Aus dem Institut für Hygiene und Umweltmedizin
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. habil. Axel Kramer
der Universitätsmedizin der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald

Antimikrobielle Wirksamkeit von kaltem Atmosphärendruckplasma drei verschiedener Quellen an Biofilmen auf Kunststoffoberflächen im Hinblick auf eine Anwendbarkeit zur Behandlung chronischer Wunden

Inaugural Dissertation
zur
Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Humanbiologie mit medizinischer Ausrichtung
(Dr. rer. med. Hum. Biol.)
der
Universitätsmedizin
der
Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald

Greifswald
2012

vorgelegt von: Rutger Matthes
geb. am: 05. 05. 1981

Die vorliegende Dissertation basiert auf folgenden Veröffentlichungen:

Hübner NO, Matthes R, Koban I, Rändler C, Müller G, Bender C, Kindel E, Kocher T, Kramer A (2010). Efficacy of Chlorhexidine, Polihexanide and Tissue-Tolerable Plasma against Pseudomonas aeruginosa Biofilms Grown on Polystyrene and Silicone Materials. *Skin Pharmacology and Physiology* 23 (suppl 1):28-34.

Matthes R, Koban I, Bender C, Masur K, Kindel E, Weltmann KD, Kocher T, Kramer A, Hübner NO (2012). Antimicrobial efficacy of an atmospheric pressure plasma jet against biofilms of Pseudomonas aeruginosa and Staphylococcus epidermidis. *Plasma Processes and Polymers* (im Druck, DOI: 10.1002/ppap.201100133)

Matthes R, Hübner NO, Bender C, Koban I, Horn S, Bekeschus S, Kocher T, Weltmann KD, Kramer A and Assadian O (2012). Efficacy of different carrier gases for barrier discharge plasma generation compared to chlorhexidine on the survival of Pseudomonas aeruginosa embedded in biofilm in vitro. *Skin Pharmacology and Physiology* (eingereicht, Nr. SPP2590).

Matthes R, Bender C, Schlüter R, Koban I, Bussiahn R, Reuter S, Weltmann KD, Kramer A (2012). Antimicrobial efficacy of air plasma in comparison of two surface barrier discharges against in vitro biofilms. *PLOS ONE* (eingereicht, Nr. PONE-S-12-48386).

Promotionskomitee:

Dekan:	Prof. Dr. med. dent. Reiner Biffar
1. Gutachter:	Prof. Dr. med. Axel Kramer
2. Gutachter:	Prof. Dr. rer. nat. Dr. h.c. Gregor Morfill
Tag der Disputation:	Donnerstag, den 20. Juni 2013
Ort, Raum:	Greifswald, Hörsaal Zahnklinik, Walter-Rathenau-Straße 42a

„Der Beginn aller Wissenschaften ist das Erstaunen,
dass die Dinge sind, wie sie sind.“ *Aristoteles*

Abkürzungsverzeichnis

A	Fläche / Oberfläche
Abb.	Abbildung
ACT	Acidum aceticum, Essigsäure
A. dest.	lat.: aqua destillata, destilliertes/deionisiertes Wasser
Ar	Argon
Ar+O_2	Argon mit Beimischung von molekularem Sauerstoff
Ar+H_2O	Mit Wasser erhöhte Gasfeuchtigkeit im Argon
ATCC	engl.: American Type Culture Collection (private, amerikanische Forschungseinrichtung und Ressourcen-Zentrum für die Entwicklung und Vertreibung von mikrobiologischen Standard-Referenz-Stämmen und Zellkulturen)
AWM	engl.: Artificial Wound Medium (künstliches Wundmedium)
CHX	Chlorhexidindigluconat
CLSM	engl. Confocal Laser Scanning Microscope (Konfokales Rasterlaser Mikroskop)
Conplas	Kunstwort für „Kontaktplasma“; Bezeichnung der SBD-Plasmaquelle
CS	„Chirurgenstahl“ / Edelstahl
CSA	Casein–Pepton–Sojamehlpepton-Agar
DBE	dielektrische Barriere-Entladung
DIN	Deutsche Institut für Normung e. V.
DNA	engl.: Deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
EDHF	engl.: Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor, ein hyperpolarisierender Faktor bzw. eine vasodilatorisch wirkende Substanz, des Endothels
EH	Bezeichnung der sog. Epoxidharz-Plasmaquelle
EN	Europäische Norm
EPS	extrazelluläre polymere Substanzen
FBS	engl.: Fetal Bovine Serum (fetales Kälberserum)
h	Stunde
H_2O	Wasser

H_2O_2	Wasserstoffperoxid
He	Helium
HH	Hemmhof / Wachstums-Hemmung der KbE aufgrund einer antimikrobiellen Behandlung
HH-∅	Hemmhof-Durchmesser
KbE	Koloniebildende Einheit(en), beschreibt jedes teilungsfähige Bakterium, welches auf dem Nähragar eine makroskopisch sichtbare Einheit bildete
kinpen09	Bezeichnung der Jet-Plasmaquelle
$\log_{10}$	dekadischer Logarithmus
MAT	mikrobieller Agartest
min	Minute
ml	Milliliter
NOS	engl.: (reactive) Nitrogen-Oxygen Species ([reaktive] Stickstoff-Sauerstoff-Verbindungen)
NCTC	engl.: National Collection of Type Cultures (britisches Ressourcen-Zentrum für standardisierte mikrobiologische Stämme und Zellkulturen)
µl	mikro-Liter
µM	mikro-Mol
MRSA	Methicillin resistenter Staphylococcus aureus
MTP	Mikrotiterplatte(n)
N_2	molekularer Stickstoff
nM	nano-Mol
O	atomarer Sauerstoff
O_2	molekularer Sauerstoff
$\cdot O_2^-$	Hyperoxid-Anion, früher: Superoxid-Anion
$^1O_2$	Singulett-Sauerstoff
$^1\triangle_g O_2$	Delta-Singulett-Sauerstoff
O_3	Ozon
OCT	Octenidin
OD	optische Dichte
$\cdot OH$	Hydroxylradikal

$ONOO^-$	Peroxynitrit
PC	Polycarbonat
PDGF	engl.: Platelet-derived growth factor (steht für eine Gruppe verschiedener Wachstumsfaktoren)
P. aeruginosa	Pseudomonas aeruginosa SG81
PHMB	Polyhexametylenbiguanid / Polihexanid
PMMA	Polymethylmethacrylat
PS	Polystyrol
REM	Raster-Elektronen-Mikroskop
RF	Reduktionsfaktor(en)
RNS	engl.: Reactive Nitrogen Species (reaktive Stickstoff-Verbindungen)
ROS	engl.: Reactive Oxygen Species (reaktive Sauerstoff-Verbindungen)
S. aureus	Staphylococcus aureus ATCC 6538
σ	(grich. Sigma) Standardabweichung
SBD	engl.: Surface Barrier Discharged (Oberflächen-Barriere-Entladung)
S. epidermidis	Staphylococcus epidermidis RP62A (ATCC 35984)
Tab.	Tabelle
TCHS	Abkürzung für den Inaktivator mit Tween, Cystein, Histidin, Saponin
$TLHT_E$	Abkürzung für den Inaktivator mit Tween, Lecithin, Histidin, Natriumthiosulfat und Natriumhydroxid
TSLS	Abkürzung für den Inaktivator mit Tween, Saponin, Lecithin, SDS
TTP	englisch: Tissue Tolerable Plasma (gewebeverträgliches Plasma)
SDS	engl.: Sodium Dodecyl Sulfate (Natriumlaurylsulfat)
Si	Silikon (synthetisches Polymer, verwendet als Biofilm-Substrat)

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung 1

1.1 Biofilme und biofilmassoziierte Krankenhausinfektionen 1

1.2 Aktuelle Behandlungsstrategien für biofilmassoziierte Infektionen und gegen mikrobielle Kolonisation 3

1.3 Generierung von physikalischem Plasma zur medizinischen Anwendung 3

1.3.1 Kriterien von Tissue Tolerable Plasmen (TTP) 7

1.3.2 Biologische Wirkmechanismen von TTP 8

1.4 Zielstellung der Arbeit 9

2 Eigene Untersuchungen 11

2.1 Material und Methoden 11

2.1.1 Verwendete Medien und Lösungen 11

2.1.1.1 Nährmedien und Supplemente 11

2.1.1.2 Wasch- und Verdünnungslösungen 12

2.1.1.3 Inaktivatorlösungen 12

2.1.1.4 Antiseptika 12

2.1.2 Verwendete Testorganismen 14

2.1.3 Verwendete Oberflächenmaterialien für die Biofilmkultivierung 14

2.1.4 Mikrobiologische Kultivierung 15

2.1.4.1 Stammhaltung 15

2.1.4.2 Kultivierung der Biofilme 15

2.1.5 Mikrobiologische Untersuchungsmethoden 16

2.1.5.1 Erregerzahl im Biofilm 16

2.1.5.2 Bestimmung der optimalen Plasmaparameter 16

2.1.5.3 Qualitative Untersuchungsmethoden mit Fluoreszenz-Farbstoffen . . . 17

2.1.5.4 Mikroskopische Methoden 17

2.1.6 Verwendete Plasmaquellen und Trägergase . . . 17
2.1.7 Weitere Messsysteme . . . 18
2.1.8 Methoden zu den weiterführenden Untersuchungen in Hinblick auf die Behandlung chronischer Wunden . . . 18
2.1.8.1 Plasmaanwendung auf rekonstruierter humaner Epidermiskultur . . . 18
2.1.8.2 Antimikrobielle Effekte von Plasma und Antiseptika in Kombination . 19
2.1.8.3 Vergleich der Plasmawirkung in einem „abgeschirmten“ und einem „offenen“ System . . . 19
2.1.8.4 Untersuchung des Plasma-Gas-Gemischs . . . 19
2.1.8.5 Bakterielle Plasma-Resistenzentwicklung (Kurzzeit-Test) . . . 20
2.2 Ergebnisse . . . 22
2.2.1 Vor- bzw. ergänzende Untersuchungen zur antimikrobiellen Wirksamkeit der Plasmaquellen gegen „planktonische“ Bakterien . . . 22
2.2.1.1 Bestimmung der optimalen Behandlungsparameter . . . 22
2.2.2 Zusammenfassung der Untersuchungen zur antimikrobiellen Wirkung von Plasmen an Biofilmen . . . 26
2.2.2.1 kinpen09 (Plasma-Jet) mit Argon und Argon + O_2 -Plasma . . . 27
2.2.2.2 Conplas-Plasmaquelle mit Argon, Argon + O_2 und feuchtem Argon -Plasma . . . 28
2.2.2.3 Epoxidharz- und Conplas-Plasmaquelle mit Luftplasma . . . 29
2.2.2.4 Wirksamkeit von Argonplasma des kinpen09 an Biofilmen auf verschiedenen Oberflächen . . . 29
2.2.3 Weiterführende Untersuchungen in Hinblick auf die Behandlung chronisch infizierter Wunden mit TTP . . . 30
2.2.3.1 Antimikrobielle Effekte und Eindringtiefe von Bakterien auf rekonstruierter humaner Epidermiskultur . . . 30
2.2.3.2 Antimikrobielle Wirksamkeit bei kombinierter Anwendung von Plasma und Antiseptika . . . 31
2.2.3.3 Vergleich der Plasmawirkung in einem „abgeschirmten“ und einem „offenen“ System . . . 32
2.2.3.4 Antimikrobielle Wirksamkeit des Plasma-Gas-Gemischs mit und ohne O_2-Beimischung . . . 32

2.2.3.5 Voruntersuchung einer möglichen Resistenzentwicklung gegen Plasma (Kurzzeit-Test) . . . 33

3 Diskussion 35

3.1 Methoden . . . 35

3.2 Ergebnisse . . . 37

3.3 Resümee der untersuchten Plasmaquellen in Hinblick auf eine Wundbehandlung . . . 51

4 Weiterführende Gedanken 56

5 Zusammenfassung 58

6 Summary 60

Literaturverzeichnis 62

Anhang 82

A 83

Publikationsverzeichnis Rutger Matthes . . . 83

Eidesstattliche Erklärung . . . 87

Danksagung . . . 89

Zugehörige Publikationen . . . 92

Abbildungsverzeichnis

1 1,1-Hexamethylenbis[5-(4-chlorphenyl)biguanid] 12
2 N-Octyl-1-[10-(4-octyliminopyridin-1-yl)decyl]pyridin-4-imin 13
3 Poly[iminocarbonylimidoyl-Iminocarbonylimidoylimino 1,6-hexandiyl]-hydrochlorid) 13
4 Ethansäure 14
5 Testaufbau des kinpen09 zur Bestimmung der antimikrobiellen Wirkung des Plasma-Gas-Gemischs in einer Distanz von 55 cm an Erregern auf Blutagar. 20
6 Wachstumshemmung von *P. aeruginosa* auf Casein-Soja-Agar nach 120 s Argonplasma-Behandlung mit der Conplas-Plasmaquelle bei den Abständen zwischen Elektrode und Agar von 2, 4 und 6 mm im Vergleich zur Argongas-Kontrolle (GK). 23
7 Wachstumshemmung von *P. aeruginosa* auf Casein-Soja-Agar nach Argonplasma-Behandlung mit der Conplas-Plasmaquelle im Abstand zwischen Elektrode und Agar von 2 mm. Die Behandlungszeiten betrugen 10, 30, 60 und 120 s. 23
8 *S. epidermidis* nach 10 s und 60 s (links) und *P. aeruginosa* nach 30 s und 60 s (rechts) Argonplasma-Behandlung mit der EH-1 auf Casein-Soja-Agar im Abstand von 2 mm zwischen Elektrode und Agar. 26
9 *P. aeruginosa* auf Casein-Soja-Agar nach 60 s Argonplasma-Behandlung mit der EH-1- (links) und EH-2- (rechts) Plasmaquelle im Abstand von 2 mm zwischen Elektrode und Agar. 26
10 Reduktion von *S. aureus* ATCC 6538 Biofilm auf Polystyrol anhand des Mittelwerts (MW) und der Reduktionsfaktoren (RF) in $\log_{10}$ (KbE/cm^2) nach wiederholter Plasma-Behandlung (kinpen09, Ar, 20 s, Abstand: 10 mm) nach 1, 2, 3, 5 und 6 h. 34

11 REM-Aufnahme morphologisch geschädigter Zellen von Biofilmen auf Polycarbonat nach 300 s Behandlungszeit mit Luftplasma, A: *P. aeruginosa* SG81 (7000x) exponiert mit der Conplas-Plasmaquelle, B: *S. epidermidis* RP62A (10000x) exponiert mit der Epoxidharz-Plasmaquelle 41

Tabellenverzeichnis

1 Wachstumshemmhöfe nach punktförmiger Plasmabehandlung von *P. aeruginosa* SG81 auf Casein-Soja-Agar mit dem kinpen09 (Argon, Abstand 10 mm) nach 5, 10, 20, 30 und 60 s. 23

2 Wachstumshemmhöfe nach punktförmiger Plasmabehandlung mit dem kinpen09 (Argon mit und ohne 0,1 %, 0,5 % und 1 % N_2-sowie 1 % Luftbeimischung; Abstand 10 mm) von *P. aeruginosa* SG81 und *S. aureus* ATTC 6538 auf Blutagar (ca. 176 KbE/cm^2) nach 60 und 120 s Exposition. 24

3 Vergleich der Wirksamkeit des kinpen09 (Abstand 10 mm) mit Argon- und Argon +1%O_2-Plasma an Biofilmen auf Polycarbonat mit *P. aeruginosa* SG81 und *S. epidermidis* RP62A nach 60 und 300 s Behandlungszeit; Reduktionsfaktor (RF) und Standardabweichung (σ) in $\log_{10}$ KbE/cm^2. 27

4 Vergleich der Wirksamkeit von Argon-, Argon+1 % O_2- und feuchtem Argon-Plasma nach 60 und 300 s Behandlungszeit mit der Conplas-Plasmaquelle an Biofilmen von P. aeruginosa SG81 (Abstand 2 mm); Reduktionsfaktor (RF) und Standardabweichung (σ) in $\log_{10}$ KbE/cm^2 28

5 Vergleich der Wirksamkeit von Luftplasma der Conplas- und Epoxidharz-Plasmaquelle an Biofilmen mit *P. aeruginosa* SG81 und *S. epidermidis* RP62A nach 60, 300 und 600 s Behandlungszeit im Abstand von jeweils 2 mm; Reduktionsfaktor (RF) und Standardabweichung (σ) in $\log_{10}$ (KbE/cm^2). 29

6 Vergleich der antiseptischen Wirksamkeit von Argonplasma des kinpen09 (Abstand 10 mm) an *P. aeruginosa* SG81- Biofilmen auf den Substraten Polystyrol (PS), Polycarbonat (PC), Polymethylmethacrylat (PMMA) und Stahl (CS) nach 60 s bzw. mit 0,1 % CHX nach 600 s Behandlungszeit mit der unbehandelten Kontrolle anhand der Mittelwerte (MW), Reduktionsfaktoren (RF) und Standardabweichung (σ) in $\log_{10}$ (KbE/cm^2) mit Probenzahl (n). 30

7 Vergleich der antiseptischen Wirksamkeit von Argonplasma des kinpen09 (Abstand 10 mm) an *P. aeruginosa*, *S. aureus* und *S. epidermidis* an aufgetragener Suspension und an *P. aeruginosa*- und *S. aureus* - Biofilmen auf rekombinierter humaner Epidermis nach 60 s mit Argongas und der unbehandelten Kontrolle anhand der Reduktionsfaktoren (RF) und der Standardabweichung (σ) in $\log_{10}$ (KbE/cm^2) mit Probenzahl (n). 31

8 Antimikrobielle Wirksamkeit des Plasma-Gas-Gemischs des kinpen09 mit 0,1 %, 0,5 % und 1 % O_2-Beimischung zu Argon nach einer Distanz von ca. 55 cm an *P. aeruginosa*, *S. aureus* und *S. epidermidis* auf Blutagarplatten anhand der Reduktionen der KbE in $\log_{10}$ (KbE/cm^2) oder als Beschreibung mit R (eine Reduktion der KbE war erkennbar, aber nicht auswertbar), kR (keine Reduktion der KbE erkennbar) und HZ (eine Wachstumshemmzone mit reduzierter KbE-Zahl ist erkennbar). Die Ausgangskoloniezahl auf dem Agar betrug 176 KbE/cm^2. 33

Kapitel 1

Einleitung

1.1 Biofilme und biofilmassoziierte Krankenhausinfektionen

Mikroorganismen können an nahezu allen Oberflächen adhärieren und unter geeigneten Bedingungen (Feuchtigkeit, Nährstoffe, aerob/anaerobes Milieu) einen Biofilm aus extrazellulären polymeren Substanzen (EPS), bestehend v. a. aus Polysacchariden und Proteinen, produzieren. Biofilme, meist durch verschiedene Spezies gebildet, kommen ubiquitär in der Natur, in künstlichen Lebensräumen sowie in und am Körper von Tier und Mensch vor. Die EPS-Matrix bietet den Mikroorganismen einen von der Umwelt abgegrenzten Lebensraum und ermöglicht einen besseren Schutz vor Austrocknung, antibiotisch und antimikrobiell wirksamen Substanzen oder vor dem Immunsystem [1]. Die Mechanismen, die Mikroorganismen in Biofilmen widerstandsfähiger machen, sind u. a. die Herabsetzung der Diffusion chemischer Substanzen in die Biofilmmatrix, der Übergang der Mikroorganismen in verschiedene metabolische Zustände - in aktive Zellen und inaktive Zellen (sog. Persister) -, eine mögliche metabolische „Arbeitsteilung“ zwischen den verschiedenen Spezies, die Förderung des Austauschs von Resistenzgenen oder auch der Erhöhung der Mutationsrate, die durch die Kommunikation innerhalb der Biofilmpopulation (Quorum sensing) mit reguliert werden [1, 2, 3, 4]. Bilden sich Biofilme auf erkranktem oder geschädigtem Gewebe, stellt die Fähigkeit zur Biofilmbildung einen besonderen Pathogenitätsfaktor der Erreger dar, der den Heilungsprozess z. B. durch Toxinbildung behindert [5, 6].

Die Bildung von Biofilmen auf Medizinprodukten, z. B. auf Implantaten und an Katheter, ist nicht vollständig vermeidbar und kann zu folgenschweren nosokomialen Infektionen führen. In Deutschland tritt pro Jahr bei ca. 400-600 Tsd. Patienten

eine nosokomiale Sekundärerkrankung durch Krankenhauspathogene auf [7], wovon ca. 71 % durch Bakterien hervorgerufen werden [8].

Eine weitere u. U. schwer therapierbare Situation ist die Bildung von Biofilmen auf Wunden. Überwiegt die destruktive Komponente durch die bakterielle Wundbesiedlung, z. B. durch Freisetzung von mikrobiellen Proteasen oder der Stimulation neutrophiler Granulozyten oder Monozyten, die wiederum Proteasen, proinflammatorische Zytokine und Sauerstoffradikale freisetzen, gegenüber der Geweberegeneration, kann der Wundheilungsprozess chronifizieren [9]. Im „Expertenstandard zur Pflege von Menschen mit chronischen Wunden“ wird geschätzt, dass allein in Deutschland etwa 3 - 4 Millionen Menschen mit chronischen Wunden leben. Die häufigsten Formen sind Dekubitus, Diabetisches Fußsyndrom und gefäßbedingtes *Ulcus cruris* [10].

Häufige Erreger sogenannter Device-assoziierter Infektionen sind *Staphylococcus epidermidis* und *Staphylococcus aureus* sowie *Enterococcus faecalis* [11]. Typische Erreger in chronischen Wunden sind v. a. *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* und verschiedene *Streptococcus* spp. [12], wobei multiresistente Bakterienspecies an Bedeutung gewinnen [13]. Dadurch wird die Behandlung noch schwieriger [14].

Biofilm-assoziierte Infektionen sind sowohl bezüglich der Prävention als auch bezüglich der Therapie eine Herausforderung für die moderne Medizin [15]. Das gilt auch für Wunden, obwohl diese im Unterschied zu Implantaten direkt zugänglich sind, da es *in praxi* nur schwer beurteilbar ist, welche Wunden sich in Richtung Wundinfektion entwickeln [16]. Bei der infizierten chronischen Wunde wird der Behandlungserfolg durch die Zytotoxizität von Antibiotika und Antiseptika [17, 18, 19] sowie die Möglichkeit einer Resistenzförderung [20] und der Stimulation einer Biofilmbildung [21, 22] limitiert. Daher werden neue innovative Behandlungsstrategien gegen Biofilme benötigt. Das Feld der Plasmamedizin eröffnet hierfür neue Ansatzpunkte.

1.2 Aktuelle Behandlungsstrategien für biofilmassoziierte Infektionen und gegen mikrobielle Kolonisation

Zur Behandlung von lokalen Wundinfektionen einschließlich -biofilmen werden überwiegend Antiseptika wie Octenidin, Polihexanid, PVP-Iod und Silberionen als Spüllösung oder Gel bzw. an Wundauflagen gebunden eingesetzt [23, 24]. Ebenso werden Chelatbildner wie Laktoferrin und Ethylendiamintetraacetat (EDTA) angewandt, um die EPS-Struktur der Biofilme und das Attachement zu stören [25]. Eine Spaltung der Biofilmmatrix an Oligosacchariden mit N-Actelyglucosamin-Verbindungen kann durch die katalysierte Hydrolyse durch Dispersin B die Ablösung des Biofilms und die Wirkung antiseptischer Wirkstoffe unterstützen [26, 27]. Im Kathetersystem wurde eine erfolgreiche Lyse der Erreger in Biofilmen durch Bakteriophagen demonstriert [28, 29]. Ebenfalls wurden chemische Verbindungen zur Regulierung des Quorum sensing über Analoge des Autoinduktors 2 patentiert, um die Biofilmbildung zu hemmen [30]. Ferner werden medizinischer Honig [31] und Fliegenlarven zur Wundantiseptik eingesetzt [32, 33]. Soweit möglich, muss in allen Fällen der mechanische Abtrag des Biofilms (Debridément) und die Wundbett-Vorbereitung erfolgen [34]. Das Debridément ist die effektivste Methode, Biofilme zu entfernen, die körpereigenen Regerationsprozesse zu mobilisieren und darauffolgende Therapien zu unterstützen [35]. Beschichtungen mit Silber- oder Kupferionen, Antibiotika oder Antiseptika sind aktuelle Forschungsschwerpunkte, um die mikrobielle Besiedlung von Implantaten durch Mikroorganismen zu unterdrücken [36]. Antibiotika werden systemisch zur Inaktivierung bakterieller Biofilme eingesetzt, sind jedoch aufgrund reduzierter Wirksamkeit an Biofilmen und bei Vorliegen resistenter Erreger in ihrem Einsatz eingeschränkt [24].

1.3 Generierung von physikalischem Plasma zur medizinischen Anwendung

Das Wort „Plasma“ als physikalisches Phänomen wurde ca. 1928/29 von seinem Erstbeschreiber Irving Langmuir geprägt [37]. Physikalisches Plasma ist ein teilweise oder vollständig ionisiertes Gas mit freien Elektronen [38]. Es entsteht durch

Energiezufuhr und der damit verbundenen Anregung von Atomen und Molekülen eines zuvor neutralen Gases. Diese emittieren Photonen, was zu einem Leuchten führt [38]. Der Anteil der Ladungsträger im Gas kann wenige Promille bis 100 % betragen [39]; seine Gesamtheit wird als Plasma bezeichnet [38]. Der Plasmazustand wird in die Kategorie der nichtklassischen Aggregatzustände eingeordnet, da er nicht nur von Druck und Temperatur abhängt [40]. Er wird dennoch oft aufgrund seines physikalischen Charakters als die Fortsetzung des klassischen 3. (gasförmig) als energetisch höherer 4. Aggregatzustand bezeichnet [38]. Typische Beispiele für physikalische Plasmen in der Natur sind Flammen von Verbrennungsprozessen, Gewitterblitze oder Sterne. Plasmen in der Natur sind meist mit mehreren hundert, tausend oder gar Millionen Kelvin sehr heiß [39].
Künstlich erzeugte Plasmen mit hoher Temperatur oder im Niederdruckbereich bzw. Vakuum finden vor allem in der Industrie zur Oberflächenveränderung, Beschichtung von Materialien, zum Schweißen und zur Lichterzeugung Verwendung [39].

In der Plasmamedizin werden „kalte“ Plasmen benötigt, die Kunststoffmaterialien oder vitales Gewebe nicht schädigen. „Kalte“ Plasmen werden sowohl bei Niederdruck als auch bei Atomsphärendruck mittels elektrostatischer oder elektromagnetischer Felder vor allem durch Stoßionisation mit Elektronen erzeugt, bei der die Temperatur der Schwereteilchen des Plasma-Gas-Gemischs im Gegensatz zu den freien Elektronen, die 10^4-10^5 K betragen kann, moderat bleibt (nicht-thermische Plasmen) [41, 42].

Zur Abgrenzung zu anderen Naturerscheinungen, die ebenfalls mit dem Wort „Plasma“ bezeichnet werden können, sind in dieser Arbeit ab dem folgenden Kapitel alle Begriffe mit „Plasma“ ohne zusätzlicher Bezeichnung ausschließlich auf elektromagnetische Atmosphärendruckplasmen von Gasen bezogen. Mit dem Begriff „Effluent“ ist im Weiteren das sichtbare Plasma bzw. das sichtbare Plasma-Gas-Gemisch an der Plasmaaustrittsöffnung oder in unmittelbarer Nähe der Elektrode gemeint.

Die Plasmamedizin ist eine moderne, interdisziplinäre Wissenschaft, die die biologischen Effekte des Plasmas für den Einsatz in der Medizin untersucht [43]. Die Entdeckung bzw. die erste Publikation biologischer Effekte von Gasentladungen er-

folgte bereits in den späten 1850er Jahren. Siemens generierte mit Plasma Ozon, um Wasser zu dekontaminieren [44]. In den 1980er Jahren gab es erste Patente zur Sterilisation mittels Plasma und seit Mitte der 1990er Jahre wird Plasma systematisch für die medizinische Anwendung untersucht [44]. Seine antimikrobielle Wirkung wurde vielfach für verschiedene Bakterienspezies [45, 46], für Bakteriensporen [47] und für Pilze [48] beschrieben, ebenso die Anwendbarkeit auf der Haut und die Geweberegeneration fördernde Eigenschaft [49]. Die Inaktivierung von Viren und Prionen mittels Plasma konnte ebenfalls demonstriert werden [50, 51].

Mit Hilfe der Plasmamedizin sollen herkömmliche Behandlungs- oder Herstellungsverfahren optimiert oder neue Strategien entwickelt werden. Es können folgende wesentliche Bereiche unterschieden werden:

A) Plasmaanwendungen an abiotischen Oberflächen (indirekt medizinische Anwendungen) zur Vorbehandlung für klinische Anwendungen:

   i Sterilisation und Desinfektion abiotischer Oberflächen mittels Plasma [52].

   ii Oberflächenmodifikationen, um physikochemische Eigenschaften der Oberfläche, die einen direkten Einfluss auf das Verhalten biologischer Systeme haben oder für weitere Oberflächenmodifikationen dienen, definiert zu verändern, meist durch Änderung von Oberflächenladungen oder der Hydrophilität (z. B. bei Implantaten) [53, 54] mittels Plasmatechnologie (Plasmapolymerisation) bioaktive Materialoberflächen zu generieren; dabei ist es möglich, nur wenige Nanometer starke Beschichtungen auf Oberflächen aufzutragen (z. B. auf Kontaktlinsen) [55]. Ziele der Oberflächenveränderungen sind die Veränderung der Adhäsivität von Zellen oder organischer Substanzen bzw. eine antimikrobielle Beschichtung, um mikrobielle Besiedelungen zu verhindern und die Integration eines Devices in im oder am Körper zu regulieren [54, 55].

   iii Plasmaätzen, ein destruktiver Vorgang, um Schichten rückstandslos abzutragen (z. B. dentale Plaqueentfernung) [56].

B) Plasmaanwendungen an biotischen Oberflächen (direkte medizinische Anwendungen), die an eröffneten Bereichen oder auf der Körperoberfläche erfolgen

können und insbesondere der Wundheilung und Entzündungsmodulation dienen. Folgende Bereiche sind Zielsetzungen der Plasmamedizin:

i Antiseptik und Inaktivierung mikrobieller Biofilme durch Störung der Membranintegrität aufgrund von Änderungen des Membranpotentials und der Peroxidation von Lipiden, DNA-Schädigungen durch UV-Strahlung oder reaktiven Produkten sowie durch Oxidation der EPS [57, 58].

ii Lokale Inaktivierung von Tumorzellen/-gewebe durch Störung der Zellmembran und des Stoffwechsels oder Unterbindung der Blutversorgung [57]und der Überführung in die Apoptose [59, 60].

iii Abtrag von Gewebe und Biofilmen durch „Abätzen“ organischer Verbindungen [61, 62].

iv Förderung der Wundheilung/Beeinflussung des Immunsystems durch moderate Aktivierung akuter Entzündungsreaktionen möglicherweise durch Aktivierung primärer Wundheilungskaskaden und Apoptose defekter Zellen über intrazelluläre Second Messengers [63]; ferner werden eine Stimulation von Immunzellen [49, 57] sowie die Förderung der Proliferation von Fibroblasten und der Gefäßneubildung als Ursachen diskutiert [64].

v Förderung der Wirkstoffpenetration und -Wirkung durch den Einfluss auf Zellverbände und Membranen [65, 66].

Zur Generierung von Atmosphärendruckplasma für den medizinischen Bereich werden drei wesentliche Verfahren angewendet: direktes, indirektes und sog. Hybridplasma. Das Plasma wird als direkt bezeichnet, wenn die Gegenelektrode zur dielektrisch behinderten Elektrode das zu behandelnde Substrat, z. B. die Wunde, ist; dann erfolgt ein Stromfluss über den Körper oder Gegenstand. Ein Plasma wird indirekt bezeichnet, wenn die Gasentladung zwischen zwei durch eine Barriere (Dielektrikum) getrennten Elektroden stattfindet, die hierbei eine gemeinsame Oberfläche bilden. Ein Hybridplasma wird wie ein direktes Plasma generiert, jedoch wird hier der elektrische Strom über ein leitendes Netz, das einen geringeren elektrischen Widerstand als das zu behandelnde Substrat z. B. die Haut aufweist, abgeleitet [42]. Hybridplasmen werden daher oft ebenfalls als indirektes Plasma bezeichnet. Eine häufige Einteilung der Gasplasmen erfolgt anhand der Frequenz:

dc (direct current, Gleichstrom), ac (alternating current, Wechselstrom), rf (radio frequency, Hochfrequenz) und mc (microwave, Mikrowellenfrequenz), sowie anhand der Pulsung (gepulst oder ungepulst/kontinuierlich) und der verschiedenen Trägergase, die zur Plasmagenerierung eingesetzt werden. Eine weitere Unterscheidung von Plasmaquellen kann bezüglich der Entladungsform erfolgen, ob z. B. ein Lichtbogen, eine Koronarentladung oder aufgrund eines Dielektrikums zwischen beiden Elektroden (DBE) eine sog. stille Entladung entsteht. Genaue Beschreibungen zu verschiedenen Plasmaquellen sind veröffentlicht [67, 68, 69, 70]. Bei Plasma-Jets findet die Gasentladung zwischen zwei Elektroden statt und das Plasma wird im Gasstrom nach außen getrieben; daher wird es als indirektes Plasma bezeichnet. Bei Oberflächen-DBE Plasmaquellen gibt es Formen, die ein direktes oder ein indirektes Plasma erzeugen. Viele Plasmaquellen für verschiedene Applikationen wurden entwickelt und beschrieben [67, 71, 72, 73].

Plasmaanwendungen im und am Körper setzen die Anwendung von gewebeverträglichen Plasmen - „Tissue Tolerable Plasmen“ - voraus.

1.3.1 Kriterien von Tissue Tolerable Plasmen (TTP)

Um die Gewebeverträglichkeit von Plasma sicherzustellen, wird im Allgemeinen vorausgesetzt, dass es unter Normaldruckbedingungen anwendbar ist, die Temperatur des Plasma-Gas-Gemisches während der Behandlung etwa Körpertemperatur betragen [49] und die UV-Belastung vernachlässigbar gering ist. Es sollten keine spontanen direkten Entladungen über das Gewebe erfolgen, da diese in Abhängigkeit vom Aufbau bzw. den physikalischen Parametern der Plasmaquelle aggressiv mit dem Gewebe reagieren und ein erhöhter Stromfluss durch den Patienten erfolgt. Im Speziellen darf mit der Plasmabehandlung keine akute oder chronische Toxizität für das Gewebe verbunden sein einschließlich fehlender Mutagenität und Karzinogenität der Reaktionsproduktedes Plasmas. Falls akute Entzündungsreaktionen induziert werden sollen, z. B. bei der Behandlung chronischer Wunden, müssen diese moderat verlaufen. Eventuell auftretende Zell- und Gewebeschädigungen müssen reversibel sein. Ferner sollte die Plasmabehandlung schmerzfrei verlaufen, um als Therapiealternative von Patienten angenommen zu werden und ein möglicher Stromfluss

durch den Körper muss entsprechend begrenzt sein, um z. B. eine Destabilisierung lebenswichtiger elektrischer Geräte, z. B. Herzschrittmacher zu verhindern.

1.3.2 Biologische Wirkmechanismen von TTP

Die energetisch angeregten Atome, Ionen und freien Elektronen erzeugen je nach Gaszusammensetzung weitere verschiedene reaktive Verbindungen, Radikale und energiereiche elektromagnetische Strahlung, die in ihrer Gesamtheit eine komplexe Wirkung an lebenden Systemen hervorrufen oder Oberflächen auch destruktiv (Plasmaätzen) oder nichtdestruktiv (Änderungen von Oberflächenladungen) modifizieren. Durch ROS, NOS und RNS, die v. a. durch Reaktion mit Luft, Wasser und chemischen Verbindungen am Target entstehen, werden die Aktivierung von intrazellulären Signalkaskaden, Oxidationsprozesse an Membranlipiden, Strukturänderungen an Proteinen und DNA als Ursache der antimikrobiellen Wirkung diskutiert [57]. Elektromagnetische Strahlung im UV-Bereich verändert Proteinstrukturen und fördert den Verlust von DNA-Basen, durch die Bildung von Quervernetzungen [74]. Daher sollte die UV-Belastung bei TTP vernachlässigbar gering sein. Ebenso spielt die Entwicklung von Wärme für die biologischen Reaktionen eine Rolle und beeinflusst die Gewebeverträglichkeit und Aktivierung von Stoffwechselprozessen und somit die Wundheilung. Hierfür ist die durchschnittliche Teilchenbewegung insbesondere der Schwereteilchen des Plasma-Gas-Gemischs entscheidend [41].
Maßgeblich für die Reaktionsprodukte am Target ist das Vorhandensein von Wasser [75], insbesondere für ROS wie $\cdot OH$, O, $^1O_2$ und H_2O_2 [76], die entscheidend für die antimikrobielle Wirkung verantwortlich sein sollen [57]. Im Plasma-Gas-Gemisch entstehen zudem wichtige biologisch reaktive Sauerstoffverbindungen wie O_3, $\cdot O_2^-$ und $^1O_2$ durch Folgereaktionen nach der Dissoziation von O_2 zu O und bei Anwesenheit von N_2 zu NO, NO_2 und weiteren RNS/NOS, die ebenfalls selbst oder synergistisch zu ROS antimikrobiell wirken [77]. Eine durch Plasma hervorgerufene Acidität spielt aufgrund der meist vorhandenen Puffersysteme für die antimikrobiellen Effekte eine untergeordnete Rolle und hat eher eine modulierende Wirkung [78, 79].
Für die Wundheilung ist eine ausgewogene Balance der ROS, NOS und RNS entscheidend. Wichtige Produkte hierfür sind z. B. das als EDHF vasodilatorisch

wirkende H_2O_2 [80] das u. a. auch die Zell-Migration und -Proliferation durch eine Stimulation der Protein-Phosphorylierung (z. B. bei PDGF) beeinflusst [81, 82]. Das $\cdot OH$ ist ein Second Messenger bei der T-Zell-Aktivierung [83] und induziert Apoptose [84]. Stickstoffmonoxid wirkt vasodilatorisch, beeinflusst den Sauerstoffverbrauch im Gewebe [77], fördert die Angiogenese, beeinflusst Zellproliferation, Zelldifferenzierung, Apoptose [85] und kann indirekt über die Hemmung der T-Zellen-Aktivität [86] immunsuppresiv wirken oder durch Entstehung von $ONOO^-$, das die Freisetzung des „fibroblast growth factor“ und somit die Gefäßneubildung und Proliferation von Fibroblasten stimulieren kann [87].

