.
- Bekeschus S, Schmidt A, Weltmann K-D, von Woedtke T. 2016. The plasma jet kINPen – A powerful tool for wound healing. *Clinical Plasma Medicine*, 4 (1):19-28.
- Boudam MK, Moisan M, Saoudi B, Popovici C, Gherardi N, Massines F. 2006. Bacterial spore inactivation by atmospheric-pressure plasmas in the presence or absence of UV photons as obtained with the same gas mixture. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 39 (16):3494.
- Boxhammer V. 2014. Developmant of a safe therapeutic window for cold atmospheric plasma treatments [Dissertation, LMU München].
- Brandenburg R, Lange H, Woedtke Tv, Stieber M, Kindel E, Ehlbeck J, Weltmann KD. 2009. Antimicrobial Effects of UV and VUV Radiation of Nonthermal Plasma Jets. *IEEE Transactions on Plasma Science*, 37 (6):877-883.
- Brehmer F, Haenssle HA, Daeschlein G, Ahmed R, Pfeiffer S, Gorlitz A, Simon D, Schon MP, Wandke D, Emmert S. 2015. Alleviation of chronic venous leg ulcers with a hand-held dielectric barrier discharge plasma generator (PlasmaDerm((R)) VU-2010): results of a monocentric, two-armed, open, prospective, randomized and controlled trial (NCT01415622). *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 29 (1):148-155.
- Burm KTAL. 2012. Plasma: The Fourth State of Matter. *Plasma Chemistry and Plasma Processing*, 32 (2):401-407.
- Buselmaier W. 2012. *Biologie für Mediziner*. 12., neubearbeitete und erweiterte Auflage Aufl. Berlin u.a.: Springer.
- Conrads H, Schmidt M. 2000. Plasma generation and plasma sources. *Plasma Sources Science and Technology*, 9 (4):441.
- Daeschlein G, von Woedtke T, Kindel E, Brandenburg R, Weltmann K-D, Jünger M. 2010. Antibacterial Activity of an Atmospheric Pressure Plasma Jet Against Relevant Wound Pathogens in vitro on a Simulated Wound Environment. *Plasma Processes and Polymers*, 7 (3-4):224-230.
- Daeschlein G, Scholz S, Ahmed R, von Woedtke T, Haase H, Niggemeier M, Kindel E, Brandenburg R, Weltmann KD, Juenger M. 2012a. Skin decontamination by

- low-temperature atmospheric pressure plasma jet and dielectric barrier discharge plasma. *J Hosp Infect*, 81 (3):177-183.
- Daeschlein G, Scholz S, Ahmed R, Majumdar A, von Woedtke T, Haase H, Niggemeier M, Kindel E, Brandenburg R, Weltmann KD, Junger M. 2012b. Cold plasma is well-tolerated and does not disturb skin barrier or reduce skin moisture. *J Dtsch Dermatol Ges*, 10 (7):509-515.
- Daeschlein G, Napp M, von Podewils S, Lutze S, Emmert S, Lange A, Klare I, Haase H, Gümbel D, von Woedtke T, Jünger M. 2014. In Vitro Susceptibility of Multidrug Resistant Skin and Wound Pathogens Against Low Temperature Atmospheric Pressure Plasma Jet (APPJ) and Dielectric Barrier Discharge Plasma (DBD). *Plasma Processes and Polymers*, 11 (2):175-183.
- David BG. 2012. The emerging role of reactive oxygen and nitrogen species in redox biology and some implications for plasma applications to medicine and biology. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 45 (26):263001.
- Deng XT, Shi JJ, Kong MG. 2006. Physical mechanisms of inactivation of *Bacillus subtilis* spores using cold atmospheric plasmas. *IEEE Transactions on Plasma Science*, 34 (4):1310-1316.
- Emmert S. 2018. Technik für den Menschen – kaltes Atmosphärendruckplasma. *JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft*, 16 (1):1-2.
- Emmert S, Brehmer F, Hänßle H, Helmke A, Mertens N, Ahmed R, Simon D, Wandke D, Maus-Friedrichs W, Däschlein G, Schön MP, Viöl W. 2013. Atmospheric pressure plasma in dermatology: Ulcus treatment and much more. *Clinical Plasma Medicine*, 1 (1):24-29.
- Finger S. 2011. Wirkung von Cyclodextrin-Komplexen auf Bakterien und Pilze [Diploma]. Jena: Friedrich Schiller Universität,.
- Fluhr JW, Sassning S, Lademann O, Darvin ME, Schanzer S, Kramer A, Richter H, Sterry W, Lademann J. 2012. In vivo skin treatment with tissue-tolerable plasma influences skin physiology and antioxidant profile in human stratum corneum. *Exp Dermatol*, 21 (2):130-134.
- Fridman A, Chirokov A, Gutsol A. 2005. Non-thermal atmospheric pressure discharges. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 38 (2):R1.
- Fridman G, Friedman G, Gutsol A, Shekhter AB, Vasilets VN, Fridman A. 2008. Applied Plasma Medicine. *Plasma Processes and Polymers*, 5 (6):503-533.
- Gaunt LF, Beggs CB, Georghiou GE. 2006. Bactericidal Action of the Reactive Species Produced by Gas-Discharge Nonthermal Plasma at Atmospheric Pressure: A Review. *IEEE Transactions on Plasma Science*, 34 (4):1257-1269.
- Gay-Mimbrera J, Garcia MC, Isla-Tejera B, Rodero-Serrano A, Garcia-Nieto AV, Ruano J. 2016. Clinical and Biological Principles of Cold Atmospheric Plasma Application in Skin Cancer. *Adv Ther*, 33 (6):894-909.

- Heinlin J, Isbary G, Stolz W, Morfill G, Landthaler M, Shimizu T, Steffes B, Nosenko T, Zimmermann JL, Karrer S. 2011. Plasma applications in medicine with a special focus on dermatology. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 25 (1):1-11.
- Heinlin J, Zimmermann JL, Zeman F, Bunk W, Isbary G, Landthaler M, Maisch T, Monetti R, Morfill G, Shimizu T, Steinbauer J, Stolz W, Karrer S. 2013. Randomized placebo-controlled human pilot study of cold atmospheric argon plasma on skin graft donor sites. *Wound Repair Regen*, 21 (6):800-807.
- Helmke A, Hoffmeister D, Berge F, Emmert S, Laspe P, Mertens N, Vioel W, Weltmann K-D. 2011. Physical and Microbiological Characterisation of *Staphylococcus epidermidis* Inactivation by Dielectric Barrier Discharge Plasma. *Plasma Processes and Polymers*, 8 (4):278-286.
- Ho PL, Lo WU, Yeung MK, Lin CH, Chow KH, Ang I, Tong AHY, Bao JY-J, Lok S, Lo JYC. 2011. Complete Sequencing of pNDM-HK Encoding NDM-1 Carbapenemase from a Multidrug-Resistant *Escherichia coli* Strain Isolated in Hong Kong. *PLOS ONE*, 6 (3):e17989.
- Horn K, Beier O, Wiegand C, Laouina A, Fink S, Pfuch A, Schimanski A, Grünler B, Hipler U-C. 2017. Screening Test of a New Pulsed Plasma Jet for Medical Application. 7 (2):133-145.
- Ikawa S, Kitano K, Hamaguchi S. 2010. Effects of pH on Bacterial Inactivation in Aqueous Solutions due to Low-Temperature Atmospheric Pressure Plasma Application. *Plasma Processes and Polymers*, 7 (1):33-42.
- Isbary G, Shimizu T, Zimmermann JL, Heinlin J, Al-Zaabi S, Rechfeld M, Morfill GE, Karrer S, Stolz W. 2014. Randomized placebo-controlled clinical trial showed cold atmospheric argon plasma relieved acute pain and accelerated healing in herpes zoster. *Clinical Plasma Medicine*, 2 (2):50-55.
- Isbary G, Köritzer J, Mitra A, Li YF, Shimizu T, Schroeder J, Schlegel J, Morfill GE, Stolz W, Zimmermann JL. 2013. Ex vivo human skin experiments for the evaluation of safety of new cold atmospheric plasma devices. *Clinical Plasma Medicine*, 1 (1):36-44.
- Isbary G, Heinlin J, Shimizu T, Zimmermann JL, Morfill G, Schmidt HU, Monetti R, Steffes B, Bunk W, Li Y, Klaempfl T, Karrer S, Landthaler M, Stolz W. 2012. Successful and safe use of 2 min cold atmospheric argon plasma in chronic wounds: results of a randomized controlled trial. *Br J Dermatol*, 167 (2):404-410.
- Isbary G, Morfill G, Schmidt HU, Georgi M, Ramrath K, Heinlin J, Karrer S, Landthaler M, Shimizu T, Steffes B, Bunk W, Monetti R, Zimmermann JL, Pompl R, Stolz W. 2010. A first prospective randomized controlled trial to decrease bacterial load using cold atmospheric argon plasma on chronic wounds in patients. *Br J Dermatol*, 163 (1):78-82.

- Jablonowski H, von Woedtke T. 2015. Research on plasma medicine-relevant plasma–liquid interaction: What happened in the past five years? *Clinical Plasma Medicine*, 3 (2):42-52.
- Jablonowski H, Bussiahn R, Hammer MU, Weltmann KD, von Woedtke T, Reuter S. 2015. Impact of plasma jet vacuum ultraviolet radiation on reactive oxygen species generation in bio-relevant liquids. *Physics of Plasmas*, 22 (12).
- Kalghatgi SU, Fridman G, Fridman A, Friedman G, Clyne AM. 2008. Non-thermal dielectric barrier discharge plasma treatment of endothelial cells. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc*, 2008:3578-3581.
- Karrer S, Arndt S. 2015. Plasmamedizin in der Dermatologie. *Der Hautarzt*, 66 (11):819-828.
- Klampfl TG, Isbary G, Shimizu T, Li YF, Zimmermann JL, Stolz W, Schlegel J, Morfill GE, Schmidt HU. 2012. Cold atmospheric air plasma sterilization against spores and other microorganisms of clinical interest. *Appl Environ Microbiol*, 78 (15):5077-5082.
- Kogelschatz U. 2003. Dielectric-Barrier Discharges: Their History, Discharge Physics, and Industrial Applications. *Plasma Chemistry and Plasma Processing*, 23 (1):1-46.
- Kogelschatz U. 2004. Atmospheric-pressure plasma technology. *Plasma Physics and Controlled Fusion*, 46:B63-B75.
- Kong MG, Kroesen G, Morfill G, Nosenko T, Shimizu T, van Dijk J, Zimmermann JL. 2009. Plasma medicine: an introductory review. *New Journal of Physics*, 11 (11):115012.
- Kumarasamy KK, Toleman MA, Walsh TR, Bagaria J, Butt F, Balakrishnan R, Chaudhary U, Doumith M, Giske CG, Irfan S, Krishnan P, Kumar AV, Maharjan S, Mushtaq S, Noorie T, Paterson DL, Pearson A, Perry C, Pike R, Rao B, Ray U, Sarma JB, Sharma M, Sheridan E, Thirunarayan MA, Turton J, Upadhyay S, Warner M, Welfare W, Livermore DM, Woodford N. 2010. Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study. *Lancet Infect Dis*, 10 (9):597-602.
- Lackmann JW, Bandow JE. 2014. Inactivation of microbes and macromolecules by atmospheric-pressure plasma jets. *Appl Microbiol Biotechnol*, 98 (14):6205-6213.
- Lademann J, Ulrich C, Patzelt A, Richter H, Kluschke F, Klebes M, Lademann O, Kramer A, Weltmann KD, Lange-Asschenfeldt B. 2013. Risk assessment of the application of tissue-tolerable plasma on human skin. *Clinical Plasma Medicine*, 1 (1):5-10.
- Laroussi M. 2002. Nonthermal decontamination of biological media by atmospheric-pressure plasmas: review, analysis, and prospects. *IEEE Transactions on Plasma Science*, 30 (4):1409-1415.

- Laroussi M, Leipold F. 2004. Evaluation of the roles of reactive species, heat, and UV radiation in the inactivation of bacterial cells by air plasmas at atmospheric pressure. *International Journal of Mass Spectrometry*, 233 (1):81-86.
- Laroussi M, Akan T. 2007. Arc-Free Atmospheric Pressure Cold Plasma Jets: A Review. *Plasma Processes and Polymers*, 4 (9):777-788.
- Laroussi M, Mendis DA, Rosenberg M. 2003. Plasma interaction with microbes. *New Journal of Physics*, 5 (1):41.
- Lenhard W, Lenhard A 25.10.2018. Berechnung von Effektstärken <https://www.psychometrica.de/effektstaerke.html>.
- Lerouge S, Wertheimer MR, Yahia LH. 2001. Plasma Sterilization: A Review of Parameters, Mechanisms, and Limitations. *Plasmas and Polymers*, 6 (3):175-188.
- Liao X, Liu D, Xiang Q, Ahn J, Chen S, Ye X, Ding T. 2017. Inactivation mechanisms of non-thermal plasma on microbes: A review. *Food Control*, 75:83-91.
- Liu F, Sun P, Bai N, Tian Y, Zhou H, Wei S, Zhou Y, Zhang J, Zhu W, Becker K, Fang J. 2010. Inactivation of Bacteria in an Aqueous Environment by a Direct-Current, Cold-Atmospheric-Pressure Air Plasma Microjet. *Plasma Processes and Polymers*, 7 (3-4):231-236.
- Logan LK, Weinstein RA. 2017. The Epidemiology of Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae: The Impact and Evolution of a Global Menace. *J Infect Dis*, 215 (suppl\_1):S28-s36.
- Lu H, Patil S, Keener KM, Cullen PJ, Bourke P. 2014. Bacterial inactivation by high-voltage atmospheric cold plasma: influence of process parameters and effects on cell leakage and DNA. *Journal of Applied Microbiology*, 116 (4):784-794.
- Lu X, Naidis GV, Laroussi M, Reuter S, Graves DB, Ostrikov K. 2016. Reactive species in non-equilibrium atmospheric-pressure plasmas: Generation, transport, and biological effects. *Physics Reports*, 630:1-84.
- Mai-Prochnow A, Murphy AB, McLean KM, Kong MG, Ostrikov KK. 2014. Atmospheric pressure plasmas: infection control and bacterial responses. *Int J Antimicrob Agents*, 43 (6):508-517.
- Metelmann H-R, Woedtke Tv, Weltmann K-D. 2016. *Plasmamedizin : Kaltplasma in der medizinischen Anwendung*. Berlin, Heidelberg ; s.l.: Springer Berlin Heidelberg.
- Michael K. 2015. Plasma for cancer treatment. *Plasma Sources Science and Technology*, 24 (3):033001.
- Moellering RC. 2010. NDM-1 — A Cause for Worldwide Concern. *New England Journal of Medicine*, 363 (25):2377-2379.