1.4 Zielstellung der Arbeit

Bisherige Methoden zur Behandlung chronisch infizierter Wunden und die schwer kontrollierbare Gefahr einer Infektion bei Einsatz von Medizinprodukten am und im Körper sowie die mit der Ausbreitung multiresistenter Bakterien verbundenen therapeutischen Limitierungen erfordern wirksamere oder ergänzende Methoden zur Behandlung von chronischen Wunden bzw. zur Infektionsprävention bei Implantation von Fremdmaterial. Die Plasmamedizin eröffnet hierfür neue Strategien in der Human- und Veterinärmedizin. Die Inaktivierung mikrobieller Biofilme insbesondere durch komplikationsreiche nosokomiale bakterielle Erreger ist ein wichtiger Kernbereich. Daher werden verschiedene Plasmaquellen auf ihre antibakterielle Effizienz, Gewebeverträglichkeit und Anwendbarkeit überprüft. In der vorliegenden Arbeit werden v. a. die Inaktivierung von Biofilmen auf abiotischen Oberflächen zur Dekontamination von Materialien im medizinischen Bereich (Verpackung, Katheter, Implantate), aber auch auf biotischen Oberflächen mit dem Fokus einer Plasmaanwendung auf bzw. an Wunden untersucht. Hierzu wurden ein Plasma-Jet und zwei verschiedene Oberflächen-DBE Plasmaquellen mit unterschiedlichen Gaszusammensetzungen an bakteriellen Biofilmen auf künstlichen und z. T. biotischen Oberflächen geprüft. Die Arbeit wurde im Rahmen des Campus PlasmaMed, einem BMBF finanzierten Projekt (Nr. 13N9779 und 13N11181) unter der Leitung einer der beiden Projektsprecher, Prof. Dr. med. Axel Kramer, im Modul PlasmaCure, Projektbereich PlasmaBiozid durchgeführt. In PlasmaBiozid wird neben den antimikrobiellen

Wirkungen von Plasma an Biofilmen die Gewebeverträglichkeit an Zell-Epidermis-Äquivalenten und im HET-CAM der Plasmaquellen untersucht. Die gewonnenen Parameter sollen einen TTP-Quellen-Prototyp für den klinischen Einsatz in Zusammenarbeit mit den anderen Projektpartnern von PlasmaCure und dem gesamten Campus spezifizieren und optimieren.

Kapitel 2

Eigene Untersuchungen

Die für die Untersuchungen verwendeten Materialien sind in den zugehörigen Veröffentlichungen benannt, eine ergänzende Liste zu nicht-veröffentlichten Untersuchungen folgt und fasst die verwendeten Materialen zusammen.

2.1 Material und Methoden

2.1.1 Verwendete Medien und Lösungen

2.1.1.1 Nährmedien und Supplemente

- CSA (40 g/L CASO-Agar [Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland])
- CSL (CASO-Bouillon [Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland])
- Tween 80 (Serva, Heidelberg, Deutschland)
- Saponin (Serva, Heidelberg, Deutschland)
- Histidin (Serva, Heidelberg, Deutschland)
- Cystidin (Merck, Darmstadt, Deutshland)
- Lecithin (Serva, Heidelberg, Deutschland)
- Natriumthiosulfat (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Natriumhydroxid (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- Natriumchlorid (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- Schafblutagar (BD, Heidelberg, Deutschland
- Minimal Essential Medium mit Earle‘s Salts und L-glutamine (MEM, PAA Laboratories, Cölbe, Deutschland)
- Fetales Rinderserumalbumin (Fetal Bovines Serum Gibco, Life Technologies Corporation, USA)

2.1.1.2 Wasch- und Verdünnungslösungen

Natriumchloridlösung (NaCl, 0,9 %; Eigenproduktion) Phosphatpuffer-Lösung (DPBS, Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, Gibco, Life Technologies Corporation, USA)

2.1.1.3 Inaktivatorlösungen

Diese Lösungen dienen zum Inaktivieren der antimikrobiellen Wirkung von in die Erregersuspension übertragenen Wirkstoffreste der geprüften Antiseptika:

- Lipofundin® MCT 20 % (B|Braun, Melsingen, Deutschland)
- TCHS: 30 g/L CSL, 30 g/L Tween 80, 30 g/L Saponin, 1 g/L Cystein, 1 g/L Histidin
- TSLS: 9 g/L NaCl, 40g /L Tween 80, 30 g/L Saponin, 4 g/L Lecithin, 10 g/L SDS
- $TLHT_E$: 30 g/L CSL, 30 g/L Tween 80, 3 g/L L-Lecithin, 1 g/L Histidin, 5 g/L Natriumthiosulfat, 0,025 mol/L Natriumhydroxid.

2.1.1.4 Antiseptika

Chlorhexidindigluconat

Chlorhexidin (Sigma, München, Deutschland) ist ein Wirkstoff der Gruppe der

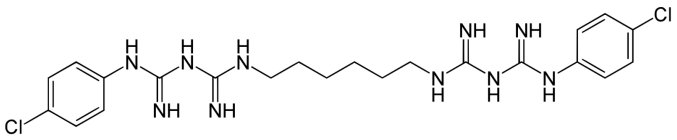


Abb. 1 : 1,1-Hexamethylenbis[5-(4-chlorphenyl)biguanid]

Biguanide (Abb. 1) [1] und ist das Mittel der Wahl zur Behandlung von dentalen mikrobiellen Biofilmen [88].
Da es aufgrund seiner Zytotoxizität die Wundheilung stärker behindert als der Benefit durch Erregerreduktion gegeben ist, hat es seine Bedeutung zur Wundantiseptik nahezu verloren [24, 89]. Als Inaktivator für CHX wurde Lipofundin verwendet.

[1] Quelle Abbildung 1: http://en.wikipedia.org/wiki/Chlorhexidine (27.11.12)

Octenidindihydrochlorid

Octenidin (Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt, Deutschland) gehört zur Wirk-

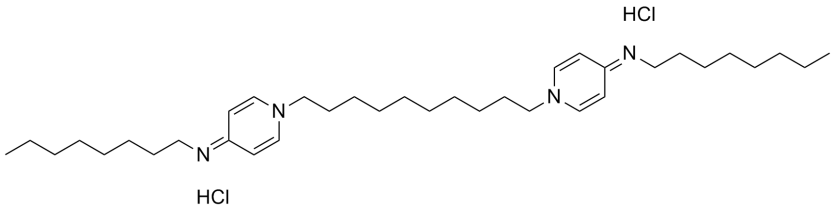


Abb. 2 : N-Octyl-1-[10-(4-octyliminopyridin-1-yl)decyl]pyridin-4-imin

stoffgruppe der Pyridine (Abb. 2) [2] und wird v. a. in Lösungen allein oder in Kombination mit Phenoxyethanol in der Haut- und Schleimhautantiseptik verwendet und kann zur chronischen Wundantiseptik angewandt werden [24, 90, 91].
Übliche Anwendungskonzentrationen betragen zwischen 0,05 % und 0,3 % [92]. Als Inaktivator für OCT diente Lipofundin.

Polyhexamethylenbiguanid

Polihexanid (Fragon, Barsbüttel, Deutschland) gehört zu den Biguaniden

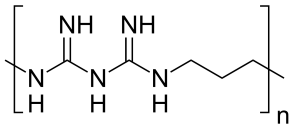


Abb. 3 : Poly[iminocarbonylimidoyl-Iminocarbonylimidoylimino 1,6-hexandiyl]-hydrochlorid)

(Abb. 3) [3] und wird v. a. in Lösungen zur Wundantiseptik aber auch in Kontaktlinsenpflegelösungen verwendet [93, 94]. Aufgrund der Gewebeverträglichkeit und seiner wundheilungsfördernden Eigenschaften wird es als Mittel der Wahl zur antimikrobiellen Behandlung von chronischen bzw. sehr empfindlichen Wunden angesehen [24].
Die Anwendungskonzentration beträgt gewöhnlich zwischen 0,02 % und 0,04 %.

[2] Quelle der Abbildung 2: http://en.wikipedia.org/wiki/Octenidine_dihydrochloride (27.11.12)
[3] Quelle der Abbildung 3: http://de.wikipedia.org/wiki/Polihexanid (27.11.12)

Eine neue Formulierung mit an Lipofundin gebundenen PHMB zur Antiseptik wird diskutiert [95] und wurde in dieser Arbeit ebenfalls mit verwendet. Zum Inaktivieren von PHMB wurden die Inaktivatoren TCHS für *P. aeruginosa* und TSLS für *S. staphylococcus* spp. verwendet.

Essigsäure / Acidum aceticum

Essigsäurekonzentrationen von 0,2 % bis 2 % werden für Umschläge und Bäder

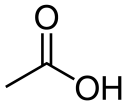


Abb. 4 : Ethansäure

bei Hautentzündung angewandt [96]. Eine 0,15 %ige Essigsäurelösung stimuliert die Wundheilung [97]. Zur Inaktivierung der Essigsäure (Abb. 4) [4] wurde $TLHT_E$ verwendet.

2.1.2 Verwendete Testorganismen

***P. aeruginosa* SG81**, ein Gram-negatives Stäbchen-Bakterium und Biofilmbildner, isoliert aus einem technischen Wassersystem der Universität Duisburg-Essen, Aquatische Mikrobiologie.
***S. epidermidis* RP62A** (ATCC 35984), ein Gram-positives Kokken-Bakterium und Biofilmbildner.
***S. aureus* ATCC 6538** sowie ***S. aureus* SH-095-1** (Klinikisolat) [98].

2.1.3 Verwendete Oberflächenmaterialien für die Biofilmkultivierung

Es wurden vorranging

- Polycarbonat-Scheiben (PC, ∅ 12,7 mm, Höhe 3 mm, A = 3,7 cm^2; Arthur Krueger KG, Barsbüttel, Deutschland) und
- Polystyrol (PS, Boden zelladhäsiver Mikrotiterplatten, ∅ 6,5 mm, Höhe 2 mm [bei 50 µl Medium] A = 0,75 cm^2; Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz) verwendet.

[4] Quelle der Abbildung 4: http://en.wikipedia.org/wiki/Acetic_acid (27.11.12)

Für Vergleiche der Biofilmbildung und der Wirksamkeit von Plasma zwischen verschiedenen Oberflächenmaterialien wurden zusätzlich

- Polymethylmethacrylat-Scheiben (PMMA, ∅ 12,7 mm, Höhe 3 mm, A = 3,7 cm^2; SR Ivocap Plus clear, Ivoclar vivadent, Jagst, Deutschland; bearbeitet in der Poliklinik für Zahnärztliche Prothetik, Alterszahnheilkunde und Medizinische Werkstoffkunde der Universitätsmedizin Greifswald),
- Stahl-Scheiben (∅ 12 mm, Höhe 3 mm, A = 3,4 cm^2; X2CrNiMo17-12(13)-2, AISI 316L, WNr. 1.4404, Wilhelm Modersohn GmbH & Co. KG, Spenge, Deutschland) und
- Silikon-Plättchen (Si, ∅ 6 mm, Höhe 1 mm, A = 0,75 cm^2; Shore-Härte A: 60, Typ: THOMASIL-60 transparent Nr. 19879, Reichelt Chemietechnik GmbH + Co, Heidelberg, Deutschland)

verwendet.

2.1.4 Mikrobiologische Kultivierung

2.1.4.1 Stammhaltung

Die Testorganismen wurden bei -70 °C bzw. für kurze Lagerzeiten bei -20 °C auf beimpften Glasperlen in Kryo-Röhrchen gelagert. Jeweils eine Glasperle wurde zur Erstellung einer Stammplatte auf Schafblutagar ausgerollt und 24 h bei 37 °C inkubiert. Zur Herstellung der Subkulturen wurden mit einer Impföse Kolonien auf eine neue Schafblutagarplatte ausgestrichen und ebenfalls 24 h bei 37 °C inkubiert. Die Kolonien der Subkulturen wurden für mikrobiologische Tests und zur Biofilmkultivierung verwendet. Die Stammplatte wurde maximal vier Wochen nach Erstellung zur Herstellung von Subkulturen genutzt.

2.1.4.2 Kultivierung der Biofilme

Die auf Schafblutagar kultivierten Bakterien wurden „gewaschen“ und photometrisch auf 10^8 KbE/ml bei OD_{620nm} = 0,1 bei *P. aeruginosa* und OD_{620nm} = 0,15 bei *S. epidermidis* und *S. aureus* eingestellt. Beschreibungen zur Erstellung des Inokulums befinden sich in Matthes *et al.* [99]. Zur Biofilmkultivierung wurde ein Medium

verwendet, das ähnlich einer künstlichen Wundflüssigkeit ist [100, 101]. Die Kultivierung erfolgte auf Polycarbonat-Scheiben auf dem Boden zelladhäsiver Mikrotiterplatten (Polystyrol) oder auf Silikon-Plättchen. Ergänzend wurden PMMA und Chirurgenstahl als Substrat für die Biofilmkultivierung verwendet. Die Dauer der Biofilmbildung betrug 48 h bei Polystyrol und 72 h auf Polycarbonat-Scheiben. Detaillierte Beschreibungen sind jeweils in den Veröffentlichungen von Hübner *et al.* [102] und Matthes *et al.* [103, 104, 105] zu finden. Abweichungen für ergänzende Versuche sind entsprechend vermerkt.

2.1.5 Mikrobiologische Untersuchungsmethoden

2.1.5.1 Erregerzahl im Biofilm

Die behandelten und unbehandelten Biofilme wurden mit Hilfe von Ultraschall (Ultraschallbad, 130 W, 40 kHz, Branson 2510, Fredericksburg, Virginia, USA) in Suspension gebracht. Es folgte eine dekadische Verdünnungsreihe in PBS. Davon wurden je 100 µl auf CSA mit einem Spatel oder mit Hilfe von Glasperlen (∅ 3 mm) ausplattiert. Nach 24 h bis max. 48 h Inkubation bei 37 °C erfolgte die Auszählung der KbE nach DIN Norm [106]. Von jeder verwendbaren Verdünnungsstufe wurde jeweils die Gesamt-Koloniezahl der Probe ermittelt. Der Mittelwert der Gesamtkoloniezahlen der einzelnen Verdünnungsstufen in KbE/ml wurde in KbE/cm^2 umgerechnet und anschließend dekadisch logarithmiert. Der dekadisch-logarithmische Ausdruck diente für die weiteren statistischen Berechnungen und der Auswertung der Testergebnisse. Der RF in $\log_{10}$ (KbE/cm^2) ergibt sich aus der Subtraktion des ermittelten Mittelwerts der jeweiligen Testgruppe von dem ermittelten Mittelwert der unbehandelten Kontrollgruppe innerhalb einer Untersuchungsfolge.

2.1.5.2 Bestimmung der optimalen Plasmaparameter

Diese Untersuchungen erfolgten mittels MAT [107] auf CSA und Schafblut. Die exponierten Erreger stammten aus einer Suspension mit planktonischen Bakterien und wurden mittels Glasperlen auf CSA oder Blutagar verteilt. Die Auswertung der antimikrobiellen Wirkung erfolgte anhand von Wachstumshemmhöfen. Hierfür wurde der Durchschnittswert der Durchmesser der kreisförmigen Hemmhöfe von

mindestens 2 Testabläufen ermittelt. Für Untersuchungen der Conplas wurden große Petrischalen (⌀ 8,5 cm, A = 56,7 cm^2, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) und der EH-Plasmaquelle kleine Petrischalen (⌀ 5,5 cm, A = 23,7 cm^2, TPP, Trasadingen, Schweiz) verwendet. Antimikrobielle Effekte, die als z. T. ungleichmäßige flächige Wachstumshemmzonen entstanden, wurden fotographisch dokumentiert (PowerShot G9, Canon, Krefeld, Deutschland) und über digitale Farbbilder (Gesamtgröße der ausgewerteten Fläche: 320x370 mm, 72 dpi) ausgewertet. Hierfür wurde die zu bestimmende Wachstumshemmfläche im Bild selektiert, monochromiert und anschließend die Anzahl der Bildpunkte mittels Histogramm (ImageJ, „open source“ Programm) ermittelt. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte anhand des Vergleichs der Anzahl der Bildpunkte der unterschiedlichen Behandlungen miteinander.

2.1.5.3 Qualitative Untersuchungsmethoden mit Fluoreszenz-Farbstoffen

Die fluoreszenzanalytische Bestimmung zum Lebend/Tod-Verhältnis erfolgte mittels der Live/Dead BacLight® DNA-Fluoreszenzfarbstoffe Propidiumiodid (membrangängig wenn die Membran geschädigt ist, „Tot“) und Syto®9 (generell membrangängig) [104].

2.1.5.4 Mikroskopische Methoden

Für mikroskopische Analysen der Biofilme oder auch zur Visualisierung der mikrobiologischen Ergebnisse wurden ein konfokales Laserrasterelektronenmikroskop (CLSM, 510 Exciter, Carl Zeiss Jena, Deutschland) [104] und ein Rasterelektronenmikroskop (REM, EVO LS10, Zeiss, Oberkochen, Deutschland) [105] verwendet.

2.1.6 Verwendete Plasmaquellen und Trägergase

Es wurden der Plasma-Jet kinpen09® [103] und zwei Oberflächen-DBE Plasmaquellen, die quadratische Handelektrode Conplas und die runde Elektrode mit Epoxidharz als Dielektrikum (Epoxidharz-Plasmaquelle) untersucht [104, 105]. Die Conplas wurde „offen“ (offenes System) zur Umgebungsluft, die EH wurde bei Luftplasma „offen“ und bei Argonplasma durch eine Glocke „geschlossen“ (geschlossenes System) zur Umgebungsluft betrieben. Von der EH gab es zwei parallel betriebene Vorrich-

tungen (EH-1, EH-2). Weitere Details zu den verwendeten Plasmaquellen sind in der Veröffentlichung von Weltmann *et al.* [71] sowie Oehmigen *et al.* [79] zu finden. Die Temperatur des kinpen09 an der sichtbaren Spitze des 10 mm großen Effluenten ergab ca. 45 °C (ermittelt aus der Temperaturkurve, Messung des INP 9.3.11). In der Veröffentlichung Matthes *et al.* [105] wird die Epixidharz-Plasmaquelle (EH-1) als SBD-A und die Conplas-Plasmaquelle als SBD-B bezeichnet.

Es erfolgten Untersuchungen mit folgenden Trägergasen: Argon (Ar, Reinheit 99,999 %) [102, 103, 104] Helium (He, Reinheit 99,999 %) [99] Luft [105] Sauerstoff (mind. 99.5 % Vol., Reinheit 99,999 %) [99, 103, 104] Stickstoff (Reinheit 99,999 %) [99]. Alle Gase (ALPHAGAZ, Air Liquide, Düsseldorf, Deutschland) wurden über die Apotheke der Universitätsmedizin Greifswald bezogen. Sauerstoff und Stickstoff wurden nur als Beimischungen zu Ar oder He verwendet. Die im Plasmalabor des INP verwendeten Gase sind mit den hier aufgeführten identisch.

2.1.7 Weitere Messsysteme

Die Messung der optischen Dichte erfolgte mittels Photometer (Evolution 600 Spectrophotometer, Thermo Scientific, Schwerte, Deutschland). Der pH-Wert wurde mit dem pH-Messgerät pMX3000 (WTW, Weilheim, Deutschland) und pH-Mess- Elektrode (Metrohm 6.0259.100, Herisau, Schweiz) bestimmt. Die Messung reaktiver Sauerstoffspezies wurde mittels Dräger-Röhrchen (Drägerwerk, Lübeck, Deutschland) für Ozonmessung analysiert.

2.1.8 Methoden zu den weiterführenden Untersuchungen in Hinblick auf die Behandlung chronischer Wunden

2.1.8.1 Plasmaanwendung auf rekonstruierter humaner Epidermiskultur

Die Plasmabehandlungen erfolgten mit dem kinpen09 (Ar, 60 s, Abstand 10 mm) an *P. aeruginosa* und *S. aureus*. Eine genaue Beschreibung der Methoden zur Bestimmung der KbE und der Eindringtiefe ist bei Matthes *et al.* [108] zu finden. Bei Behandlungen von Biofilmen auf der Epidermiskultur inkubierten die verwendeten Erreger 24 h bei 37 °C auf den Zellen.

2.1.8.2 Antimikrobielle Effekte von Plasma und Antiseptika in Kombination

Die Biofilmbildung mit *P. aeruginosa* und *S. aureus* (Inokulum: 80 µl) erfolgte in 96-Well-Mikrotiterplatten mit 80 µl Inokulum (10^7 KbE/ml in AWM) für 48 h bei 37 °C. Vor den Tests wurden die Wells 1x mit 100 µl PBS gewaschen. Die Plasmabehandlung (Ar, 30 s, Abstand 10 mm) nach Matthes *et al.* [103] erfolgte vor oder nach der Applikation mit Antiseptika (0,1 % CHX in A. dest., 0,05 % PHMB in A. dest., 0,05 % PHMB+Lipofundin-Komplex, 0,1 % OCT in A. dest., 0,2 % ACT in A. dest.). Die Inkubationszeit der Antiseptika betrug stets 29 +/-1 min bei Raumtemperatur.

2.1.8.3 Vergleich der Plasmawirkung in einem „abgeschirmten“ und einem „offenen“ System

Die Methoden sind bei Matthes *et al.* [99] aufgeführt.

2.1.8.4 Untersuchung des Plasma-Gas-Gemischs

Das Plasma-Gas-Gemisch von Ar-Plasma oder He-Plasma (5 slm) mit oder ohne 0,5 % Sauerstoffbeimischung wurde zur Behandlung von *P. aeruginosa* und *S. aureus* auf Blutagar über eine Distanz von ca. 55 cm in einem Gasschlauch durch ein Loch im Deckel der Petrischale geleitet. Das Plasma-Gas-Gemisch wurde möglichst dicht mittels Plastikkopf am kinpen09 und einer Parafilm®-Ummantelung von der Umwelt isoliert (abgeschlossenes System) (Abb. 5). Der in der Petrischale angestaute Gasfluss konnte aufgrund von Nocken am Petrischalendeckel aus dem System entweichen.

Die Vorbereitung der Agarplatten mit den Erregern erfolgte nach Matthes *et al.* [99]. Die Auswertung erfolgte je nach Resultat durch Auszählen der KbE oder durch Beschreibung der Wachstumshemmzonen nach Bebrütung (37 °C, 24 h).

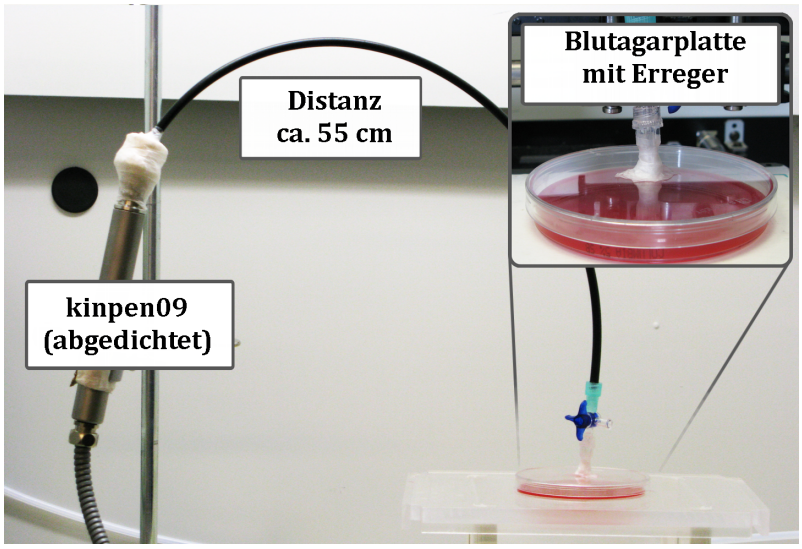


Abb. 5 : Testaufbau des kinpen09 zur Bestimmung der antimikrobiellen Wirkung des Plasma-Gas-Gemischs in einer Distanz von 55 cm an Erregern auf Blutagar.

2.1.8.5 Bakterielle Plasma-Resistenzentwicklung (Kurzzeit-Test)

Die Biofilmbildung mit *S. aureus* (Inokulum: 80 µl) erfolgte in sechs separaten 96-Well-Mikrotiterplatten. Die Inkubation der Erreger betrug 48 h bei 37 °C. Vor den Tests wurden die Wells 1x mit 100 µl PBS gewaschen. Die Plasmabehandlung (Ar, 20 s, Abstand 10 mm) erfolgte mit dem kinpen09 wie beschrieben [103]. Der Test erfolgte von 8 (alle 6 MTP), 9 (5 MTP), 10 (4 MTP), 11 (3 MTP), 13 (2 MTP) bis 14 Uhr (1 MTP)des Versuchstags. In jedem Behandlungsdurchlauf wurden alle Wells aller MTP, die für die Plasmabehandlung vorgesehen waren, entsprechend behandelt. Während nur eine MTP zur Bestimmung der Erregerzahl genutzt wurde, wurden die Biofilme in den Wells der anderen MTP nach der Behandlung erneut mit 80 µl sterilem AWM bedeckt und weiter bei 37 °C inkubiert, so dass im Verlauf der Behandlungsphasen die letzte MTP nach der Plasmabehandlung 14 Uhr insgesamt 6x behandelt wurde. Dabei erfolgte je Behandlungsphase eine Kontrolle der verblieben Erreger, die ebenfalls in den Behandlungsphasen zuvor, aber nicht während des entsprechenden Durchlaufs mit Plasma behandelt wurden. Zusätzlich erfolgten zu Beginn (8 Uhr) und am Ende (14 Uhr) eine Kontrolle unbehandelter Biofilme sowie eine einmalige Plasmabehandlung, um die Beständigkeit des Biofilms und der Plasmabehandlung zu kontrollieren. Hierbei erfolgte parallel zu den Wells, die behandelt

wurden, ein Mediumwechsel mit sterilem AWM mit weiterer Inkubation bei 37 °C. Je Behandlungs- bzw. Kontrollmodus wurden je fünf Proben getestet. Durch den Vergleich des RF der plasmabehandelten Biofilme zur Kontrolle der verbliebenen Erreger im Biofilm der jeweiligen Behandlungsphase kann eine Abnahme oder Zunahme der Empfindlichkeit gegenüber Plasma ermittelt werden. Um eine Verminderung der Ausgangserregerzahl je Testphase durch vorangegangene Plasmabehandlungen zu vergleichen und somit die Regeneration der Erregerzahl im Biofilm nach der Plasmabehandlung zu ermitteln, wurde der RF zwischen der Kontrolle der verbliebenen Erreger und der unbehandelten Kontrolle in KbE/cm^2 ermittelt.

2.2 Ergebnisse

2.2.1 Vor- bzw. ergänzende Untersuchungen zur antimikrobiellen Wirksamkeit der Plasmaquellen gegen „planktonische“ Bakterien

2.2.1.1 Bestimmung der optimalen Behandlungsparameter

Die Bestimmung des optimalen Abstands, der Behandlungszeit und der Gaszusammensetzung erfolgten mittels MAT auf CSA und Schafblut (jeweils 2-4 Wiederholungen). Nach Plasmaeinwirkung auf CSA mit anschließender Verteilung der Erreger auf dem plasma-behandelten Agar wurden ebenfalls Hemmhöfe ermittelt, jedoch nicht bei der Verwendung von Schafblutagar.

A) Abstand und Behandlungszeit

kinpen09

Die Untersuchung des Behandlungsabstands erfolgte in 2, 4, 6, 10 und 14 mm Abstand zwischen der Austrittsöffnung am kinpen09 zur Agaroberfläche. Die Länge des sichtbaren Effluenten betrug 10 mm. Bei *P. aeruginosa* (176 KbE/cm^2) bleibt nach 60 s Ar-Plasma-Behandlung die Hemmhofgröße mit einem Durchmesser von ca. 18 mm bis zu einem Abstand von 4-10 mm nahezu konstant und nimmt bei 14 mm Abstand (es gibt keinen Kontakt mehr zwischen dem sichtbaren Effluenten und der Agaroberfläche) ab (HH-$\varnothing$ ca. 12 mm). Bei *S. aureus* (176 KbE/cm^2) nahm die Größe des Hemmhofs nach 60 s Exposition mit Ar-Plasma in den Abständen 6, 10 und 14 mm von ca. 15 auf 10 und 6 mm ab. Bei einem Abstand $<$ 6 mm nahm die Hemmhofgröße bei *P. aeruginosa* geringfügig und bei *S. aureus* deutlich wieder ab. Dabei zeigte die Erregerdichte einen Einfluss auf die Größe der Hemmhöfe. Bei beiden Erregern vergrößerte sich bei geringerer Erregerdichte der Hemmhof. Bei einem Abstand von 10 mm zur Agaroberfläche betrugen die Hemmhöfe 14, 18 bzw. 20 mm nach 60 s Exposition mit Ar-Plasma für jeweils 1760, 176 bzw. 18 KbE/cm^2 bei *P. aeruginosa*. Bei Versuchen auf CSA mit 176000 und 176 KbE/cm^2 waren die Unterschiede noch deutlicher (Tab. 1). Eine Pulsung des kinpen09 reduzierte seine Effektivität.

Tab. 1 : Wachstumshemmhöfe nach punktförmiger Plasmabehandlung von *P. aeruginosa* SG81 auf Casein-Soja-Agar mit dem kinpen09 (Argon, Abstand 10 mm) nach 5, 10, 20, 30 und 60 s.

Erregerdichte (KbE/cm^2)	Hemmhofdurchmesser (mm) bei einer Expositionsdauer von				
	5 s	**10 s**	**20 s**	**30 s**	**60 s**
176000	**6,5**	**9,5**	**12,0**	**14,0**	**15,0**
176	**6,5**	**10,5**	**16,5**	**19,0**	**29,0**

Conplas-DBE Plasmaquelle

Die antimikrobiell wirksamen Plasmakomponenten sind bei dieser Oberflächenentladungselektrode bei einem Abstand zwischen Substrat und Elektrode von maximal 4 mm gegeben (Abb. 6). Mit steigender Behandlungszeit vergrößert sich der Bereich der Wachstumshemmung (Abb. 7).

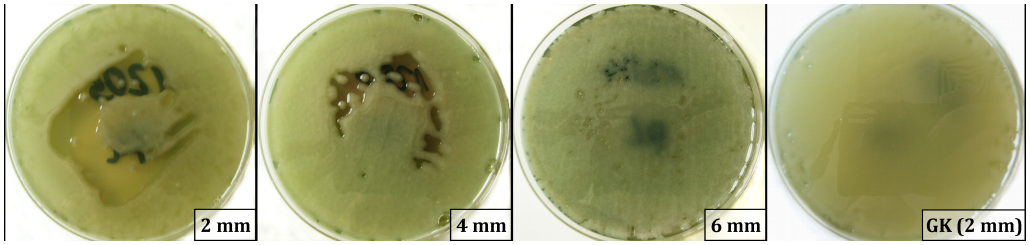


Abb. 6 : Wachstumshemmung von *P. aeruginosa* auf Casein-Soja-Agar nach 120 s Argonplasma-Behandlung mit der Conplas-Plasmaquelle bei den Abständen zwischen Elektrode und Agar von 2, 4 und 6 mm im Vergleich zur Argongas-Kontrolle (GK).

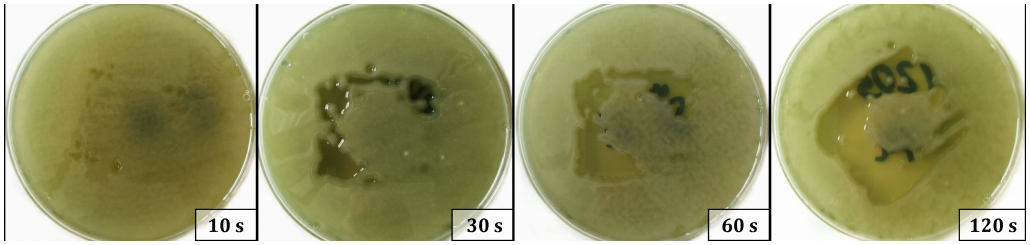


Abb. 7 : Wachstumshemmung von *P. aeruginosa* auf Casein-Soja-Agar nach Argonplasma-Behandlung mit der Conplas-Plasmaquelle im Abstand zwischen Elektrode und Agar von 2 mm. Die Behandlungszeiten betrugen 10, 30, 60 und 120 s.

Epoxidharz-Plasmaquelle (EH-1)

Die Wachstumshemmung blieb bei der EH-1 innerhalb der Behandlungsabstände 2, 4 und 6 mm nahezu gleich, eine geringe Wirkungsreduzierung war im Abstand von 2 mm nach 30 und 60 s Behandlungszeit bei *P. aeruginosa* beobachtbar.

B) Gaszusammensetzung

kinpen09 (im offenen System)

Bei Plasmaanwendung mit Sauerstoffbeimischung von 0,1 % bzw. 0,5 % zum Argon entstehen bei *P. aeruginosa* geringfügig kleiner werdende Hemmzonen bis zu einer deutlichen Verringerung bei 1 % O_2-Beimischung im Vergleich zum puren Ar-Plasma. Bei *S. aureus* wie auch bei *S. epidermidis* ergaben sich z. T. größere HH oder eine stärkere Reduktion über die gesamte Agarplatte durch Sauerstoffbeimischung zu Argon. Helium als Hauptträgergas zur Plasmagenerierung zeigte keinen stärkeren wachstumshemmenden Effekt als Argon bei *P. aeruginosa*, aber einen verstärkten Effekt bei *S. aureus*. Eine detaillierte Beschreibung der Studie und Ergebnisse für *P. aeruginosa* und *S. aureus* wird bei Matthes *et al.* [99] gegeben. Eine Beimischung von N_2 zwischen 0,1 %, 0,5 % und 1 % oder 1 % Druckluft zu Argon führten zu einer Reduktion der Hemmhofgröße bei *S. aureus* und etwas stärker bei *P. aeruginosa* (Tab. 2).

Tab. 2 : Wachstumshemmhöfe nach punktförmiger Plasmabehandlung mit dem kinpen09 (Argon mit und ohne 0,1 %, 0,5 % und 1 % N_2-sowie 1 % Luftbeimischung; Abstand 10 mm) von *P. aeruginosa* SG81 und *S. aureus* ATTC 6538 auf Blutagar (ca. 176 KbE/cm^2) nach 60 und 120 s Exposition.

Erreger	Expositions-zeit (s)	Hemmhofdurchmesser (mm) nach einer Exposition mit				
		Ar	Ar+0,1%N_2	Ar+0,5%N_2	Ar+1%N_2	Ar+1%Luft
P. aeruginosa SG81	60	**17,5**	**16,0**	**11,0**	**10,0**	**12,5**
	120	**19,0**	**19,0**	**15,0**	**15,0**	**16,0**
S. aureus ATCC 6538	60	**11,5**	**11,0**	**10,0**	**8,0**	**12,5**
	120	**15,5**	**13,0**	**11,5**	**10,0**	**12,5**

Diese Angaben beziehen sich auf einen Behandlungsabstand von 10 mm und eine Erregerdichte von ca. 176 KbE/cm^2. Nach 120 s Argon+1%-Luft Exposition von

ca. 176 KbE/cm^2 auf Blutagar (Abstand: 10 mm) betrug der HH bei *P. aeruginosa* 16 mm (Vgl. Ar-Plasma HH-$\varnothing$ = 19 mm) und bei *S. aureus* 12,5 mm (Vgl. Ar-Plasma HH-$\varnothing$ = 15,5 mm). Die Vergleichswerte von Ar-Plasma sind bei Matthes *et al.* [99] gegeben.

Conplas-Plasmaquelle

Es erfolgten Untersuchungen mit Ar-, Ar+1%O_2- und Luftplasma. Eine deutliche Wachstumshemmung auf der behandelten Fläche ergab sich nach 30 s bei *S. epidermidis* und nach 60 s bei *P. aeruginosa* durch die Anwendung von Luftplasma. Bei Ar-Plasma waren nach 120 s erste antimikrobielle Effekte bei *S. epidermidis* und bereits nach 30 s bei *P. aeruginosa* erkennbar. Die Ergebnisse für *P. aeruginosa* und *S. epidermidis* sind bei Matthes *et al.* [107] dargestellt (die Conplas wird hier als „Plasma source A“ bezeichnet). Eine Beimischung von Sauerstoff zu Argon verringerte die Wachstumshemmfläche für *P. aeruginosa* um ca. 27 % (ca. 413000 Bildpunkte) und bei *S. epidermidis* um ca. 62 % (ca. 188000 Bildpunkte) im Vergleich zu reinem Ar-Plasma (ca. 570000 bei *P. aeruginosa* und 500000 Bildpunkte bei *S. epidermidis*). Bei Behandlung mit Luftplasma war bereits nach 10 s Behandlungszeit das Wachstum der Erreger fast vollständig über die Fläche, die von der Elektrode abgedeckt wird (ca. 960000 Bildpunkte), gehemmt. Diese Angaben beziehen sich auf einen Behandlungsabstand von 2 mm.

Epoxidharz-Plasmaquelle EH-1 und EH-2

Nach Behandlung mit Ar-Plasma konnte keine Reduktion von *P. aeruginosa* oder *S. epidermidis* bis 600 s Behandlungszeit festgestellt werden. Veranschaulicht ist dieses Ergebnis bei Matthes *et al.* [107], wobei die EH-1 als „Plasma source B“ bezeichnet ist. Bei Ar+1%O_2-Plasma zeichnete sich eine Wachstumshemmung nach 150 s und 300 s ab. Für eine Auswertung ist diese jedoch zu gering. Anwendungen mit Luftplasma zeigten eine deutliche Wachstumshemmung nach 10 s bei *S. epidermidis* und 30 s bei *P. aeruginosa*. Nach 60 s Behandlungszeit betrug die Reduktion ca. 2 $\log_{10}$ (KbE/cm^2) bei *P. aeruginosa* und ca. 3 $\log_{10}$ (KbE/cm^2) bei *S. epidermidis* (Abb. 8). Die Erregerreduktion mit der EH-2 war im Vergleich mit der EH-1 mindestens 1 $\log_{10}$ (KbE/cm^2) geringer und die Reduktion verteilte sich ungleichmäßiger

(Abb. 9). Diese Angaben beziehen sich auf einen Behandlungsabstand von 2 mm.

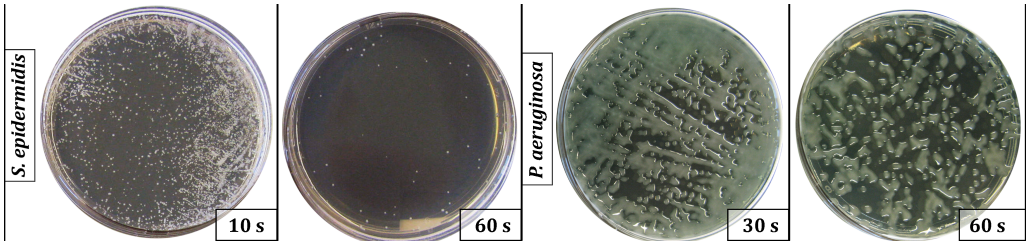


Abb. 8 : *S. epidermidis* nach 10 s und 60 s (links) und *P. aeruginosa* nach 30 s und 60 s (rechts) Argonplasma-Behandlung mit der EH-1 auf Casein-Soja-Agar im Abstand von 2 mm zwischen Elektrode und Agar.

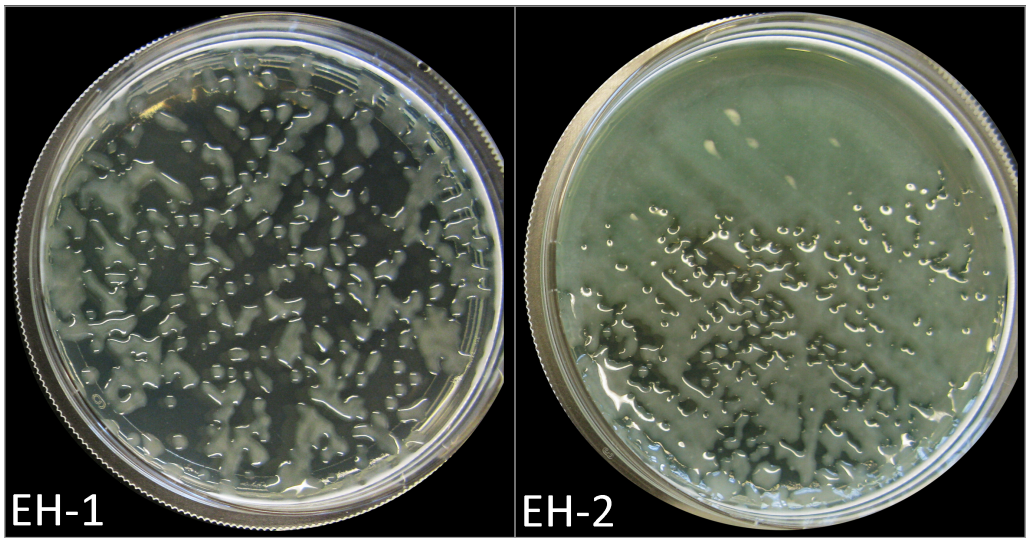


Abb. 9 : *P. aeruginosa* auf Casein-Soja-Agar nach 60 s Argonplasma-Behandlung mit der EH-1- (links) und EH-2- (rechts) Plasmaquelle im Abstand von 2 mm zwischen Elektrode und Agar.