- Mofidi A, Rochelle P, Chou C, mehta h, Linden K, Malley J. 2002. Bacterial Survival After Ultraviolet Light Disinfection: Resistance, Regrowth and Repair. Proceedings of the American Water Works Association Water Quality Technology Conference, November 10 - 14, Seattle, USA, 2002.
- Moisan M, Barbeau J, Moreau S, Pelletier J, Tabrizian M, Yahia LH. 2001. Low-temperature sterilization using gas plasmas: a review of the experiments and an analysis of the inactivation mechanisms. *Int J Pharm*, 226 (1-2):1-21.
- Moreau M, Orange N, Feuilloy MGJ. 2008. Non-thermal plasma technologies: New tools for bio-decontamination. *Biotechnology Advances*, 26 (6):610-617.
- Moussa G. 2008. Referenzbereich der minimalen Erythemdosis für UVB- und UVA-Strahlung / vorgelegt von Georg Moussa. Ruhr-Universität Bochum, Universitätsbibliothek, Accession Number: rub.2426278: 2009.
- Munk K. 2001. Mikrobiologie. Heidelberg u.a.: Spektrum, Akad. Verl.
- Nishime TMC, Borges AC, Koga-Ito CY, Machida M, Hein LRO, Kostov KG. 2017. Non-thermal atmospheric pressure plasma jet applied to inactivation of different microorganisms. *Surface and Coatings Technology*, 312:19-24.
- O'Connor N, Cahill O, Daniels S, Galvin S, Humphreys H. 2014. Cold atmospheric pressure plasma and decontamination. Can it contribute to preventing hospital-acquired infections? *J Hosp Infect*, 88 (2):59-65.
- Oehmigen K, Hähnel M, Brandenburg R, Wilke C, Weltmann KD, von Woedtke T. 2010. The Role of Acidification for Antimicrobial Activity of Atmospheric Pressure Plasma in Liquids. *Plasma Processes and Polymers*, 7 (3-4):250-257.
- Oehmigen K, Winter J, Hähnel M, Wilke C, Brandenburg R, Weltmann K-D, von Woedtke T. 2011. Estimation of Possible Mechanisms of Escherichia coli Inactivation by Plasma Treated Sodium Chloride Solution. *Plasma Processes and Polymers*, 8 (10):904-913.
- Partecke LI, Evert K, Haugk J, Doering F, Normann L, Diedrich S, Weiss FU, Evert M, Huebner NO, Guenther C, Heidecke CD, Kramer A, Bussiahn R, Weltmann KD, Pati O, Bender C, von Bernstorff W. 2012. Tissue tolerable plasma (TTP) induces apoptosis in pancreatic cancer cells in vitro and in vivo. *BMC Cancer*, 12:473.
- Pasqual-Melo G, Gandhirajan RK, Stoffels I, Bekeschus S. 2018. Targeting malignant melanoma with physical plasmas. *Clinical Plasma Medicine*, 10:1-8.
- Pavlovich MJ, Chen Z, Sakiyama Y, Clark DS, Graves DB. 2013. Effect of Discharge Parameters and Surface Characteristics on Ambient-Gas Plasma Disinfection. *Plasma Processes and Polymers*, 10 (1):69-76.
- Rasch B. 2010. Quantitative Methoden : Band 1: Einführung in die Statistik für Psychologen und Sozialwissenschaftler/ von Björn Rasch, Wilhelm Hofmann, Malte Friese, Ewald Naumann. 3., erweiterte Auflage Aufl. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

- Rehman MU, Jawaid P, Uchiyama H, Kondo T. 2016. Comparison of free radicals formation induced by cold atmospheric plasma, ultrasound, and ionizing radiation. *Arch Biochem Biophys*, 605:19-25.
- Reuter S, von Woedtke T, Weltmann KD. 2018. The kINPen-a review on physics and chemistry of the atmospheric pressure plasma jet and its applications. *Journal of Physics D-Applied Physics*, 51 (23):51.
- Ring J, Alomar A, Bieber T, Deleuran M, Fink-Wagner A, Gelmetti C, Gieler U, Lipozencic J, Luger T, Oranje AP, Schafer T, Schwennesen T, Seidenari S, Simon D, Stander S, Stingl G, Szalai S, Szepietowski JC, Taieb A, Werfel T, Wollenberg A, Darsow U, Edf, Eadv, Etfad, Efa, Espd, Global Allergy Asthma European N. 2012. Guidelines for treatment of atopic eczema (atopic dermatitis) Part I. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 26 (8):1045-1060.
- Sanaei N, Ayan H. 2015. Bactericidal Efficacy of Dielectric Barrier Discharge Plasma on Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* in Planktonic Phase and Colonies In vitro. *Plasma Medicine*, 5 (1):1-16.
- Schneider S, Lackmann J-W, Ellerweg D, Denis B, Narberhaus F, Bandow JE, Benedikt J. 2012. The Role of VUV Radiation in the Inactivation of Bacteria with an Atmospheric Pressure Plasma Jet. *Plasma Processes and Polymers*, 9 (6):561-568.
- Shen J, Sun Q, Zhang Z, Cheng C, Lan Y, Zhang H, Xu Z, Zhao Y, Xia W, Chu PK. 2015. Characteristics of DC Gas-Liquid Phase Atmospheric-Pressure Plasma and Bacteria Inactivation Mechanism. *Plasma Processes and Polymers*, 12 (3):252-259.
- Shimizu K, Fukunaga H, Blajan M. 2014. Biomedical applications of atmospheric microplasma. *Current Applied Physics*, 14:S154-S161.
- Shimizu T, Nosenko T, Morfill GE, Sato T, Schmidt H-U, Urayama T. 2010. Characterization of Low-Temperature Microwave Plasma Treatment With and Without UV Light for Disinfection. *Plasma Processes and Polymers*, 7 (3-4):288-293.
- Shimizu T, Steffes B, Pompl R, Jamitzky F, Bunk W, Ramrath K, Georgi M, Stolz W, Schmidt H-U, Urayama T, Fujii S, Morfill GE. 2008. Characterization of Microwave Plasma Torch for Decontamination. *Plasma Processes and Polymers*, 5 (6):577-582.
- Spange S, Pfuch A, Wiegand C, Beier O, Hipler UC, Grunler B. 2015. Atmospheric pressure plasma CVD as a tool to functionalise wound dressings. *J Mater Sci Mater Med*, 26 (2):76.
- Stoffels E, Sakiyama Y, Graves DB. 2008. Cold Atmospheric Plasma: Charged Species and Their Interactions With Cells and Tissues. *IEEE Transactions on Plasma Science*, 36 (4):1441-1457.

- Szili EJ, Hong S-H, Oh J-S, Gaur N, Short RD. 2018. Tracking the Penetration of Plasma Reactive Species in Tissue Models. *Trends in Biotechnology*, 36 (6):594-602.
- Trizio I, Sardella E, Rizzi V, Dilecce G, Cosma P, Schmidt M, von Woedtke T, Gristina R, Favia P. 2016. Characterization of Reactive Oxygen/Nitrogen Species Produced in PBS and DMEM by Air DBD Plasma Treatments. *Plasma Medicine*, 6 (1):13-19.
- Ulrich C, Kluschke F, Patzelt A, Vandersee S, Czaika VA, Richter H, Bob A, Hutten J, Painsi C, Hüge R, Kramer A, Assadian O, Lademann J, Lange-Asschenfeldt B. 2015. Clinical use of cold atmospheric pressure argon plasma in chronic leg ulcers: A pilot study. *J Wound Care*, 24 (5):196, 198-200, 202-193.
- Vatansever F, de Melo W, Avci P, Vecchio D, Sadasivam M, Gupta A, Chandran R, Karimi M, Parizotto NA, Yin R, Tegos GP, Hamblin MR. 2013. Antimicrobial strategies centered around reactive oxygen species - bactericidal antibiotics, photodynamic therapy, and beyond. *Fems Microbiology Reviews*, 37 (6):955-989.
- von Woedtke T, Reuter S, Masur K, Weltmann KD. 2013. Plasmas for medicine. *Physics Reports*, 530 (4):291-320.
- Wagner HE, Brandenburg R, Kozlov KV, Sonnenfeld A, Michel P, Behnke JF. 2003. The barrier discharge: basic properties and applications to surface treatment. *Vacuum*, 71 (3):417-436.
- Warnke P, Frickmann H, Ottl P, Podbielski A. 2014. Nasal Screening for MRSA: Different Swabs – Different Results! *PLOS ONE*, 9 (10):e111627.
- Weltmann K-D, von Woedtke T. 2011. Basic requirements for plasma sources in medicine. *Eur Phys J Appl Phys*, 55 (1):13807.
- Weltmann K-D, von Woedtke T. 2017. Plasma medicine—current state of research and medical application. *Plasma Physics and Controlled Fusion*, 59 (1):014031.
- Weltmann K-D, Kindel E, von Woedtke T, Hähnel M, Stieber M, Brandenburg R. 2010. Atmospheric-pressure plasma sources: Prospective tools for plasma medicine. *Pure and Applied Chemistry - PURE APPL CHEM*, 82:1223-1237.
- Weltmann KD, Kindel E, Brandenburg R, Meyer C, Bussiahn R, Wilke C, Woedtke Tv. 2009. Atmospheric Pressure Plasma Jet for Medical Therapy: Plasma Parameters and Risk Estimation. *Contributions to Plasma Physics*, 49 (9):631-640.
- Wertheim HF, Vos MC, Boelens HA, Voss A, Vandembroucke-Grauls CM, Meester MH, Kluytmans JA, van Keulen PH, Verbrugh HA. 2004. Low prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) at hospital admission in the Netherlands: the value of search and destroy and restrictive antibiotic use. *J Hosp Infect*, 56 (4):321-325.