2.2.2 Zusammenfassung der Untersuchungen zur antimikrobiellen Wirkung von Plasmen an Biofilmen

Untersucht wurde die antimikrobielle Wirkung von Ar-Plasma mit und ohne Sauerstoffbeimischung mit dem kinpen09 und zusätzlich von feuchtem Argon an der Conplas Elektrode. Untersuchungen mit Luftplasma erfolgten mit der Conplas- und

der EH-Plasmaquelle an Biofilmen von *S. epidermidis* und *P. aeruginosa*. Als Referenz zur Wirksamkeit von Plasma wurde die antimikrobielle Wirksamkeit von 0,1 % wässriger Lösung von CHX nach 600 s Einwirkdauer getestet. Die Reduktion von CHX betrug an Biofilmen auf Polycarbonat mit *P. aeruginosa* im Mittel 1,5 $\log_{10}$ und mit *S. epidermidis* 1,7 $\log_{10}$ (KbE/cm^2).

2.2.2.1 kinpen09 (Plasma-Jet) mit Argon und Argon + O_2 -Plasma

Auf Polycarbonat kultivierten Biofilmen stieg die antimikrobielle Wirkung kontinuierlich zwischen 30 und 300 s an, wobei die stärkste Reduktion nach Anwendung von 300 s Ar-Plasma mit 5,4 $\log_{10}$ bei *P. aeruginosa* und 3,1 $\log_{10}$ (KbE/cm^2) bei *S. epidermidis* stattfand [103]. Die Beimischung von 1 % O_2 zu Argon verstärkte die antimikrobielle Wirkung bis 60 s Behandlungsdauer signifikant und lag bei maximal 5,1 $\log_{10}$ (KbE/cm^2) bei *P. aeruginosa* nach 300 s Behandlungsdauer, jedoch war hier die Wirkung des Gasstroms allein deutlich stärker als beim alleinigen Ar-Gas [103]. Bei *S. epidermidis* verringerte sich die antimikrobielle Wirkung durch Beimischung von 1 % O_2 zu Argon, die Wirkung des Gasstroms war nur leicht gegenüber dem Ar-Gas erhöht. Die maximale Reduktion lag hier bei 3,1 $\log_{10}$ bzw. 2,2 $\log_{10}$ (KbE/cm^2) nach 300 s Behandlungszeit (Tab. 3). Die Wirksamkeit von Ar- wie Ar+1%O_2-Plasma gegenüber CHX war statistisch signifikant höher bei *P. aeruginosa* nach 60 s und bei *S. epidermidis* nach 150 s [103].

Tab. 3 : Vergleich der Wirksamkeit des kinpen09 (Abstand 10 mm) mit Argon- und Argon +1%O_2-Plasma an Biofilmen auf Polycarbonat mit *P. aeruginosa* SG81 und *S. epidermidis* RP62A nach 60 und 300 s Behandlungszeit; Reduktionsfaktor (RF) und Standardabweichung (σ) in $\log_{10}$ KbE/cm^2.

	P. aeruginosa SG81		*S. epidermidis* RP62A	
Behandlung	**Ar**	**Ar+1%O_2**	**Ar**	**Ar+1%O_2**
	RF ± σ	**RF** ± σ	**RF** ± σ	**RF** ± σ
plasma - 60 s	**3,2** ±1,1	**3,7** ±0,8	**1,6** ±1,1	**0,9** ±0,6
plasma - 300 s	**5,4** ±1,6	**5,1** ±0,4	**3,1** ±1,1	**2,2** ±1,0
gas - 300 s	**2,2** ±0,6	2,7 ±0,5	**1,1** ±0,5	2,2 ±0,8

Auf Polycarbonat und Silikon kultivierten Biofilme waren der Reduktionsfaktor nach 60 s Ar-Plasma Exposition bei *P. aeruginosa* auf Polystyrol (MTP-Boden) mit RF = 3,1 $\log_{10}$ und auf Silikon RF = 3,5 $\log_{10}$ vergleichbar. Die Wirkung des alleinigen Gasflusses unterschied sich dagegen stark: RF = 2,3 $\log_{10}$ bei Polystyrol und RF = 0,7 $\log_{10}$ bei Silikon. Der RF von 0,1 % CHX und 0,04 % PHMB nach 30 min Inkubation betrug 1,3 $\log_{10}$ auf Polystyrol, auf Silikon für PHMB 2 $\log_{10}$ und für CHX 4 $\log_{10}$, allerdings mit einer Standardabweichung von ca. 3 $\log_{10}$ [102].

2.2.2.2 Conplas-Plasmaquelle mit Argon, Argon + O_2 und feuchtem Argon -Plasma

Die Wirkung an Biofilmen von *P. aeruginosa* auf Polycarbonat bei Verwendung von Argon, Argon mit 1 % Sauerstoff und erhöhter Argon-Gasfeuchtigkeit als Trägergase ist im Detail in der Veröffentlichung von Matthes *et al.* [104] dargestellt:

Bei Biofilmen von *P. aeruginosa* auf Polycarbonat war nach 300 s Exposition mit Ar-Plasma der RF mit 4,9 $\log_{10}$ (KbE/cm^2) höher als nach Ar+1%O_2-Plasma (RF = 3 $\log_{10}$, p = 0,06) und signifikant höher als nach Exposition mit feuchtem Ar-Plasma (RF = 2,7 $\log_{10}$, p = 0,04). Die Wirkung des Gasflusses unterschied sich ebenfalls in Abhängigkeit von seiner Modifikation. Hierbei war der RF nach 300 s Behandlungszeit von feuchtem Argon mit 0,5 $\log_{10}$ am niedrigsten und nach Exposition mit Ar+1%O_2 mit einem RF = 2 $\log_{10}$ (KbE/cm^2) der höchsten (Tab. 4). Die Wirksamkeit von Ar- und Ar+1%O_2-Plasma ist nach 150 s ($p < 0{,}002$) und vom feuchten Ar-Plasma nach 300 s (p = 0,014) im Vergleich zur Wirksamkeit von 0,1 % CHX nach 600 s Behandlungszeit statistisch signifikant höher.

Tab. 4 : Vergleich der Wirksamkeit von Argon-, Argon+1 % O_2- und feuchtem Argon-Plasma nach 60 und 300 s Behandlungszeit mit der Conplas-Plasmaquelle an Biofilmen von P. aeruginosa SG81 (Abstand 2 mm); Reduktionsfaktor (RF) und Standardabweichung (σ) in $\log_{10}$ KbE/cm^2.

Behandlung	**Ar**	**Ar+1%O_2**	**Ar+H_2O**
	RF ± σ	**RF ± σ**	**RF ± σ**
plasma - 60 s	**1,6** ±0,7	**2,2** ±1,3	**1,2** ±0,9
plasma - 300 s	**4,9** ±2,2	**3,0** ±1,6	**2,7** ±1,2
gas - 300 s	**1,5** ±0,8	**2,0** ±1,3	**0,5** ±0,3

2.2.2.3 Epoxidharz- und Conplas-Plasmaquelle mit Luftplasma

Die Wirksamkeit von Luftplasma an Biofilmen von *P. aeruginosa* und *S. epidermidis* auf Polycarbonat mit der Conplas- und Epoxidharz-Plasmaquelle (EH-1) ist im Detail in der Veröffentlichung von Matthes *et al.* [105] dargestellt.

Luftplasma zeigt an Biofilmen mit *P. aeruginosa* auf Polycarbonat eine Reduktion bis 7 $\log_{10}$ (KbE/cm^2) nach 600 s Behandlungszeit mit der EH-Plasmaquelle (Tab. 5). Deutlich geringer war die Effektivität mit einem RF von 3,8 $\log_{10}$ (KbE/cm^2) nach 600 s Plasmabehandlung mit der Conplas-Plasmaquelle. An Biofilmen mit *S. epidermidis* war kein deutlicher Unterschied in der Effektivität zwischen den beiden Plasmaquellen vorhanden (Tab. 5). Die stärkste Reduktion betrug 3,4 $\log_{10}$ (KbE/cm^2) nach 600 s Plasmaexposition durch die EH-Plasmaquelle. Nach 150 s Behandlungsdauer war die antimikrobielle Wirkung von Luftplasma bei beiden Plasmaquellen und beiden Erregern statistisch signifikant höher im Vergleich zu 600 s CHX-Behandlung ($p < 0{,}0001$) [105].

Tab. 5 : Vergleich der Wirksamkeit von Luftplasma der Conplas- und Epoxidharz-Plasmaquelle an Biofilmen mit *P. aeruginosa* SG81 und *S. epidermidis* RP62A nach 60, 300 und 600 s Behandlungszeit im Abstand von jeweils 2 mm; Reduktionsfaktor (RF) und Standardabweichung (σ) in $\log_{10}$ (KbE/cm^2).

	P. aeruginosa SG81		*S. epidermidis* RP62A	
Behandlung	**EH-1**	**Conplas**	**EH-1**	**Conplas**
	RF ± σ	**RF** ± σ	**RF** ± σ	**RF** ± σ
plasma - 60 s	**1,8** ±0,7	**1,3 ±0,4**	**1,6** ±1,0	**1,2** ±0,4
plasma - 300 s	**4,8** ±2,2	**3,0 ±1,0**	**2,8** ±1,3	**2,0** ±0,6
plasma - 600 s	**7,1** ±1,2	**3,8 ±1,5**	**3,4** ±0,9	**2,7** ±1,0

2.2.2.4 Wirksamkeit von Argonplasma des kinpen09 an Biofilmen auf verschiedenen Oberflächen

Die Plasmawirkung an Biofilmen von *P. aeruginosa* auf PS, PC und PMMA waren mit einem RF zwischen 2,9 und 3,1 $\log_{10}$ vergleichbar, auf CS war der RF mit 2,3 $\log_{10}$ (KbE/cm^2) am geringsten (Tab. 6). Der Unterschied der RF zwischen PS und CS sowie PMMA war statistisch signifikant. Nach CHX-Behandlung waren der RF bei PS und PC mit ca. 1,2 und 1,1 $\log_{10}$ und der RF bei PMMA und CS mit 1,9

und 2,4 $\log_{10}$ miteinander vergleichbar. Signifikante Unterschiede gab es zwischen den RF von PS und CS sowie PMMA. Die hierfür verwendeten Biofilme wurden nach 48 h Inkubationszeit mit Mediumwechsel (AWM) nach 4 und 24 h antiseptisch behandelt.

Tab. 6 : Vergleich der antiseptischen Wirksamkeit von Argonplasma des kinpen09 (Abstand 10 mm) an *P. aeruginosa* SG81- Biofilmen auf den Substraten Polystyrol (PS), Polycarbonat (PC), Polymethylmethacrylat (PMMA) und Stahl (CS) nach 60 s bzw. mit 0,1 % CHX nach 600 s Behandlungszeit mit der unbehandelten Kontrolle anhand der Mittelwerte (MW), Reduktionsfaktoren (RF) und Standardabweichung (σ) in $\log_{10}$ (KbE/cm^2) mit Probenzahl (n).

Behandlung	Argonplasma 60 s				CHX 600 s				Kontrolle (unbehandelt)			
Material	PS	PC	PMMA	CS	PS	PC	PMMA	CS	PS	PC	PMMA	CS
MW	**4,1**	**4,2**	**4,9**	**5,5**	**6,0**	**6,3**	**5,8**	**5,4**	**7,2**	**7,3**	**7,8**	**7,8**
RF	3,1	3,2	2,9[a]	2,3[a]	1,2	1,1	1,9[b]	2,4[c]				
σ	0,9	1,0	0,7	1,5	0,5	0,5	0,4	0,7	0,6	0,6	0,2	0,4
n	22	12	15	12	5	16	16	11	21	13	14	10

[a] signifikanter Unterschied im Vergleich zu PS
[b] signifikanter Unterschied zu PC
[c] signifikanter Unterschied zu PC und PS

2.2.3 Weiterführende Untersuchungen in Hinblick auf die Behandlung chronisch infizierter Wunden mit TTP

2.2.3.1 Antimikrobielle Effekte und Eindringtiefe von Bakterien auf rekonstruierter humaner Epidermiskultur

Es findet eine Penetration der Erreger in das Gewebe statt, jedoch nicht über das *Stratum corneum* hinaus. Die Eindringtiefe von *P. aeruginosa* war nach Ar-Gas-Behandlung stärker als nach TTP-Behandlung und erwies sich als abhängig von der Korneozytendichte [108]. Die Reduktion lag bei frisch aufgetragenen Erregern im Mittel bei 2,5 $\log_{10}$ für *P. aeruginosa*, 1,2 $\log_{10}$ für *S. aureus* und 1 $\log_{10}$ (KbE/cm^2) für *S. epidermidis*. Nach 24 h Biofilmbildung auf der 3-D-Epidermiskultur betrug die Reduktion im Vergleich zur Kontrolle bei *S. aureus* 1,7 $\log_{10}$ und bei *P. aeruginosa* 4,7 $\log_{10}$ (KbE/cm^2). Die Unterschiede zwischen der Plasmabehandlung und der Kontrolle waren bis auf die Behandlung an *S. aureus* Biofilmen stets signifikant (Tab. 7).

Tab. 7 : Vergleich der antiseptischen Wirksamkeit von Argonplasma des kinpen09 (Abstand 10 mm) an *P. aeruginosa*, *S. aureus* und *S. epidermidis* an aufgetragener Suspension und an *P. aeruginosa*- und *S. aureus* - Biofilmen auf rekombinierter humaner Epidermis nach 60 s mit Argongas und der unbehandelten Kontrolle anhand der Reduktionsfaktoren (RF) und der Standardabweichung (σ) in $\log_{10}$ (KbE/cm^2) mit Probenzahl (n).

Erreger		Behandlung		
		Plasma 60 s	Gas 60 s	Kontrolle
P. aeruginosa aufgetragene Suspension	RF	2,5[a,b]	1,1	0
	σ	1,3	0,7	0,1
	n	18	15	18
S. aureus aufgetragene Suspension	RF	1,2[a]	0,2	0
	σ	1,2	0,4	0,2
	n	18	18	18
S. epidermidis aufgetragene Suspension	RF	1,0[a,b]	< 0,1	0
	σ	0,3	0,4	0,4
	n	10	10	10
P. aeruginosa 24 h Biofilm	RF	4,8[a,b]	1,1	0
	σ	0,8	1,1	0,1
	n	4	5	5
S. aureus 24 h Biofilm	RF	1,7	0,7	0
	σ	0,3	0,7	0,2
	n	5	5	5

[a] signifikanter Unterschied im Vergleich zu Kontrolle
[b] signifikanter Unterschied im Vergleich zur reinen Gasbehandlung

2.2.3.2 Antimikrobielle Wirksamkeit bei kombinierter Anwendung von Plasma und Antiseptika

In Voruntersuchungen zeigte eine 30 s TTP-Behandlung nach Applikation von PHMB und OCT additive Wirkung und für CHX synergistische Wirkung. Unterschiedliche Ergebnisse wurden bei ACT festgestellt. In der Anwendungskonzentration von 0,2 % zeigte ACT mit TTP keinen synergistischen Effekt [109, 110], in einer Konzentration von bereits 0,001 % konnte an Gram-positiven Erregern eine Steigerung der Erregerreduktion im Biofilm zwischen 0,5 und 1 $\log_{10}$ erreicht werden. Hierbei wurde jedoch mit ACT 1x gewaschen, so dass die Biofilme nur benetzt wurden, bevor die

Behandlung der Proben mit TTP erfolgte. Es gab keine messbare pH-Änderung oder alleinige antimikrobielle Wirkung durch 0,001 % ACT.

2.2.3.3 Vergleich der Plasmawirkung in einem „abgeschirmten“ und einem „offenen“ System

Generell zeigte sich im Vergleich beider Systeme eine verstärkte Wachstumshemmung im abgeschirmten System. Hierbei traten zwei verschiedene Phänomene auf, eine Erregerreduktion über den gesamten Agar verteilt oder in Form eines Hemmhofs. Detaillierte Ergebnisse sind bei Matthes *et al.* [99] aufgeführt.

2.2.3.4 Antimikrobielle Wirksamkeit des Plasma-Gas-Gemischs mit und ohne O_2-Beimischung

Die Leitung des Plasma-Gas-Gemischs des kinpen09 von Ar-Plasma mit 0,1 %, 0,5 % und 1 % Sauerstoff- oder Stickstoffbeimischung über eine Distanz von ca. 55 cm an *P. aeruginosa*, *S. epidermidis* und *S. aureus* auf Blutagar zeigte eine deutliche Reduktion der Erreger. Die Reduktion verstärkte sich von wenn der O_2-Anteil im Argon stieg. Durch Argon allein oder mit Beimischung von N_2 zu Argon konnte kein antimikrobieller Effekt ermittelt werden. Nach einer Expositionszeit von 2 min Ar+1%O_2-Plasma wurden ca. 2 $\log_{10}$, nach 5 min 2,5 $\log_{10}$ und nach 15 min 3 $\log_{10}$ (KbE/cm^2) Reduktion bei den Gram-positiven Erregern und jeweils um etwa 0,5-1 $\log_{10}$ (KbE/cm^2) geringer bei *P. aeruginosa* nachgewiesen (Tab. 8). Die Reduktion der Erreger nach Exposition des Plasma-Gas-Gemischs durch Ar+0,5%O_2-Plasma war ca. 1-1,5 $\log_{10}$ geringer als die RF nach Ar+1%O_2-Plasma, nach Ar+0,1%O_2-Plasma war eine antimikrobielle Wirkung kaum noch vorhanden und die Reduktion zeigte sich eher als Hemmhof statt über die gesamte Agarplatte. Eine Behandlung von Blutagar und CSA mit anschließender Verteilung der Erreger ergab, dass allein die Behandlung von CSA, nicht aber die des Blutagars antimikrobiell wirkt. Das Plasma-Gas-Gemisch reduzierte nach 600 s Expositionszeit die Erreger ebenfalls in Biofilmen. Erste Daten zeigten eine Reduktion der Erreger bei *S. aureus* um 0,7 $\log_{10}$ und bei *P. aeruginosa* um 4,4 $\log_{10}$ (KbE/cm^2).

Tab. 8 : Antimikrobielle Wirksamkeit des Plasma-Gas-Gemischs des kinpen09 mit 0,1 %, 0,5 % und 1 % O_2-Beimischung zu Argon nach einer Distanz von ca. 55 cm an *P. aeruginosa*, *S. aureus* und *S. epidermidis* auf Blutagarplatten anhand der Reduktionen der KbE in $\log_{10}$ (KbE/cm^2) oder als Beschreibung mit R (eine Reduktion der KbE war erkennbar, aber nicht auswertbar), kR (keine Reduktion der KbE erkennbar) und HZ (eine Wachstumshemmzone mit reduzierter KbE-Zahl ist erkennbar). Die Ausgangskoloniezahl auf dem Agar betrug 176 KbE/cm^2.

Erreger	Plasma-Gas-Gemisch	Reduktion der KbE ($\log_{10}$) nach einer Expositionszeit von			
		60 s	**120 s**	**300 s**	**600 s**
P. aeruginosa	Ar+1%O_2	**R**	**1,5**	**2**	**2**
	Ar+0,5%O_2	**kU**	**kU**	**kU**	**2**
	Ar+0,1%O_2	**kU**	**kU**	**kU**	**HZ**
S. aureus	Ar+1%O_2	**1,5**	**2**	**2,5**	**3**
	Ar+0,5%O_2	**R**	**R**	**R**	**1,5**
	Ar+0,1%O_2	**kU**	**kU**	**kU**	**HZ**
S. epidermidis	Ar+1%O_2	**1,5**	**2**	**2,5**	**3**
	Ar+0,5%O_2	**R**	**R**	**R**	**2,5**
	Ar+0,1%O_2	**kU**	**kU**	**kU**	**R**

2.2.3.5 Voruntersuchung einer möglichen Resistenzentwicklung gegen Plasma (Kurzzeit-Test)

In einem Testablauf über 6 h wurde eine kontinuierliche Reduktion in der Kontrolle der Gesamterregerzahl zur Ausgangserregerzahl von ca. 7,9 auf 4,4 $\log_{10}$ (KbE/cm^2) ermittelt. Nach der 5. Behandlung mit Argonplasma blieb die Erregerzahl im Biofilm stabil. Die Reduktion je Behandlungsphase blieb mit einem RF zwischen 0,7 und 1,4 $\log_{10}$ (KbE/cm^2) relativ konstant (Abb. 10). Die Empfindlichkeit der Erreger gegenüber der wiederholten Plasmaexposition weißt keine erkennbare Veränderung auf.

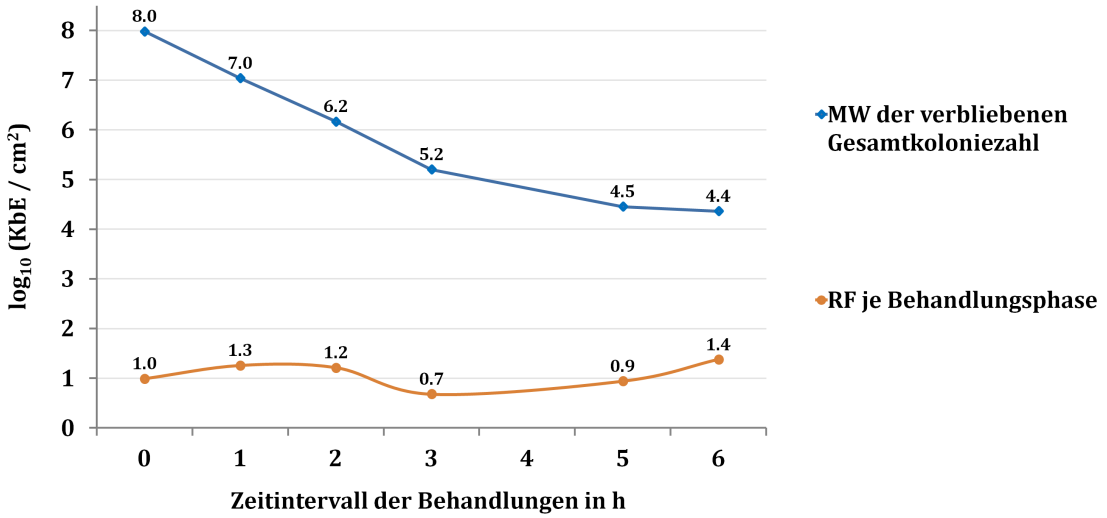


Abb. 10 : Reduktion von *S. aureus* ATCC 6538 Biofilm auf Polystyrol anhand des Mittelwerts (MW) und der Reduktionsfaktoren (RF) in $\log_{10}$ (KbE/cm^2) nach wiederholter Plasma-Behandlung (kinpen09, Ar, 20 s, Abstand: 10 mm) nach 1, 2, 3, 5 und 6 h.

Kapitel 3

Diskussion

Die Plasmamedizin ist als eigener Forschungsbereich noch relativ jung, sodass sich Untersuchungen zu Interaktionen zwischen Plasma und biologischen Systemen derzeit noch in den Anfängen befinden. Im Campus PlasmaMed werden die biologischen Wirkungen von Plasma untersucht, um Einflussfaktoren auf die Wirksamkeit an biologischen Systemen zu analysieren, die Anwendbarkeit für verschiedene medizinische Bereiche zu prüfen und gegebenenfalls an verschiedene Anforderungen anzupassen. In PlasmaCure liegt der Fokus auf Plasmaquellen mit der Zielsetzung einer Anwendung an chronisch infizierten Wunden. In der vorliegenden Arbeit sind die Untersuchungen zur Inaktivierung von Biofilmen auf abiotischen Oberflächen und z. T. auf Zellkulturen beschrieben.

3.1 Methoden

Pseudomonas aeruginosa SG81, ein starker Biofilmbilder, wurde als Gram-negativer Erreger für diese Untersuchungen gewählt, da *P. aeruginosa* häufig ein mit Komplikationen verbundener Wundinfektionserreger ist [12]. Er ist ubiquitär in feuchten Habitaten zu finden [111]. Die Biofilm bildenden Stämme *S. epidermidis* RP62A sowie *S. aureus* ATCC 6538 und SH-095-1 wurden als Gram-positive Vertreter für die Untersuchungen gewählt. Gram-positive Staphylokokken treten häufig bei Implantat- und Katheter-assoziierten Infektionen auf [112] und sind ebenfalls häufig als Wundpathogen zu finden [12]. Sie gehören zur natürlichen Hautflora.

Polycarbonat, Polystyrol, Silikon, PMMA und Edelstahl sind häufig eingesetzte Kunststoffe für Implantate und Medizinprodukte [113, 114]. Polycarbonat und

Polystyrol, die hier v. a. verwendet wurden, sind zur Biofilmkultivierung geeignet [115, 116],Biofilmmodelle in Mikrotiterplatten sind in der Literatur beschrieben [117, 118]. Die Protokolle sind vor allem zur Untersuchung von antimikrobiell wirkenden Substanzen mit längerer Verweildauer angelegt und daher nicht direkt auf die Untersuchung von Plasma an Biofilmen übertragbar sind. In der Literatur beschriebene Biofilmmodelle zur Untersuchung der Plasmawirkung unterscheiden sich, es gibt hierfür derzeit kein Standardmodell. Die hier verwendeten Methoden der Biofilmkultivierung und -ablösung wurden in Vorversuchen untersucht und optimiert. Eine optimale Ausgangerregerzahl im Biofilm mit *P. aeruginosa* auf Polycarbonat nach 72 h Inkubationszeit wurde ebenfalls bei Zelaya *et al.* [119] ermittelt. Biofilmmodelle über 48 h auf Böden von Mikrotiterplatten (Polystyrol) wurden ebenfalls von anderen Arbeitsgruppen verwendet [120, 121]. Eine mögliche Inaktivierung der Erreger durch die Ultraschallbehandlung kann anhand der Ergebnisse vorangegangener Experimente (hierbei wurden die Erreger in Suspension bis zu 45 min mit Ultraschall behandelt, ohne dass eine Reduktion der KbE beobachtet wurde) ausgeschlossen werden. Zum Aufbringen der Erreger auf Nähragar zeigte sich die „Glasperlen-Methode“ im Vergleich zu der „spread-plate“ Methode mittels Spatel als gleichwertig und ermöglichte auch gegenüber dem Ausstreichen mit Wattetupfer eine gleichmäßigere Verteilung der Erreger über den Agar. Da die antimikrobielle Behandlung der Biofilme auf (unterschiedlich großen) Oberflächen erfolgte, wurden die ermittelten KbE/ml jeweils in KbE/cm^2 umgerechnet.

Im Campus PlasmaMed werden sogenannte Plasma-Jets und verschiedene DBE-Plasmaquellen untersucht. Für die Untersuchungen an Biofilmen wurden der kinpen09, die Conplas- und die Epoxidharz-Plasmaquelle ausgewählt, da sie aufgrund der geringen Temperaturentwicklung, der geringen UV-Emission und ihrer indirekten Arbeitsweise (das Substrat bildet hier nicht die Gegenelektrode), eventuell für die Anwendung am lebenden humanen oder tierischen Gewebe geeignet sind. Argon war das Basis-Trägergas für alle Untersuchungen. Es ist zur Generierung von Plasma geeignet, kostengünstig einsetzbar und es können bei Sauerstoffbeimischung zu Argon mehr reaktive Spezies erzeugt werden als z. B. mit Heliumplasma [42, 122].

3.2 Ergebnisse

Der Behandlungsabstand mit dem kinpen09 ist für dessen Wirksamkeit und die erzeugte Temperatur am Substrat entscheidend. Ein direkter Kontakt des durch Ar-Plasma entstandenen sichtbaren Effluenten (10 mm) mit dem Substrat erzielte eine stärkere Inaktivierung der Erreger, als wenn der Kontakt nicht mehr gegeben ist, was durch ein „Ausverdünnen“ der reaktiven Spezies durch das vergrößerte Volumen zum Target und dem damit größer werdenden Einfluss der Umgebungsluft auf das Plasma erklärt werden kann. Die antimikrobielle Wirkung bzw. Reichweite für Erregermengen bis zu 1760 KbE/cm^2 nahm bis 6 mm Abstand für *P. aeruginosa* geringfügig und für *S. aureus* deutlich zu, bei noch geringerem Abstand allerdings wieder ab. Die beobachteten Unterschiede zwischen beiden Erregern könnten ihre Ursache in der unterschiedlichen Verteilung oder unterschiedlichen Reaktionskinetik antimikrobiell wirksamer Produkte im Plasma haben; so sind die Hemmhöfe bei *P. aeruginosa* stets größer als bei *S. aureus*, jedoch nur bis zu einer Erregerdichte von 1760 KbE/cm^2. Steigt die Erregerdichte, werden die HH kleiner und sind zwischen beiden Erregern nahezu identisch. Die Verteilung des Plasmas und des reaktiven Gases aber bleibt identisch. Es ist anzunehmen, dass eine verminderte Erregeranzahl an plasma-empfindlichen Zellen aufgrund der hohen Zelldichte im Umkreis des HH dann nicht mehr beobachtbar ist.
Die antimikrobiellen Reaktionskinetiken der Plasmaprodukte dürften durch die unterschiedliche Zellmembranstruktur der beiden Mikroorganismen Spezies beeinflusst sein.
Aufgrund der moderaten Temperatur an der Spitze des Effluenten bei einer Jet-Länge von 10 mm und der dabei hohen antimikrobiellen Wirksamkeit erwies sich der Behandlungsabstand von 10 mm als optimal für die antimikrobiellen Untersuchungen.

Bei der Conplas ist der Behandlungsabstand für die antimikrobielle Wirksamkeit entscheidend. Die Abbildungen 6 und 7 zeigen, dass bei Ar-Plasma mit einem Abstand $\geq$ 4 mm der Effekt stark abnahm: daher wurde der Abstand für die SBD-Plasmabehandlungen an Biofilmen auf 2 mm festgelegt. Geringere Abstände kamen

aufgrund der Versuchsanordnung und im Hinblick auf eine Wundbehandlung nicht in Betracht.

Für die EH mit Luftplasma war dagegen der Behandlungsabstand nicht so entscheidend. Somit spielten vermutlich eher „langlebige“ Spezies oder Sekundärprodukte des Luftplasmas die entscheidende Rolle in der antimikrobiellen Wirkung gegen *P. aeruginosa* und *S. epidermidis*.

Wirksamkeit von Plasma gegen Biofilme

Bei *P. aeruginosa* wurde mit dem kinpen09 nach 300 s Behandlungszeit eine stärkere Reduktion (bis 5 $\log_{10}$) im Vergleich zu *S. epidermidis* (bis zu 3 $\log_{10}$) bei Ar- und zu Ar+1%O_2-Plasma (2 $\log_{10}$) erreicht.
Die Beimischung von O_2 führte bei *P. aeruginosa* zu keiner erhöhten Wirksamkeit des Plasmas, bei *S. epidermidis* hat sich der antimikrobielle Effekt sogar verringert. Als Ursache kommt die unterschiedliche Zellwandstruktur und damit verbundene Sensibilität gegenüber Sauerstoffstress in Betracht [103]. Zudem könnte die Auslöschung angeregter Argonspezies durch O_2 eine Ursache sein (s. Abschnitt zur Untersuchung der Gasbeimischungen). Die geringere Wirkung gegenüber *S. epidermidis* ist ebenfalls durch eine veränderte Zusammensetzung des Plasmas nach O_2-Beimischung erklärbar, wie sie anhand des Effekts im MAT beobachtetet und diskutiert wird.
Versuche mit Luftplasma wurden mit dem kinpen09 nicht an Biofilmen getestet, da in Voruntersuchungen die antimikrobielle Wirkung deutlich schlechter im Vergleich zu Ar-Plasma war.
Eine Ar+1%O_2-Gas-Behandlung führte beim kinpen09 wie auch bei der Conplas-Plasmaquelle zu einer erhöhten Reduktion der Erreger im Vergleich zum Ar-Gas. Vermutlich verursachte der durch den Gasstrom ausgelöste Druck einen erhöhten oxidativen Stress der Erreger. Auch hier reagierte *P. aeruginosa* empfindlicher als *S. epidermidis*.

Bei der Conplas-Plasmaquelle zeigte ebenfalls Ar-Plasma die stärkste antimikrobielle Wirksamkeit im Vergleich zu Ar+1%O_2- und Ar+H_2O-Plasma. Die Ergebnisse

hierzu sind diskutiert [104]. Ein antimikrobieller Effekt war durch den alleinigen Gasstrom gegeben und besonders hoch bei Ar+1%O_2-Gas, der vermutlich durch Trocknung und oxidativen Stress hervorgerufen wird. Hingegen blieb der antimikrobielle Effekt durch Ar+H_2O-Gas nahezu konstant und gering.

Die Eigenschaft, durch H_2O-Beimischung die Austrocknung zu verringern, macht eine Beimischung von Feuchtigkeit zum Trägergas für Wundbehandlungen interessant, bei denen ein Austrocknen der Wundoberfläche vermieden werden soll [104]. Argonplasma gilt aufgrund der hohen Energie seiner freien Elektronen als geeignet, um O-H-Bindungen von Wasser zu dissoziieren [42]. Die in diesem Experiment gewählte rel. Gasfeuchtigkeit von ca. 80 % war relativ hoch, wodurch vermutlich die erwartete Erhöhung von ROS, z. B. $\cdot$OH, eher gehemmt als gefördert wurde, was ebenfalls diskutiert wurde [104]. Die ineffektive Reduktion der Conplas bei auf Agar kultivierten Erreger im Zentrum der Elektrode (Abb. 6/7) war bei Behandlung an Biofilmen nicht gegeben, da sich aufgrund der geringen Oberfläche der Probenkörper die Umgebungsluft besser verteilen konnte (überprüft mittels Erreger auf Agar-Scheiben anstelle der Probenkörper).

Die EH-Plasmaquelle wurde nicht mit Argon an Biofilmen getestet, da aufgrund der Ergebnisse beim MAT keine Wirkung zu erwarten war.

Die beiden SBD-Plasmaquellen, EH und Conplas, eignen sich zur Generierung von Luftplasma, das bei unterschiedlichen Behandlungszeiten an Biofilmen mit *P. aeruginosa* und *S. epidermidis* untersucht wurde. Hierbei kam es zu zwei auffälligen Unterschieden. Der antimikrobielle Effekt der EH-Plasmaquelle war ca. 0,8 $\log_{10}$ stärker ausgeprägt bei *S. epidermidis* im Vergleich zu *P. aeruginosa* und bei der Conplas-Plasmaquelle mit bis zu 3 $\log_{10}$ (KbE/cm^2) deutlich stärker ausgeprägt bei *P. aeruginosa* im Vergleich zu *S. epidermidis*, obwohl rechnerisch mehr Leistung pro Oberfläche mit der Conplas erzeugt wurde. Eine mögliche Erklärung könnte die unterschiedliche Verteilung des Plasmas über das Substrat sein, denn die Conplas wurde zum leichten Kühlen und zur Verbreitung der reaktiven Spezies mit einem geringeren Gasfluss betrieben und ist ein zur Umgebung offenes System, während die

EH ohne Gasstrom verwendet und in einem von der Umgebung abgegrenztem System betrieben wurde. Der Einfluss der Umgebungsluft kann sich hemmend auf das Luftplasma wirken, z. B. aufgrund einer „Verdünnung“ der reaktiven Spezies. Auch die unterschiedliche Zellwandstruktur, Biofilmmatrix und die unterschiedliche Trocknungsgeschwindigkeit des Substrats während der Behandlung können die Effekte beeiinflussen. Dass die Zellwandstruktur die Wirkungsweise von Plasma beeinflusst, konnte anhand von REM-Bildern demonstriert werden. In Abb. 11A sind flache inaktivierte Zellen von *P. aeruginosa* zu sehen, deren Zelllumen verloren gegangen ist. Im Gegensatz dazu sind in Abb. 11B aufgebrochene Zellen von *S. epidermidis* sichtbar. Plausibel erscheint eine Erklärung aufgrund des unterschiedlichen Aufbaus der Zellhülle zwischen Gram-negativen Erregern, die mit einer äußeren Membran und mit einer vergleichsweise dünnen Wand aus Peptidoglycan als Abgrenzung zur inneren Membran ausgestattet sind, und den Gram-positiven Erregern, die keine äußere Membran, dafür aber eine stark ausgeprägte Peptidoglycanschicht als Zellwand aufweisen. Die Hypothese ist, das die Fettsäuren, insbesondere die ungesättigten der Zellmembran, leichter und schneller oxidieren und zu Membranschäden und Verlust der Struktur führen, während die Oxidation von Polysaccharidstrukturen länger dauert und die reaktiven Spezies zur Inaktivierung von Gram-positiven Erregern vornehmlich durch Diffusion durch die Zellwand an der inneren Bakterienmembran bestimmt wird [123]. Aus diesem Grund wird häufig eine erhöhte Empfindlichkeit von Gram-negativen gegenüber Gram-positiven Erregern berichtet und wurde auch hier beobachtet, womit die Differenz der Wirkstärke der beiden SBD-Plasmaquellen an *S. epidermidis* und *P. aeruginosa* erklärt werden kann. Die beobachteten Zellaufbrüche am Gram-positiven Erreger *S. epidermidis*, die in rasterelektronmikroskopischen Aufnahmen zu sehen sind (Abb. 11B), können daher aufgrund von oxidativen Prozessen an der Zellwand erklärt werden. Die bei Montie *et al.* [123] beschriebenen Mechanismen an Gram-positiven Erregern besagen ebenfalls, dass Zellen, die morphologisch intakt erscheinen, dennoch durch Plasma im Stoffwechsel gestört oder inaktiviert sein können.

Beim Vergleich der Ar-Plasma-Behandlung mit der Conplas-Plasmaquelle mit den Werten nach Luftplasma-Behandlungen derselben Quelle zeigte sich die Ar-Plasma-

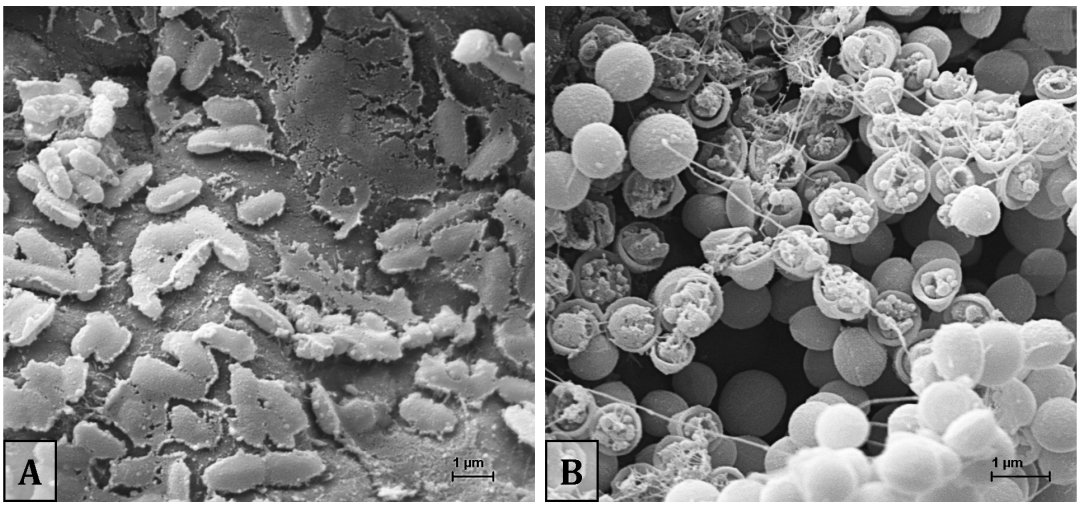


Abb. 11 : REM-Aufnahme morphologisch geschädigter Zellen von Biofilmen auf Polycarbonat nach 300 s Behandlungszeit mit Luftplasma, A: *P. aeruginosa* SG81 (7000x) exponiert mit der Conplas-Plasmaquelle, B: *S. epidermidis* RP62A (10000x) exponiert mit der Epoxidharz-Plasmaquelle.

Behandlung mit 2 $\log_{10}$ Differenz nach 300 s Behandlungszeit antimikrobiell überlegen. Im Vergleich der Ar-Plasma-Behandlung der Conplas zur Luftplasma-Behandlung mit der EH waren beide Plasmaquellen nach 300 s Behandlungszeit gleich effektiv (4,9 $\log_{10}$ vs. 4,8 $\log_{10}$). Aus physikalischer Sicht ist jedoch kein einfacher Vergleich zwischen Luftplasma und Ar-Plasma zulässig, da zur Generierung von Luftplasma meist eine höhere elektrische Leistung in das Plasma investiert wird und auch andere physikalische Parameter variieren, sowie die physikochemische Zusammensetzung des Plasmas aufgrund der verschiedenen Gase eine andere ist. Somit stellen die Vergleiche keine generelle, sondern nur für die zur Testung gewählten physikalischen Parameter der gewählten Plasmaquellen spezifische Aussage dar.

Die Plasma-Behandlung von *P. aeruginosa*-Biofilmen im Vergleich der Conplas-Plasmaquelle mit dem kinpen09 zeigte, dass die antimikrobielle Wirkung des kinpen09 mit Ar-Plasma für kurze Behandlungszeiten effektiver (3,2 $\log_{10}$ vs. 1,6 $\log_{10}$ nach 60 s) ist, nach langen Behandlungszeiten sich aber die Wirksamkeit beider Plasmaquellen angleicht, wobei der kinpen09 mit einem RF von 5,4 $\log_{10}$ dennoch um 0,5 $\log_{10}$ effektiver war als die Conplas. Beim Vergleich der antimikrobielle Wirk-

samkeit des kinpen09 mit Ar-Plasma mit beiden SBD-Plasmaquellen mit Luftplasma war die Wirksamkeit des kinpen09 an Biofilmen mit *P. aeruginosa* und *S. epidermidis* nach 300 s Behandlungszeit der EH nur geringfügig überlegen und um 1-2 $\log_{10}$ antimikrobiell effektiver als die Conplas.

Bei der Wirksamkeit des kinpen09 mit Ar-Plasma an Biofilmen von *P. aeruginosa* auf verschiedenen Substraten zeigte sich, dass die Biofilme auf den Kunststoffmaterialien PS, PC und PMMA vergleichbar empfindlich gegenüber dem Plasma waren. An Biofilmen mit *P. aeruginosa* auf CS war die Wirkung geringer, dieser Unterschied war jedoch nur gegenüber PS signifikant. Die antiseptische Wirkung von CHX an Biofilmen war auf PS und PC am geringsten und bei PMMA und CS stärker ausgeprägt. Diese Unterschiede zeigen, dass Biofilme auf verschiedenen Materialen unterschiedlich empfindlich gegenüber antiseptischer Behandlung sein können. Die Unterschiede waren jedoch in Bezug auf die Plasmabehandlung vernachlässigbar gering. Eine stärkere Reduktion von 3,5 $\log_{10}$ wurde durch Argonplasma auf Silikon erreicht [102]. Dieser Wert liegt nahe den RF der anderen Kunststoffmaterialien.
Um die antimikrobielle Wirksamkeit des kinpen09 besser zu verstehen und optimale Einstell-Parameter zu finden, erfolgten weiterführend verschiedene Untersuchungen an „auf Agarplatten verteilten“ Erregern, kurz MAT (mikrobieller Agartest).

Ergänzende Untersuchungen

Der MAT zeigte sich zur Untersuchung der antimikrobiellen Wirksamkeit verschiedener Plasmen und Applikationsparameter sowie zur Überprüfung der homogenen Verteilung des reaktiven Plasma-Gas-Gemischs von SBD-Plasmaquellen als geeignet, da der Test empfindlich und optisch gut auswertbar ist. Geringe Unregelmäßigkeiten der Plasmaverteilung der Conplas (Abb. 6/7) oder auch technische Abweichungen zweier „baugleicher“ Vorrichtungen der EH (Abb. 9) konnten hiermit dargestellt werden [107]. Es hat sich später herausgestellt, dass sich die Abweichung der beiden EH aufgrund geringer Differenzen im Pulsungsmuster während der Plasmagenerierung unterschied (pers. Mitteilung). Die in Abbildung 6/7 erkennbare Unregelmäßigkeit der Wirkung von Ar-Plasma auf Agar mit der Conplas ist auf den unterschiedlich stark verteilten Einfluss der Umgebungsluft an das Plasma zurückzuführen, denn

bei Luftplasma trat dieser Effekt nicht auf.
Da CSA nach Plasmaeinwirkung selbst antibakteriell wirkt, kann CSA nur bedingt für die Überprüfung der Effektivität von Plasmen an flächig aufgetragenen Bakterien verwendet werden. Der Vorteil von CSA ist jedoch die dabei z. T. gesteigerte Sensitivität, um z. B. Unregelmäßigkeiten der mit Plasma behandelten Fläche erkennbar zu machen. Um die mikrobiozide Wirkung von Plasma zu bestimmen, hat sich daher die Verwendung von Blutagar als geeignet herausgestellt.

Für Untersuchungen mit dem kinpen09 wurden davon ausgehend Gasbeimischungen mit Sauerstoff und Stickstoff sowie Luft zu Argon mittels MAT auf Blutagar getestet, da ein Zuwachs von ROS und NOS bzw. RNOS mit entsprechend veränderter biologischer Wirkung des Plasmas angenommen wurde. Insbesondere bei der Beimischung von Sauerstoff sind eine Vielzahl an hochreaktiven Spezies möglich [124, 125]. Bei den Untersuchungen mit dem kinpen09 an *S. aureus* kam es nach O_2-Beimischung zu Argon zu einem deutlichen Anstieg der antimikrobiellen Wirkung des Plasmas in Form größerer Hemmhöfe, an *P. aeruginosa* jedoch nur leicht verstärkt bei 0,1 % O_2 und nahm bei $>$ 0,5 % O_2-Beimischung wieder leicht ab. Hier zeigte sich, dass die Sauerstoffbeimischung nicht nur zu einer Erhöhung, sondern auch zu einer Verschiebung der Konzentration verschiedener reaktiver Spezies im Ar-Plasma führt. Ebenso kann man bei *S. aureus* nach 60 s Exposition mit Ar-Plasma im „offenen System“ beobachten, wie der HH bei steigender O_2-Konzentration größer wird, aber gleichzeitig die Zahl vereinzelter Kolonien im Hemmbereich zunimmt, bis es schließlich keinen HH mehr gibt, dafür aber die Reduktion gleichmäßig über die Platte verteilt ist [99]. Park *et al.* [125] zeigten die Verschiebung der Konzentrationen von O und O_3 in He-Plasma durch Sauerstoffbeimischung, dabei stieg die O-Konzentration bis zu 0,5 % O_2-Anteil an, sank aber bei höheren O_2-Konzentration wieder ab, wobei die Konzentration von O_3 im Weiterem zunahm. Eine Hypothese ist, dass *P. aeruginosa* empfindlicher auf angeregtem O oder durch O generierte Folgeprodukte und *S. aureus* empfindlicher auf O_3 bzw. dessen Folgeprodukte reagiert. Jedoch trat dieses Bild bei Beimischung von O_2 zu He nicht auf. Daher könnte auch eine Empfindlichkeit von *P. aeruginosa* gegenüber angeregten Argonspezies oder deren Folgeprodukte wahrscheinlicher sein. Wagatsuma und Hirokawa [126]

berichteten, dass eine O_2-Beimischung zu Argon angeregte Argonspezies drastisch reduziert, bei 4 % O_2 bereits um den Faktor 800. Weng *et al.* [127] zeigten, dass die Konzentration von angeregtem O bis 0,5 % O_2 –Zumischung steigt und bei 1 % O_2-Beimischung zu Argon wieder geringer wird. Eine Beimischung bis 0,5 % O_2 zu Argon entspricht der beobachteten Grenze, bei der die antimikrobielle Wirkung an *P. aeruginosa* auf Blutagarplatten ihr Maximum zeigte. Das war jedoch nicht bei *S. aureus* der Fall. Eine O_2-Beimischung zu Helium steigerte bei beiden Erregern die antimikrobielle Effektivität des Plasmas, bei *S. aureus* überstieg diese z. T. die Wirkung von Ar-Plasma, insbesondere wenn 1 % O_2 beigemischt wurde, jedoch blieb hier wiederum die Wirkung bei *P. aeruginosa* leicht unter der Wirksamkeit von Ar-Plasma [99]. Die geringere Effektivität von He- gegenüber Ar-Plasma könnte an einer geringeren Elektronendichte im Plasma und somit einer weniger effektiven Erzeugung bestimmter ROS liegen (innerhalb der hier verwendeten physikalischen Parameter, da die Quelle auf Argon optimiert ist) [128, 129], die für den Effekt an *P. aeruginosa* entscheidend sind. Dagegen entstehen bei He+1%O_2-Plasma ausreichend reaktive Produkte mit dem Potential, insbesondere *S. aureus* zu inaktivieren. Zu beachten ist, dass sich die beschriebene antimikrobielle Wirkung anhand der HH-Größe möglicherweise nur auf die Reichweite der antimikrobiell wirksamen Produkte beschränkt, die wiederum je nach Beschaffenheit der HH ein Zeichen für die Konzentration der entsprechenden Produkte sein kann, aber nicht sein muss. So können, wie es die vorliegenden Ergebnisse andeuten, durch eine Verschiebung der Zusammensetzung der Produkte stabilere Spezies entstehen, deren Reichweite größer ist, ohne dass wirklich eine erhöhte Wirksamkeit im Sinne einer schnelleren oder effektiveren antimikrobiellen Wirkung vorliegt.

Untersuchungen mit Luft als Trägergas zeigten keine Wirkungsoptimierung gegenüber Argon. Die geringere Wirkung von He- und Luftplasma könnte eventuell durch eine erhöhte Energiezufuhr zur Generierung des Plasmas verstärkt werden, um die Elektronendichte und auch die –Temperatur zu erhöhen. Die Beimischungen von N_2 zu Argon oder Helium führten hier zu keinem verstärkenden Effekt. Bei Untersuchungen mit der EH mittels MAT war keine antimikrobielle Wirkung mit Ar-Plasma nachweisbar, da diese Applikation von der Umwelt abgeschlossen in reiner Ar-Atmosphäre arbeitete. Im Gegensatz dazu wurden deutliche Effekte mit der

Conplas, deren Plasma von Umgebungsluft beeinflusst wird, ermittelt. Dieser Vergleich zeigt, dass die antimikrobiellen Wirkkomponenten des Ar-Plasmas erst durch den Kontakt mit Luft erzeugt werden. Dieser Aspekt wird durch das Ergebnis der Untersuchung zum Plasma-Gas-Gemisch über größere Distanz mit purem Ar-Plasma bekräftigt (s. Abschnitt „Plasma-Gas-Gemisch-Test“). Überraschenderweise genügte bei der EH die Beimischung von 1 % O_2 zum Ar nicht, um innerhalb der untersuchten 150 s eine antimikrobielle Wirkung zu erzielen. Eine mögliche Ursache könnte eine zu geringe Ionisierung des Gases sein, um ausreichend antimikrobiell wirksame ROS zu generieren.

Die durch Gasbeimischungen von O_2 und H_2O zu Argon angestrebte antimikrobielle Wirkungsverbesserung des Plasmas gegen Biofilme hat sich nicht oder nur im geringen Maß bestätigt. Die Anreicherung des Argons mit ca. 80 % relativer Feuchtigkeit wurde aufgrund der einfachen, damals verfügbaren, Methode, mit der das Gas durch eine Flasche mit destilliertem Wasser getrieben wurde, gewählt. Eine geringere Befeuchtungsmöglichkeit war noch nicht etabliert. Die Beimischung von 1 % O_2 wurde anfangs gewählt, da hierbei die deutlichsten Effekte zur Beeinflussung der Ätzrate [130] an Polymeren und der Hydrophilisierung von Oberflächen bekannt waren und demzufolge eine hohe Konzentration an ROS erwartet wurde. Die Ergebnisse zur Hydrophilität wurden unlängst in Zusammenhang mit einer gesteigerten Ausbreitung (Zell-spreading) von adhärierenden Zellen auf den behandelten Oberflächen präsentiert [131]. Bezüglich der gesteigerten Ätzrate ist anzumerken, dass diese Untersuchungen mit einem älteren Modell des kinpen untersucht wurden.

Bisherige Untersuchungen mit dem kinpen09 erfolgten stets im Kontakt der sichtbaren Spitze der Strahlungsemission (sichtbare Effluent) mit dem Substrat. Damit wurde ein Kompromiss zwischen einer möglichst hohen Dichte an reaktiven Spezies und einer geringen Temperatur des Plasma-Gas-Gemischs erreicht. Es stellte sich daher die Frage, ob biologisch wirksame Produkte des Plasmas auch über längere Distanzen zur Verfügung stehen, also sehr langlebige Spezies beteiligt sind. Die Untersuchungen zu den Gasbeimischungen im „abgeschirmten System“ (s. Abschnitt „Plasmawirkung zwischen einem zur Umgebung „offenen“ oder abgeschirmten Sys-

tem“), bei dem eine Reduktion über die gesamte Agarplatte auftrat, deuteten darauf hin. Vorteile für eine Wundbehandlung wären, dass

- der Druck des Gasflusses durch die Verteilung auf eine Oberfläche stark reduziert und somit die mechanische Reizung und Austrocknung herabgesetzt werden könnten,
- unebene Oberflächen gleichmäßig und flächig mit dem kinpen09 behandelt werden könnten,
- das Plasmasystem nicht in unmittelbarer Nähe des Behandlungsorts stehen muss,
- eine mögliche Kontamination des Plasmapens vermieden wird und eine hygienische Plasmabehandlung somit einfacher realisierbar ist.

Die Ergebnisse zu den Untersuchungen des Plasma-Gas-Gemischs ergaben, dass, wenn den Trägergasen Ar oder He Sauerstoff beigemischt wird, das Plasma-Gas-Gas-Gemisch, ebenfalls über eine Distanz von ca. 55 cm eine Erregerreduktion auf der Agarfläche hervorruft. Weiterhin wurde auch eine antimikrobielle Wirkung an Biofilmen festgestellt. Damit ist bestätigt, dass im Plasma „stabile“ reaktive Produkte an einer antimikrobiellen Wirkung beteiligt sind, die eine Erregerreduktion bei einer Wundbehandlung erzielen könnten. Es konnte ebenfalls bestätigt werden, dass hierbei Sauerstoffspezies beteiligt sind, da zum einen die Hemmung des Bakterienwachstums nur bei Sauerstoffbeimischungen zum Ar oder He auftrat, während das gesamte System zur Umwelt „abgeschlossen“ war, und zum anderen eine Überprüfung auf ROS mittels Ozon-Dräger-Röhrchen einen positiven Nachweis ergab.

Die antimikrobielle Eigenschaft von plasmabehandeltem CSA deutet darauf hin, dass dieses bereits bei der Bestimmung des Behandlungsabstands aufgetretene Phänomen durch „langlebige“ Spezies vermittelt wird, die durch Reaktionen mit dem Agar antimikrobiell wirksame Produkte erzeugen.

Der Vergleich der Plasmawirkung zwischen einem zur Umgebung „offenen“ oder abgeschirmten System ergab in Abhängigkeit des verwendeten Systems Unterschiede in der antimikrobiellen Wirkung. Abgeschirmt bedeutet, dass der Einfluss der Umge-

bungsluft lediglich im Bereich des sichtbaren Effluenten gegeben ist und im Weiteren durch den Petrischalendeckel begrenzt wird. Der antimkrobielle Effekt, meist in Form der HH-Größe, wurde durch die Abschirmung verstärkt. Dieser Effekt kann mit einem Anstauen des Plasma-Gas-Gemischs und damit erhöhter Konzentration von ROS erklärt werden. Es zeigte sich auch, dass ab einer bestimmten Konzentration an Sauerstoffbeimischung nach einer punktförmigen Behandlung mit Plasma insbesondere im abgeschirmten System anstatt eines zentralen Hemmhofs eine Reduktion der Erreger über die gesamte Agarplatte verteilt auftrat. Dieser Effekt war vom Trägergas, der beigefügten Sauerstoffkonzentration und der Behandlungszeit abhängig. Der Wechsel des zu beobachtenden Effekts könnte ursächlich mit dem antimikrobiellen Effekt des Plasma-Gas-Gemischs über größere Distanz (s. „Plasma-Gas-Gemisch-Test“) vergleichbar sein. Die folgende Erklärung ist ein mögliches Modell. Die Entstehung des Hemmhofs wird aufgrund hoch reaktiver und kurzlebiger Reaktionsprodukte, wie z. B. von $\cdot$OH, sowie energiereicher Strahlung (UV/VUV) erzeugt und ist im Ausmaß begrenzt. Wird der Sauerstoffanteil im Plasma erhöht, könnte es, wie bereits im Abschnitt zur Gasbeimischung besprochen, zu einer Verschiebung zu stabileren reaktiven Plasmaprodukten wie O_3 kommen [125], die weiter transportiert werden können und im Substrat bzw. Medium reaktive Sekundärprodukte erzeugen. Eine Verdünnung oder möglicherweise geringere Reaktivität der entstehenden Sekundärprodukte führt dann zu einer im Vergleich zur direkten Plasmabehandlung schwächeren biologischen Wirkung und damit notwendigen längeren Expositionszeit am Target.

Um den Einfluss der Feuchtigkeit am Target zu untersuchen (und um somit eventuelle sekundäre Produkte zu erfassen), erfolgte eine Testreihe mit verändertem Versuchsaufbau. *Staphylococcus aureus* wurde auf Edelstahl-Scheiben aufgetragen und diese am oberen und unteren Rand sowie in der Mitte der Petrischale positioniert, jeweils mit unterschiedlichen Bedingungen an Umgebungsfeuchtigkeit.

Die Feuchtigkeit unterschied sich dabei folgenderweise:

a) die Erregersuspension war mit einem Wasserfilm bedeckt (nass),
b) die Oberfläche mit den Erregern war noch feucht,
c) die Erreger sind trocken auf der Plättchenoberfläche, aber die Plättchen liegen auf nassen (und warmen) Zellstoff (hohe Feuchtigkeitsabgabe),
d) die Plättchen mit trockenen Erregern liegen auf Blutagar (geringe Feuchtigkeitsabgabe),
e) die Plättchen mit trockenen Erregern liegen in einer trockenen Petrischale.

Anschließend wurde die antimikrobielle Wirkung des Plasmas (Ar+0,5%O_2-Plasma, 2 min, hierbei wird eine Gesamtreduktion der KbE über die Agarfläche erzeugt) in Abhängigkeit von der Feuchtigkeit ermittelt. In der Mitte erfolgte stets eine Erregerreduktion. Im Randbereich der Petrischale erfolgte einerseits keine Reduzierung der Erreger, wenn diese auf dem Plättchen getrocknet oder noch mit einem Wasserfilm bedeckt waren. Andererseits erfolgte eine Erregerreduktion auch im Randbereich, wenn die Umgebung der Erreger feucht war. Dabei zeichnete sich ab, dass die Wirkstärke in Abhängigkeit von der Umgebungsfeuchtigkeit von feucht zu trocken abnimmt, in der Reihenfolge der Varianten b) > c) > d). Daraus ergibt sich, dass in diesem Fall die antimikrobielle Wirkung der „stabilen“ reaktiven Spezies nicht allein direkt, sondern vor allem über Reaktionsprodukte mit Wasser im gasförmigen Zustand entsteht und im direkten Kontakt mit den Mikroorganismen wirkt. Mögliche Reaktionsprodukte des Plasmas bei Sauerstoffbeimischung, die vergleichsweise stabil sind, können z. B. Ozon und $^1O_2$ sein. In der Gasphase kann $^1\triangle_g O_2$ mehrere Minuten und O_3 in Abhängigkeit verschiedener physikalischer Parameter bis zu vielen Stunden stabil bleiben [132, 133]. Mögliche reaktive und antimikrobiell wirkende Produkte, die dabei in Reaktion mit Wasser entstehen können, sind vor allem $\cdot OH$, wenn es unmittelbar an der bakteriellen Membran entsteht, und H_2O_2, das in Kombination insbesondere mit NO_2^- und NO_3^- potentiell antimikrobielle Wirkung entfaltet [75, 134, 135].

Weiterführende Untersuchungen in Bezug auf eine Wundbehandlung mit TTP beinhaltete die Eindringtiefe von Bakterien in eine rekonstruierte Epidermis. Es

konnte gezeigt werden, dass Bakterien aufgrund des Gasstroms von 5 slm durch eine 2 mm-Öffnung des kinpen09 nicht tiefer in die Epidermis verlagert werden. Einschränkend ist anzumerken, dass es sich um intakte und nicht um eine geschädigte Haut (= Wunde) handelte. Eine antimikrobielle Wirkung konnte in diesem Modell auch an aufgetragenen Erregern und an Biofilmen gezeigt werden.

Die Wirksamkeit von Plasma ist insofern limitiert, als sich bei langen Behandlungszeiten ein Detritus an der Oberfläche des Biofilms bilden kann, der sich wie eine Schutzbarriere über die tieferen Schichten des Biofilms ausbreitet [105]. Daher könnte eine Kombination von Plasma mit konventionellen Antiseptika eine aussichtsreiche Methode sein, um die Wirksamkeit zu verbessern.

Der kinpen09 eignet sich für kurze Behandlungszeiten, da er ständig bewegt wird. Kurze Plasmaexpositionszeiten sind zudem besser gewebeverträglich. Wenn durch Plasma die Effektivität von Antiseptika gesteigert wird, könnten geringere Wirkstoffkonzentrationen eingesetzt werden, die dann möglicherweise eine verminderte Zelltoxizität aufweisen. Eine Pilotstudie dazu zeigte vor allem additive Effekte von TTP mit PHMB, ACT und OCT. Bei *S. aureus* konnte bei einer ACT-Konzentration von 0,001 % eine synergistische Wirkung beobachtet werden. Bei dieser Konzentration ist, nachgewiesen in einem Vortest, eine antiseptische Wirkung von ACT allein ausgeschlossen. Auch bei CHX trat eine synergistische Wirkung mit TTP auf. Die Behandlungen erfolgten jeweils aufeinanderfolgend. Effektiv ist es, wenn zuerst die Behandlung mit dem Antiseptikum und anschließend mit TTP erfolgt. Eine Zerstörung des Antiseptikums durch die Plasmaexposition ist vermutlich nicht gegeben. Spektrometrische Messungen von Lösungen mit CHX, PHMB und OCT vor und nach 5 min Plasmaexposition zeigten keine Veränderung im graphischen Spektrum (Hauptabsorptionsmaxima für OCT = 213 nm, PHMB = 235 nm, CHX = 231 und 255 nm). Für die Kombination sind Behandlungen mit PHMB und ACT interessant, weil diese Substanzen eine wundheilungsfördernde Wirkung besitzen [97, 136]. Eine wundheilungsfördernde Eigenschaft von TTP in Kombination mit PHMB wurde an Tierpatienten bereits mehrfach beobachtet [137].
Die Stabilität der Antiseptika bei einer Plasmabehandlung und deren möglicherweise

veränderten Toxizität müssen noch weiter untersucht werden.

Die Voruntersuchung zu einer möglichen Resistenzbildung gegenüber Plasma an Biofilmen mit *S. aureus* ergab, dass die antimikrobielle Wirkung je Behandlungsphase unabhängig von der Ausgangserregerzahl und Anzahl vorangegangener Plasmabehandlungen relativ konstant blieb. Die Gesamterregerzahl im Biofilm nahm bis zur 5. Stunde je Behandlungsphase kontinuierlich ab. Von der 5. zur 6. Stunde betrug die Regeneration der Erreger ca. 1 $\log_{10}$ und erreichte somit die Erregerzahl, die durch die Plasmabehandlung inaktiviert wurde. Demzufolge ist bei etwa 4,5 $\log_{10}$ die Grenze erreicht, bei der die Regeneration der Erregerpopulation und deren Inaktivierung durch Plasma von ca. 1 $\log_{10}$ ausgeglichen wird. Die Konstanz des RF, ohne dass sich die Erregermenge im Biofilm zwischen den Behandlungsphasen im Verlauf des Experiments schneller regenerierten, lässt keinen Rückschluss auf eine allmähliche „Gewöhnung“ bzw. Resistenzentwicklung der Erreger gegenüber Plasma zu.
In Bezug auf eine Behandlung infizierter chronischer Wunden ist derzeit keine Limitierung der Plasmabehandlung durch eine mögliche Resistenzentwicklung der Mikroorganismen zu erwarten.

Eine Aussage, ob der Gram-negative Erreger *P. aeruginosa* empfindlicher oder unempfindlicher als die untersuchten Gram-positiven Erreger gegenüber Plasma reagieren, kann nicht pauschal gegeben werden. Bei Versuchen an Biofilmen war *P. aeruginosa* stets empfindlicher als *S. epidermidis*, jedoch zeigte sich kein einheitliches Bild bei Plasmabehandlungen an Erregern auf Nähragarplatten. Hier war nach Behandlungen mit Luftplasma der SBD-Plasmaquellen *S. epidermidis* und bei Argon oder Helium mit Sauerstoffbeimischung des kinpen09 *S. aureus* stärker gegenüber Plasma empfindlicher als *P. aeruginosa*. Bei Behandlungen mit purem Ar-Plasma war wiederum *P. aeruginosa* empfindlicher.

3.3 Resümee der untersuchten Plasmaquellen in Hinblick auf eine Wundbehandlung

Für ein Resümee der untersuchten Plasmaquellen in Hinblick auf eine Wundbehandlung soll ein kurzer Überblick über deren Vor- und Nachteile gegeben werden.

Der kinpen09 ist durch folgende Merkmale gekennzeichnet:

- Die antimikrobielle Effizienz ist in Bezug zum Abstand des Effluent zum Substrat relativ unempfindlich.
- Schwer zugängliche Bereiche können durch die Wirksamkeit des Effluenten erreicht werden.
- Das Handstück ist relativ klein und somit praktisch handhabbar.
- Nachteilig ist der starke Gasstrom, durch den ein Verspritzen von Flüssigkeit und somit auch von Erregern mit einer Kontamination des Handstücks möglich ist und sich Trocknungseffekte auf dem Gewebe negativ auf die Wundheilung auswirken können.
- Er ist nicht flexibel an verschiedene Trägergase adaptierbar, kann bei anhaltender punktueller Behandlung lokal als heiß empfunden werden und es kann, insbesondere, wenn Metalle getroffen werden, zu einem erhöhten Stromfluss am Patienten kommen.

Die Conplas weist folgende Eigenschaften auf:

- Sie ist an verschiedene Trägergase flexibel anpassbar, und es besteht die Möglichkeit, das Trägergas anzufeuchten.
- Sie ist sowohl mit Argon- als auch mit Luftplasma antimikrobiell sehr effektiv, wobei Luftplasma den Vorteil besitzt, dass bestehende Luftleitungen eines Krankenhauses genutzt werden könnten und die Betreibung und Installation kostengünstiger wird.
- Es kann eine größere Fläche gleichzeitig behandelt werden. Zudem können verschiedene Bauformen nach dem Prinzip der Conplas-Elektrode erstellt und somit an verschiedene Oberflächenformen angepasst werden [138].
- Es ist nicht möglich, dass elektrische Ladungen auf den Patienten überspringen.

- Nachteilig ist, dass der Abstand zum Substrat sehr gering gehalten werden muss. Die Elektrode kann daher leicht verschmutzt und kontaminiert werden. Ebenso würden durch Unebenheiten Bereiche unterschiedlich effektiv behandelt.

Die EH-Plasmaquelle und deren Weiterentwicklung mit Keramik als Dielektrikum sind durch folgende Eigenschaften gekennzeichnet:

- Ihr Vorteil liegt in der hohen antimikrobiellen Effizienz mit Luftplasma, besonders bei dem Gram-negativen *P. aeruginosa*-Stamm. Aufgrund ihrer Bauweise können neue Modelle an verschiedene Strukturen adaptiert werden.
- Sie lässt sich mit der Umgebungsluft betreiben, oder es ist eine Glocke notwendig, um das zu behandelnde Areal mit dem Trägergas zu fluten.
- Nachteilig wirkt sich die hohe Empfindlichkeit der Elektrode gegenüber Abnutzungserscheinung (Epoxidharz) oder der Umgebungsfeuchtigkeit (Keramik) aus, sodass für eine stabile Plasmagenerierung erst eine bestimmte Betriebstemperatur notwendig ist, um Kondensationen an der Elektrode zu verhindern.
- Ihr größter Nachteil für eine kontaktnahe Behandlung besteht durch die Gefahr einer Entladung zwischen der Elektrode und dem Gewebe, wie es unter bestimmten Bedingungen auftreten kann (direkte Punktentladungen konnten an Blutagarplatten beobachtet werden), was mit einer punktuellen Verbrennung einhergehen würde.

Bei allen drei Plasmaquellen entsteht während der Behandlung ein Gas, das bei längerer Exposition zu Unwohlsein der Personen in unmittelbarer Nähe führen kann. Ob es sich dabei allein um das hier vermutete Ozon handelt, ist derzeit unklar.

Die Gewebeverträglichkeit kann in Hinsicht auf Temperaturentwicklung und UV-Emission für alle drei Plasmaquellen gegeben sein. Für den kinpen09 ist seine „Tissue Tolerability“ bis 60 s Behandlungszeit vermutlich gegeben, sofern die Behandlungszeit kumulativ über ein Areal und nicht konstant an einem Punkt erfolgt. An extrahierten Augen von Schlachtschweinen wurden bis 58 s Behandlungszeit keine histologischen Schäden beobachtet [139], jedoch wurden im HET-CAM bereits nach

10 s punktueller Behandlung Schäden beobachtet, die nach Bender *et al.* [140] das moderate Stadium überschritten. Aufgrund einer Voruntersuchung an Mausfibroblasten (L-929) ist eine Gewebeverträglichkeit der beiden SBD-Elektroden bei einer Behandlungsdauer bis zu 60 s ebenfalls zu erwarten [104, 105]. Aufgrund der hohen Flexibilität in der Handhabung des kinpen09 können kleine Flächen leicht „abgepinselt“ werden. Wegen seiner stabilen antimikrobiellen Wirksamkeit, die der Wirksamkeit verschiedener Wundantiseptika nahe kommt [65, 90], und insbesondere wegen seiner antimikrobiellen Wirkung auch in Kavitäten [65] ist diese Plasmaquelle aus Sicht der Behandlung von Biofilmen auf chronisch infizierten Wunden zu favorisieren. Ebenso ist er aus diesen Gründen zur Behandlung eröffneter Wunden, z. B. bei einer implantat-assoziierten Entzündung, als geeignet anzusehen.

Mit den vorliegenden Ergebnissen sind wichtige Plasmaparameter (punktförmige, flächige, gepulste, verschiedene Gasmischungen) und Einstellungsparameter (Behandlungsabstand) für die vorgegebenen Behandlungsparameter (Gasfluss, Spannung) für die Optimierung von Plasmaquellen zur antimikrobiellen Wirksamkeit dargelegt worden, mit Hinweisen zur antimikrobiellen Wirkungsweise von Plasma und seinen Anwendungschancen auf Wunden. Aufgrund der z. T. komplexen Mechanismen der Interaktion von Plasma und Mikroorganismen, die eine antimikrobielle Wirkung hervorrufen, kann kein abschließendes einheitliches Resultat für eine optimale Plasmaquelle zur Inaktivierung von Mikroorganismen in Biofilmen auf künstlichen Materialien gegeben werden.
Das Substrat selbst hat keinen entscheidenden Einfluss auf die Wirksamkeit von Plasma gegenüber den Biofilmen. Vielmehr spielen die Zusammensetzung der Biofilmmatrix und metabolische Zustände der Erreger, die nur *in vitro* vergleichbar sind, und physikalische Parameter der Plasmaquelle sowie der Versuchsaufbau die entscheidendere Rolle. Argon (erregerspezifisch auch Helium) als Trägergas ist zur Generierung von bioaktivem Plasma geeignet. Eine Beimischung von O_2 bis 0,5 % kann die Wirksamkeit verstärken, bei höherer O_2-Konzentration ist ein weiterer Benefit möglicherweise eher nur erregerspezifisch. Weitere Gas-Beimischungen von N_2, N_2+O_2 oder Luft brachten keine Wirkungsverbesserung. Eine hier erwartete Zunahme an NOS könnte dennoch für eine Wundbehandlung zur physiologischen Be-

einflussung interessant sein [42]. Luftplasmen sind für flächige Barriere-Entladungs-Plasmaquellen eine Alternative zu Argon, zumal die Umgebungsluft bei Argonplasma möglicherweise nicht die gesamte Fläche der Elektrode gleichmäßig beeinflusst. Zudem müssen die Behandlungsabstände zur Behandlungsfläche auf wenige Millimeter beschränkt werden. Eine Hybrid-Variante, eine DBD mit einem konzentrierten Ausstoß des Plasmas, könnte ein interessanter Kompromiss zwischen der flexibel an Gasmischungen mit und ohne Feuchtigkeit einsetzbaren DBD und einer weitreichenden Ausbreitung der reaktiven Plasmaprodukte, die flexiblere Behandlungsabstände ermöglichen, sein. Die Zugabe von Feuchtigkeit zum Plasma zur Erhöhung von ROS scheint eher nur bei geringen Konzentrationen relativer Gasfeuchtigkeit Vorteile zu bringen. Wenn eine hohe Feuchtigkeit auf der Behandlungsoberfläche erwünscht ist, sollte diese eher extern zugeführt werden.

Die von Matthes *et al.* [99] präsentierte Methode des MAT ist eine einfache, schnelle, standardisierbare und im Aufbau leicht auf sämtliche Plasmaquellen adaptierbare Möglichkeit, Plasma mit unterschiedlichen Parametern und Gasbeimischungen an verschiedenen Erregern zu vergleichen. Parallel ist es möglich, anhand verschiedener Formen der Wachstumshemmung und der Beschaffenheit der HH Verschiebungen in der Zusammensetzung von reaktiven Spezies im Plasma-Gas zu beobachten und erste Hinweise auf die Verteilung der Sensitivität des Plasma-Gas-Gemischs innerhalb einer Erregerspezies zu erhalten.

Eine Analyse zur spezifischen Wirkung von Plasma an Mikroorganismen und humanen sowie tierischen Gewebes benötigt weitere, v. a. in den Grundlagen der Zellphysiologie und Molekularbiologie basierende Forschung und der Analyse der verschiedenen physikalischen Komponenten und physikochemischen Interaktionen im Plasma und im Kontakt mit der Umwelt.

In Hinblick auf eine Wundbehandlung stellt TTP aufgrund seiner den herkömmlichen chemischen Wundantiseptika in Bezug auf den Wirkungsmechanismus und die Behandlungszeit überlegenen antimikrobiellen Wirksamkeit wie teilweise geringeren akuten Toxizität und beobachteten wundheilungsfördernden Eigenschaften

eine vielversprechende alternative Therapiemöglichkeit zur Behandlung von chronisch infizierten Wunden oder zur Dekontamination von eröffneten Wunden und implantierten Materialien dar.

Kapitel 4

Weiterführende Gedanken

Weitere Untersuchungen zum Verstehen und Optimieren der antimikrobiellen Wirkung von Plasma sind z. B. die Bestimmung des Einflusses der unmittelbaren „Umgebungsfeuchtigkeit“ am Substrat, der Stärke des Flüssigkeitsfilms auf Biofilmen oder des Einflusses des Pulsungsmodus während der Plasmagenerierung.
Limitierungen im Einsatz von Plasma aufgrund von Erkenntnissen über die Gewebeverträglichkeit und wundheilungsstimulierender Effekte sollten mit in die Versuchsaufbauten zur antimikrobiellen Untersuchungen einfließen, da diese Aspekte Voraussetzungen für eine erfolgreiche Wundbehandlung sind.
Die Flüssigkeit im Wundbereich wird mit Sicherheit die Plasmawirkung beeinflussen bzw. mitbestimmen; daher sollte die Wirksamkeit an mikrobiellen Biofilmen auf Wunden mittels *in vitro* – Modellen mit möglichst wirklichkeitsnaher, standardisierter künstlichen Wundflüssigkeit erfolgen.
Die Ergebnisse der verschiedenen Gasmischungen in einem zur Umgebung „offenen“ oder „geschlossenen“ System ergaben, dass die antimikrobielle Wirkung von Plasma an verschiedenen Mikroorganismen unterschiedlich stark ist. Das Plasma kann zur Inaktivierung der Mikroorganismen möglicherweise erregerspezifisch optimiert werden.
Eine steigernde Unempfindlichkeit der Erreger gegenüber Plasma oder die Bildung von nichtkultivierbaren, aber lebensfähigen Zellen sollte ebenfalls untersucht werden, um eine bakterielle Rekolonisation des Gewebes oder Implantatmaterials, im Behandlungsverlauf auszuschließen. Zudem sollte auch die Interaktion von Plasma mit Antibiotika nicht unberücksichtigt bleiben, falls eine parallele oder gekoppelte Therapiestrategie angestrebt wird. Es ist denkbar, dass eine durch Plasma induzierte Stressantwort der Erreger, z. B. aufgrund von ROS oder pH-Wert-Änderungen in

der umliegenden Flüssigkeit, gleichzeitig eine geringere Empfindlichkeit gegenüber Antibiotika induziert wird [141].

Kapitel 5

Zusammenfassung

Die Inaktivierung von Bakterien durch Antiseptika, z. B. auf chronischen Wunden ist unter anderem aufgrund der Bildung von Biofilmen erschwert. Ebenso stellt die Entwicklung von Resistenzen gegenüber Antibiotika ein immer größer werdendes Problem bei der Behandlung von Infektionen dar. Zudem ist die antimikrobielle Behandlung nur ein Teilaspekt, um chronisch infizierte Wunden in einen regenerativen Heilungsprozess zu überführen. Daher sind neue, alternative Behandlungsstrategien von hoher Bedeutung. Hierfür scheint physikalisches Plasma aufgrund seiner antimikrobiellen wie auch wundheilungsfördernder Wirkungsweise eine aussichtsreiche Perspektive darzustellen.