- Wiegand C, Beier O, Horn K, Pfuch A, Tolke T, Hipler UC, Schimanski A. 2014. Antimicrobial impact of cold atmospheric pressure plasma on medical critical yeasts and bacteria cultures. *Skin Pharmacol Physiol*, 27 (1):25-35.
- Wiegand C, Fink S, Hipler UC, Beier O, Horn K, Pfuch A, Schimanski A, Grunler B. 2017. Cold atmospheric pressure plasmas exhibit antimicrobial properties against critical bacteria and yeast species. *J Wound Care*, 26 (8):462-468.
- Wiegand C, Fink S, Beier O, Horn K, Pfuch A, Schimanski A, Grunler B, Hipler UC, Elsner P. 2016. Dose- and Time-Dependent Cellular Effects of Cold Atmospheric Pressure Plasma Evaluated in 3D Skin Models. *Skin Pharmacol Physiol*, 29 (5):257-265.
- Yan D, Sherman JH, Keidar M. 2017. Cold atmospheric plasma, a novel promising anti-cancer treatment modality. *Oncotarget*, 8 (9):15977-15995.
- Yan D, Talbot A, Nourmohammadi N, Sherman JH, Cheng X, Keidar M. 2015. Toward understanding the selective anticancer capacity of cold atmospheric plasma--a model based on aquaporins (Review). *Biointerphases*, 10 (4):040801.
- Yong D, Toleman MA, Giske CG, Cho HS, Sundman K, Lee K, Walsh TR. 2009. Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, bla(NDM-1), and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrob Agents Chemother*, 53 (12):5046-5054.
- Zimmermann R, Pfuch A, Horn K, Weisser J, Heft A, Röder M, Linke R, Schnabelrauch M, Schimanski A. 2011. An Approach to Create Silver Containing Antibacterial Coatings by Use of Atmospheric Pressure Plasma Chemical Vapour Deposition (APCVD) and Combustion Chemical Vapour Deposition (CCVD) in an Economic Way. *Plasma Processes and Polymers*, 8 (4):295-304.

# 11. Anhang

## 11.1 GEE-Modell

### 11.1.1 GEE-Modell: Geringster Durchmesser

Tab. 24 Gesamttestergebnisse des GEE-Modells „Geringster Durchmesser“

Tests der Modelleffekte			
Quelle	Typ III		
	Wald-Chi-Quadrat	df	Sig.
(Konstanter Term)	1018,068	1	0,0001
Verwendeter Mikroorganismus	14,149	4	0,007
Bestrahlungsdauer	401,232	1	0,0001
Verwendeter Mikroorganismus * Bestrahlungsdauer	14,872	4	0,005
Abhängige Variable: Wert (mm) Modell: (Konstanter Term), Verwendeter Mikroorganismus, Bestrahlungsdauer, Verwendeter Mikroorganismus * Bestrahlungsdauer			

Tab. 25 Paarweise Vergleiche „Bestrahlungsdauer“ des GEE-Modells „Geringster D.“

Paarweise Vergleiche							
(I)Bestrahlungs- dauer		Mittlere Differenz (I- J)	Std.-Fehler	df	Bonferroni- Sig.	95% Wald- Konfidenzintervall für die Differenz	
						Unterer Wert	Oberer Wert
2s	60s	-8,23 <sup>a</sup>	0,410	1	0,0001	-9,03	-7,42
Paarweise Vergleiche der geschätzten Randmittel auf der Grundlage der ursprünglichen Skala der abhängigen Variablen Wert (mm)							
a. Die mittlere Differenz ist auf dem ,05-Niveau signifikant.							

Tab. 26 Paarweise Vergleiche: Interaktion Mikroorganismus mit 2s Bestrahlungsdauer

(I)Verwendeter Mikroorganismus*Bestrahlungsdauer		Mittlere Differenz (I-J)	Std.- Fehler	df	Bonferroni -Sig.	95% Wald- Konfidenzintervall für die Differenz	
						Unterer Wert	Oberer Wert
[S. aureus]* [Bestrahlungsdauer 2s]	[S.aureus]*[Bestrahlungsdauer 60s]	-7,53 <sup>a</sup>	0,91	1	0,0000	-10,48	-4,58
	[MRSA]*[Bestrahlungsdauer 2s]	-0,29	1,11	1	1,0000	-3,91	3,33
	[E. coli]*[Bestrahlungsdauer 2s]	0,97	1,08	1	1,0000	-2,55	4,48
	[E. coli NDM-1]*[Bestrahlungsdauer 2s]	1,52	1,03	1	1,0000	-1,83	4,86
	[C. albicans]*[Bestrahlungsdauer 2s]	3,74 <sup>a</sup>	0,90	1	0,0015	0,80	6,67
[MRSA]* [Bestrahlungsdauer 2s]	[S.aureus]*[Bestrahlungsdauer 2s]	0,29	1,11	1	1,0000	-3,33	3,91
	[MRSA]*[Bestrahlungsdauer 60s]	-5,94 <sup>a</sup>	0,81	1	0,0000	-8,58	-3,31
	[E. coli]*[Bestrahlungsdauer 2s]	1,26	1,14	1	1,0000	-2,46	4,97
	[E. coli NDM-1]*[Bestrahlungsdauer 2s]	1,80	1,09	1	1,0000	-1,75	5,36
	[C. albicans]*[Bestrahlungsdauer 2s]	4,028 <sup>a</sup>	0,97	1	0,0015	0,86	7,20
[E. coli]* [Bestrahlungsdauer 2s]	[S.aureus]*[Bestrahlungsdauer 2s]	-0,97	1,08	1	1,0000	-4,48	2,55
	[MRSA]*[Bestrahlungsdauer 2s]	-1,26	1,14	1	1,0000	-4,97	2,46
	[E. coli]*[Bestrahlungsdauer 60s]	-8,47 <sup>a</sup>	1,09	1	0,0000	-12,03	-4,91
	[E. coli NDM-1]*[Bestrahlungsdauer 2s]	0,55	1,06	1	1,0000	-2,90	4,00
	[C. albicans]*[Bestrahlungsdauer 2s]	2,77	0,93	1	0,1372	-0,28	5,82
[E. coli NDM-1]* [Bestrahlungsdauer 2s]	[S.aureus]*[Bestrahlungsdauer 2s]	-1,52	1,03	1	1,0000	-4,86	1,83
	[MRSA]*[Bestrahlungsdauer 2s]	-1,80	1,09	1	1,0000	-5,36	1,75
	[E. coli]*[Bestrahlungsdauer 2s]	-0,55	1,06	1	1,0000	-4,00	2,90
	[E. coli NDM-1]*[Bestrahlungsdauer 60s]	-8,44 <sup>a</sup>	0,74	1	0,0000	-10,85	-6,03
	[C. albicans]*[Bestrahlungsdauer 2s]	2,22	0,87	1	0,4980	-0,63	5,07
[C. albicans]* [Bestrahlungsdauer 2s]	[S.aureus]*[Bestrahlungsdauer 2s]	-3,74 <sup>a</sup>	0,90	1	0,0015	-6,67	-0,80
	[MRSA]*[Bestrahlungsdauer 2s]	-4,027 <sup>a</sup>	0,97	1	0,0015	-7,20	-0,86
	[E. coli]*[Bestrahlungsdauer 2s]	-2,77	0,93	1	0,1372	-5,82	0,28
	[E. coli NDM-1]*[Bestrahlungsdauer 2s]	-2,22	0,87	1	0,4980	-5,07	0,63
	[C. albicans]*[Bestrahlungsdauer 60s]	-10,77 <sup>a</sup>	1,00	1	0,0000	-14,05	-7,49

a. Die mittlere Differenz ist auf dem ,05-Niveau signifikant.