Zur Erzeugung von sog. Tissue Tollerablen Plasma (TTP) stehen verschiedene Plasmaquellen zur Verfügung, die zur Anwendung gegen Mikroorganismen in Biofilmen in Frage kommen. In der vorliegenden Arbeit wurden der kinpen09 und zwei Dielektrisch-Behinderte-Oberflächen-Entladungs-Quellen, die Conplas- und die Epoxidharz-Plasmaquelle, auf ihre antimikrobielle Wirkungsweise mit Argonplasma mit und ohne Sauerstoffbeimischung und mit Luftplasma v. a. an Biofilmen mit *P. aeruginosa* SG81 und *S. epidermidis* RP62A untersucht. Mit dem kinpen09 wurde zusätzlich die antimikrobielle Effektivität von Plasma mit Helium oder Stickstoffbeimischungen getestet. Bei Einsatz des kinpen09 zeigte sich Argon als das antimikrobiell effektivste Trägergas. Bei der Epoxidharz-Plasmaquelle war Luftplasma am wirksamsten. Bei der Conplas sind Luft- und Argonplasma etwa gleich effizient gegen mikrobielle Biofilme. Die Reduktionsraten bei Argonplasma mit dem kinpen09 und Conplas lagen nach 300 s Expositionszeit bei *P. aeruginosa* bei ca. 5 $\log_{10}$ und mit dem kinpen09 bei *S. epidermidis* bei 3 $\log_{10}$. Diese Reduktionsraten übersteigen mit Ausnahme von 300 s Ar+O_2-Plasma (kinpen09) die Wirksamkeit

von Chlorhexidin (0,1 %), einem Standard-Antiseptikum zur Behandlung von Biofilmen, nach 10 min Behandlungsdauer von ca. 1,5 $\log_{10}$ signifikant ($p < 0{,}005$).
In Übereinstimmung zur Literatur lässt sich aus den Ergebnissen ableiten, dass v. a. Sauerstoffradikale für die antimikrobielle Wirksamkeit verantwortlich sind.
Neben der alleinigen Anwendung von TTP könnten Kombinationsbehandlungen mit Antiseptika aussichtsreiche Verfahren zur gezielten Inaktivierung von Mikroorganismen in Biofilmen und zur Modulation von Wundheilungsprozessen darstellen.

Von den geprüften Plasmaquellen kann der kinpen09 aufgrund seiner flexiblen Einsatzweise und hohen antimikrobiellen Effizienz derzeit zur Behandlung von chronisch infizierten Wunden favorisiert werden.

Kapitel 6

Summary

The inactivation of bacteria by antiseptics, like in chronic wounds, is complicated by microbial biofilms. Just as the development of bacterial resistance against antibiotics is an increasing problem in the treatment of infections. Additionally, the antimicrobial strategy is only one aspect to lead chronically infected wounds into a stable regeneration process. Therefore, new and alternative strategies are necessary and are particularly interesting. Here, physical plasma with its antimicrobial efficacy and stimulation of wound healing seems to be a promising option.
Different plasma sources are available to generate tissue tolerable plasma (TTP). For this work, the tissue tolerable plasma-jet kinpen09 and two different surface dielectric barrier discharges, the "Conplas"- and "Epoxidharz"- plasma sources, which seem to be tissue tolerable by their physical properties, were tested for their antimicrobial efficacy against the biofilm forming bacteria *P. aeruginosa* SG81 and *S. epidermidis* RP62A on biofilms and uncoated on agar. The working gas helium and admixtures of nitrogen to argon or helium were additionally tested by the kinpen09 plasma source. With the kinpen09 argon was the most antimicrobial effective working gas. The "Epoxidharz" plasma source with the ambient air as working gas showed the highest antimicrobial effect. The antimicrobial effectiveness of the Conplas was similar for argon and air plasma. The reduction rates for argon after 300 s treatment time on *P. aeruginosa* with the kinpen09 and Conplas was approximately 5 $\log_{10}$ and the treatment on *S. epidermidis* at 3 $\log_{10}$. These reductions are superior to the efficacy of Chlorhexidin (0.1 %), a standard antiseptic solution used especially for biofilm treatment. The Chlorhexidine treatment resulted in a reduction of 1.5 $\log_{10}$ after 10 min treatment time, which is significantly ($p < 0.005$) lower than the plasma treatment, except the 300 s $Ar+O_2$-plasma treatment with the kinpen09. In compar-

ison with the scientific literature different indications after the experiments suggest that the main antimicrobial components of plasma are chiefly caused by oxygen radicals.
Besides, the single application of TTP for antimicrobial treatments, the use of a combination of plasma and different antiseptics could be promising to inactivate microorganism in biofilms and to modulate wound healing processes.

Currently, in comparison to the three tested plasma sources the kinpen09 is the favorite plasma source for a future application in wound treatment, because it is flexible in usage and showed a high antimicrobial efficacy.

Literaturverzeichnis

[1] Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections. Science. 1999;284(5418):1318–1322. URL: http://dx.doi.org/10.1126/science.284.5418.1318.

[2] Driffield K, Miller K, Bostock JM, O'Neill AJ, Chopra I. Increased mutability of Pseudomonas aeruginosa in biofilms. J Antimicrob Chemother. 2008;61(5):1053–1056. URL: http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkn044.

[3] Fux CA, Costerton JW, Stewart PS, Stoodley P. Survival strategies of infectious biofilms. Trends Microbiol. 2005;13(1):34. URL: http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2004.11.010.

[4] Molin S, Tolker-Nielsen T. Gene transfer occurs with enhanced efficiency in biofilms and induces enhanced stabilisation of the biofilm structure. Curr Opin Biotechnol. 2003;14(3):255–261. URL: http://dx.doi.org/10.1016/S0958-1669(03)00036-3.

[5] Jain A, Agarwal A. Biofilm production, a marker of pathogenic potential of colonizing and commensal staphylococci. J Microbiol Methods. 2009;76(1):88–92. URL: http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2008.09.017.

[6] Ovington L. Bacterial toxins and wound healing. Ostomy Wound Manage. 2003;49(7A Suppl):8–12. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12883157?dopt=Citation.

[7] Gastmeier P, Geffers C. Nosokomiale Infektionen in Deutschland: Wie viele Infektionen gibt es wirklich? Dtsch Med Wochenschr. 2008;133(21):1111–1115. URL: http://dx.doi.org/10.1055/s-2008-1077224.

[8] Geffers C, Gastmeier P, Rüden H. Gesundheitsberichterstattung des Bundes Heft 8 - Nosokomiale Infektionen. 2002;8:18. URL: http://www.rki.de/DE/Content/Gesundheitsmonitoring/Gesundheitsberichterstattung/GBEDownloadsT/nosokomiale_infektionen.pdf?__blob=publicationFile.

[9] Eming SA, Kaufmann J, Löhrer R, Krieg T. Chronische Wunde. Neue Wege in Forschung und Therapie. Hautarzt. 2007;58(11):939–944. URL: http://dx.doi.org/10.1007/s00105-007-1402-1.

[10] Schiemann D. Expertenstandard Pflege von Menschen mit chronischen Wunden. Hochschule Osnabrück: Deutsches Netzwerk für Qualitätsentwicklung in der Pflege (DNQP); 2009. URL: http://www.wiso.hs-osnabrueck.de/38092.html.

[11] Zimmerli W, Trampuz A, Ochsner PE. Prosthetic-joint infections. N Engl J Med. 2004;351(16):1645–1654. URL: http://dx.doi.org/10.1056/NEJMra040181.

[12] Dissemond J, Schmid EN, Esser S, Witthoff M, Goos M. Bakterielle Kolonisation chronischer Wunden. Hautarzt. 2004;55(3):280–288. URL: http://dx.doi.org/10.1007/s00105-004-0697-4.

[13] Wang L, Lansing B, Symons K, Flannery EL, Fisch J, Cherian K, et al. Infection rate and colonization with antibiotic-resistant organisms in skilled nursing facility residents with indwelling devices. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2012;31(8):1797–1804. URL: http://dx.doi.org/10.1007/s10096-011-1504-7.

[14] Kwon AS, Park GC, Ryu SY, Lim DH, Lim DY, Choi CH, et al. Higher biofilm formation in multidrug-resistant clinical isolates of Staphylococcus aureus. Int J Antimicrob Agents. 2008;32(1):68–72. URL: http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2008.02.009.

[15] Danese PN. Antibiofilm approaches: prevention of catheter colonization. Chem Biol. 2002;9(8):873–880. URL: http://dx.doi.org/10.1016/S1074-5521(02)00192-8.

[16] Dissemond J, Assadian O, Gerber V, Kingsley A, Kramer A, Leaper DJ, et al. Classification of wounds at risk and their antimicrobial treatment with polihexanide: a practice-oriented expert recommendation. Skin Pharmacol Physiol. 2011;24(5):245–255. URL: http://dx.doi.org/10.1159/000327210.

[17] Gelmetti C. Local antibiotics in dermatology. Dermatol Ther. 2008;21(3):187–195. URL: http://dx.doi.org/10.1111/j.1529-8019.2008.00190.x.

[18] Kalteis T, Lüring C, Schaumburger J, Perlick L, Bäthis H, Grifka J. Tissue toxicity of antiseptics. Gewebetoxizität lokaler Antiseptika. Z Orthop Ihre Grenzgeb. 2003;141(2):233–238. URL: http://dx.doi.org/10.1055/s-2003-38654.

[19] Marquardt C, Matuschek E, Bölke E, Gerber PA, Peiper M, J VSK, et al. Evaluation of the tissue toxicity of antiseptics by the hen's egg test on the chorioallantoic membrane (HETCAM). Eur J Med Res. 2010;15(5):204–209. URL: http://dx.doi.org/10.1186/2047-783X-15-5-204.

[20] Høiby N, Bjarnsholt T, Givskov M, Molin S, Ciofu O. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. Int J Antimicrob Agents. 2010;35(4):322–332. URL: http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2009.12.011.

[21] Kaplan JB. Antibiotic-induced biofilm formation. Int J Artif Organs. 2011;34(9):737–751. URL: http://dx.doi.org/10.5301/ijao.5000027.

[22] Cristobal R, Edmiston CEJ, Runge-Samuelson CL, Owen HA, Firszt JB, Wackym PA. Fungal biofilm formation on cochlear implant hardware after antibiotic-induced fungal overgrowth within the middle ear. Pediatr Infect Dis J. 2004;23(8):774–778. URL: http://dx.doi.org/10.1097/01.inf.0000134315.24413.92.

[23] Piatek S, Tautenhahn J, Assadian O, Kramer A. 8 Lokalbehandlung sekundär heilender Wunden. In: Lippert H, editor. Wundatlas: Kompendium der komplexen Wundbehandlung. vol. 3. Stuttgart and New York: Thieme; 2012. p. 390. URL: http://webshop.thieme.de/webshop/product/thieme/9783131408334/detail.jsf.

[24] Kramer A, Müller G, Assadian O. Indications and agent selection for the antiseptic therapy of secondarily healing wounds. GMS Krankenhhyg Interdiszip. 2006;1(1):Doc32. URL: http://www.egms.de/static/de/journals/dgkh/2006-1/dgkh000032.shtml#Erratum.

[25] Ammons CB. Anti-biofilm strategies and the need for innovations in wound care. Recent Pat Antiinfect Drug Discov. 2010;5(1):10–17. URL: http://dx.doi.org/10.2174/157489110790112581.

[26] Fekete A, Borbás A, Gyémánt G, Kandra L, Fazekas E, Ramasubbu N, et al. Synthesis of beta-(1 -> 6)-linked N-acetyl-D-glucosamine oligosaccharide substrates and their hydrolysis by Dispersin B. Carbohydr Res. 2011;346(12):1445–1453. URL: http://dx.doi.org/10.1016/j.carres.2011.03.029.

[27] Darouiche RO, Mansouri MD, Gawande PV, Madhyastha S. Antimicrobial and antibiofilm efficacy of triclosan and DispersinB (R) combination. J Antimicrob Chemother. 2009;64(1):88–93. URL: http://dx.doi.org/10.1093/Jac/Dkp158.

[28] Fu WL, Forster T, Mayer O, Curtin JJ, Lehman SM, Donlan RM. Bacteriophage Cocktail for the Prevention of Biofilm Formation by Pseudomonas aeruginosa on Catheters in an In Vitro Model System. Antimicrob Agents Chemother. 2010;54(1):397–404. URL: http://dx.doi.org/10.1128/Aac.00669-09.

[29] Curtin JJ, Donlan RM. Inhibition of biofilm formation using bacteriophage: US Application Publication. US Application Publication. 2009;Patent Nr US 2009/0191254 A1(A61F 2/04; A61K 35/76; A61K 9/10; A01N 63/00; B05D 3/00). URL: http://ip.com/patapp/US20090191254.

[30] Bassler BL, Dammel C, Schauder S, Shokat K, Stein J, Surette MG. Compounds and methods for regulating bacterial growth and pathogenesis: State of New Jersey Patent Bank. State of New Jersey Patent Bank. 2004;Patent Nr 6559176. URL: http://www.freepatentsonline.com/6559176.html.

[31] Robson V, Dodd S, Thomas S. Standardized antibacterial honey (Medihoney) with standard therapy in wound care: randomized clinical trial. J Adv Nurs. 2009;65(3):565–575. URL: http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2648.2008.04923.x.

[32] Dumville JC, Worthy G, Bland JM, Cullum N, Dowson C, Iglesias C, et al. Larval therapy for leg ulcers (VenUS II): randomised controlled trial. Br Med J. 2009;338(b773). URL: http://dx.doi.org/10.1136/bmj.b773.

[33] Kramer A, Daeschlein G, Kammerlander G, Aspöck R, Andriessen A, Bergemann R, et al. Konsensusempfehlung zur Auswahl von Wirkstoffen für die Wundantiseptik. Hyg Med. 2004;29(5):147–157. URL: http://www.oegkv.at/uploads/media/kamerlander01-2004.pdf.

[34] Kramer A, Assadian O, Frank M, Bender C, Hinz P. Prevention of post-operative infections after surgical treatment of bite wounds. GMS Krankenhhyg Interdiszip. 2010;5(2)::Doc12. URL: http://dx.doi.org/10.3205/dgkh000155.

[35] Eisenbeiß W. Stellenwert und Vorgehensweise des chirurgischen Debridements Importance and technique of surgical wound debridement. GMS Krankenhhyg Interdiszip. 2007;2(2):Doc64. URL: http://www.egms.de/static/en/journals/dgkh/2007-2/dgkh000097.shtml.

[36] Ramritu P, Halton K, Collignon P, Cook D, Fraenkel D, Battistutta D, et al. A systematic review comparing the relative effectiveness of antimicrobial-coated catheters in intensive care units. Am J Infect Control. 2008;36(2):104–117. URL: http://dx.doi.org/10.1016/i.ajic.2007.02.012.

[37] Mott-Smith HM. History of "plasmas". Nature. 1971;233(5316):219. URL: http://dx.doi.org/10.1038/233219a0.

[38] Moisan M, Barbeau J, Moreau S, Pelletier J, Tabrizian M, Yahia LH. Low-temperature sterilization using gas plasmas: a review of the experiments and an analysis of the inactivation mechanisms. Int J Pharm. 2001;226(1-2):1–21. URL: http://dx.doi.org/10.1016/S0378-5173(01)00752-9.

[39] Rutscher A. 3 Effekte der Plasmaphysik. In: Ardenne Mv, Musiol G, Klemradt U, editors. Effekte der Physik und ihre Anwendungen. vol. 3. Frankfurt am Main: Wissenschaftlicher Verlag Harri Deutsch; 2005. p. 1249. URL: http://www.harri-deutsch.de/cgi-bin/start.cgi?1682.

[40] Vajenine GV. Use of plasma-activated gases in synthesis of solid-state nitrides. Dalton Trans. 2010;39(26):6013. URL: http://dx.doi.org/10.1039/c000361a.

[41] Ehlbeck J, Schnabel U, Polak M, Winter J, Woedtke Tv, Brandenburg R, et al. Low temperature atmospheric pressure plasma sources for microbial decontamination. J Phys D Appl Phys. 2011;44(013002). URL: http://dx.doi.org/10.1088/0022-3727/44/1/013002.

[42] Lee HW, Park GY, Seo YS, Im YH, Shim SB, Lee HJ. Modelling of atmospheric pressure plasmas for biomedical applications. J Phys D Appl Phys. 2011;44(053001). URL: http://dx.doi.org/10.1088/0022-3727/44/5/053001.

[43] Kramer A, Assadian O, Below H, Bender C, Hammann A, Hartmann B, et al. Perspektiven der Plasmamedizin. Vakuum in Forschung und Praxis. 2010;22(2):33–38. URL: http://dx.doi.org/10.1002/vipr.201000415.

[44] Laroussi M. The Biomedical Application of Plasma: A Brief History of the Development of a New Field of Research. IEEE Trans Plasma Sci. 2008;36(4):1612–1614. URL: http://dx.doi.org/10.1109/TPS.2008.917167.

[45] Daeschlein G, Woedtke Tv, Kindel E, Brandenburg R, Weltmann KD, Jünger M. Antibacterial Activity of an Atmospheric Pressure Plasma Jet Against Relevant Wound Pathogens in vitro on a Simulated Wound Environment. Plasma Process Polym. 2010;7(3-4):224–230. URL: http://dx.doi.org/10.1002/ppap.200900059.

[46] Koban I, Holtfreter B, Hübner NO, Matthes R, Sietmann R, Kindel E, et al. Antimicrobial efficacy of non-thermal plasma in comparison to chlorhexidine against dental biofilms on titanium discs in vitro - proof of principle experiment. J Clin Periodontol. 2011;38(10):956–965. URL: http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-051X.2011.01740.x.

[47] Hähnel M, Woedtke Tv, Weltmann KD. Influence of the Air Humidity on the Reduction of Bacillus Spores in a Defined Environment at Atmospheric Pressure Using a Dielectric Barrier Surface Discharge. Plasma Process Polym. 2010;7(3-4):244–249. URL: http://dx.doi.org/10.1002/ppap.200900076.

[48] Koban I, Matthes R, Hübner NO, Welk A, Meisel P, Holtfreter B, et al. Treatment of Candida albicans biofilms with low-temperature plasma induced by dielectric barrier discharge and atmospheric pressure plasma jet. New J Phys. 2010;12(073039). URL: http://dx.doi.org/10.1088/1367-2630/12/7/073039.

[49] Kramer A, Hübner NO, Assadian O, Below H, Bender C, Benkhai H, et al. Chances and perspectives of the plasma medicine by use of Tissue Tolerable Plasma (TTP). GMS Krankenhhyg Interdiszip. 2009;4(2):Doc10. URL: http://dx.doi.org/10.3205/dgkh000135.

[50] Keudell Av, Awakowicz P, Benedikt J, Raballand V, Yanguas-Gil A, Opretzka J, et al. Inactivation of Bacteria and Biomolecules by Low-Pressure Plasma Discharges. Plasma Process Polym. 2010;7(3-4):327–352. URL: http://dx.doi.org/10.1002/ppap.200900121.

[51] Zimmermann JL, Dumler K, Shimizu T, Morfill GE, Wolf A, Boxhammer V, et al. Effects of cold atmospheric plasmas on adenoviruses in solution. J Phys D Appl Phys. 2011;44(505201). URL: http://dx.doi.org/10.1088/0022-3727/44/50/505201.

[52] Woedtke Tv, Kramer A, Weltmann KD. Plasma sterilization: what are the conditions to meet this claim? Plasma Process Polym. 2008;5(6):534–539. URL: http://dx.doi.org/10.1002/ppap.200800013.

[53] Coelho PG, Giro G, Teixeira HS, Marin C, Witek L, Thompson VP, et al. Argon-based atmospheric pressure plasma enhances early bone response to rough titanium surfaces. J Biomed Mater Res A. 2012;100A(7):1901–1906. URL: http://dx.doi.org/10.1002/Jbm.A.34127.

[54] Finke B, Hempel F, Testrich H, Artemenko A, Rebl H, Kylian O, et al. Plasma processes for cell-adhesive titanium surfaces based on nitrogen-containing coatings. Surf Coat Technol. 2011;205:520–524. URL: http://dx.doi.org/10.1016/j.surfcoat.2010.12.044.

[55] Santos L, Rodrigues D, Lira M, Oliveira ME, Oliveira R, Vilar EY, et al. The influence of surface treatment on hydrophobicity, protein adsorption and microbial colonisation of silicone hydrogel contact lenses. Cont Lens Anterior Eye. 2007;30(3):183–188. URL: http://dx.doi.org/10.1016/j.clae.2006.12.007.

[56] Koban I, Jablonowski L, Kramer A, Weltmann KD, Kocher T. Medical Plasma in Dentistry: A Future Therapy for Peri-implantitis. In: Machala Z, Hensel K, Akishev Y, editors. NATO Science for Peace and Security Series A: Chemistry and Biology. Dordrecht: Springer Netherlands; 2012. p. 191–200. URL: http://dx.doi.org/10.1007/978-94-007-2852-3_15.

[57] Dobrynin D, Fridman G, Friedman G, Fridman A. Physical and biological mechanisms of direct plasma interaction with living tissue. New J Phys. 2009;11(115020). URL: http://dx.doi.org/10.1088/1367-2630/11/11/115020.

[58] Laroussi M. Low-Temperature Plasmas for Medicine? IEEE Trans Plasma Sci. 2009;37(6):714–725. URL: http://dx.doi.org/10.1109/Tps.2009.2017267.

[59] Sensenig R, Kalghatgi S, Cerchar E, Fridman G, Shereshevsky A, Torabi B, et al. Non-thermal Plasma Induces Apoptosis in Melanoma Cells via Production of Intracellular Reactive Oxygen Species. Ann Biomed Eng. 2011;39(2):674–687. URL: http://dx.doi.org/10.1007/s10439-010-0197-x.

[60] Partecke LI, Evert K, Haugk J, Döring F, Normann L, Diedrich S, et al. Tissue Tolerable Plasma (TTP) induces apoptosis in pancreatic cancer cells in vitro and in vivo. BMC Cancer. 2012;12(1):473. URL: http://dx.doi.org/10.1186/1471-2407-12-473.

[61] Stalder KR, Woloszko J. Some physics and chemistry of electrosurgical plasma discharges. Contrib Plasma Phys. 2007;47(1-2):64–71. URL: http://dx.doi.org/10.1002/ctpp.200710010.

[62] Lee MH, Park BJ, Jin SC, Kim D, Han I, Kim J, et al. Removal and sterilization of biofilms and planktonic bacteria by microwave-induced argon plasma at atmospheric pressure. New J Phys. 2009;11(115022). URL: http://dx.doi.org/10.1088/1367-2630/11/11/115022.

[63] Leonarduzzi G, Sottero B, Poli G. Targeting tissue oxidative damage by means of cell signaling modulators: the antioxidant concept revisited. Pharmacol Ther. 2010;128(2):336–374. URL: http://dx.doi.org/10.1016/j.pharmthera.2010.08.003.

[64] Lloyd G, Friedman G, Jafri S, Schultz G, Fridman A, Harding K. Gas Plasma: Medical Uses and Developments in Wound Care. Plasma Process Polym. 2010;7(3-4):194–211. URL: http://dx.doi.org/10.1002/ppap.200900097.

[65] Lademann O, Richter H, Meinke MC, Patzelt A, Kramer A, Hinz P, et al. Drug delivery through the skin barrier enhanced by treatment with tissue-tolerable plasma. Exp Dermatol. 2011;20(6):488–490. URL: http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0625.2010.01245.x.

[66] Leduc M, Guay D, Leask RL, Coulombe S. Cell permeabilization using a non-thermal plasma. New J Phys. 2009;11(115021). URL: http://dx.doi.org/10.1088/1367-2630/11/11/115021.

[67] Park GY, Park SJ, Choi MY, Koo IG, Byun JH, Hong JW, et al. Atmospheric-pressure plasma sources for biomedical applications. Plasma Sources Sci Technol. 2012;21(4):043001. URL: http://dx.doi.org/10.1088/0963-0252/21/4/043001.

[68] Bárdos L, Baránková H. Cold atmospheric plasma: Sources, processes, and applications. Thin Solid Films. 2010;518(23):6705–6713. URL: http://dx.doi.org/10.1016/j.tsf.2010.07.044.

[69] Conrads H, Schmidt M. Plasma generation and plasma sources. Plasma Sources Sci Technol. 2000;9(4):441–454. URL: http://dx.doi.org/10.1088/0963-0252/9/4/301.

[70] Fridman A, Chirokov A, Gutsol A. Non-thermal atmospheric pressure discharges. J Phys D Appl Phys. 2005;38(2):R1–R24. URL: http://dx.doi.org/10.1088/0022-3727/38/2/R01.

[71] Weltmann KD, Kindel E, Woedtke Tv, Hähnel M, Stieber M, Brandenburg R. Atmospheric-pressure plasma sources: Prospective tools for plasma medicine. Pure Appl Chem. 2010;82(6):1223–1237. URL: http://dx.doi.org/10.1351/Pac-Con-09-10-35.

[72] Stoffels E. "Tissue processing" with atmospheric plasmas. Contrib Plasma Phys. 2007;47(1-2):40–48. URL: http://dx.doi.org/10.1002/ctpp.200710007.

[73] Heinlin J, Isbary G, Stolz W, Morfill G, Landthaler M, Shimizu T, et al. Plasma applications in medicine with a special focus on dermatology. J Eur Acad Dermatol Venereol. 2011;25(1):1–11. URL: http://dx.doi.org/10.1111/j.1468-3083.2010.03702.x.

[74] Ravanat JL, Douki T, Cadet J. Direct and indirect effects of UV radiation on DNA and its components. J Photochem Photobiol B. 2001;63(1-3):88–102. URL: http://dx.doi.org/10.1016/S1011-1344(01)00206-8.

[75] Dobrynin D, Friedman G, Fridman A, Starikovskiy A. Inactivation of bacteria using dc corona discharge: role of ions and humidity. New J Phys. 2011;13(103033). URL: http://dx.doi.org/10.1088/1367-2630/13/10/103033.

[76] Liu DX, Bruggeman P, Iza F, Rong MZ, Kong MG. Global model of low-temperature atmospheric-pressure He + H2O plasmas. Plasma Sources Sci Technol. 2010;19(2):025018. URL: http://dx.doi.org/10.1088/0963-0252/19/2/025018.

[77] Fang FC. Antimicrobial reactive oxygen and nitrogen species: Concepts and controversies. Nat Rev Microbiol. 2004;2(10):820–832. URL: http://dx.doi.org/10.1038/Nrmicro1004.

[78] Nosenko T, Shimizu T, Morfill GE. Designing plasmas for chronic wound disinfection. New J Phys. 2009;11(115013). URL: http://dx.doi.org/10.1088/1367-2630/11/11/115013.

[79] Oehmigen K, Hähnel M, Brandenburg R, Wilke C, Weltmann KD, Woedtke Tv. The Role of Acidification for Antimicrobial Activity of Atmospheric Pressure Plasma in Liquids. Plasma Process Polym. 2010;7(3-4):250–257. URL: http://dx.doi.org/10.1002/ppap.200900077.

[80] Fujiki T, Shimokawa H, Morikawa K, Kubota H, Hatanaka M, Talukder MA, et al. Endothelium-derived hydrogen peroxide accounts for the enhancing effect of an angiotensin-converting enzyme inhibitor on endothelium-derived hyperpolarizing factor-mediated responses in mice. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2005;25(4):766–771. URL: http://dx.doi.org/10.1161/01.ATV.0000158498.19027.75.

[81] Sundaresan M, Yu ZX, Ferrans VJ, Irani K, Finkel T. Requirement for generation of H2O2 for platelet-derived growth factor signal transduction. Science. 1995;270(5234):296–299. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7569979.

[82] Rhee SG. Cell signaling. H2O2, a necessary evil for cell signaling. Science. 2006;312(5782):1882–1883. URL: http://dx.doi.org/10.1126/science.1130481.

[83] Tatla S, Woodhead V, Foreman JC, Chain BM. The role of reactive oxygen species in triggering proliferation and IL-2 secretion in T cells. Free Radic Biol Med. 1999;26(1-2):14–24. URL: http://dx.doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00133-6.

[84] Ren JG, Xia HL, Tian YM, Just T, Cai GP, Dai YR. Expression of telomerase inhibits hydroxyl radical-induced apoptosis in normal telomerase negative human lung fibroblasts. FEBS Lett. 2001;488(3):133–138. URL: http://dx.doi.org/10.1016/S0014-5793(00)02397-8.

[85] Luo JD, Chen AF. Nitric oxide: a newly discovered function on wound healing. Acta Pharmacol Sin. 2005;26(3):259–264. URL: http://dx.doi.org/10.1111/j.1745-7254.2005.00058.x.

[86] Huang FP, Niedbala W, Wei XQ, Xu DM, Feng GJ, Robinson JH, et al. Nitric oxide regulates Th1 cell development through the inhibition of IL-12 synthesis by macrophages. Eur J Immunol. 1998;28(12):4062–4070. URL: http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1521-4141(199812)28:12<4062::AID-IMMU4062>3.0.CO;2-K.

[87] Hicks KK, Shin JT, Opalenik SR, Thompson JA. Molecular mechanisms of angiogenesis: experimental models define cellular trafficking of FGF-1. P R Health Sci J. 1996;15(3):179–186. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8994282.

[88] Moshrefi A. Chlorhexidine. J West Soc Periodontol Periodontal Abstr. 2002;50(1):5–9. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12049062?dopt=Citation.

[89] Main RC. Should chlorhexidine gluconate be used in wound cleansing? J Wound Care. 2008;17(3):112–114. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18376652.

[90] Hübner NO, Siebert J, Kramer A. Octenidine Dihydrochloride, a Modern Antiseptic for Skin, Mucous Membranes and Wounds. Skin Pharmacol Physiol. 2010;23(5):244–258. URL: http://dx.doi.org/10.1159/000314699.

[91] Kramer A, Reichwagen S, Widulle H, Nürnberg W, Heldt P. 49 N-Heterocyclen. In: Assadian O, Kramer A, editors. Wallhäußers Praxis der Sterilisation, Desinfektion, Antiseptik und Konservierung: Qualitätssicherung der Hygiene in Industrie, Pharmazie und Medizin. vol. 6. Stuttgart and New York: Thieme; 2008. p. 984. URL: http://webshop.thieme.de/webshop/product/thieme/9783131411211/detail.jsf.

[92] Greener M. Octenidine: antimicrobial activity and clinical efficacy. Wounds UK. 2011;7(3). URL: http://www.wounds-uk.com/pdf/content_10096.pdf.

[93] Hübner NO, Kramer A. Review on the efficacy, safety and clinical applications of polihexanide, a modern wound antiseptic. Skin Pharmacol Physiol. 2010;23(suppl 1):17–27. URL: http://dx.doi.org/10.1159/000318264.

[94] Santos L, Rodrigues D, Lira M, Real Oliveira ME, Oliveira R, Vilar EY, et al. The influence of lens material and lens wear on the removal and viability of Staphylococcus epidermidis. Cont Lens Anterior Eye. 2008;31(3):126–130. URL: http://dx.doi.org/10.1016/j.clae.2008.01.003.

[95] Müller G, Kramer A, Schmitt J, Harden D, Koburger T. Reduced cytotoxicity of polyhexamethylene biguanide hydrochloride (PHMB) by egg phosphatidylcholine while maintaining antimicrobial efficacy. Chem Biol Interact. 2011;190(2-3):171–178. URL: http://dx.doi.org/10.1016/j.cbi.2011.02.024.

[96] Kramer A, Reichwagen S, Widulle H, Nürnberg W, Heldt P. 43 Organische Carbonsäuren. In: Assadian O, Kramer A, editors. Wallhäußers Praxis der Sterilisation, Desinfektion, Antiseptik und Konservierung: Qualitätssicherung der Hygiene in Industrie, Pharmazie und Medizin. vol. 6. Stuttgart and New York: Thieme; 2008. p. 984. URL: http://webshop.thieme.de/webshop/product/thieme/9783131411211/detail.jsf.

[97] Bolton L, Oleniacz W, Constantine B, Kelliher BO, Jensen D, Means B, et al. Repair and antibacterial effects of topical antiseptic agents in vivo. In: Maibach Hl, Lowe NJ, editors. Dermatopharmacology and toxicology. vol. 2 of Models in Dermatology 1985. Basel: Karger; 1985. p. 145–158. URL: http://content.karger.com/ProdukteDB/produkte.asp?Aktion=showproducts&searchWhat=books&ProduktNr=220682.

[98] Holtfreter S, Grumann D, Schmudde M, Nguyen HT, Eichler P, Strommenger B, et al. Clonal distribution of superantigen genes in clinical Staphylococcus aureus isolates. J Clin Microbiol. 2007;45(8):2669–2680. URL: http://dx.doi.org/10.1128/JCM.00204-07.

[99] Matthes R, Bekeschus S, Bender C, Koban I, Hübner NO, Kramer A. Pilot-study on the influence of carrier gas and plasma application (open resp. delimited) modifications on physical plasma and its antimicrobial effect against Pseudomonas aeruginosa and Staphylococcus aureus. GMS Krankenhhyg Interdiszip. 2012a;7(1):Doc02. URL: http://dx.doi.org/10.3205/dgkh000186.

[100] Campbell KE, Keast D, Woodbury G, Houghton P. Wear time in two hydrocolloid dressings using a novel in-vivo model. Wounds. 2003;15(2):40–48. URL: http://www.woundsresearch.com/article/1287.

[101] Müller G, Kramer A. Biocompatibility index of antiseptic agents by parallel assessment of antimicrobial activity and cellular cytotoxicity. J Antimicrob Chemother. 2008;61(6):1281–1287. URL: http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkn125.

[102] Hübner NO, Matthes R, Koban I, Rändler C, Müller G, Bender C, et al. Efficacy of chlorhexidine, polihexanide and tissue-tolerable plasma against Pseudomonas aeruginosa biofilms grown on polystyrene and silicone materials. Skin Pharmacol Physiol. 2010;23(suppl 1):28–34. URL: http://dx.doi.org/10.1159/000318265.

[103] Matthes R, Koban I, Bender C, Masur K, Kindel E, Weltmann KD, et al. Antimicrobial efficacy of an atmospheric pressure plasma jet against biofilms of Pseudomonas aeruginosa and Staphylococcus epidermidis. Plasma Process Polym. 2012b;in press. URL: http://dx.doi.org/10.1002/ppap.201100133.

[104] Matthes R, Hübner NO, Bender C, Koban I, Horn S, Bekeschus S, et al. Modulations of feed-gases for barrier discharge plasma generation influence the survival of Pseudomonas aeruginosa embedded in biofilm. Skin Pharmacol Physiol. 2012c;submitted (s.Anhang).

[105] Matthes R, Bender C, Schlüter R, Koban I, Bussiahn R, Reuter S, et al. Antimicrobial efficacy of air plasma in comparison of two surface barrier discharges with air plasma against in vitro biofilms. PLOS ONE. 2012d;submitted (s.Anhang).

[106] DIN EN 1040 D. CEN/TC 216 - Chemical disinfectants and antiseptics, editor. DIN EN 1040: 2006-03 Chemical disinfectants and antiseptics - Quantitative suspension test for the evaluation of basic bactericidal activity of chemical disinfectants and antiseptics - Test method and requirements (phase 1); German version EN 1949:2005. Berlin: Beuth-Verlag; 2006. URL: http://www.beuth.de/de/norm/din-en-1040/85932314.

[107] Matthes R, Hübner NO, Bender C, Koban I, Weltmann KD, Kramer A. Screening test for quality control of surface barrier discharged plasma sources with the microorganism-agar test (MAT). Screeningmethode zur Qualitätsprüfung flächiger Plasmaquellen mit dem Mikroorganismen-Agar-Test (MAT). GMS Krankenhhyg Interdiszip. 2010;5(2):DOC02. URL: http://dx.doi.org/10.3205/dgkh000145.

[108] Matthes R, Bender C, Hübner NO, Müller G, Kohl K, Mentz J, et al. Beeinflussung der Penetration von Pseudomonas aeruginosa in eine 3-D-Epidermis und Inaktivierung mit gewebeverträglichem Plasma Influencing of the penetration of Pseudomonas aeruginosa into a 3-D epidermis model and the inactivation with tissue tolerable plasma. GMS Krankenhhyg Interdiszip. 2009;4(2):1–7. URL: http://dx.doi.org/10.3205/dgkh000133.

[109] Matthes R, Bender C, Koban I, Bekeschus S, Kramer A. Investigation of the antiseptic efficacy on in vitro biofilms of tissue tolerable plasma combined with common antiseptic solutions; Poster In: 4th International Conference on Plasma Medicine (ICPM4); June, 17.-21.2012, (Orléans, France); http://icpm4.sciencesconf.org/4950/document; 2012p. URL: https://groupware.uni-greifswald.de/index.php?r=files/file/download&id=144875&random_code=QELmrUYNTFs&inline=false&security_token=nupheriqlzwdbtvyk49x.

[110] Matthes R, Bender C, Hübner NO, Koban I, Kramer A. Verstärkung der antimikrobiellen Effekte durch Kombination von TTP mit Antiseptika an in vitro Biofilmen. vol. 37 - Supplement. mhp Verlag; 2012k. URL: http://www.mhp-verlag.de/media/zeitschriften/hygiene_medizin/inhalte/dgkh/DGKH_Kongress_Internet.pdf(24.11.2012).

[111] Grobe S, Wingender J, Trüper HG. Characterization of mucoid Pseudomonas aeruginosa strains isolated from technical water systems. Journal of Applied Microbiology. 1995;79(1):94–102. URL: http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.1995.tb03129.x.

[112] Lee J, Kang CI, Lee JH, Joung M, Moon S, Wi YM, et al. Risk factors for treatment failure in patients with prosthetic joint infections. J Hosp Infect. 2010;75(4):273–276. URL: http://dx.doi.org/10.1016/j.jhin.2010.03.012.

[113] Powell DG. Medical Applications of Polycarbonate. Medical Plastics and Biomaterials. 1998;URL: http://www.mddionline.com/article/medical-applications-polycarbonate(25.11.2012).

[114] Park JB, Lakes RS. Section: 5: Metallic Implant Materials and 7: Polymeric Implant Materials: An introduction. In: Park JB, Lakes RS, editors. Biomaterials: An introduction. New York: Springer; 2007. p. xi, 561. URL: http://www.springer.com/materials/biomaterials/book/978-0-387-37879-4.

[115] Becker K. Exopolysaccharide production and attachment strength of bacteria and diatoms on substrates with different surface tensions. Microb Ecol. 1996;32(1):23–33. URL: http://dx.doi.org/10.1007/BF00170104.

[116] Merritt K, Gaind A, Anderson JM. Detection of bacterial adherence on biomedical polymers. J Biomed Mater Res. 1998;39(3):415–422. URL: http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1097-4636(19980305)39:3<415::AID-JBM10>3.0.CO;2-9.

[117] Pitts B, Hamilton MA, Zelver N, Stewart PS. A microtiter-plate screening method for biofilm disinfection and removal. J Microbiol Methods. 2003;54(2):269–276. URL: http://dx.doi.org/10.1016/S0167-7012(03)00034-4.

[118] Müsken M, Di Fiore S, Römling U, Häussler S. A 96-well-plate-based optical method for the quantitative and qualitative evaluation of Pseudomonas aeruginosa biofilm formation and its application to susceptibility testing. Nat Protoc. 2010;5(8):1460–1469. URL: http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2010.110.

[119] Zelaya AJ, Stough G, Rad N, Vandervoort K, Brelles-Mariño G. Pseudomonas aeruginosa Biofilm Inactivation: Decreased Cell Culturability, Adhesiveness to Surfaces, and Biofilm Thickness Upon High-Pressure Nonthermal Plasma Treatment. IEEE Trans Plasma Sci. 2010;38(12):3398–3403. URL: http://dx.doi.org/10.1109/TPS.2010.2082570.

[120] Salamitou S, Kirkpatrick MJ, Ly HM, Leblon GE, DuBow O, S M. Augmented Survival of Bacteria Within Biofilms to Exposure to an Atmospheric Pressure Non-Thermal Plasma Source. Biotechnology. 2009;8(2):228–234. URL: http://dx.doi.org/10.3923/biotech.2009.228.234.

[121] Gilbert P, Das JR, Jones MV, Allison DG. Assessment of resistance towards biocides following the attachment of micro-organisms to, and growth on, surfaces. J Appl Microbiol. 2001;91(2):248–254. URL: http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2672.2001.01385.x.

[122] Uhm HS, Lim JP, Li SZ. Sterilization of bacterial endospores by an atmospheric-pressure argon plasma jet. Appl Phys Lett. 2007;90(26):261501. URL: http://dx.doi.org/10.1063/1.2747177.

[123] Montie TC, Kelly-Wintenberg K, Roth JR. An overview of research using the one atmosphere uniform glow discharge plasma (OAUGDP) for sterilization of surfaces and materials. IEEE Trans Plasma Sci. 2000;28(1):41–50. URL: http://dx.doi.org/10.1109/27.842860.

[124] Moravej M, Yang X, Hicks RF, Penelon J, Babayan SE. A radio-frequency nonequilibrium atmospheric pressure plasma operating with argon and oxygen. J Appl Phys. 2006;99(9):093305. URL: http://dx.doi.org/10.1063/1.2193647.

[125] Park GY, Hong YJ, Lee HW, Sim JY, Lee JK. A Global Model for the Identification of the Dominant Reactions for Atomic Oxygen in He/Ohttp://icpm4.sciencesconf.org/49502 Atmospheric-Pressure Plasmas. Plasma Process Polym. 2010;7(3-4):281–287. URL: http://dx.doi.org/10.1002/ppap.200900084.

[126] Wagatsuma K, Hirokawa K. Effect of Oxygen Addition to an Argon Glow-Discharge Plasma Source in Atomic-Emission Spectrometry. Anal Chim Acta. 1995;306(2-3):193–200. URL: http://dx.doi.org/10.1016/0003-2670(95)00007-M.

[127] Weng CC, Wu YT, Liao JD, Kao CY, Chao CC, Chang JE, et al. Inactivation of bacteria by a mixed argon and oxygen micro-plasma as a function of exposure time. Int J Radiat Biol. 2009;85(4):362–368. URL: http://dx.doi.org/10.1080/09553000902781105.

[128] Lim JP, Uhm HS, Li SZ. Influence of oxygen in atmospheric-pressure argon plasma jet on sterilization of Bacillus atrophaeous spores. Phys Plasmas. 2007;14(9):093504. URL: http://dx.doi.org/10.1063/1.2773705.

[129] Li SZ, Lim JP, Kang JG, Uhm HS. Comparison of atmospheric-pressure helium and argon plasmas generated by capacitively coupled radio-frequency discharge. Phys Plasmas. 2006;13(9):093503. URL: http://dx.doi.org/10.1063/1.2355428.

[130] Fricke K, Steffen H, Woedtke Tv, Schröder K, Weltmann KD. High Rate Etching of Polymers by Means of an Atmospheric Pressure Plasma Jet. Plasma Process Polym. 2011;8(1):51–58. URL: http://dx.doi.org/10.1002/ppap.201000093.

[131] Duske K, Koban I, Kindel E, Schröder K, Nebe B, Holtfreter B, et al. Atmospheric plasma enhances wettability and cell spreading on dental implant metals. J Clin Periodontol. 2012;39(4):400–407. URL: http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-051X.2012.01853.x.

[132] Sousa JS, Niemi K, Cox LJ, Algwari QT, Gans T, O'Connell D. Cold atmospheric pressure plasma jets as sources of singlet delta oxygen for biomedical applications. J Appl Phys. 2011;109(12):123302. URL: http://dx.doi.org/10.1063/1.3601347.

[133] Atkinson R, Carter WPL. Kinetics and Mechanisms of the Gas-Phase Reactions of Ozone with Organic-Compounds under Atmospheric Conditions. Chem Rev. 1984;84(5):437–470. URL: http://dx.doi.org/10.1021/cr00063a002.

[134] Naitali M, Kamgang-Youbi G, Herry JM, Bellon-Fontaine MN, Brisset JL. Combined Effects of Long- Living Chemical Species during Microbial Inactivation Using Atmospheric Plasma- Treated Water. Appl Environ Microbiol. 2010;76(22):7662–7664. URL: http://dx.doi.org/10.1128/Aem.01615-10.

[135] Sun P, Sun Y, Wu HY, Zhu WD, Lopez JL, Liu W, et al. Atmospheric pressure cold plasma as an antifungal therapy. Appl Phys Lett. 2011;98(2):021501. URL: http://dx.doi.org/10.1063/1.3530434.

[136] Roth C, Beule AG, Kramer A, Hosemann W, Kohlmann T, Scharf C. Response analysis of stimulating efficacy of polihexanide in an in vitro wound model with respiratory ciliary epithelial cells. Skin Pharmacol Physiol. 2010;23(suppl 1):35–40. URL: http://dx.doi.org/10.1159/000319602.

[137] Bender C, Hübner NO, Weltmann KD, Scharf C, Kramer A. Tissue Tolerable Plasma and Polihexanide: Are Synergistic Effects Possible to Promote Healing of Chronic wounds? In Vivo and In Vitro Results. In: Machala Z, Hensel K, Akishev Y, editors. NATO Science for Peace and Security Series A: Chemistry and Biology. Dordrecht: Springer Netherlands; 2012. p. 479. URL: http://dx.doi.org/10.1007/978-94-007-2852-3_25.

[138] Weltmann KD, Fricke K, Stieber M, Brandenburg R, Woedtke Tv, Schnabel U. New Nonthermal Atmospheric-Pressure Plasma Sources for Decontamination of Human Extremities. IEEE Trans Plasma Sci. 2012;40(11):2963–2969. URL: http://dx.doi.org/10.1109/TPS.2012.2204279.

[139] Hammann A, Hübner NO, Bender C, Ekkernkamp A, Hartmann B, Hinz P, et al. Antiseptic Efficacy and Tolerance of Tissue-Tolerable Plasma Compared with Two Wound Antiseptics on Artificially Bacterially Contaminated Eyes from Commercially Slaughtered Pigs. Skin Pharmacol Physiol. 2010;23(6):328–332. URL: http://dx.doi.org/10.1159/000314724.

[140] Bender C, Partecke LI, Kindel E, Döring F, Lademann J, Heidecke CD, et al. The modified HET-CAM as a model for the assessment of the inflammatory response to tissue tolerable plasma. Toxicol In Vitro. 2011;25(2):530–537. URL: http://dx.doi.org/10.1016/j.tiv.2010.11.012.

[141] Poole K. Bacterial stress responses as determinants of antimicrobial resistance. J Antimicrob Chemother. 2012;67(9):2069–2089. URL: http://dx.doi.org/10.1093/jac/dks196.

Anhang A

Publikationsverzeichnis Rutger Matthes

Koban I, Hübner NO, **Matthes R**, Welk A, Kindel E, Weltmann KD, Kramer A, Kocher T (2009). Antiseptic efficacy of selected agents and tissue tolerable plasma (TTP) on C. albicans biofilms – has the biofilm maturity influence on it? *GMS Krankenhaushygiene Interdisziplinär* 4(2):Doc09.

Kramer A, Hübner NO, Assadian O, Below H, Bender C, Benkhai H, Bröker B, Ekkernkamp A, Eisenbeiß W, Hammann A, Hartmann B, Heidecke CD, Hinz P, Koban I, Koch S, Kocher T, Lademann J, Lademann O, Lerch MM, Maier S, **Matthes R**, Müller G, Partecke LI, Rändler C, Weltmann KD, Zygmunt M (2009). Chances and perspectives of the plasma medicine by use of Tissue Tolerable Plasma (TTP). *GMS Krankenhaushygiene Interdisziplinär* 4(2):Doc10.

Matthes R, Bender C, Hübner NO, Müller G, Kohl K, Mentz J, Koban I, Kindel E, Kocher T, Weltmann KD, Lademann J, Kramer A (2009). Influencing of the penetration of Pseudomonas aeruginosa into a 3-D epidermis model and the inactivation with tissue tolerable plasma. *GMS Krankenhaushygiene Interdisziplinär* 4(2):Doc08.

Bender C, **Matthes R**, Kindel E, Kramer A, Lademann J, Weltmann KD, Eisenbeiß W, Hübner NO (2010). The Irritation Potential of Nonthermal Atmospheric Pressure Plasma in the HET-CAM. *Plasma Processes and Polymers* 7 (3-4):318-326.

Hammann A, Huebner NO, Bender C, Ekkernkamp A, Hartmann B, Hinz P, Kindel E, Koban I, Koch S, Kohlmann T, Lademann J, **Matthes R**, Müller G, Titze R, Weltmann KD, Kramer A (2010). Antiseptic Efficacy and Tolerance of Tissue-Tolerable Plasma Compared with Two Wound Antiseptics on Artificially Bacterially Contaminated Eyes from Commercially Slaughtered Pigs. *Skin Pharmacology and Physiology* 23:328-332.

Hübner NO, **Matthes R**, Koban I, Rändler C, Müller G, Bender C, Kindel E, Kocher T, Kramer A (2010). Efficacy of Chlorhexidine, Polihexanide and Tissue-Tolerable Plasma against Pseudomonas aeruginosa Biofilms Grown on Polystyrene and Silicone Materials. *Skin Pharmacology and Physiology* 23 (suppl 1):28-34.

Koban I, **Matthes R**, Hübner NO, Welk A, Meisel P, Holtfreter B, Sietmann R, Kindel E, Weltmann KD, Kramer A, Kocher T (2010). Treatment of Candida albicans biofilms with low temperature plasma induced by dielectric barrier discharge and atmospheric pressure plasma jet. *New Journal of Physics* 12:073039

Kramer A, Assadian O, Below H, Bender C, Hammann A, Hübner NO, Koban I, Kocher T, Lademann J, **Matthes R**, Weltmann KD (2010). Perspektiven der Plasmamedizin durch Anwendung von gewebekompatiblen Atmosphärendruckplasmen (Tissue Tolerable Plasma, TTP). *Vakuum in Forschung und Praxis* 22 (2) 33–38.

Matthes R, Hübner NO, Bender C, Koban I, Weltmann KD, Kramer A (2010). Screening test for quality control of surface barrier discharged plasma sources with the microorganism-agar test (MAT) Screeningmethode zur Qualitätsprüfung flächiger Plasmaquellen mit dem Mikroorganismen-Agar-Test (MAT).*GMS Krankenhaushygiene Interdisziplinär* 5 (2), S. DOC02.

Rändler C, **Matthes R**, McBain AJ, Giese B, Fraunholz M, Sietmann R, Kohlmann T, Hübner NO, Kramer A (2010). A three-phase in-vitro system for studying Pseudomonas aeruginosa adhesion and biofilm formation upon hydrogel contact lenses. *Bmc Microbiology* 10 (1):282-282.

Koban I, Holtfreter B, Hübner NO, **Matthes R**, Sietmann R, Kindel E, Weltmann KD, Welk A, Kramer A, Kocher T (2011). Antimicrobial efficacy of non-thermal plasma in comparison to chlorhexidine against dental biofilms on titanium discs in vitro - proof of principle experiment. *Journal of Clinical Periodontology* 38 (10):956-965.

Koban I, **Matthes R**, Hübner NO, Müller G, Sietmann R, Kramer A, Lademann J, Kocher T (2012). XTT assay of ex vivo saliva biofilms to test antimicrobial influences. *GMS Krankenhhyg Interdiszip* 7 (1:Doc06), S. 1–10.

Matthes R, Bekeschus S, Bender C, Koban I, Hübner NO, Kramer A (2012). Pilot-study on the influence of carrier gas and plasma application (open resp. delimited) modifications on physical plasma and its antimicrobial effect against Pseudomonas aeruginosa and Staphylococcus aureus. *GMS Krankenhaushygiene Interdisziplinär* 7 (1:Doc02).

Matthes R, Koban I, Bender C, Masur K, Kindel E, Weltmann KD, Kocher T, Kramer A, Hübner NO (2012). Antimicrobial efficacy of an atmospheric pressure plasma jet against biofilms of Pseudomonas aeruginosa and Staphylococcus epidermidis. *Plasma Processes and Polymers* (in press, DOI: 10.1002/ppap.201100133)

Kramer A, Lademann J, Bender C, Sckell A, Hartmann B, Hinz P, Ekkernkamp A, **Matthes R**, Koban I, Partecke LI, Heidecke CD, Assadian O (2012). Suitability of Tissue Tolerable Plasmas (TTP - cold atmospheric-pressure plasmas with tissue applicable properties) for chronic wound management. *Clinical Plasma Medicine* (in press)

Matthes R, Hübner NO, Bender C, Koban I, Horn S, Bekeschus S, Kocher T, Weltmann KD, Kramer A and Assadian O (2012). Modulations of feed-gases for barrier discharge plasma generation influence the survival of Pseudomonas aeruginosa embedded in biofilm. *Skin Pharmacology and Physiology* (eingereicht, Nr. SPP2590).

Matthes R, Bender C, Schlüter R, Koban I, Bussiahn R, Reuter S, Weltmann KD, Kramer A (2012). Antimicrobial efficacy of air plasma in comparison of two surface barrier discharges against in vitro biofilms. *PLOS ONE* (eingereicht, Nr. PONE-S-12-48386).

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Die Dissertation ist bisher keiner anderen Fakultät und keiner anderen wissenschaftlichen Einrichtung vorgelegt worden.

Ich erkläre, dass ich bisher kein Promotionsverfahren erfolglos beendet habe und dass eine Aberkennung eines bereits erworbenen Doktorgrades nicht vorliegt.

Greifswald, den 06.12.2012

Danksagung

Für die Breitstellung des interessanten Themas danke ich ganz besonders Herrn Prof. Dr. Axel Kramer. Seine zahlreichen Anregungen, Hinweise und die jederzeit sehr gute und freundschaftliche Betreuung waren der Grundstein für das Gelingen dieser Arbeit.

Meinen Mitarbeitern wie Co-Autoren Claudia Bender und Ina Koban danke ich für die gute Zusammenarbeit und Unterstützung beim Veröffentlichen der Ergebnisse.

Ein herzliches Dankeschön geht an das gesamte Assistenten-Team des Instituts und der Institutssekretärin Frau Brigitte Sümnicht für Hygiene und Umweltmedizin, die mir stets hilfreich zur Seite standen. Ein besonderer Dank gilt hier Jaqueline Mentz für ihre Unterstützung und verlässlichen Hilfe bei der Durchführung der Versuche und Juliane Jeschke für die Hilfe zur Hege von Zellkulturen. Herrn Dr. Gerald Müller und Herrn Dr. Harald Below danke ich sehr für ihre fachliche und stets freundliche Unterstützung sowie Bereitstellung von Laborraum und/oder Geräten. Herrn Dr. Nils-Olaf Hübner danke ich für seine organisatorischen Bemühungen.

Weiterer Dank gilt den vielen Mitarbeitern des INP, für ihre Unterstützung und Hilfe bei der Durchführung der Plasma-Experimente. Hierbei danke ich besonders Herrn Dr. René Bussiahn und Herrn Dr. Stephan Reuter für ihre fachliche Unterstützung und Frau Christiane Meyer sowie Herrn Rüdiger Titze für ihre Hilfe bei der experimentellen Durchführungen und den physikalischen Messungen. Dem Team von PlasmaQuellen und Koordinator der Plasmamedizin in Greifswald Herrn Prof. Thomas von Woedtke danke ich für die Bereitstellung der Plasmaquellen und des Plasmalabors. Sander Bekeschus danke ich für seine große Hilfsbereitschaft und Unterstützung sowie Kritik bei der Erfassung und Übersetzung der Arbeiten.

Dem Institut für Mikrobiologie der EMA-Universität, insbesondere Frau Dr. Rabea Schlüter gilt mein Dank für die gute Zusammenarbeit und den hervorragenden rasterelektronmikroskopischen Bildern.

Ich danke allen Mitarbeitern des Campus PlasmaMed, voran den Leitern Prof. Axel Kramer und Prof. Klaus-Dieter Weltmann, für die Ermöglichung und Kontinuität des Projekts sowie für die interdisziplinäre Zusammenarbeit, die meine Arbeit sehr bereichert hat.

Ich danke meinen Freunden für Ihre Unterstützung während dieser Zeit und den gemeinsamen Stunden, Anja Jesse für ihre gewissenhafte Durchsicht und Sebastian Kalies für das Layout.

Ein großer Dank gilt meiner Familie, die immer für mich da ist.

Zugehörige Publikationen

Skin Pharmacology and Physiology

Skin Pharmacol Physiol 2010;23(suppl 1):28–34
DOI: 10.1159/000318265

Published online: September 8, 2010

Efficacy of Chlorhexidine, Polihexanide and Tissue-Tolerable Plasma against *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms Grown on Polystyrene and Silicone Materials

N.-O. Hübner[a] R. Matthes[a] I. Koban[b] C. Ränd ler[a] G. Müller[a] C. Bender[a]
E. Kindel[c] T. Kocher[b] A. Kramer[a]

[a]Institute of Hygiene and Environmental Medicine, and [b]Centre for Dental and Oral Medicine and Maxillofacial Surgery, Ernst Moritz Arndt University Greifswald, and [c]Leibniz Institute for Plasma Research and Technology, Greifswald, Germany

Key Words
Chlorhexidine · Polihexanide · *Pseudomonas aeruginosa* · Biofilm efficacy · Tissue-tolerable plasma

Abstract
Background: The formation of biofilms is crucial in the pathogenesis of many acute and subacute microbial infections, including chronic wounds and foreign-body-related infections. Topical antimicrobial therapy with chemical antiseptics or physical treatment with tissue-tolerable plasma (TTP) may be promising to control bacterial infection. ***Methods:*** We assessed the efficacy of 0.1% chlorhexidine digluconate (CHX), 0.02 and 0.04% polihexanide (polyhexamethylene biguanide, PHMB) and of TTP against *Pseudomonas aeruginosa* SG81 biofilm grown in microtitre plates (polystyrene) and on silicone materials in an artificial wound fluid. ***Results:*** Overall, PHMB was as effective as CHX in reducing the total amount of biofilm (gentian violet assay) and in reducing the bacterial metabolism in biofilms (XTT assay). TTP also led to a significant reduction in colony-forming units. ***Conclusion:*** The antimicrobial activity of PHMB in biofilms is comparable to that of CHX. TTP could become an interesting physical alternative to chemical antisepsis in the future.

Copyright © 2010 S. Karger AG, Basel

Introduction

The formation of biofilms is crucial in the pathogenesis of many acute and subacute microbial infections, including chronic wounds and foreign-body-related infections [1, 2]. Bacteria organized in biofilms are distinctly less susceptible to host defences and antimicrobial therapy compared with their planktonic counterparts [3–5]. Topical antimicrobial therapy with antiseptics or with tissue-tolerable plasma (TTP) could be an interesting option for biofilm elimination, given that these measures are effective in the inactivation and removal of microbial biofilms, but data available on this topic are limited.

We therefore compared the efficacy of chlorhexidine digluconate (CHX) with that of polihexanide (polyhexamethylene biguanide, PHMB) and TTP against *Pseudomonas aeruginosa* grown in microtitre plates and on silicone in vitro with different analytic methods.

Chlorhexidine is one of the most frequently used antiseptics worldwide, the gold standard for oral cavity antisepsis, and effective against developing and mature biofilms [6–10]. As the microbicidal efficacy of polihexanide is comparable to that of chlorhexidine [11], but PHMB, despite structural similarity, differs from chlorhexidine in that it does not contain the toxicologically critical ter-

KARGER

Fax +41 61 306 12 34
E-Mail karger@karger.ch
www.karger.com

© 2010 S. Karger AG, Basel
1660–5527/10/0237–0028$26.00/0

Accessible online at:
www.karger.com/spp

Nils-Olaf Hübner, MD
Institute of Hygiene and Environmental Medicine
Ernst Moritz Arndt University Greifswald, Walther Rathenau Strasse 49a
DE–17489 Greifswald (Germany)
Tel. +49 383 451 5546, Fax +49 383 451 5541, E-Mail nhuebner@uni-greifswald.de

minal chlorobenzene substituents, it was to be compared with chlorhexidine in its effect against biofilms. A further reason for the choice of polihexanide is its growing importance as an antiseptic substance and its related increasing use, particularly for the treatment of infected wounds and for decolonization of skin [Hübner and Kramer, this supplement issue; 12–14], as well as for the decolonization of mucous membranes of patients colonized with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* [Eberlein and Assadian, this supplement issue].

The use of TTP as a physical alternative to chemical antisepsis appears promising, because plasma, too, depending on the dose, is microbicidally effective [15, 16] and in the body temperature range can also be used on the surface of the body [17]. Unlike chemical antisepsis, energy can be supplied to the wound tissue through the use of plasma, thus possibly contributing to promoting the healing process. The possibility of the use of TTP worldwide is therefore being studied in centres specializing in this.

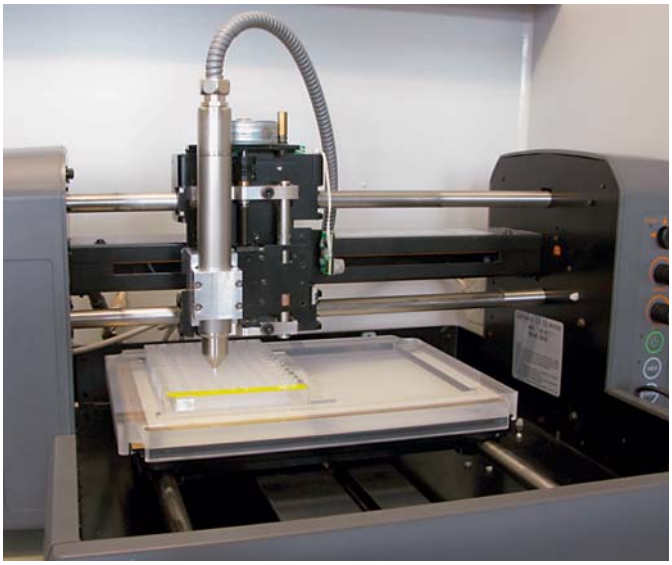


Fig. 1. Configuration for plasma treatment. The KINPen 09 is attached to the x/y/z-plotting table. The microtitre plate is fixed. Movement of the pen is controlled by a PC (not shown).

Materials and Methods

Bacterial Strains and Growth Conditions

The bacterium used in this study was a mucoid environmental *P. aeruginosa* strain SG81 which was isolated from a biofilm in a technical water system and was provided by the biofilm centre Duisburg, Germany. This strain is a well-characterized and stable alginate-producing strain that forms highly mucoid colonies on standard media agar. The content of the alginate was subclassified in mannose and glucose residues in which the mannose residues outweigh with 67% [18, 19]. The bacteria were grown overnight on Columbia blood agar at 37°C for 24 h. A single colony was then transferred to trypticase soy agar plates (Oxoid, Cambridge, UK) and was incubated for 24 h at 37°C. The grown cells were suspended in phosphate-buffered saline (PBS), harvested by centrifugation for 15 min at 3,000 *g*, washed twice in PBS and resuspended in artificial wound fluid (minimal essential medium + 10% fetal bovine serum) (GIBCO-Invitrogen, Karlsruhe, Germany) [11] to a final concentration of approximately 1×10^9 colony-forming units (CFU)/ml.

Culture of the Biofilms and Preparation of the Samples

Biofilms were cultured on test objects made of silicone with a diameter of 0.6 cm (Thomasil-60, Reichelt Chemietechnik, Heidelberg, Germany) and in the wells of cell culture 24-well microtitre plates (Techno Plastic Products AG, Switzerland).

The final bacteria medium consisted of the artificial wound and the washed bacteria at a final concentration of 10^8 CFU/ml. The sterile test objects were positioned in 24-well microtitre plates, covered with 0.7 ml microorganism suspension, and incubated aerobically on the agitator (Polymax, Heidolph, Germany) at 160 rpm for 4 h at 37°C. For the direct culture, on 96-well microtitre plates, 50 μl microorganism suspension per well was applied by pipette and likewise incubated. After 4 h, the suspension was drawn off and replaced by sterile medium; after renewed incubation, the medium was changed every 8 h. After 44 h, the medium was drawn off and the test object/well was washed with PBS.

Test Substances and Antiseptic Treatment

CHX was used as a 0.1% aqueous solution (production by the pharmacy of Greifswald University Hospital). For production of the PHMB solutions, Cosmocil, a 20% PHMB solution (Arch Biocides, UK) was used.

The test objects were transferred into new, sterile microtitre plates, covered with 0.9 ml of the antiseptic, and incubated. After 30 min, the antiseptic was drawn off, and the antiseptic effect was halted by adding 1 ml inactivator (see below). In the case of the 96-well microtitre plates, 90 μl antiseptic was added, and the effect halted with 100 μl inactivator. PBS was used as the control.

Both antiseptics were inactivated using 40 g/l Tween 80, 30 g/l saponin, 4 g/l lecithin, 10 g/l SDS and 1 g/l sodium thioglycolate. The inactivation of the antiseptics by the inactivator was proved in the quantitative suspension test according to DIN 1040 (data not shown).

Treatment with TTP

As the plasma source, an HF plasma pen (frequency 1.82 MHz, input power 3 W; KINPen 09, INP Greifswald; fig. 1) was used with argon as the carrier gas [20, 21]. During treatment, the plasma generated in the jet (spatial afterglow plasma, effluent) is directed to the treated surface at an argon flow rate of 5 standard l/min, the temperature at the plasma tip being 42°C. At this temperature, a mean heat output of about 150 mW is generated on the surface.

For plasma use, the plasma source was attached to a computer-controlled x/y/z table and the test object or microtitre plate was positioned below it (fig. 1). The distance from the test object or bottom of the microtitre plate was 7 mm. The entire surface of the

Table 1. Effect of CHX, PHMB and non-thermal plasma on biofilms in microtitre plates (mean ± SD)

96-well microtitre plate	PBS	CHX 0.1%	PHMB 0.02%	PHMB 0.04%	TTP	Gas
GV	0.0704 ± 0.0801	0.0196 ± 0.0441	0.0284 ± 0.0350	0.0374 ± 0.0659	0.0048 ± 0.0116	0.0118 ± 0.0122
XTT	0.0625 ± 0.0191	0.0093 ± 0.0100[1]	0.0226 ± 0.0055[1]	0.0194 ± 0.0064[1]	0.0602 ± 0.0320	0.0780 ± 0.0063
CFU	7.13 ± 0.65	5.87 ± 0.60[1]	6.71 ± 0.64[2]	5.77 ± 0.45[1]	4.02 ± 0.33[1, 2]	4.88 ± 1.00[1]

[1] Significant difference from PBS.
[2] Significant difference from CHX.

Table 2. Effect of CHX, PHMB and non-thermal plasma on biofilms on silicone swatches (mean ± SD)

Silicone	PBS	CHX 0.1%	PHMB 0.02%	PHMB 0.04%	TTP	Gas
GV	0.0020 ± 0.0356	–0.0107 ± 0.0333	0.0070 ± 0.0188	–0.0215 ± 0.0338	0.1545 ± 0.0932[1, 2]	0.1168 ± 0.1475[1, 2]
XTT	0.067 ± 0.052	0.022 ± 0.021	0.053 ± 0.071	0.017 ± 0.033[1]	0.085 ± 0.027[2]	0.126 ± 0.035[1, 2]
CFU	7.31 ± 0.16	2.83 ± 3.13[1]	4.05 ± 3.15[1]	5.15 ± 2.64[1]	3.84 ± 0.78[1]	6.39 ± 0.33[1, 2]

[1] Significant difference from PBS.
[2] Significant difference from CHX.

test object was treated meander-like at a speed of 10 mm/s. The whole time of treatment was 60 s. The samples were also treated with inactivation solution to destroy possible existing radicals.

Determination of the CFU

After 5 min of inactivation, biofilms were detached in 5 ml PBS using sonication for 20 min at 130 W. CFU were determined by serial dilutions, which were plated on trypticase soy agar and incubated for 24 h at 37°C.

Determination of the Biofilm Mass Using Gentian Violet Assay

The evaluation was carried out according to published methods [22–24]. After 5 min of inactivation, the inactivator was drawn off, the objects were rinsed with fresh PBS and dried for at least 60 min at 37°C. The samples were then covered with 0.1% gentian violet (GV), incubated for 15 min, washed three times with distilled water, and then decoloured with 96% v/v ethanol HCl (Merck, Darmstadt, Germany). The supernatant was pipetted off and the extinction detected in the photometer at 590 nm (BIO-TEK, Power Wave XS).

Determination of Vitality Using XTT

For this, a procedure optimized for *P. aeruginosa* on the basis of the literature was used [25–27]. After 5 min of inactivation, the inactivator was drawn off and fresh PBS was added. To each of the samples, 250 μl of the stain solution, consisting of a mixture of sodium 3′-[1-(phenylaminocarbonyl)-3,4-tetrazolium]-bis(4-methoxy-6-nitro) benzene sulphonic acid hydrate (XTT; 180 mg/l; AppliChem, Darmstadt, Germany), menadione (0.688 mg/l; Sigma-Aldrich, Munich, Germany) and N-methylphenazinium methyl sulphate (20 mg/l; AppliChem) in distilled water, were added and incubated for 3 h at 37°C; 200 μl were transferred to a new sterile microtitre plate and evaluated in the photometer at 450 nm (reference value 620 nm).

Confocal Laser Scanning Microscopy

Two different dyes, Live/Dead (BacLight, Invitrogen, Darmstadt, Germany, SKU# L-7012) and acridine orange (AppliChem-BioChemica, Darmstadt, Germany), were used to visualize the components of the biofilm. The samples were transferred into a 24-well microtitre plate and incubated immediately according to the manufacturer's instructions. After incubation and fixation, samples were rinsed 5 times with PBS to remove dye residues. Samples were then placed onto glass object slides covered with 10 μl Mowiol 4-88 (Polysciences Inc., Eppelheim, Germany) and a coverslip placed on top. Samples were observed using a Zeiss CLSM510 Exciter confocal laser scanning microscope with a 488-nm argon laser. Microscope work was carried out using the oil immersion Plan-Neofluar 63×/1.4 Oil DIC objective.

Biostatistics

All tests were carried out sixfold each for the CFU, biofilm mass determinations, and in duplicate for the staining. In addition, for each test, 6 samples were used as controls. The Friedman test was used for testing for global statistical differences in microorganism count, biofilm mass and vitality, and if the result was significant, further testing was carried out with the Wilcoxon test. The level of significance was set at 0.05.

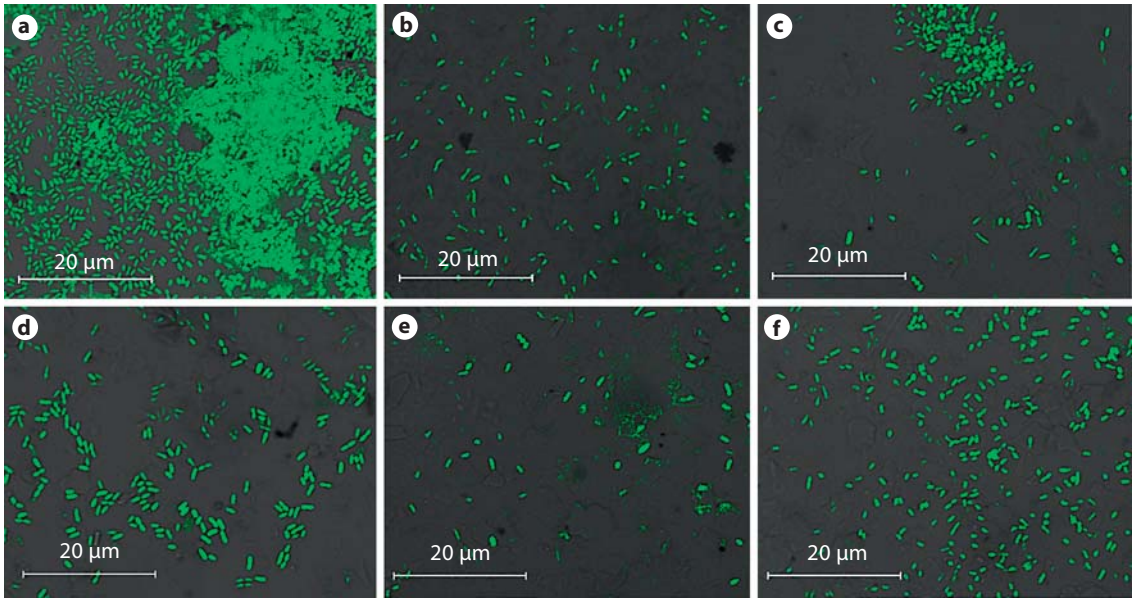


Fig. 2. Effect of antiseptics and TTP against biofilms. **a** Control in PBS. **b** CHX 0.1%. **c** PHMB 0.02%. **d** PHMB 0.04%. **e** TTP. **f** Argon (gas control). Bacteria stained with acridine orange.

Results

GV Assay

For the microtitre plates, the results of the extinction measurement of the samples stained with GV showed no significant differences between the treatments (Friedman test, p = 0.702) (table 1). On the silicone test objects, the treatment with antiseptics likewise led to no significant effect (table 2). Negative values are explained by the subtraction of the control values. In contrast, plasma and gas led to a significant increase in the extinction compared with control and CHX (table 2).

XTT Assay

The converted amount of XTT stain as a measure of the metabolic activity of the microorganisms in the biofilm was significantly reduced by the antiseptics in the microtitre plate, while plasma and gas did not lead to a significant reduction (table 1). On the silicone test objects, only 0.04% PHMB led to a significant reduction compared to the control, while, as in the microtitre plate, plasma and gas led to an increase in the extinction that differed significantly from CHX and PBS (table 2).

Colony-Forming Units

The antimicrobial effect of the antiseptics and of the plasma was seen most clearly in the reduction of the CFU. Both in the microtitre plates and on the silicone test objects the treatments (with the exception of 0.02% PHMB in the microtitre plate) led to a significant reduction in the CFU compared with the control, although there were no significant differences between the treatments. Only the plasma control gas on silicone and 0.02% PHMB in the microtitre plate were poorer than CHX (tables 1 and 2).

Fluorochroming

Acridine orange intensely fluoresces after intercalating with the DNA/RNA in living and dead bacteria. Compared to the untreated sample, the number of microorganisms in the preparation stained with acridine orange is clearly reduced (fig. 2). The clearest effects were seen for 0.1% CHX, TTP and 0.04% PHMB. The live/dead-stained preparation permits additional information about the vitality of the microorganisms in the biofilm (fig. 3). The dense, vital 'massive microorganism growth' in the control is killed by the antimicrobial treatments and reduced in its density. Live/dead-staining included the fluorochromes Syto9 and propidium iodide, both intercalating the DNA. Worth noting are the differences between gas and TTP on the one hand and between 0.02 and 0.04% PHMB on the other. Both with TTP and with 0.04% PHMB, hardly any vital microorganisms stain after treatment. This is in conformity with the preparations

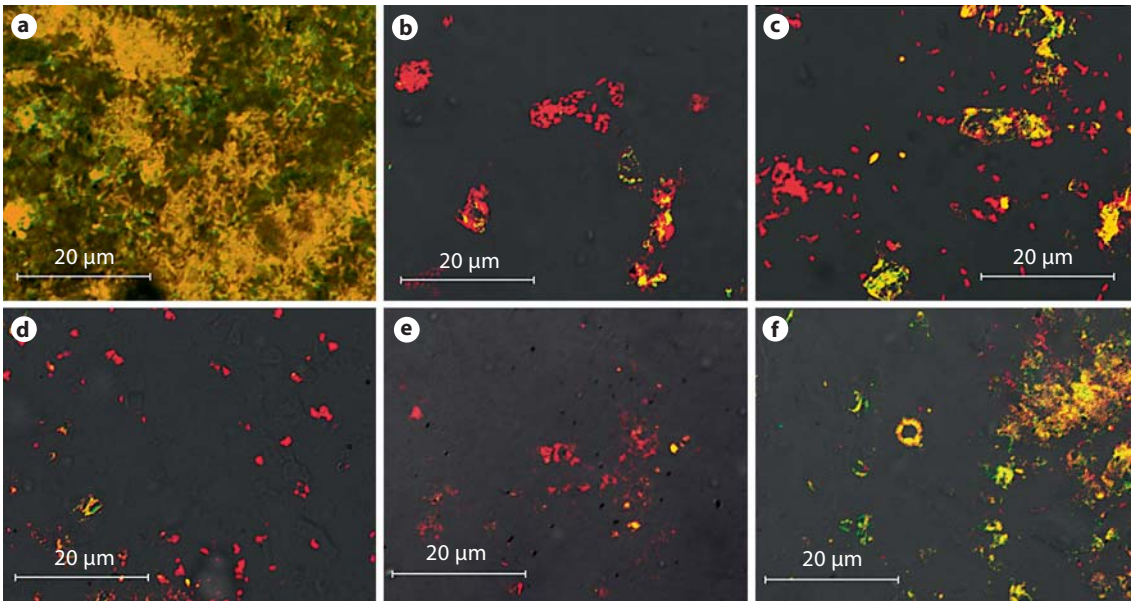


Fig. 3. Effect of antiseptics and TTP on biofilms grown in microtitre plates. **a** Control in PBS. **b** CHX 0.1%. **c** PHMB 0.02%. **d** PHMB 0.04%. **e** TTP. **f** Argon (gas control). Bacteria stained fluorescent green (Syto9) have intact membranes, whereas bacteria stained red (propidium iodide) have damaged membranes, allowing propidium iodide to enter the cell. The micrographs show both the green and red channel, yellow locations represent areas where dyes overlapped.

stained with acridine orange, after which TTP and the higher PHMB concentration even inactivate 'islands', i.e. areas of high microorganism density.

Discussion

Biofilms make treatment of microbial infections more difficult. This applies especially if abiotic foreign bodies are present in the wound and form a basis for biofilm formation that is difficult for the immune system to access [1]. For accessibility to microbial biofilms, topical treatment with antiseptic measures is superior to the chemotherapeutic use of antibiotics, and in view of the increasing microbial resistance to antibiotics, it is of particular significance. In the study described here, the effects of PHMB and TTP in vitro in the presence of artificial wound fluid were compared with that of chlorhexidine as a substance with a proven effect against biofilms and seen as the gold standard to eliminate dental plaque [28–31]. However, it must be remembered that, depending on the test system, chlorhexidine also proved to be ineffective against biofilms [9]. The effectiveness of PHMB against biofilms was also shown [2, 32–34]. First investigations on the antimicrobial abilities of physical plasma against bacteria in biofilms have been published [35–37]. In the present study, the biofilms were cultured not only on routinely used microtitre plates, but also on silicone as a material frequently used in medicine with organic burden.

The results show that PHMB is comparable to CHX in its effect against the *P. aeruginosa* biofilm, irrespective of the material. In addition to efficacy, local tolerability and systemic toxicity play a decisive role for clinical use. PHMB has proved to be well tolerable and tissue-friendly [38], and in these respects is clearly superior to CHX [see Hübner and Kramer, this supplement issue]. On account of the deficient data situation on the clinical efficacy of CHX for wound treatment [39] and its tissue toxicity [11], in Germany CHX-based wound antiseptics are no longer authorized. The results in the biofilm model substantiate the results of clinical studies in which the potential of PHMB and products containing PHMB for the treatment of infected wounds could be demonstrated [14, 40–42].