Tab. 27 Paarweise Vergleiche: Interaktion Mikroorganismus mit 60s Bestrahlungsdauer

(I)Verwendeter Mikroorganismus*Bestrahlungsdauer		Mittlere Differenz (I-J)	Std.- Fehler	df	Bonferroni -Sig.	95% Wald- Konfidenzintervall für die Differenz	
						Unterer Wert	Oberer Wert
[Bestrahlungsdauer 2s] [S. aureus]*	[MRSA]*[Bestrahlungsdauer 60s]	1,30	1,24	1	1,0000	-2,74	5,33
	[E.coli]*[Bestrahlungsdauer 60s]	0,03	0,84	1	1,0000	-2,70	2,75
	[E.coli NDM-1]*[Bestrahlungsdauer 60s]	0,61	0,81	1	1,0000	-2,02	3,24
	[C. albicans]*[Bestrahlungsdauer 60s]	0,50	0,96	1	1,0000	-2,62	3,62
[Bestrahlungsdauer 2s] [MRSA]*	[S.aureus]*[Bestrahlungsdauer 60s]	-1,30	1,24	1	1,0000	-5,33	2,74
	[E.coli]*[Bestrahlungsdauer 60s]	-1,27	1,22	1	1,0000	-5,24	2,70
	[E.coli NDM-1]*[Bestrahlungsdauer 60s]	-0,69	1,20	1	1,0000	-4,59	3,21
	[C. albicans]*[Bestrahlungsdauer 60s]	-0,80	1,30	1	1,0000	-5,05	3,45
[Bestrahlungsdauer 2s] [E. coli]*	[S.aureus]*[Bestrahlungsdauer 60s]	-0,03	0,84	1	1,0000	-2,75	2,70
	[MRSA]*[Bestrahlungsdauer 60s]	1,27	1,22	1	1,0000	-2,70	5,24
	[E.coli NDM-1]*[Bestrahlungsdauer 60s]	0,58	0,78	1	1,0000	-1,95	3,11
	[C. albicans]*[Bestrahlungsdauer 60s]	0,47	0,93	1	1,0000	-2,56	3,50
[Bestrahlungsdauer 2s] [E. coli NDM-1]*	[S.aureus]*[Bestrahlungsdauer 60s]	-0,61	0,81	1	1,0000	-3,24	2,02
	[MRSA]*[Bestrahlungsdauer 60s]	0,69	1,20	1	1,0000	-3,21	4,59
	[E.coli]*[Bestrahlungsdauer 60s]	-0,58	0,78	1	1,0000	-3,11	1,95
	[C. albicans]*[Bestrahlungsdauer 60s]	-0,11	0,90	1	1,0000	-3,06	2,84
[Bestrahlungsdauer 2s] [C. albicans]*	[S.aureus]*[Bestrahlungsdauer 60s]	-0,50	0,96	1	1,0000	-3,62	2,62
	[MRSA]*[Bestrahlungsdauer 60s]	0,80	1,30	1	1,0000	-3,45	5,05
	[E.coli]*[Bestrahlungsdauer 60s]	-0,47	0,93	1	1,0000	-3,50	2,56
	[E.coli NDM-1]*[Bestrahlungsdauer 60s]	0,11	0,90	1	1,0000	-2,84	3,06

a. Die mittlere Differenz ist auf dem ,05-Niveau signifikant.

## 11.1.2 GEE-Modell „Maximaler Durchmesser“

Tab. 28: Gesamttestergebnisse des GEE-Modells „Maximaler Durchmesser“

Tests der Modelleffekte			
Quelle	Typ III		
	Wald-Chi-Quadrat	df	Sig.
(Konstanter Term)	1586,04	1	0,0001
Verwendeter Mikroorganismus	27,76	4	0,0001
Bestrahlungsdauer	436,68	1	0,0001
Verwendeter Mikroorganismus * Bestrahlungsdauer	21,75	4	0,0002
Abhängige Variable: Wert (mm) Modell: (Konstanter Term), Verwendeter Mikroorganismus, Bestrahlungsdauer, Verwendeter Mikroorganismus * Bestrahlungsdauer			

Tab. 29: Paarweise Vergleiche „Bestrahlungsdauer“ des GEE-Modells „Maximaler D.“

Paarweise Vergleiche							
(I)Bestrahlungsdauer		Mittlere Differenz (I-J)	Std.-Fehler	df	Bonferroni-Sig.	95% Wald-Konfidenzintervall für die Differenz	
						Unterer Wert	Oberer Wert
2s	60s	-11,49 <sup>a</sup>	0,55	1	0,0001	-12,57	-10,41
Paarweise Vergleiche der geschätzten Randmittel auf der Grundlage der ursprünglichen Skala der abhängigen Variablen Wert (mm)							
a. Die mittlere Differenz ist auf dem ,05-Niveau signifikant.							



Tab. 30: Paarweise Vergleiche: Interaktion Mikroorganismus mit 2s Bestrahlungsdauer