TTP is a physical alternative to chemical antisepsis. In recent years, plasma sources for wound treatment have been developed and tested at several centres [43–46]. Two

advantages of physical procedures are the fact that they can be standardized and the absence of entry of the antiseptic into the wound. In our tests, the microbicidal effect of plasma was comparable to that of CHX, whereas the simple gassing with argon proved to be significantly poorer than CHX. This confirms that the antimicrobial effect is not just a result of drying by the gas current, but truly of the plasma itself. These reductions through TTP were not only statistically significant, but with >3 $\log_{10}$ correspond to the required efficacy for antiseptics [47]. This confirms the results of other authors reporting on the antimicrobial effects of TTP [36, 48].

However, the results regarding the determination of the biofilm mass could only be evaluated for the microtitre plates, as the drying caused by the flow of gas apparently altered the stainability on silicone.

To ensure the reproducibility of the results, standard methods of biofilm research were used. For the method of analysis of the solid substance, GV was used. This method is applied in many variations, which all follow the same scheme [22, 23]. In contrast, the XTT test was modified with regard to the combination with menadione and N-methylphenazinium methyl sulphate [25–27], because in the results of our previous studies in the case of *P. aeruginosa* the most intensive conversion of XTT was measured with this combination (data not shown). Nevertheless, the study has numerous limitations that must be taken into consideration in the evaluation. Evaluation of the metabolic activity by means of XTT must be made with caution for microorganism counts $<10^5$ CFU/ml on account of the S-shaped calibration curve for the stain. This particularly applies for the values for TTP and gas in the microtitre plate. To make the test conditions as similar as possible to the conditions in vivo, all tests were carried out in the presence of artificial wound fluid. However, this makes comparison with the results of other authors more difficult, as in the absence of such a load greater reductions tend to be achieved. With microtitre plates (polystyrene) and silicone, the choice of samples involved two materials that are frequently used in biofilm research. The results show that the results cannot be extrapolated uncritically to other materials, as just the two materials studied showed clear differences. The same applies for the plasma source used, as other configurations, especially changes in gas flow, energy density and type of plasma produced can lead to other results. Further investigations are therefore necessary in order to verify the efficacy for other microorganisms and under other conditions.

Conclusion

Biofilms play a key role in the pathogenesis of many acute and subacute microbial infections, including chronic wound and foreign-body-related infections. CHX and PHMB have been shown to be effective against bacteria in biofilms and could therefore be an interesting option for biofilm treatment. Topical antimicrobial therapy with TTP was also shown to be effective against *P. aeruginosa* biofilms on polystyrene and silicone materials. Further research should be done to evaluate the possible role of physical therapies for biofilm-derived infections.

Acknowledgements

The authors thank Prof. Hans-Curt Flemming for providing the SG 81 strain and Claudia Rändler and Jacqueline Menz for their help to perform the study.

Disclosure Statement

The authors declare that they have no stocks or stocks options related to any company manufacturing commercially available products on the basis of polihexanide as ingredient. Prof. Axel Kramer and Dr. Gerald Müller have a patent pending for a medical device that utilizes polihexanide as active agent. Prof. Axel Kramer and Dr. Nils-Olaf Hübner received consulting fees from B. Braun. Prof. Axel Kramer received financial support as a clinical investigator for B. Braun, Lohmann & Rauscher, Serag-Wiesner and Fresenius. Dr. Nils-Olaf Hübner received financial support as a clinical investigator for B. Braun and Serag-Wiesner as well as speaker's honoraria for public medical education related to clinical use of antiseptics, including polihexanide. Dr. Gerald Müller received financial support for research from B. Braun, Lohmann & Rauscher, Serag-Wiesner and Fresenius. All other authors declare no conflict of interest.

References

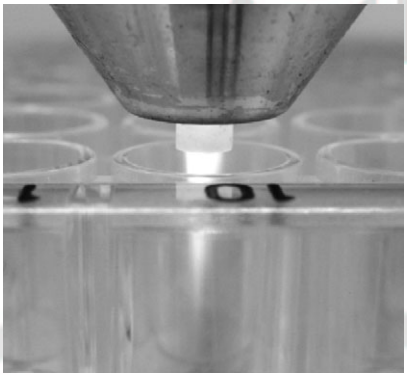
1 Pozo JL, Patel R: The challenge of treating biofilm-associated bacterial infections. Clin Pharmacol Ther 2007;82:204–209.
2 Seipp H, Hofmann S, Hack A, Skowronsky A, Hauri A: Efficacy of various wound irrigation solutions against biofilms. ZfW 2005: 160–164.
3 Fux CA, Costerton JW, Stewart PS, Stoodley P: Survival strategies of infectious biofilms. Trends Microbiol 2005;13:34–40.
4 Lewis K: Multidrug tolerance of biofilms and persister cells. Curr Top Microbiol Immunol 2008;322:107–131.
5 Stewart PS, Costerton JW: Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. Lancet 2001; 358:135–138.

6 Pusateri CR, Monaco EA, Edgerton M: Sensitivity of *Candida albicans* biofilm cells grown on denture acrylic to antifungal proteins and chlorhexidine. Arch Oral Biol 2009;54:588–594.
7 Karpanen TJ, Worthington T, Hendry ER, Conway BR, Lambert PA: Antimicrobial efficacy of chlorhexidine digluconate alone and in combination with eucalyptus oil, tea tree oil and thymol against planktonic and biofilm cultures of *Staphylococcus epidermidis*. J Antimicrob Chemother 2008;62:1031–1036.
8 Houari A, Di Martino P: Effect of chlorhexidine and benzalkonium chloride on bacterial biofilm formation. Lett Appl Microbiol 2007;45:652–656.
9 Vitkov L, Hermann A, Krautgartner WD, Herrmann M, Fuchs K, Klappacher M, Hannig M: Chlorhexidine-induced ultrastructural alterations in oral biofilm. Microsc Res Tech 2005;68:85–89.
10 Hope CK, Wilson M: Analysis of the effects of chlorhexidine on oral biofilm vitality and structure based on viability profiling and an indicator of membrane integrity. J Antimicrob Chemother 2004;48:1461–1468.
11 Müller G, Kramer A: Biocompatibility index of antiseptic agents by parallel assessment of antimicrobial activity and cellular cytotoxicity. J Antimicrob Chemother 2008;61:1281–1287.
12 Horrocks A: Prontosan wound irrigation and gel: management of chronic wounds. Br J Nurs 2006;15:1222, 1224–1228.
13 Möller A, Kaehn K, Nolte A: Erfahrungen mit dem Einsatz polihexanidhaltiger Wundprodukte bei der Versorgung chronischer Wunden – Ergebnisse einer systematischen retrospektiven Untersuchung an 953 Patienten. Wundmanagement 2008;3:64–69.
14 Valenzuela AR, Perucho NS: The effectiveness of a 0.1% polyhexanide gel. Rev Enferm 2008;31:7–12.
15 Sladek REJ, Stoffels E: Deactivation of *Escherichia coli* by the plasma needle. J Phys D Appl Phys 2005;11:1716.
16 Von Woedtke T, Kramer A, Weltmann K-D: Plasma sterilization: what are the conditions to meet this claim? Plasma Process Polym 2008;5:534–539.
17 Kalghatgi SU, Fridman G, Fridman A, Friedman G, Clyne AM: Non-thermal dielectric barrier discharge plasma treatment of endothelial cells. Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc 2008;2008:3578–3581.
18 Grobe S, Fiedler S, Wingender J, Overath H: Wirkung von Chlor und Wasserstoffperoxid auf schleimbildende Bakterien aus wasserführenden Systemen. Vom Wasser 1994;83:17.
19 Grobe S, Wingender J, Truper HG: Characterization of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from technical water systems. J Appl Bacteriol 1995;79:94–102.
20 Weltmann K-D, Brandenburg R, Woedtke Tv, Ehlbeck J, Foest R, Stieber M, Kindel E: Antimicrobial treatment of heat sensitive products by miniaturized atmospheric pressure plasma jets (APPJs). J Phys D Appl Phys 2008;41:194008.
21 Foest R, Kindel E, Ohl A, Stieber M, Weltmann K-D: Non-thermal atmospheric pressure discharges for surface modification. Plasma Phys Control Fusion 2005;47:B525.
22 Peeters E, Nelis HJ, Coenye T: Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. Microbiol Methods 2008;72:157–165.
23 Vesterlund S, Paltta J, Karp M, Ouwehand AC: Measurement of bacterial adhesion – in vitro evaluation of different methods. Microbiol Methods 2005;60:225–233.
24 Mathur T, Singhal S, Khan S, Upadhyay DJ, Fatma T, Rattan A: Detection of biofilm formation among the clinical isolates of Staphylococci: an evaluation of three different screening methods. Indian J Med Microbiol 2006;24:25–29.
25 Thein ZM, Samaranayake YH, Samaranayake LP: In vitro biofilm formation of *Candida albicans* and non-albicans Candida species under dynamic and anaerobic conditions. Arch Oral Biol 2007;52:761–767.
26 Cerca N, Martins S, Cerca F, Jefferson KK, Pier GB, Oliveira R, Azeredo J: Comparative assessment of antibiotic susceptibility of coagulase-negative staphylococci in biofilm versus planktonic culture as assessed by bacterial enumeration or rapid XTT colorimetry. J Antimicrob Chemother 2005;56:331–336.
27 Sousa C, Teixeira P, Oliveira R: The role of extracellular polymers on *Staphylococcus epidermidis* biofilm biomass and metabolic activity. J Basic Microbiol 2009;49:363–370.
28 Zelic O, Cakic S, Lukovic N: The effect of two different oral antiseptics on dental plaque formation (de novo biofilm) and on gingival inflammation. Srp Arh Celok Lek 2009;137:6–9.
29 Lamfon H, Porter SR, McCullough M, Pratten J: Susceptibility of *Candida albicans* biofilms grown in a constant depth film fermentor to chlorhexidine, fluconazole and miconazole: a longitudinal study. J Antibicrob Chemother 2004;53:383–385.
30 Wirthlin MR, Chen PK, Hoover CI: A laboratory model biofilm fermenter: design and initial trial on a single species biofilm. J Periodontol 2005;76:1443–1449.
31 Auschill TM, Hein N, Hellwig E, Follo M, Sculean A, Arweiler NB: Effect of two antimicrobial agents on early in situ biofilm formation. J Clin Periodontol 2005;32:147–152.
32 Harbs N, Siebert J: In vitro efficacy of octenidine and polihexanide against biofilms composed of *Pseudomonas aeruginosa*. GMS Krankenhaushyg Interdiszip 2007;2:Doc45(20071228).
33 Pietsch M, Kraft B: Antimikrobielle Wirksamkeit ausgewählter Substanzen für die Wasserdesinfektion in Dentaleinheiten mit Biofilm. Aseptica 2006;12:3–4.
34 Brecx M, Decker EM, Freitag HP, Maier G, Von Ohle C: The effect of polihexanide on dental biofilm formation in vivo. Conf Pan Eur Fed Int Assoc Dent Res, London, 2008.
35 Joaquin JC, Kwan C, Abramzon N, Vandervoort K, Brelles-Marino G: Is gas-discharge plasma a new solution to the old problem of biofilm inactivation? Microbiology 2009;155:724–732.
36 Abramzon N, Joaquin JC, Bray J, Brelles-Marino G: Biofilm destruction by RF high-pressure cold plasma jet. IEEE Trans Plasma Sci IEEE Nucl Plasma Sci Soc 2006;34:1304–1309.
37 Sladek RE, Filoche SK, Sissons CH, Stoffels E: Treatment of *Streptococcus mutans* biofilms with a nonthermal atmospheric plasma. Lett Appl Microbiol 2007;45:318–323.
38 Hirsch T, Koerber A, Jacobsen F, Dissemond J, Steinau HU, Gatermann S, Al-Benna S, Kesting M, Seipp HM, Steinstraesser L: Evaluation of toxic side effects of clinically used skin antiseptics in vitro. J Surg Res, E-pub ahead of print.
39 Cooper R: A review of the evidence for the use of topical antimicrobial agents in wound care. 2004. www.worldwidewounds.com/2004/february/Cooper/Topical-Antimicrobial-Agents.html.
40 Schmit-Neuerburg K, Bettag C, Schlickewei W, Fabry W, Hanke J, Renzig-Köhler K, Kirche H, Kock HJ: Wirksamkeit eines neuartigen Antisepticum in der Behandlung kontaminierter Weichteilwunden. Chirurg 2001;72:61–71.
41 Daeschlein G, Assadian O, Bruck JC, Meinl C, Kramer A, Koch S: Feasibility and clinical applicability of polihexanide for treatment of second-degree burn wounds. Skin Pharmacol Physiol 2007;20:292–296.
42 Roth B, Assadian O, Wurmitzer F, Kramer A: Surgical site infections after primary antiseptic cleansing of dirty-contaminated wounds by polihexanide, PVP iodine resp hydrogen peroxide. GMS Krankenhaushyg Interdiszip 2007;2:Doc58(20071228).
43 Stoffels E, Kieft IE, Sladek REJ, van der Bedem LJM, van der Laan EP, Steinbuch M: Plasma needle for in vivo medical treatment: recent developments and perspectives. Plasma Sources Sci Technol 2006;4:169.
44 Fridman G, Peddinghaus M, Balasubramanian M, Ayan H, Fridman A, Gutsol A, Brooks A: Blood coagulation and living tissue sterilization by floating-electrode dielectric barrier discharge in air. Plasma Chem Plasma Process 2006;16:425–442.
45 Watts AE, Fubini SL, Vernier-Singer M, Golkowski C, Shin S, Todhunter RJ: In vitro analysis of nonthermal plasma as a disinfecting agent. Am J Vet Res 2006;67:2030–2035.
46 Tipa RS, Stoffels E: Effects of Plasma Treatment on Wounds. 13th International Conference on Biomedical Engineering, IFMBE Proceedings. Berlin, Springer, 2009, pp 1385–1388.
47 Pitten FA, Werner HP, Kramer A: A standardized test to assess the impact of different organic challenges on the antimicrobial activity of antiseptics. J Hosp Infect 2003;55:108–115.
48 Chunqi J, Meng-Tse C, Amita G, Christoph S, David EJ, Costerton JW, Sedghizadeh PP, Vernier TP, Gundersen MA: Nanosecond pulsed plasma dental probe. Plasma Process Polym 2009;6:479–483.

ppap.201100133C

Full Paper

With the purpose of finding new treatment options of biofilm infected wounds, an atmospheric pressure plasma jet is used. In vitro biofilms of two problematic pathogens, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus epidermidis*, are treated with argon plasma with and without admixture of 1% oxygen or the important biofilm antiseptic chlorhexidine digluconate.



Antimicrobial Efficacy of an Atmospheric Pressure Plasma Jet Against Biofilms of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus epidermidis*

R. Matthes,* I. Koban, C. Bender, K. Masur, E. Kindel, K.-D. Weltmann, T. Kocher, A. Kramer, N.-O. Hübner

Plasma Process. Polym. **2012**, *9*, 000–000

Early View Publication; these are NOT the final page numbers, use DOI for citation !!

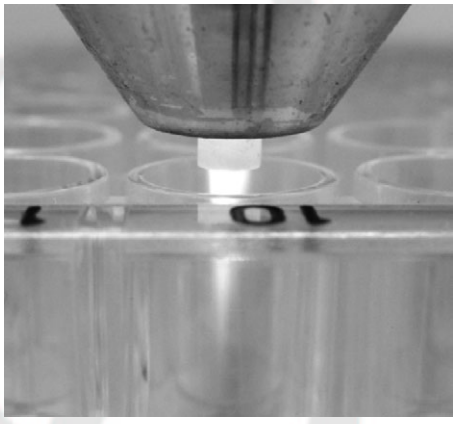
WILEY-VCH

ppap.201100133

Antimicrobial Efficacy of an Atmospheric Pressure Plasma Jet Against Biofilms of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus epidermidis*[a]

Rutger Matthes,* Ina Koban, Claudia Bender, Kai Masur, Eckhard Kindel, Klaus-Dieter Weltmann, Thomas Kocher, Axel Kramer, Nils-Olaf Hübner

Microbial biofilms impair wound healing and the efficacy of antimicrobial treatment. This study used the tissue-tolerable plasma source kinpen 09 to investigate the efficacy of pure argon and an argon/oxygen-mixture plasma against in vitro biofilms of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus epidermidis* compared to the antiseptic chlorhexidine digluconate (CHX). Biofilms were treated for 30, 60, 150, or 300 s with cold atmospheric plasma and for 600 s with 0.1% CHX. Thereafter, the biofilms were dispersed and their inactivation was determined as the reduction of colony forming units (CFU). Plasma treatment led to a significant antimicrobial effect compared to the untreated control and was at least as effective as 10-min treatment with a 0.1% CHX solution, or even better, depending on the admixtures to argon, the bacterial strain used, and the exposure time[Q2].



R. Matthes, C. Bender, A. Kramer, N.-O. Hübner
Institute for Hygiene and Environmental Medicine, Ernst Moritz Arndt University Greifswald, Walther Rathenau Straße 49a, 17487 Greifswald, Germany
E-mail: rutger.matthes@uni-greifswald.de
I. Koban, T. Kocher
Unit of Periodontology, Dental School, Ernst Moritz Arndt University Greifswald, Rotgerberstr. 8, 17475 Greifswald, Germany
K. Masur
Center for innovation competence (ZIK) plasmatis, Felix-Hausdorff-Str. 2, 17489 Greifswald, Germany
E. Kindel, K.-D. Weltmann
Leibniz Institute for Plasma Science and Technology (INP), Felix-Hausdorff-Str.2, 17489 Greifswald, Germany

[a] Supporting Information is available from the Wiley Online Library or from the author.

1. Introduction

Device- and implant-associated infections as well as chronic wounds are often complicated by microbial biofilms that impair antiseptic or antibiotic treatment and host defense,[1–3] and are associated with increased morbidity, mortality, and costs.[4,5] Therefore, alternative antimicrobial treatments are highly desirable. Physical plasma, a mixture of charged particles such as free electrons and ions generated in a neutral gas, is a possible alternative antimicrobial option. Tissue Tolerable Plasmas (TTP) do not cause thermal damage, emit only noncritical levels of UV radiation, and do not damage the skin or skin functions under defined conditions.[6,7] This observation is consistent with structural results from laser scanning microscopy.[8] In addition, TTP can improve the tissue regeneration[9,10] and

© 2012 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

Early View Publication; these are NOT the final page numbers, use DOI for citation !!

is effective against a large number of planktonic microbial pathogens, including multidrug resistant bacteria,[11] as well as against biofilms of *Pseudomonas aeruginosa* [12] and *Candida albicans*.[13]

In recent years, numerous different plasma sources have been developed worldwide.[14–16] These devices differ mainly in type of plasma generation, energy output, gas mixture, gas temperature, gas flow, treatment area,[15] and their biological effects.[17,18] Thus, it is necessary to determine the biological effects of every type of laboratory setup to find designs suitable for medical use in the future.

An advanced design that could be usable for medical applications is a commercially available radio-frequency atmospheric pressure plasma jet (kinpen 09, neoplas tools GmbH, Greifswald, Germany), developed by the Leibniz Institute for Plasma Science and Technology (INP),[19] which generates TTP at atmospheric pressure and room temperature.[6–8] The kinpen 09 was shown to act antiseptically effectively on planktonic bacteria on freshly enucleated pig eyes without histological damage,[20] but data on the inactivation of biofilms are scarce. Therefore, we investigated the inactivation potency of TTP against biofilms of *Pseudomonas aeruginosa*, a Gram-negative pathogen often involved in nosocomial infections, especially chronic wounds,[21] and *Staphylococcus epidermidis*, a Gram-positive inhabitant of the cutaneous flora which is frequently involved in implant infections.[22] Both pathogens are often resistant to antibiotic therapy.[23,24]

The inactivation of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms by cold plasma generated by the kinpen 09 with argon (Ar) or Ar admixed with 1% oxygen ($Ar + O_2$) was compared with chlorhexidine digluconate (CHX), a typical antiseptic for skin[25–27] and mucous membranes,[28] and is the criterion standard for treatment of dental biofilms.[13,29] Comparing the antimicrobial effect against biofilm bacteria of two strains with different cell wall structures and the influence of admixing oxygen to the carrier gas is a new aspect, which will provide new knowledge for possible future applications of plasma on wounds, catheters, or indwelling devices.

2. Experimental Section

2.1. Cultivation and Evaluation of Biofilms

The strongly biofilm-forming strains *Pseudomonas aeruginosa* SG81 and *Staphylococcus epidermidis* RP62A were used.[30,31]

Biofilms were grown on polystyrene on the bottom of 96-well microplates for cell culture (Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Switzerland) by using an artificial wound medium (minimal essential medium +10% fetal bovine serum) (GIBCO-Invitrogen, Darmstadt, Germany) as the growth medium.[12,32] Bacterial cultivation and preparation were performed as described previously.[18] The batch medium had a final concentration of 10^8 colony forming units (CFU) ml^{-1}. The wells were covered with 50 µl batch medium and incubated aerobically for 24 h at 37 °C. Afterwards, the medium was replaced with sterile artificial wound medium and biofilms were incubated for another 24 h at 25 °C on a laboratory shaker (Polymax, Heidolph, Schwabach, Germany) at 150 rpm.

Wells were washed with 90 µl phosphate buffered saline solution to remove unattached bacteria before biofilms were exposed to CHX or plasma.

After exposure, biofilms were dispersed in an ultrasonic bath (130 W, Branson 2510, Emerson Technologies GmbH & Co. OHG, Dietzenbach, Germany) for 20 min. The antimicrobial effect was determined as the difference in the number of CFU in the suspension as described elsewhere.[12]

2.2. Treatment

For plasma treatment, the kinpen 09 (1.1 MHz at 2–6 kVpp, 3.5 W maximal input DC power), which is a hand-held unit, was attached to a computer-controlled x/y/z table (modified EDX-20, Roland DG, Westerlo, Belgium) and the microtiter plate was positioned below it (Figure 1). The exposure times were 30, 60, 150, and 300 s, while the hand-held unit moved in small circles (diameter: 1 mm) at a speed of 10 $mm \cdot s^{-1}$. The distance from the nozzle of the jet to the bottom of the microplate was held constant at 11 mm during application. Temperature at the fixed plasma tip was 47 °C (distributed temperature sensing) after 15 min exposition, with a mean heat output of about 300 mW (calorimetric measurement, distance of 10 mm) generated at the surface. Temperature measurements on biofilm after 300 s of plasma treatment did not exceeded 41 °C (digital hand thermometer K101, VOLTCRAFT, Hirschau, Germany). The plasma device is described in detail elsewhere.[19]

Ar (99.995% pure) and Ar admixed with 1 vol.-% oxygen ($Ar + O_2$) (medical oxygen, 99.5% pure) were used as carriers with a gas flow of 5 standard $l \cdot min^{-1}$ (slm) for plasma and gas (solely argon

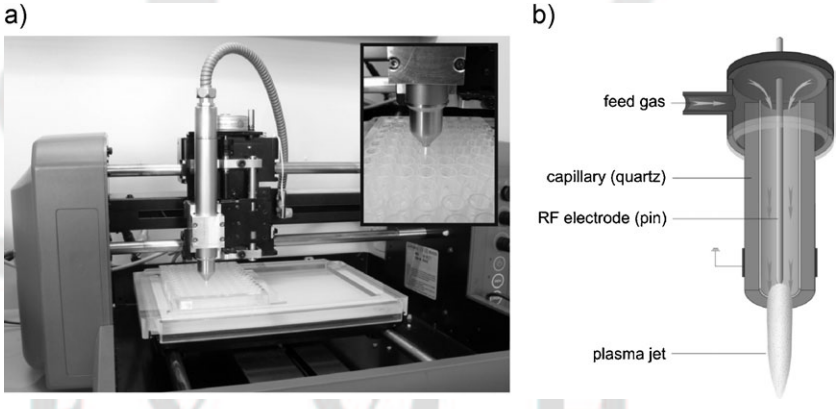


Figure 1. Experimental set-up. (a) plasma jet in action. (b) schematic representation of the kinpen 09 RF plasma jet.

© 2012 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

DOI: 10.1002/ppap.201100133
Early View Publication; these are NOT the final page numbers, use DOI for citation !!

without plasma generation) treatment, controlled by a mass flow controller (MKS Instruments, Munich, Germany).

For antiseptic treatment with CHX (Sigma-Aldrich, Hamburg, Germany), wells were filled with 90 µl of 0.1% CHX and left for 10 min at 23 °C. Antiseptic activity was stopped by replacing the CHX with 100 µl of inactivation solution (30 g·l^{-1} Tween 80, 30 g·l^{-1} saponine, 1 g·l^{-1} cysteine, 1 g·l^{-1} histidine) for 10 min. The efficacy of the inactivation solution has been verified previously according to DIN EN 1040 (data not shown).[33]

2.3. Statistical Analysis

All CFU counts were transformed to $\log_{10}$ cm^{-2}. The colony reduction factor (CRF) was calculated for each sample as the difference from the means of controls in every test. Standard deviations (SD) and confidence intervals (CI) after treatments were calculated based on CRFs for all plasma and gas treatment modifications and CHX treatments for both *P. aeruginosa* and *S. epidermidis*. Differences between treatment modes, times, CHX, and control were analyzed for statistical significance using the Kruskal–Wallis test, followed by a Mann–Whitney *U*-test with the statistical analysis system SAS Enterprise Guide 4.1 (SAS Enterprise Guide 4.1, SAS Institute GmbH, Heidelberg, Germany), when applicable. The level of significance was set at $\alpha = 0.05$.

3. Results

All applications (plasma, gas, CHX) showed a statistically significant antimicrobial effect on biofilms compared to the untreated control. The effect of the plasma was dependent on the carrier gas used and increased with exposure time. *P. aeruginosa* was generally more susceptible than *S. epidermidis* (Table 1 and 2).

The increase of the antimicrobial efficacy of Ar plasma on *P. aeruginosa* was almost linear between 30 and 300 s with a maximum CRF of 5.41 $\log_{10}$ at 300 s. Ar + O_2 plasma was more effective than Ar plasma at shorter exposure times on *P. aeruginosa* biofilms, but the effect did not increase with time as for Ar plasma, with a maximum CRF of 5.10 $\log_{10}$ at 300 s.

The pure Ar and Ar + O_2 gas treatment showed an antimicrobial effect that also increased with time. The difference between gas and plasma treatment became statistically significant after 30 s for Ar plasma (Ar 30 s: $p = 0.031$, Ar 60–300 s: $p < 0.0001$) on biofilms of *P. aeruginosa* (Table 1).

The antimicrobial effects of Ar and Ar + O_2 plasma were lower for *S. epidermidis* than *P. aeruginosa* biofilms. For *S. epidermidis,* Ar plasma was more effective than Ar + O_2

Table 1. Inactivation of *Pseudomonas aeruginosa* SG81 biofilms after application of Ar and Ar + O_2 plasma, Ar and Ar + O_2 gas for 30–300 s treatment time, 0.1% chlorhexidine digluconate (CHX), and the untreated control. Number of samples (*N*), colony reduction factors (CRF) in $\log_{10}$ (CFU cm^{-2}) ± standard deviation (SD), lower and upper 95% confidence limits (CI) [*p*-values of omnibus tests (Kruskal–Wallis) and two-sample tests (Whitney U); statistical significance: $\alpha = 0.05$].

Treatment	Ar				Ar + O_2				*p*
			95% CI limits				95% CI limits		
	N	RF ± SD	Lower	Upper	*N*	RF ± SD	Lower	Upper	
Plasma — 30 s	19	**1.56** ± 1.56[a)]	0.81	2.31	19	**2.68** ± 0.74 cg[b)]	2.33	3.04	0.0355
Plasma — 60 s	22	**3.17** ± 1.11 cg[b)]	2.68	3.67	23	**3.69** ± 0.80 cg[b)]	3.61	4.31	0.0090
Plasma — 150 s	16	**4.06** ± 0.94 cg[b)]	3.56	4.56	22	**4.59** ± 0.91 cg[b)]	4.19	5.00	0.0546
Plasma — 300 s	20	**5.41** ± 1.58 cg[b)]	4.67	6.15	22	**5.10** ± 0.42 cg[b)]	4.91	5.28	0.5288
p		0.0001				0.0001			0.0001
Gas — 30 s	16	**0.41** ± 0.79[c)]	−0.02	0.83	20	**1.59** ± 0.43	1.39	1.79	
Gas — 60 s	16	**0.83** ± 0.69[c)]	0.46	1.19	20	**2.10** ± 0.63[c)]	1.81	2.40	
Gas — 150 s	16	**1.26** ± 1.52	0.45	2.07	20	**2.45** ± 0.47[c)]	2.31	2.76	
Gas — 300 s	16	**2.21** ± 0.61[c)]	1.88	2.53	20	**2.74** ± 0.50[c)]	2.51	2.98	
p		0.0001				0.0001			
CHX 0.1%	31	**1.50** ± 0.60	1.28	1.72					
Control	49	**0.00** ± 0.41	−0.13	0.11					
p		0.0001				0.0001			0.0001

[a)]Significantly different from the respective gas control; [b)]significantly different from the respective treatment[Q5] time of *Staphylococcus epidermidis* RP62A (only for plasma); [c)]significantly different from CHX.

© 2012 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

Early View Publication; these are NOT the final page numbers, use DOI for citation !!

Table 2. Inactivation of *Staphylococcus epidermidis* RP62A biofilms after application of Ar and Ar + O_2 plasma, Ar and Ar + O_2 gas control for 30–300 s treatment time, 0.1% chlorhexidine dicluconate (CHX), and the untreated control. Number of samples (*N*), colony reduction factor (CRF) in $\log_{10}$ (CFU cm^{-2}) ± standard deviation (SD), lower and upper 95% confidence limits (CI) [*p*-values of omnibus tests (Kruskal–Wallis) and two-sample tests (Whitney U); statistical significance: $\alpha = 0.05$].

Treatment	Ar				Ar + O_2				*p*
			95% CI limits				95% CI limits		
	N	RF ± SD	Lower	Upper	*N*	RF ± SD	Lower	Upper	
Plasma — 30 s	22	**0.65** ± 0.86[a)]	0.27	1.03	24	**0.50** ± 0.24 cg[b)]	0.40	0.60	0.4816
Plasma — 60 s	25	**1.57** ± 1.06 g[b)]	1.14	2.01	24	**0.90** ± 0.55 c[b)]	0.67	1.13	0.0173
Plasma — 150 s	22	**2.48** ± 0.97 cg[b)]	2.05	2.91	24	**1.43** ± 0.54 cg[b)]	1.20	1.66	0.0002
Plasma — 300 s	22	**3.14** ± 1.06 cg[b)]	2.67	3.61	24	**2.21** ± 0.99[b)]	1.79	2.63	0.0026
p		0.0001				0.0001			0.0001
Gas — 30 s	20	**0.51** ± 0.40[a)]	0.33	0.70	22	**1.09** ± 0.74[a)]	0.77	1.42	
Gas — 60 s	21	**0.88** ± 0.51	0.65	1.11	21	**1.24** ± 0.80[a)]	0.88	1.60	
Gas — 150 s	20	**1.15** ± 0.59	0.87	1.42	22	**1.86** ± 0.70	1.55	2.17	
Gas — 300 s	20	**1.13** ± 0.45	0.92	1.34	23	**2.19** ± 0.78	1.85	2.53	
p		0.0113				0.0001			
CHX 0.1%	42	**1.79** ± 0.83	1.53	2.05					
Control	48	**0.02** ± 0.33	−0.12	0.07					
p		0.0001				0.0001			0.0001

[a)]Significantly different from CHX; [b)]significantly different from the respective treatment time of *Pseudomonas aeruginosa* SG81 (only for plasma);[c)]significantly different[Q6] from the respective gas control.

plasma for all exposure times, with a maximum CRF of 3.14 $\log_{10}$ for Ar and 2.21 $\log_{10}$ for Ar + O_2 after 300 s. The Ar plasma effect was statistically significant for Ar 60–300 s compared to the respective Ar gas treatment ($p < 0.03$). Otherwise, no superior antimicrobial efficacy of Ar + O_2 plasma compared to Ar + O_2 gas was shown for *S. epidermidis* (Table 2).

CHX treatment for 600 s led to a reduction of 1.50 $\log_{10}$ for *P. aeruginosa* and 1.79 $\log_{10}$ for *S. epidermidis*. Therefore, even for a longer treatment duration, CHX was significantly less effective than Ar plasma treatment after 60 s for *P. aeruginosa* and 150 s for *S. epidermidis,* and also significantly less effective than Ar + O_2 plasma treatment after 30 s for *P. aeruginosa*. For *S. epidermidis*, there was no statistically significant superior antimicrobial efficacy of Ar + O_2 plasma compared to CHX for any treatment time.

4. Discussion

We evaluated the antimicrobial potential of an atmospheric pressure plasma jet against microbial biofilms of *P. aeruginosa* and *S. epidermidis* on polystyrene.

The selected biofilm model is based on often-used methods to screen biofilm inactivation.[34–36] The artificial wound medium used is similar to the composition of an artificial wound fluid and simulates a wound-like environment for growing bacteria and biofilm formation — although it lacks the associated immune response components.[32,37] Although the 48-h-old monospecies biofilms do not represent the complex natural multispecies biofilms in vivo, e.g., of chronic wounds,[38] their advantage is the high standardization that allows comparison between different treatment protocols.

The kinpen 09 was used for plasma generation, because this plasma source may be suitable for wound treatment.[39] Argon plasma generated by the kinpen 09 has been shown to be tissue tolerable. Its plume can reach rather inaccessible areas — such as cavities — and allows spot treatment of small areas.[6–8,40,41] Hammann et al.[20] observed no damage of sensitive tissue while the hand-held unit moved during the 60-s treatment time. The gas flow of 5 slm is recommended for cooling the plasma device and to maintain a low plasma plume temperature in contact with the substrate. After 300-s plasma treatment using a comparable plasma pen with a lower gas flow and therefore with higher plasma temperature, the capillary net of the chorioallantoic membrane of incubated chicken eggs showed hemorrhages.[9] This implies that the gas flow, temperature,

© 2012 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim
DOI: 10.1002/ppap.201100133

Early View Publication; these are NOT the final page numbers, use DOI for citation !!

and treatment time have a distinct impact on tissue tolerability.

The gas alone was tested to control the drying effect on biofilms. Pretests showed that the gases used have no antimicrobial effect if the substrate is kept moist (data not shown).

Our experiments showed that the plasma used was at least as effective as a 600-s treatment with CHX after 60 s for *P. aeruginosa* and after 150 s exposure time for *S. epidermidis* by argon plasma. This agrees with results of similar experiments.[12,13] The incubation time of 600 s CHX was used as positive control to verify biofilm susceptibility.

The antimicrobial effect is mainly caused by reactive oxygen species (ROS) and UV radiation generated by the ionized gas.[42,43] We therefore expected a greater antimicrobial effect of the argon/oxygen combination used as a carrier gas compared to argon alone due to an increased concentration of ROS.

In contrast to our expectations, admixing oxygen to argon did not significantly increase the efficacy of plasma in all cases. For the Gram-positive *S. epidermidis*, admixing oxygen did not lead to any increased efficacy; the $Ar + O_2$ plasma effect did not exceed the antimicrobial effect of $Ar + O_2$ gas treatment.

Against the Gram-negative *P. aeruginosa* and for short treatments up to 150 s, an intensified effect was shown, while at 300 s, the effect of oxygen admixture was reduced compared to the pure Ar plasma treatment. In any case, the mechanical effect of the $Ar + O_2$ gas flow leads to an increased penetration of oxygen in deeper biofilm layers, which differs from pure argon treatment or the limited oxygen diffusion by ambient air without enhanced gas pressure, and results in increased oxidative processes. This could also explain the intensified effect of $Ar + O_2$ plasma for *P. aeruginosa*.

In short, it seems that plasma efficacy and gas flow effects result from a complex and not completely understood interaction of biochemical and biophysical reactions that are not directly transferable between different microorganisms. It is possible that even the extracellular matrix, the different cell wall structure, enzymatic features, or cell metabolism of *P. aeruginosa* and *S. epidermidis* led to differences in the efficacy of the plasma and gas flow.

In addition, admixing oxygen to the carrier gas leads to a significant change in plasma physics and energy distribution, because the length of the afterglow jet was reduced. This effect may occur due to the influence of the surrounding air in which the plasma works, so that oxygen could have diffused into the initially generated plasma, and therefore minimized the effect of ROS by oxygen admixture.[44]

S. epidermidis seemed to be more resistant to argon plasma or gas treatment in general and in particular to oxidative stress compared to *P. aeruginosa*, a phenomenon perhaps caused by the different cell wall structure of the bacteria, as discussed in a study on ozone treatments against different microorganisms.[45]

We only used one Gram-positive and one Gram-negative aerobic strain. Similar results and explanations have been published for planktonic bacteria,[46] which confirm that Gram-positive bacteria are less susceptible to argon plasma,[47] and the effects additionally depend on the plasma sources. To acquire more detailed information about the role of oxygen in argon plasma, it would be necessary to use a series of different oxygen admixtures.

5. Conclusion

Our results show that plasma generated by the kinpen 09 is an option for reducing biofilms. Plasma, either with pure argon or with 1% oxygen admixed to argon, showed an antimicrobial activity that was comparable to or exceeded the antiseptic efficacy of 0.1% CHX at even shorter exposure times. Together with the tissue tolerability of plasma, this should justify further research into the complex interactions of plasma physics and chemistry with microbial resistance mechanisms in biofilms.

Acknowledgements: This work was realized as part of the multidisciplinary cooperative research project 'Campus PlasmaMed' within the program 'PlasmaCure'. The study was supported by a grant from the German Ministry of Education and Research (BMBF, grant No. 13N9779). The authors thank Jaqueline Mentz for her excellent technical assistance and help in performing the study.

Received: June 27, 2012; Revised: August 6, 2012; Accepted: August 7, 2012; DOI: 10.1002/ppap.201100133

Keywords: chlorhexidine digluconate; biofilm; cold plasma; plasma jet; *Pseudomonas aeruginosa*; *Staphylococcus epidermidis*

[1] E. E. Braxton, G. D. Ehrlich, L. Hall-Stoodley, P. Stoodley, R. Veeh, C. Fux, F. Z. Hu, M. Quigley, J. C. Post, *Neurosurg. Rev.* **2005**, *28*, 249.

[2] C. A. Fux, J. W. Costerton, P. S. Stewart, P. Stoodley, *Trends Microbiol.* **2005**, *13*, 34.

[3] R. D. Wolcott, D. D. Rhoads, M. E. Bennett, B. M. Wolcott, L. Gogokhia, J. W. Costerton, S. E. Dowd, *J. Wound Care* **2010**, *19*, 45.

[4] E. Faglia, G. Clerici, M. Caminiti, A. Quarantiello, M. Gino, A. Morabito, *J. Foot Ankle Surg.* **2006**, *45*, 220.

[5] D. C. Vinh, J. M. Embil, *J. Long Term Eff. Med. Implants* **2005**, *15*, 467.

© 2012 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

Early View Publication; these are NOT the final page numbers, use DOI for citation !!