(I)Verwendeter Mikroorganismus*Bestrahlungsdauer		Mittlere Differenz (I-J)	Std.- Fehler	df	Bonferroni -Sig.	95% Wald- Konfidenzintervall für die Differenz	
						Unterer Wert	Oberer Wert
[Bestrahlungsdauer 2s] [S. aureus]*	[S.aureus]*[Bestrahlungsdauer 60s]	-10,74 <sup>a</sup>	0,92	1	0,0000	-13,75	-7,74
	[MRSA]*[Bestrahlungsdauer 2s]	0,71	1,18	1	1,0000	-3,16	4,57
	[E. coli]*[Bestrahlungsdauer 2s]	2,64	1,33	1	1,0000	-1,70	6,98
	[E. coli NDM-1]*[Bestrahlungsdauer 2s]	3,28	1,26	1	0,4047	-0,81	7,37
	[C. albicans]*[Bestrahlungsdauer 2s]	6,93 <sup>a</sup>	1,36	1	0,0000	2,49	11,38
[Bestrahlungsdauer 2s] [MRSA]*	[S.aureus]*[Bestrahlungsdauer 2s]	-0,71	1,18	1	1,0000	-4,57	3,16
	[MRSA]*[Bestrahlungsdauer 60s]	-7,55 <sup>a</sup>	1,28	1	0,0000	-11,74	-3,37
	[E. coli]*[Bestrahlungsdauer 2s]	1,94	1,35	1	1,0000	-2,47	6,34
	[E. coli NDM-1]*[Bestrahlungsdauer 2s]	2,57	1,27	1	1,0000	-1,58	6,73
	[C. albicans]*[Bestrahlungsdauer 2s]	6,23 <sup>a</sup>	1,38	1	0,0003	1,72	10,73
[Bestrahlungsdauer 2s] [E. coli]*	[S.aureus]*[Bestrahlungsdauer 2s]	-2,64	1,33	1	1,0000	-6,98	1,70
	[MRSA]*[Bestrahlungsdauer 2s]	-1,94	1,35	1	1,0000	-6,34	2,47
	[E. coli]*[Bestrahlungsdauer 60s]	-12,75 <sup>a</sup>	1,63	1	0,0000	-18,07	-7,43
	[E. coli NDM-1]*[Bestrahlungsdauer 2s]	0,64	1,41	1	1,0000	-3,97	5,24
	[C. albicans]*[Bestrahlungsdauer 2s]	4,29	1,51	1	0,2008	-0,63	9,22
[Bestrahlungsdauer 2s] [E. coli NDM-1]*	[S.aureus]*[Bestrahlungsdauer 2s]	-3,28	1,26	1	0,4047	-7,37	0,81
	[MRSA]*[Bestrahlungsdauer 2s]	-2,57	1,27	1	1,0000	-6,73	1,58
	[E. coli]*[Bestrahlungsdauer 2s]	-0,64	1,41	1	1,0000	-5,24	3,97
	[E. coli NDM-1]*[Bestrahlungsdauer 60s]	-11,92 <sup>a</sup>	1,27	1	0,0000	-16,07	-7,78
	[C. albicans]*[Bestrahlungsdauer 2s]	3,66	1,44	1	0,5084	-1,05	8,36
[Bestrahlungsdauer 2s] [C. albicans]*	[S.aureus]*[Bestrahlungsdauer 2s]	-6,93 <sup>a</sup>	1,36	1	0,0000	-11,38	-2,49
	[MRSA]*[Bestrahlungsdauer 2s]	-6,23 <sup>a</sup>	1,38	1	0,0003	-10,73	-1,72
	[E. coli]*[Bestrahlungsdauer 2s]	-4,29	1,51	1	0,2008	-9,22	0,63
	[E. coli NDM-1]*[Bestrahlungsdauer 2s]	-3,66	1,44	1	0,5084	-8,36	1,05
	[C. albicans]*[Bestrahlungsdauer 60s]	-14,47 <sup>a</sup>	0,89	1	0,0000	-17,36	-11,59

a. Die mittlere Differenz ist auf dem ,05-Niveau signifikant.

Tab. 31: Paarweise Vergleiche: Interaktion Mikroorganismus mit 60s Bestrahlungsdauer

(I)Verwendeter Mikroorganismus*Bestrahlungsdauer		Mittlere Differenz (I-J)	Std.- Fehler	df	Bonferroni -Sig.	95% Wald- Konfidenzintervall für die Differenz	
						Unterer Wert	Oberer Wert
[S. aureus]* [Bestrahlungsdauer 2s]	[MRSA]*[Bestrahlungsdauer 60s]	3,90	1,32	1	0,1414	-0,41	8,20
	[E. coli]*[Bestrahlungsdauer 60s]	0,64	1,40	1	1,0000	-3,92	5,19
	[E. coli NDM-1]*[Bestrahlungsdauer 60s]	2,10	1,15	1	1,0000	-1,64	5,84
	[C. albicans]*[Bestrahlungsdauer 60s]	3,20 <sup>a</sup>	0,94	1	0,0308	0,13	6,28
[MRSA]* [Bestrahlungsdauer 2s]	[[S.aureus]]* [Bestrahlungsdauer 60s]	-3,90	1,32	1	0,1414	-8,20	0,41
	[E. coli]*[Bestrahlungsdauer 60s]	-3,26	1,57	1	1,0000	-8,37	1,85
	[E. coli NDM-1]*[Bestrahlungsdauer 60s]	-1,80	1,35	1	1,0000	-6,20	2,60
	[C. albicans]*[Bestrahlungsdauer 60s]	-0,69	1,18	1	1,0000	-4,54	3,15
[E. coli]* [Bestrahlungsdauer 2s]	[[S.aureus]]* [Bestrahlungsdauer 60s]	-0,64	1,40	1	1,0000	-5,19	3,92
	[MRSA]*[Bestrahlungsdauer 60s]	3,26	1,57	1	1,0000	-1,85	8,37
	[E. coli NDM-1]*[Bestrahlungsdauer 60s]	1,46	1,42	1	1,0000	-3,18	6,11
	[C. albicans]*[Bestrahlungsdauer 60s]	2,57	1,26	1	1,0000	-1,56	6,69
[E. coli NDM-1]* [Bestrahlungsdauer 2s]	[[S.aureus]]* [Bestrahlungsdauer 60s]	-2,10	1,15	1	1,0000	-5,84	1,64
	[MRSA]*[Bestrahlungsdauer 60s]	1,80	1,35	1	1,0000	-2,60	6,20
	[E. coli]*[Bestrahlungsdauer 60s]	-1,46	1,42	1	1,0000	-6,11	3,18
	[C. albicans]*[Bestrahlungsdauer 60s]	1,10	0,99	1	1,0000	-2,11	4,31
[C. albicans]* [Bestrahlungsdauer 2s]	[[S.aureus]]* [Bestrahlungsdauer 60s]	-3,20 <sup>a</sup>	0,94	1	0,0308	-6,28	-0,13
	[MRSA]*[Bestrahlungsdauer 60s]	0,69	1,18	1	1,0000	-3,15	4,54
	[E. coli]*[Bestrahlungsdauer 60s]	-2,57	1,26	1	1,0000	-6,69	1,56
	[E. coli NDM-1]*[Bestrahlungsdauer 60s]	-1,10	0,99	1	1,0000	-4,31	2,11

a. Die mittlere Differenz ist auf dem ,05-Niveau signifikant.

### 11.1.3 GEE-Modell „Fläche“

Tab. 32: Gesamttestergebnisse des GEE-Modells „Fläche“

<b>Tests der Modelleffekte</b>			
Quelle	Typ III		
	Wald-Chi-Quadrat	df	Sig.
(Konstanter Term)	581,15	1	0,0001
Verwendeter Mikroorganismus	10,05	4	0,040
Bestrahlungsdauer	488,72	1	0,0001
Verwendeter Mikroorganismus * Bestrahlungsdauer	6,57	4	0,160
Abhängige Variable: Wert (mm) Modell: (Konstanter Term), Verwendeter Mikroorganismus, Bestrahlungsdauer, Verwendeter Mikroorganismus * Bestrahlungsdauer			

Tab. 33: Paarweise Vergleiche „Bestrahlungsdauer“ des GEE-Modells „Fläche“

<b>Paarweise Vergleiche</b>							
(I)Bestrahlungsdauer		Mittlere Differenz (I-J)	Std.-Fehler	df	Bonferroni-Sig.	95% Wald-Konfidenzintervall für die Differenz	
						Unterer Wert	Oberer Wert
2s	60s	-131,06 <sup>a</sup>	5,93	1	0,0001	-142,68	-119,44
Paarweise Vergleiche der geschätzten Randmittel auf der Grundlage der ursprünglichen Skala der abhängigen Variablen Wert (mm)							
a. Die mittlere Differenz ist auf dem ,05-Niveau signifikant.							

Tab. 34: Paarweise Vergleiche: Interaktion Mikroorganismus mit 2s Bestrahlungsdauer

(I)Verwendeter Mikroorganismus*Bestrahlungsdauer		Mittlere Differenz (I-J)	Std.- Fehler	df	Bonferroni -Sig.	95% Wald- Konfidenzintervall für die Differenz	
						Unterer Wert	Oberer Wert
[S. aureus]* [Bestrahlungsdauer 2s]	[S.aureus]*[Bestrahlungsdauer 60s]	-122,02 <sup>a</sup>	12,35	1	0,0000	-162,29	-81,75
	[MRSA]*[Bestrahlungsdauer 2s]	3,12	12,49	1	1,0000	-37,60	43,84
	[E. coli]*[Bestrahlungsdauer 2s]	12,69	13,41	1	1,0000	-31,03	56,41
	[E. coli NDM-1]*[Bestrahlungsdauer 2s]	19,27	11,91	1	1,0000	-19,58	58,12
	[C. albicans]*[Bestrahlungsdauer 2s]	36,16 <sup>a</sup>	10,76	1	0,0352	1,06	71,26
[MRSA]* [Bestrahlungsdauer 2s]	[S.aureus]*[Bestrahlungsdauer 2s]	-3,12	12,49	1	1,0000	-43,84	37,60
	[MRSA]*[Bestrahlungsdauer 60s]	-115,20 <sup>a</sup>	16,60	1	0,0000	-169,32	-61,09
	[E. coli]*[Bestrahlungsdauer 2s]	9,57	12,64	1	1,0000	-31,65	50,78
	[E. coli NDM-1]*[Bestrahlungsdauer 2s]	16,15	11,04	1	1,0000	-19,86	52,15
	[C. albicans]*[Bestrahlungsdauer 2s]	33,04 <sup>a</sup>	9,79	1	0,0333	1,11	64,96
[E. coli]* [Bestrahlungsdauer 2s]	[S.aureus]*[Bestrahlungsdauer 2s]	-12,69	13,41	1	1,0000	-56,41	31,03
	[MRSA]*[Bestrahlungsdauer 2s]	-9,57	12,64	1	1,0000	-50,78	31,65
	[E. coli]*[Bestrahlungsdauer 60s]	-153,92 <sup>a</sup>	14,99	1	0,0000	-202,80	-105,04
	[E. coli NDM-1]*[Bestrahlungsdauer 2s]	6,58	12,07	1	1,0000	-32,79	45,94
	[C. albicans]*[Bestrahlungsdauer 2s]	23,47	10,94	1	1,0000	-12,20	59,14
[E. coli NDM-1]* [Bestrahlungsdauer 2s]	[S.aureus]*[Bestrahlungsdauer 2s]	-19,27	11,91	1	1,0000	-58,12	19,58
	[MRSA]*[Bestrahlungsdauer 2s]	-16,15	11,04	1	1,0000	-52,15	19,86
	[E. coli]*[Bestrahlungsdauer 2s]	-6,58	12,07	1	1,0000	-45,94	32,79
	[E. coli NDM-1]*[Bestrahlungsdauer 60s]	-119,48 <sup>a</sup>	9,67	1	0,0000	-151,00	-87,95
	[C. albicans]*[Bestrahlungsdauer 2s]	16,89	9,05	1	1,0000	-12,60	46,39
[C. albicans]* [Bestrahlungsdauer 2s]	[S.aureus]*[Bestrahlungsdauer 2s]	-36,16 <sup>a</sup>	10,76	1	0,0352	-71,26	-1,06
	[MRSA]*[Bestrahlungsdauer 2s]	-33,04 <sup>a</sup>	9,79	1	0,0333	-64,96	-1,11
	[E. coli]*[Bestrahlungsdauer 2s]	-23,47	10,94	1	1,0000	-59,14	12,20
	[E. coli NDM-1]*[Bestrahlungsdauer 2s]	-16,89	9,05	1	1,0000	-46,39	12,60
	[C. albicans]*[Bestrahlungsdauer 60s]	-144,69 <sup>a</sup>	11,51	1	0,0000	-182,24	-107,15

a. Die mittlere Differenz ist auf dem ,05-Niveau signifikant.

Tab. 35: Paarweise Vergleiche: Interaktion Mikroorganismus mit 60s Bestrahlungsdauer

(I)Verwendeter Mikroorganismus*Bestrahlungsdauer		Mittlere Differenz (I-J)	Std.- Fehler	df	Bonferroni -Sig.	95% Wald- Konfidenzintervall für die Differenz	
						Unterer Wert	Oberer Wert
[S. aureus]* [Bestrahlungsdauer 2s]	[MRSA]*[Bestrahlungsdauer 60s]	9,94	22,80	1	1,0000	-64,41	84,29
	[E. coli]*[Bestrahlungsdauer 60s]	-19,21	18,78	1	1,0000	-80,46	42,04
	[E. coli NDM-1]*[Bestrahlungsdauer 60s]	21,81	15,36	1	1,0000	-28,26	71,88
	[C. albicans]*[Bestrahlungsdauer 60s]	13,49	16,51	1	1,0000	-40,35	67,32
[MRSA]* [Bestrahlungsdauer 2s]	[[S.aureus]]* [Bestrahlungsdauer 60s]	-9,94	22,80	1	1,0000	-84,29	64,41
	[E. coli]*[Bestrahlungsdauer 60s]	-29,15	23,70	1	1,0000	-106,44	48,14
	[E. coli NDM-1]*[Bestrahlungsdauer 60s]	11,87	21,09	1	1,0000	-56,90	80,64
	[C. albicans]*[Bestrahlungsdauer 60s]	3,55	21,94	1	1,0000	-68,01	75,10
[E. coli]* [Bestrahlungsdauer 2s]	[[S.aureus]]* [Bestrahlungsdauer 60s]	19,21	18,78	1	1,0000	-42,04	80,46
	[MRSA]*[Bestrahlungsdauer 60s]	29,15	23,70	1	1,0000	-48,14	106,44
	[E. coli NDM-1]*[Bestrahlungsdauer 60s]	41,02	16,67	1	0,6229	-13,32	95,37
	[C. albicans]*[Bestrahlungsdauer 60s]	32,70	17,73	1	1,0000	-25,13	90,52
[E. coli NDM-1]* [Bestrahlungsdauer 2s]	[[S.aureus]]* [Bestrahlungsdauer 60s]	-21,81	15,36	1	1,0000	-71,88	28,26
	[MRSA]*[Bestrahlungsdauer 60s]	-11,87	21,09	1	1,0000	-80,64	56,90
	[E. coli]*[Bestrahlungsdauer 60s]	-41,02	16,67	1	0,6229	-95,37	13,32
	[C. albicans]*[Bestrahlungsdauer 60s]	-8,32	14,05	1	1,0000	-54,15	37,50
[C. albicans]* [Bestrahlungsdauer 2s]	[[S.aureus]]* [Bestrahlungsdauer 60s]	-13,49	16,51	1	1,0000	-67,32	40,35
	[MRSA]*[Bestrahlungsdauer 60s]	-3,55	21,94	1	1,0000	-75,10	68,01
	[E. coli]*[Bestrahlungsdauer 60s]	-32,70	17,73	1	1,0000	-90,52	25,13
	[E. coli NDM-1]*[Bestrahlungsdauer 60s]	8,32	14,05	1	1,0000	-37,50	54,15

a. Die mittlere Differenz ist auf dem ,05-Niveau signifikant.

## 11.2 Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Verschiedenen Formen physikalischen Plasmas und ihre Temperaturverhältnisse .....	6
Tab. 2: Ergebnisübersicht des Agardiffusionstests nach Bestrahlung mit UVB-Licht	31
Tab. 3: Ergebnisübersicht des Agardiffusionstests nach Bestrahlung mit KAP .....	32
Tab. 4: KAP: Minimale und maximale Durchmesser [mm]. Mittelwert $\pm$ SD .....	33
Tab. 5: KAP: Minimaler und maximaler Flächeninhalt [mm <sup>2</sup> ] $\pm$ SD .....	36
Tab. 6: p-Werte des GEE-Modells der Bestrahlungsdauer (2s und 60s).....	40
Tab. 7: Konfidenzintervalle des Messpunkts „Minimaler Durchmesser“ .....	41
Tab. 8: p-Werte der GEE-Analyse des Minimalen Durchmessers (2s Bestrahlungszeit).....	41
Tab. 9: p-Werte der GEE-Analyse des Minimalen Durchmessers (60s Bestrahlungszeit).....	41
Tab. 10: Konfidenzintervalle des Messpunkts „Maximaler Durchmesser“ .....	43
Tab. 11: p-Werte der GEE-Analyse des Maximalen Durchmessers (2s Bestrahlungszeit).....	43
Tab. 12: p-Werte der GEE-Analyse des Maximalen Durchmessers (60s Bestrahlungszeit).....	43
Tab. 13: Konfidenzintervalle des Messpunkts „Flächeninhalt des Hemmhofs“ .....	45
Tab. 14: p-Werte der GEE-Analyse der Fläche des Hemmhofs (2s Bestrahlungszeit) .....	45
Tab. 15: p-Werte der GEE-Analyse der Fläche des Hemmhofs (60s Bestrahlungszeit) .....	45
Tab. 16: Wachstumskurvenauswertung nach Bestrahlung mit UVB in 1000 $\mu$ L Flüssigkeit.....	47
Tab. 17: Wachstumskurvenauswertung nach Bestrahlung des Sediments mit UVB	48
Tab. 18: Wachstumskurvenauswertung nach Bestrahlung mit KAP in 1000 $\mu$ L Flüssigkeit.....	49
Tab. 19: Wachstumskurven nach Bestrahlung des Sediments mit KAP.....	50
Tab. 20: Tabelle IC <sub>50</sub> -Werte [min]; Mittelwert $\pm$ SD und Dosisangabe der UVB-Messwerte .....	51
Tab. 21: p-Werte des Mann-Whitney-U-Tests der IC <sub>50</sub> -Werten .....	54
Tab. 22: p-Werte des Mann-Whitney-U-Tests der IC <sub>50</sub> -Werten .....	54
Tab. 23: Ergebnis des Mann-Whitney-U-Tests und Cohen`s d der IC <sub>50</sub> -Werte .....	55
Tab. 24: Gesamttestergebnisse des GEE-Modells „Geringster Durchmesser“.....	81
Tab. 25: Paarweise Vergleiche „Bestrahlungsdauer“ des GEE-Modells „Geringster D.“ .....	81
Tab. 26: Paarweise Vergleiche: Interaktion Mikroorganismus mit 2s Bestrahlungsdauer .....	82
Tab. 27: Paarweise Vergleiche: Interaktion Mikroorganismus mit 60s Bestrahlungsdauer .....	83
Tab. 28: Gesamttestergebnisse des GEE-Modells „Maximaler Durchmesser“.....	84
Tab. 29: Paarweise Vergleiche „Bestrahlungsdauer“ des GEE-Modells „Maximaler D.“ .....	84

Tab. 30: Paarweise Vergleiche: Interaktion Mikroorganismus mit 2s Bestrahlungsdauer .....	85
Tab. 31: Paarweise Vergleiche: Interaktion Mikroorganismus mit 60s Bestrahlungsdauer .....	86
Tab. 32: Gesamtergebnisse des GEE-Modells „Fläche“ .....	87
Tab. 33: Paarweise Vergleiche „Bestrahlungsdauer“ des GEE-Modells „Fläche“ .....	87
Tab. 34: Paarweise Vergleiche: Interaktion Mikroorganismus mit 2s Bestrahlungsdauer .....	88
Tab. 35: Paarweise Vergleiche: Interaktion Mikroorganismus mit 60s Bestrahlungsdauer .....	89

## 11.3 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Darstellung verschiedener zellulärer Wirkungsmechanismen durch KAP .....	8
Abb. 2: Schematische Darstellung eines Plasma-Jets und einer DBD-Plasmaquelle	10
Abb. 3: Plasma-Chips und zugehöriger Elektronik .....	18
Abb. 4: Plasmaquelle der TU Ilmenau, früher Prototyp .....	19
Abb. 5: Koplanare Anordnung des Elektrodenfelds auf dem Plasmachip.....	19
Abb. 6: Mit Plasma behandelte E. coli auf MHE-Agarplatten.....	22
Abb. 7: Ausschnitt der Agarplatte aus Abbildung 4.....	24
Abb. 8: Messtechnik der Mikroplatten-Laser-Nephelometrie (nach (Finger 2011))....	25
Abb. 9: Reaktion der Bestandteile des Gieß-Reagenzes .....	28
Abb. 10: 12-Well-Layout der Testung der Eindringtiefe des Plasmas mit Gieß- Reagenz .....	29
Abb. 11: KAP: Minimaler Hemmhofdurchmesser [mm] $\pm$ SD.....	34
Abb. 12: KAP: Minimaler Durchmesser [mm] $\pm$ SD und Ausgleichskurve .....	34
Abb. 13: KAP: Maximaler Hemmhofdurchmesser [mm] $\pm$ SD.....	35
Abb. 14: KAP: Maximaler Durchmesser [mm] $\pm$ SD und Ausgleichskurve.....	35
Abb. 15: KAP: Flächeninhalt des Hemmhofs [mm <sup>2</sup> ] $\pm$ SD.....	37
Abb. 16: KAP: Flächeninhalt des minimalen Hemmhofs [mm <sup>2</sup> ] $\pm$ SD und Ausgleichskurve .....	37
Abb. 17: KAP: Flächeninhalt des maximalen Hemmhofs [mm <sup>2</sup> ] $\pm$ SD .....	38
Abb. 18: Flächeninhalt des maximalen Hemmhofs [mm <sup>2</sup> ] $\pm$ SD und Ausgleichskurve .....	38
Abb. 19: IC <sub>50</sub> Werte [min]; Mittelwert $\pm$ SD.....	51
Abb. 20: Boxplot der IC <sub>50</sub> Werte nach Bestrahlung mit UVB .....	52
Abb. 21: Boxplot der IC <sub>50</sub> Werte nach Bestrahlung mit KAP .....	52
Abb. 22: 12-Well Platte mit MHE Agar welcher mit Gieß-Reagenz versetzt wurde .	56
Abb. 23: Querschnitt des MHE-Agar mit Gieß-Reagenz KAP-Bestrahlung .....	57
Abb. 24: Vergleich gramnegativer (oben) und grampositiver Bakterienzellwände (Munk 2001) .....	61



## 11.4 Danksagung

Ich möchte mich bei allen Menschen bedanken, die mir in der Anfertigung dieser Arbeit zur Seite gestanden und mich unterstützt haben.

Vordergründig gilt mein Dank Frau Dr. rer. nat. Cornelia Wiegand für die hervorragende Betreuung und ihre Hilfe bei allen theoretischen und praktischen Fragestellungen. Zudem möchte ich Frau Sarah Fink für ihre Unterstützungsbereitschaft im Laboralltag danken, die mir wesentlich geholfen hat, diese Arbeit zu verfassen. Des Weiteren gilt mein Dank Frau PD Dr. rer. nat. et. med. habil. Uta-Christina Hipler für ihre freundliche und zeitnahe Unterstützung bei der Ausformulierung dieser Arbeit und ihre Unterstützung durch Bereitstellung von Nachschlagewerken im Laboralltag.

Zudem möchte ich mich beim gesamten Team des in-vitro Labors der Klinik für Hautkrankheiten des Universitätsklinikums Jena für die sehr freundliche Atmosphäre im Team und die große Hilfsbereitschaft bedanken, insbesondere bei Frau Martina Grebner.

Mein Dank gilt meiner Familie, die mich in meinem Werdegang in jedweder Hinsicht unterstützt und begleitet.

Abschließend danke ich Herrn Prof. Dr. med. habil. Peter Elsner für die Überlassung des Themas sowie der Klinik für Hautkrankheiten des Universitätsklinikums Jena für die Bereitstellung der Laborräume und der Versuchsmaterialien.

## 11.5 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben:

Klinik für Hautkrankheiten des Universitätsklinikums Jena:

1. Frau Dr. Cornelia Wiegand
2. PD Dr. rer. nat. et med. habil. Uta-Christina Hipler
3. Prof. Dr. med. habil. Peter Elsner

Institut für Medizinische Statistik, Informatik und Datenwissenschaften (Jena):

4. Dr. Theresa Götz

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Braunschweig, 18.01.2022

Markus Hinkelmann