[6] J. Lademann, H. Richter, A. Alborova, D. Humme, A. Patzelt, A. Kramer, K. D. Weltmann, B. Hartmann, C. Ottomann, J. W. Fluhr, P. Hinz, G. Hubner, O. Lademann, *J. Biomed. Opt.* **2009**, *14*, 054025.
[7] J. Fluhr, S. Sassning, O. Lademann, M. Darvin, S. Schanzer, A. Kramer, H. Richter, W. Sterry, J. Lademann, *Exp. Dermatol.* **2011**, *21*, 130.
[8] O. Lademann, H. Richter, A. Patzelt, A. Alborova, D. Humme, K. D. Weltmann, B. Hartmann, P. Hinz, A. Kramer, S. Koch, *Laser Phys. Lett.* **2010**, *7*, 458.
[9] C. Bender, R. Matthes, E. Kindel, A. Kramer, J. Lademann, K.-D. Weltmann, W. Eisenbeiß, N.-O. Hübner, *Plasma Processes Polym.* **2010**, *7*, 318.
[10] G. Lloyd, G. Friedman, S. Jafri, G. Schultz, A. Fridman, K. Harding, *Plasma Processes Polym.* **2010**, *7*, 194.
[11] N. Hübner, R. Matthes, D. Gruman, S. Holtfreter, B. Bröker, I. Koban, C. Bender, E. Kindel, A. Kramer, "*Antimicrobial efficacy of low-temperature plasma against 65 genetically characterized Staphylococcus aureus isolates including PVL-positive, MRSA and c-MRSA strains", in International Conference on Antimicrobial Research (ICAR2010), Valladolid (Spain), 2010.*
[12] N. O. Hübner, R. Matthes, I. Koban, C. Randler, G. Müller, C. Bender, E. Kindel, T. Kocher, A. Kramer, *Skin Pharmacol. Physiol.* **2010**, *23*, 28.
[13] I. Koban, R. Matthes, N. O. Hubner, A. Welk, P. Meisel, B. Holtfreter, R. Sietmann, E. Kindel, K. D. Weltmann, A. Kramer, T. Kocher, *New J. Phys.* **2010**, *12*, 073039.
[14] S. Kalghatgi, D. Dobrynin, G. Fridman, M. Cooper, G. Nagaraj, L. Peddinghaus, M. Balasubramanian, K. Barbee, A. Brooks, V. Vasilets, A. Gutsol, A. Fridman, G. Friedman, *Plasma Assisted Decontamination[Q7] of Biological and Chemical Agents* **2008**, 173.
[15] K. D. Weltmann, E. Kindel, T. von Woedtke, M. Hahnel, M. Stieber, R. Brandenburg, *Pure Appl. Chem.* **2010**, *82*, 1223.
[16] M. G. Kong, G. Kroesen, G. Morfill, T. Nosenko, T. Shimizu, Jv. Dijk, J. L. Zimmermann, *New J. Phys.* **2009**, *11*, 115012.
[17] R. Matthes, S. Bekeschus, C. Bender, I. Koban, N. O. Hübner, A. Kramer, *GMS Krankenhhyg. Interdiszip.* **2012**, *7*, 1.
[18] R. Matthes, N. Hübner, C. Bender, I. Koban, K. Weltmann, A. Kramer, *GMS Krankenhhyg. Interdiszip.* **2010**, *5*, DOC02.
[19] K. D. Weltmann, E. Kindel, R. Brandenburg, C. Meyer, R. Bussiahn, C. Wilke, T. von Woedtke, *Contrib. Plasma[Q8] Phys.* **2009**, *49*, 631.
[20] A. Hammann, N.-O. Huebner, C. Bender, A. Ekkernkamp, B. Hartmann, P. Hinz, E. Kindel, I. Koban, S. Koch, T. Kohlmann, J. Lademannn, R. Matthes, G. Müller, E. Titze, K. -D. Weltmann, A. Kramer, *Skin Pharmacol. Physiol[Q9].* **2010**, *23*, 328.
[21] K. Gjodsbol, J. J. Christensen, T. Karlsmark, B. Jorgensen, B. M. Klein, K. A. Krogfelt, *Int. Wound J.* **2006**, *3*, 225.
[22] Y. H. An, R. J. Friedman, *J. Hosp. Infect.* **1996**, *33*, 93.
[23] E. Drenkard, *Microbes Infect.* **2003**, *5*, 1213.
[24] I. Uckay, D. Pittet, P. Vaudaux, H. Sax, D. Lew, F. Waldvogel, *Ann. Med.* **2009**, *41*, 109.
[25] S. O'Meara, D. Al-Kurdi, Y. Ologun, L. G. Ovington, *Cochrane Database of Systematic[Q10] Reviews* **2010**.
[26] N. O. Hubner, J. Siebert, A. Kramer, *Skin Pharmacol. Physiol.* **2010**, *23*, 244.
[27] A. Kramer, G. Müller, O. Assadian, *GMS Krankenhaushyg Interdiszip* **2006**, *1*, 11.
[28] S. H. Shippey, T. K. Malan, *Obstet. Gynecol.* **2004**, *103*, 1048.
[29] A. Moshrefi, *J. West Soc. Periodontol. Periodontal. Abstr.* **2002**, *50*, 5.
[30] I. Sadovskaya, E. Vinogradov, S. Flahaut, G. Kogan, S. Jabbouri, *Infect. Immun.* **2005**, *73*, 3007.
[31] P. Tielen, F. Rosenau, S. Wilhelm, K. E. Jaeger, H. C. Flemming, J. Wingender, *Microbiology-Sgm* **2010**, *156*, 2239.
[32] G. Müller, A. Kramer, *J. Antimicrob. Chemother.* **2008**, *61*, 1281.
[33] *D. DIN EN 1040, "DIN EN 1040:2006-03 Chemical disinfectants and antiseptics - Quantitative suspension test for the evaluation of basic bactericidal activity of chemical disinfectants and antiseptics - Test method and requirements (phase 1); German version EN 1949:2005", CEN/TC 216 - Chemical disinfectants and antiseptics, Ed., Beuth-Verlag, Berlin, 20061.*
[34] B. Pitts, M. A. Hamilton, N. Zelver, P. S. Stewart, *J. Microbiol. Methods* **2003**, *54*, 269.
[35] M. Desrosiers, Z. Bendouah, J. Barbeau, *Am. J. Rhinol.* **2007**, *21*, 149.
[36] M. Musken, S. Di Fiore, U. Romling, S. Haussler, *Nat. Protoc.* **2010**, *5*, 1460.
[37] K. E. Campbell, D. Keast, G. Woodbury, P. Houghton, *Wounds: A Compendium Clin. Res. Pract.* **2003**, *15*, 40.
[38] G. A. James, E. Swogger, R. Wolcott, E. Pulcini, P. Secor, J. Sestrich, J. W. Costerton, P. S. Stewart, *Wound Repair Regen.* **2008**, *16*, 37.
[39] C. Bender, N. O. Hübner, K. D. Weltmann, C. Scharf, A. Kramer, "Synergistic effects of tissue tolerable plasma polihexanide to promote healing of chronic wounds - in vivo in vitro results", in *NATO Science for Peace Security Series A: Chemistry Biology*, Z. Machala, K. Hensel, Y. Akishev, Eds., Springer, Netherlands, Dordrecht **2012**.
[40] O. Lademann, A. Kramer, H. Richter, A. Patzelt, M. C. Meinke, J. Roewert-Huber, V. Czaika, K. D. Weltmann, B. Hartmann, S. Koch, *Laser Phys. Lett.* **2011**, *8*, 313.
[41] C. Bender, L. I. Partecke, E. Kindel, F. Doring, J. Lademann, C. D. Heidecke, A. Kramer, N. O. Hubner, *Toxicol. In Vitro* **2011**, *25*, 530.
[42] R. Foest, et al., *Plasma Phys. Controlled Fusion[Q11]* **2005**, *47*, B525.
[43] G. Fridman, A. D. Brooks, M. Balasubramanian, A. Fridman, A. Gutsol, V. N. Vasilets, H. Ayan, G. Friedman, *Plasma Processes Polym.* **2007**, *4*, 370.
[44] S. Reuter, J. Winter, A. Schmidt-Bleker, D. Schroeder, H. Lange, N. Knake, V. Schulz-von der Gathen, K. D. Weltmann, *Plasma Sources Sci. Technol[Q12].* **2012**, 21.
[45] G. Moore, C. Griffith, A. Peters, *J. Food Prot.* **2000**, *63*, 1100.
[46] G. Daeschlein, Tv. Woedtke, E. Kindel, R. Brandenburg, K.-D. Weltmann, M. Jünger, *Plasma Processes Polym.* **2010**, *7*, 224.
[47] S. A. Ermolaeva, A. F. Varfolomeev, M. Y. Chernukha, D. S. Yurov, M. M. Vasiliev, A. A. Kaminskaya, M. M. Moisenovich, J. M. Romanova, A. N. Murashev, I. I. Selezneva, T. Shimizu, E. V. Sysolyatina, I. A. Shaginyan, O. F. Petrov, E. I. Mayevsky, V. E. Fortov, G. E. Morfill, B. S. Naroditsky, A. L. Gintsburg, *J. Med. Microbiol.* **2011**, *60*, 75.

WILEY-VCH

© 2012 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

↖ Early View Publication; these are NOT the final page numbers, use DOI for citation !!

1

Q1: Author: A running head short title was not supplied; please check if this one is suitable and, if not, please supply a short title that can be used instead.

Q2: Author: Please check, the abstract should be about 700 characters, up to 800 is still acceptable.

Q3: Author: As per the style of the journal, more than five keywords are not allowed and two of the keywords must match with the keyword list. Please check.

Q4: Author: Please check the presentation of table footnotes in 'Tables 1 and 2'.

Q5: Author: Please explain the significance of bold font used in both the tables.

Q6: Author: Please cite Table footnote [c)] suitably within 'Table 2'.

Q7: Author: Please check the presentation of Reference [14]. Also, please provide the publisher name and location.

Q8: Author: Please check the author name for author 'Woedtke' in Reference [19].

Q9: Author: Please check the author names in Reference [20].

Q10: Author: Please check the presentation of Reference [25]. Also, please provide the publisher name and location.

Q11: Author: Please provide list of all authors in Reference [42].

Q12: Author: Please provide the volume number in Reference [44].

Author Proof

WILEY-VCH

© 2012 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

Early View Publication; these are NOT the final page numbers, use DOI for citation !!

Manuskript für:

Skin Pharmacology and Physiology

Nr. SPP2590

Matthes R, Hübner NO, Bender C, Koban I, Horn S, Bekeschus S, Kocher T, Weltmann KD, Kramer A and Assadian O (2012)

Modulations of feed-gases for barrier discharge plasma generation influence the survival of *Pseudomonas aeruginosa* embedded in biofilm.

Modulations of feed-gases for barrier discharge plasma generation influence the survival of *Pseudomonas aeruginosa* embedded in biofilm.

Running title: Antimicrobial efficacy of atmospheric plasma on biofilms.

Rutger Matthes[a], Nils-Olaf Hübner[a], Claudia Bender[a], Ina Koban[b], Stefan Horn[c], Sander Bekeschus[c], Klaus-Dieter Weltmann[c], Thomas Kocher[b], Axel Kramer[a], Ojan Assadian[d]

[a] Institute for Hygiene and Environmental Medicine, University Medicine, Walther-Rathenau-Str. 49a, D-17487 Greifswald, Germany
[b] Unit of Periodontology, Dental School, University Medicine, Rotgerberstr. 8, D-17475 Greifswald, Germany
[c] Leibniz Institute for Plasma Science and Technology (INP Greifswald), Felix-Hausdorff-Str.2, D-17489 Greifswald, Germany
[d] Clinical Institute for Hospital Hygiene, Medical University of Vienna, Waehringer Guertel 18-20, A-1090 Vienna, Austria

Corresponding Author and request for reprints:
Rutger Matthes
Institute for Hygiene and Environmental Medicine
University Medicine
Walther-Rathenau-Str. 49a
D-17487 Greifswald, Germany
Tel.: +49- (0)3834 / 51 55 30
Fax: +49- (0)3834 / 51 55 41
E-Mail: rutger.matthes@uni-greifswald.de

Key Words: Biofilm; Wound management; antimicrobial; Pseudomonas aeruginosa; atmospheric pressure plasma; surface barrier discharge plasma (SBD) source; dielectric barrier discharge (DBD)

Abstract

Because of its antimicrobial properties non-thermal plasma could serve as an alternative to chemical antisepsis in wound treatment. Therefore, we investigated the inactivation of biofilm embedded *P. aeruginosa* SG81 by a surface barrier discharged (SBD) plasma for 30, 60, 150, and 300 s. In order to optimize the efficacy of the plasma, different carrier gases (argon, argon admixed with 1% oxygen, and argon with increased humidity up to approx. 80%) were tested and compared against 0.1% chlorhexidine digluconate (CHG) exposure for 600 s. The antimicrobial efficacy was determined by calculating the difference between the numbers of colony forming units (CFU) of treated and untreated biofilms. Alive or dead bacteria were distinguished by fluorescent nucleic acid stain and confocal-laser-scanning microscopy. Both, SBD plasmas and CHG, showed significant antimicrobial effects compared to the untreated control. However, plasma treatment led to a higher antimicrobial reduction (maximum achieved with argon plasma: 4.9 $\log_{10}$ CFU/cm^2 after 300 s) with a faster onset compared to CHG. Variation of the carrier gas showed significantly different effects. In conclusion, SBD plasma is suitable as an alternative to CHG for inactivation of *P. aeruginosa* embedded in biofilm. Further development of SBD plasma sources and research on the role of carrier gases and humidity may allow its clinical application for wound management in future.

Introduction

Bacterial biofilm has been shown playing a role in delayed wound healing [1-4]. *Pseudomonas aeruginosa* is one of the most important biofilm-forming species in chronic wounds [5]. This organism, however, is difficult to eradicate as it is protected against antimicrobial compounds in its biofilm, while at the same time it produces a number of enzymes such as matrix metalloproteinases or toxins such as Exotoxin A, which inhibit wound healing [6, 7].

While mechanical debridement is the most effective measure to remove biofilm, topical antimicrobial compounds are also used to control and eradicate microorganisms habiting biofilms [8, 9]. Combining physical and antimicrobial measures to remove biofilm and to kill off embedded microorganisms would be of added value in wound management [10, 11].

The antimicrobial effect of plasma is mainly based on its reactive oxygen species (ROS) and additionally by UV radiation [12-14]. While the basic principles of biological plasma effects have been under extensive investigation in recent years, data on optimal parameters for independent variables (e.g. type of source, exposure time, gas mixture) differ between distinct application forms. However, determining the optimal adjustment of parameters from the experimental setups is crucial for developing clinical applications for future clinical use.

The present study investigated the antimicrobial efficacy of a non-thermal atmospheric pressure argon plasma generated by a surface barrier discharged (SBD) plasma source with different modifications (exposure time, gas mixtures) on in vitro biofilms of *P. aeruginosa* in comparison to chlorhexidine digluconate (CHG). CHG is used on dentistry to inhibit plaque formation [15], but is also used on wounds for wound antisepsis [16-18].

Because the plasma source used in this study also emits UV light, a risk-assessment of UV irradiation on skin was conducted by measurement of UV emission.

Material and Methods

Characteristics of the plasma source

The surface barrier discharged (SBD) plasma source (neoplas GmbH, Greifswald, Germany) was developed by the Leibniz Institute for Plasma Science and Technology (INP), Greifswald, Germany. The plasma source works with sinus 30 kHz by U_{pp} = 4 kV in a burst mode (250 ms on-time, 750 ms off-time), and covers an active discharge surface of 11 cm². The electrical power was adjusted to 1.3 W, determined using a Lissajous curve (error limits: 10-20%) [19, 20], resulting in a surface power of 118 mW/cm². A metallic layer electrode was earthed for safety and joined with seven black silicone cased wires (thickness: 0.6 mm each) serving as the dielectric barrier electrode. Construction and experimental setup of the SBD plasma source are depicted in figure 1.

The construction of this SBD-electrode is applicable to different sizes and shapes, hence, the surfaces can be treated in a customized way, making it highly suitable for real life applications [21]. Additionally, the SBD-electrode avoids direct discharges to the substrate while always operating at room temperature near the electrodes [22]. These physical properties make this SBD eligible to be used as tissue tolerable plasma (TTP) source.

UV-radiation measurements

For all application modes, the UV irradiance exposure was measured in the range of 180-400 nm in µW/cm^2 at a constant distance of 2 mm using spectrometry (Avantes

AvaSpec-3648, Apeldoorn, Netherlands). The area under the curve of the graph was calculated. The UV radiant exposure was determined in mJ/cm^2 in accordance with ICNIRP Guidelines [23].

Cultivation and evaluation of experimental biofilms

For the preparation and formation of a reproducible biofilm, the strong biofilm forming *Pseudomonas aeruginosa* strain SG81 was used, as described earlier [17, 24, 25]. The biofilms were cultivated on polycarbonate discs (∅ 13 mm, height 3 mm; Arthur Krueger KG, Barsbüttel, Germany) submerged in an artificial wound medium consisting of minimal essential medium and 10% fetal bovine serum (Gobco-Invitrogen, Germany) [26] serving as growth medium. The batch medium had a final concentration of 10^8 colony forming units (CFU)/ml. Sterile discs were positioned in 24-well microplates (Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Germany), covered with 0.8 ml batch medium and incubated aerobically for 72 h in an agitator system (Polymax, Heidolph, Germany) at 150 rounds per minute (rpm). Medium was replaced after 24 h and 48 h with sterile artificial wound medium, and the polycarbonate discs were turned inside the respective well. The incubation temperature was set to 37 °C for the first 48 h, and 23 °C for the following 24 h.

The final discs covered with biofilm were washed with phosphate buffered saline (PBS) solution to remove unattached bacteria and were transferred into sterile microplates for the subsequent experiments. Finally, all discs were placed in microplates filled with 1 ml of physiological saline solution per well and treated by ultrasound (130 W, Branson 2510 Ultrasonic Cleaner, Emerson Technologies GmbH & Co. OHG, Dietzenbach, Germany) for 20 min to disperse the biofilms. Planktonic bacteria were determined by the spread plate method on tryptic soy agar (CASO-Agar, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Germany).

Staining of biofilm and microscopic evaluation

Two fluorescent nucleic acid stains, SYTO® 9 (Syto9) and propidium iodide (PI) (Live/Dead-BacLight, Invitrogen GmbH, Darmstadt, Germany) were used for discrimination of intact (stained with Syto9, green signals) and membrane-damaged (stained with PI, red signals) bacteria [27]. Overlapping of green and red signals showed as yellow signals. Here, PI could penetrate the damaged membranes but could not surpass the S9 fluorescence signals. The treated experimental and untreated control biofilm discs were transferred into 24-well-microplates (Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Switzerland) and covered with 0.5 ml staining solution (6.7 µM of Syto9 and 5 µM of PI) for 30 min at 80 rpm on an agitator system (IKA® KS 130 basic, Staufen, Germany) at dark condition. The staining solution was removed and the discs were washed with 1 ml PBS. Finally, the stained biofilm discs were transferred into a new 24 well-microplate. A confocal laser scanning microscope (CLSM, Zeiss CLSM510 Exciter, Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena, Germany) equipped with a 10x objective (Zeiss EC Plan-Neofluar 10x/0.3) was used for imaging.

Plasma experiments on biofilms

Biofilm covered carrier discs were positioned on a metallic flat grate. The SBD plasma source (neoplas GmbH, Greifswald, Germany) was positioned above the discs and fixed on 3 points (figure 1). In each experiment, the distance between the dielectric wire and the surface of the discs was adjusted to 2 mm with the support of the housing of the plasma source. A gas flow of 5 standard litres per minute was applied through small holes along the black wires in the metallic layer electrode and was controlled by a mass flow controller (MKS Instruments, Munich, Germany).

Room air exchange was allowed along the border between the electrode and petri dish including the flat metallic grate at the bottom.

Plasma or gas control was applied using argon (Ar, 99.995% pure), argon admixed with 1 vol% oxygen ($Ar+O_2$, oxygen 99.5% pure), or argon with 80% relative gas humidity ($Ar+H_2O$), respectively. The water content of the pure argon and oxygen gas was < 3 ppm/mol. In all assays both sides of the discs were treated for 30, 60, 150, or 300 s, respectively. In order to get increased relative humidity of 80 +/- 4% (at 21 °C) for argon, the gas flow was piped through a bottle with distilled water and the resulting humidity was measured using a hygrometer (testo 400, Lenzkirch, Germany).

Antimicrobial treatment of biofilms using CHG as antiseptic reference

For treatment with chlorhexidine digluconate (CHG) instead of plasma, biofilm covered carrier discs were also placed in microplate wells, filled with 0.9 ml of a 0.1% (w/v) CHG solution (Fagron GmbH & Co KG, Barsbüttel, Germany) and incubated for 600 s. Antiseptic activity was neutralized by replacing CHG with 1 ml of inactivation solution for 600 s (40 g/l Tween 80, 30 g/l saponine, 4 g/l lecitine, 10 g/l sodium dodecyl sulphate, 1 g/l sodium thioglycolate [Serva, Heidelberg, Germany]). The efficacy of the neutralizer was validated following the Standard European Norm DIN EN 1040 [28].

Statistical analysis

CFU cunts /cm^2 were transformed to $\log_{10}$ (CFU)/cm^2. For each sample the colony reduction factor (RF) was calculated by subtracting the $\log_{10}$ (CFU)/cm^2 value of the treated sample from the $\log_{10}$ (CFU)/cm^2 of the mean value of the untreated control. For each condition, mean and standard deviations (SD) were calculated based on

the RFs. Statistical differences between RFs of different treatment modalities and times were analysed with the Kruskal-Wallis test, followed by a Mann–Whitney U-test using the statistical analyses software SAS® Enterprise Guide® 4.1 (SAS Institute GmbH, Heidelberg, Germany).

Results

Regardless of the respective tested condition, all plasma treatments resulted in a measurable microbial reduction ranging between 0.97 CFU/cm^2 (Ar+H_2O plasma) and 4.88 $\log_{10}$ CFU/cm^2 (Ar plasma), compared to untreated controls ($p < 0.009$). The RFs increased with longer and decreased with shorter treatment time showing a strong correlation to the plasma exposure time.

The antimicrobial efficacy of CHG (1.4 $\log_{10}$ CFU/cm^2) after 600 seconds was reached by Ar plasma within 60 s and by Ar+O_2 plasma within 30 seconds, respectively. Ar+H_2O plasma was less effective, reaching the antimicrobial reduction efficacy of CHG after 150 s. For longer treatment times, reductions were significantly superior ($p < 0.014$) to CHG treatment (table 1).

Plasma control with pure argon gas flow also resulted into a significant bacterial reduction compared to the untreated control, yet the RFs were smaller and showed no correlating time dependency. The antimicrobial efficacy shown by Ar+H_2O gas control was always low with a RF in the range of approximately 1 $\log_{10}$ CFU/cm^2. The difference to the negative control was not statistically significant ($p = 0.36$). However, plasma was significantly more effective for the carrier gas Ar after 60 – 300 s and for Ar+H_2O after 300 s exposure time compared to the gas treatment alone ($p < 0.004$).

The efficacy of Ar+O_2 plasma after 60 s exposure times was higher compared to the respective gas treatment serving as control. However, the differences of the RFs were not statistically significant.

Increasing the relative humidity of the carrier gas did not lead to a higher antimicrobial efficacy; on the contrary, the RF of Ar+H_2O plasma was significantly lower as compared to Ar plasma after 300 s ($p = 0.0408$).

The maximum UV irradiation of the plasma source was 14.6 µW/cm^2 and was measured during the use of pure Ar plasma. This UV value corresponded to an UV radiant exposure of 0.32 mJ/cm^2 within 300 s treatment time. The other gas variations showed lower UV radiant exposures of 0.07 mJ/cm^2 by Ar+O_2 plasma, and 0.03 mJ/cm^2 by Ar+H_2O plasma within 300 s treatment time, respectively.

The biofilm thickness of 24.5 µm to 30.6 µm remained unchanged for non-detached, stainable biofilms after treatment. Figure 2 shows the fluorescence images of a plasma and CHG (positive control) treated, and untreated negative control biofilms. Image analysis of biofilms after plasma treatment showed a smaller area of fluorescence with irregularly distributed red signals in comparison to the other samples. After CHG treatment the distribution of red signals was notably superficial.

Discussion

Treatment of bacterial biofilms by application of physical plasma is of special interest because this could be an alternative method to application of chemical antimicrobials.

It offers new options for inactivating microorganisms habituating in biofilms on prosthetic material or chronic surface tissue infections, e.g. in chronic wounds.
To ascertain the safety of the SBD generated plasma for possible applications on human skin, we quantified the UV emission. Other than solid inanimate surfaces, human cells in wounds may be damaged by UV irradiation, particularly by UV radiation in the wavelength of 180 to 400 nm [23, 29-31]. At high doses, UV irradiation may cause cell damage and lead to apoptosis but also may induce cancer [32]. The measurements showed that the UV radiation emitted by the SBD plasmas ranged, depending on the gas variation used, between 0.03 mJ/cm^2 (Ar+H_2O plasma) and 0.32 mJ/cm^2 (Ar plasma) for 300 s of application time at a distance of 2 mm (comparable to distance during biofilm treatment). In humans, the maximum accepted UV radiant exposure limit over 300 s is 3 mJ/cm^2 (10 µW/cm^2) in accordance with ICNIRP Guidelines [23]. These results indicate that the UV irradiation of the SBD plasma is negligibly low, which is one important prerequisite to use plasma in human wounds.

The effect of various gas admixtures for an optimised antimicrobial efficacy in biofilms was investigated in this study. Up to now, no accepted standard for testing antimicrobial compounds against microbial biofilms is defined. Therefore, we developed the described assay, which proved reliable and easy to use regarding our research questions. To demonstrate differences in microbial inactivation of biofilms, it was necessary to produce biofilms with high colony counts ranging in the magnitude above 6 $\log_{10}$ CFU/cm^2. The untreated controls showed means of 7.14 ± 0.8 $\log_{10}$ CFU/cm^2 and were suited to calculate the RFs for statistical analyses. These high colony counts were achievable by using a distinct *P. aeruginosa* test strain [33]. Using this strain, pre-tests showed a stronger biofilm structure if the incubation

temperature was decreased to room conditions for the last 24 h of incubation while more intense bacterial growth occurred during the first 48 h at 37 °C. Artificial wound medium was used to simulate a wound like environment during biofilm culture. Polycarbonate discs were used as adhesion surface. This material is suitable for the adherence and biofilm formation of *P. aeruginosa* [34].

Chlorhexidine is used in topical antimicrobial wound dressings and is regarded as the golden standard to eradicate dental plaque and consequently inactivate and prevent biofilms [35]. Therefore, CHG was used in the experiments as positive control. It demonstrated a significant bacterial reduction of 1.4 $\log_{10}$ CFU/cm^2 after 600 s of application ($p < 0.0001$). It was expected that any plasma treatment must at least demonstrate equal or significant higher antimicrobial reduction efficacy than CHG compared to the untreated negative control.

In our experiments, the efficacy of Ar plasma and of Ar+O_2 plasma after 150 s, and of Ar+H_2O plasma after 300 s was higher than the antimicrobial efficacy of CHG. The RFs achieved by the various plasma conditions are in agreement with similar previously published studies [17, 36].

Because of the above, for future studies it may be proposed to define a minimum required RF threshold of 1.5 $\log_{10}$ CFU/cm^2 within a clinically relevant application time to accept an antimicrobial efficacy of a tested plasma treatment.

Argon showed a strong antimicrobial effect, which increased steady by increased plasma exposure time from approx. 1 to 4.9 $\log_{10}$ (CFU/cm^2). Yet, not only Argon but also the argon gas flow showed an antimicrobial effect. This observation may be explained by a simple drying effect of the biofilm by the gas flow itself, since the

effect was significantly reduced when humidity was added in the experiments using Ar+H_2O gas. However, the Ar plasma effect was significantly higher than the pure gas effect alone for 60 to 300 s of exposure time.

The SBD plasma source used for this study allowed admixing oxygen or enrichment with distilled water to the argon gas. By adding oxygen or increasing humidity, an increased concentration of ROS (e.g., O, O_2^-, OH, H_2O_2, $^1O_2$, O_3) was expected [37, 38]. Reactive oxygen species are essentially downstream products of the plasma due to its reaction with room air or with water on the substrate. Additionally, the electrons of argon plasma are able to have enough energy to dissociate O-H bonds of water, so the gas humidity may increase the concentration of OH radicals [39]. Increased concentrations of ROS result in an increased antimicrobial efficacy, which also was reported preciously [39, 40].

Surprisingly, the increased humidity decreased the plasma's antimicrobial efficacy against *P. aeruginosa* in treated biofilms. Other authors reported an increased antimicrobial effect with additional gas humidification [41-43]. Hähnel et al. [41] observed an improved effect by an air plasma with increasing relative air humidity up to 70 % against *Bacillus atrophaeus* spores. The authors discussed that especially hydroxyl radicals have an erosive effect on cell surfaces. Indeed, it is known that a minimum amount of moisture on the microbial target is needed for inactivation with species like •OH or H_2O_2 [42, 44]. This could be an explanation why an increased effect was observed when humidified gas was applied on dry spores. While in the experiments on *Bacillus atrophaeus* spores [41] only the amount of water needed for the plasma decontamination process was used, the biofilm in our experiments already contained the water necessary for antimicrobial effects, leaving no chance for

enhancement due to humidification. Dobrynin et al. [42] observed an enhanced antimicrobial efficacy by feed gas humidity (bubbled through distilled water), only if additional oxygen was admixed. Here, the relative gas humidity could be the same like in our present study. Our plasma source worked in ambient air, which could serve for the necessary oxygen content. Srivastava et al. [43] observed an enhanced effect by increased humidity alone in argon plasma, yet with a lower relative water content then used in our study. According to the authors, an H_2O/Ar ratio of 1.5 % was reported as optimal to acquire high amounts of OH radicals in plasma effluvium. Consequently, the relative humidity of 80 % in argon could have been set too high. All groups used different plasma devices, carrier gases, or application systems but none focussed on the determination of plasma effect against biofilm bacteria or worked in ambient conditions in the way described in the present study, making direct comparison difficult. Finally, the high gas humidity of 80 % in argon could have led to a loss of electron density for plasma generation [39] that may have inhibited important antimicrobial components, explaining why the antimicrobial efficacy of Ar+H_2O plasma was lower than that of Ar plasma. Therefore, a higher energy input for plasma generation or lower argon humidity may have been able to increase the efficacy of Ar+H_2O plasma. Another explanation could be a shift of different generated ROS to H_2O_2 by the fed H_2O vapour [45] since *P. aeruginosa* can neutralise these peroxide by producing catalases [46], showing increased resistant against H_2O_2 in biofilms [47]. Further investigations are necessary to understand this phenomenon, because the plasma chemistry of humidified air plasma is very much different from humidified argon plasma as well as humidified argon plasma working on ambient conditions. The ambient conditions for plasma treatment were chosen to simulate the real conditions for wound treatment on patients.

Correlations between the antimicrobial effects by plasma and biofilm water content should be a topic of future studies.

The results in this study demonstrated that addition of 1 % oxygen to argon accelerated the onset of the antimicrobial effect, but with longer treatment time the efficacy decreased again, particularly in comparison to Ar plasma alone. Possibly, the oxygen admixture at 1 % quenched the excited argon species [48] and inhibits secondary plasma products which are important for potential antimicrobial effects against *P. aeruginosa* and hampered an intensified effect by possible oxygen generated ROS. In order to take advantage of possible ROS by oxygen admixtures for treatment of *P. aeruginosa* in biofilms, further studies on optimised argon/oxygen ration in plasma are required.

The antimicrobial effect after treatment of $Ar+O_2$ gas was higher compared to Ar gas treatment and cannot be explained only by the drying effect of the biofilm. It is known, decreased oxygen concentrations dominate in *P. aeruginosa* biofilms [49, 50] and pure oxygen can diffuse easer through the biofilm matrix than air for example [49]. The influence by the low oxygen condition in biofilm and the added oxygen concentration could explain the effect of the high onset within 30 s and the slow progress for longer exposure time by $Ar+O_2$ plasma and the high antimicrobial effect of $Ar+O_2$ gas flow by an increased oxygen stress of *P. aeruginosa*. The difference between $Ar+O_2$ gas and $Ar+O_2$ plasma is only 1 $\log_{10}$ after 300 s exposure time and was not significant. The low effect of 0.8 $\log_{10}$ CFU/cm^2 at 150 s by $Ar+O_2$ gas is currently not understandable in comparison to the other treatment times, because the procedure was constant for all samples.

On scanning electron images, some other authors have showed cell detritus after plasma treatment [36, 51, 52]. It may well be that for plasma generation an increased oxygen concentration accelerates microbial cell damage, which may result in a plasma shadow effect by accumulated cell detritus. This could explain why the antimicrobial efficacy of $Ar+O_2$ plasma increased very slowly with longer required application times to achieve a 1.5 $\log_{10}$ CFU/cm^2 reduction of *P. aeruginosa* within the treated biofilm.

The results of the fluorescence images showed that plasma treatment resulted in darker visible regions after treatment. This could be a result of reduced adherence of biofilm, or reduced staining was due to loss of DNA caused by plasma effect and additional wash procedure. Furthermore, the distribution of live and dead *P. aeruginosa* was different between plasma and CHG treated biofilms. The z-axis of the images after CHG treatment shows more red signals (dead bacteria) at the surface regions of the biofilm structure, and green signals (live bacteria) in deeper regions, while signals are distributed irregularly after 300 s Ar plasma treatment. This indicates that the antimicrobial efficacy of Ar plasma is homogenously distributed through the biofilm structure while CHG did not reach deeper layers of the biofilm.

While the assay allowed investigation of the plasma effects under standardized conditions, this experimental biofilm does not correspond to complex multi-species biofilms found in-vivo as in chronic infected wounds [53]. Additionally, the experimental model used in this study does not correspond to the complex wound conditions found in chronic wounds. Finally, such well-defined physical conditions during plasma treatment as present in our experimental tests are not found in the

clinical setting, since differences in the distance of the plasma source to the surface, in room temperature, and humidity conditions are to be expected.

Conclusion

The results of this study demonstrate that the high antimicrobial efficacy of the used SBD plasma source against *P. aeruginosa* embedded in biofilm exceeds that of CHG applied for 600 s. SBD plasma may be suitable as an alternative or supplement to chemical antiseptics in the treatment of biofilm-associated wound infections. These effects, however, are depending on chemical and physical factors, such as the plasma gas condition, but also the physical condition of the surrounding air. The admixture of oxygen to argon for plasma generation led to an increased antimicrobial effect, however, only for short treatment times. Concurrently, an increased humidity of approx. 80 % to argon for plasma generation reduced the plasma's antimicrobial effect in the presence of biofilm. Further basic research on SBD plasma sources and on the role of carrier gases and humidity is needed to better understand the complex plasma physic in clinical practice.

Acknowledgements

This study was conducted within the multi-disciplinary cooperative research program "Campus PlasmaMed", in particular within the sub-project "PlasmaCure". This work was supported by a grant from the German Ministry of Education and Research (BMBF, grant No. 13N9779/ 13N11181).

The authors thank Marcel Hähnel (tesa SE, Hamburg, formerly neoplas GmbH, Greifswald, Germany) for his skilful support in operating the plasma equipment, scientific assistance with the plasma source, and plasma chemistry interpretation, Christiane Meyer (INP Greifswald) for her measurements of plasma parameters and helpful assistance, René Bussiahn (INP Greifswald) for his help in UV measuring, Jaqueline Mentz (Institute for Hygiene and Environmental Medicine, University Medicine Greifswald) for her excellent technical assistance, and Joachim Lehmann and colleagues of the medical technology lab (University Medicine Greifswald) for preparing the polycarbonate discs.

Conflict of interest statement

The authors declare no conflicts of interest.

References

1 Nakagami G, Morohoshi T, Ikeda T, Ohta Y, Sagara H, Huang L, Nagase T, Sugama J, Sanada H: Contribution of quorum sensing to the virulence of *Pseudomonas aeruginosa* in pressure ulcer infection in rats. Wound Repair Regen 2011;19:214-222.

2 Davis SC, Ricotti C, Cazzaniga A, Welsh E, Eaglstein WH, Mertz PM: Microscopic and physiologic evidence for biofilm-associated wound colonization in vivo. Wound Repair Regen 2008;16:23-29.

3 Percival SL, Bowler P, Woods EJ: Assessing the effect of an antimicrobial wound dressing on biofilms. Wound Repair Regen 2008;16:52-57.

4 Bjarnsholt T, Kirketerp-Møller K, Jensen PØ, Madsen KG, Phipps R, Krogfelt K, Høiby N, Givskov M: Why chronic wounds will not heal: A novel hypothesis. Wound Repair Regen 2008;16:2-10.

5 Bowler PG, Duerden BI, Armstrong DG: Wound microbiology and associated approaches to wound management. Clin Microbiol Rev 2001;14:244-269.

6 McCarty SM, Cochrane CA, Clegg PD, Percival SL: The role of endogenous and exogenous enzymes in chronic wounds: A focus on the implications of aberrant levels of both host and bacterial proteases in wound healing. Wound Repair Regen 2012;20:125-136.

7 Jimenez PN, Koch G, Thompson JA, Xavier KB, Cool RH, Quax WJ: The multiple signaling systems regulating virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. Microbiol Mol Biol Rev 2012;76:46-65.

8 Eberlein T, Assadian O: Clinical use of polihexanide on acute and chronic wounds for antisepsis and decontamination. Skin Pharmacol Physiol 2010;23:45-51.

9 Hübner NO, Kramer A: Review on the efficacy, safety and clinical applications of polihexanide, a modern wound antiseptic. Skin Pharmacol Physiol 2010;23:17-27.

10 Ammons CB: Anti-biofilm strategies and the need for innovations in wound care. Recent Pat Anti-Infect Drug Discovery 2010;5:10-17.

11 Ermolaeva SA, Varfolomeev AF, Chernukha MY, Yurov DS, Vasiliev MM, Kaminskaya AA, Moisenovich MM, Romanova JM, Murashev AN, Selezneva, II, Shimizu T, Sysolyatina EV, Shaginyan IA, Petrov OF, Mayevsky EI, Fortov VE, Morfill GE, Naroditsky BS, Gintsburg AL: Bactericidal effects of non-thermal argon plasma in vitro, in biofilms and in the animal model of infected wounds. J Med Microbiol 2011;60:75-83.

12 Kong MG, Kroesen G, Morfill G, Nosenko T, Shimizu T, Dijk Jv, Zimmermann JL: Plasma medicine: An introductory review. New J Phys 2009;11:115012.

13 Laroussi M: Low temperature plasma-based sterilization: Overview and state-of-the-art. Plasma Processes Polym 2005;2:391-400.

14 Nosenko T, Shimizu T, Morfill GE: Designing plasmas for chronic wound disinfection. New J Phys 2009;11:115013.

15 Zelic O, Cakic S, Lukovic N: The effect of two different oral antiseptics on dental plaque formation (de novo biofilm) and on gingival inflammation. Srp Arh Celok Lek 2009;137:6-9.

16 Muangman P, Nitimonton S, Aramwit P: Comparative clinical study of Bactigras and Telfa AMD for skin graft donor-site dressing. Int J Mol Sci 2011;12:5031-5038.

17 Hübner NO, Matthes R, Koban I, Rändler C, Müller G, Bender C, Kindel E, Kocher T, Kramer A: Efficacy of chlorhexidine, polihexanide and tissue-tolerable plasma against *Pseudomonas aeruginosa* biofilms grown on polystyrene and silicone materials. Skin Pharmacol Physiol 2010;23:28-34.

18 Afilalo M, Dankoff J, Guttman A, Lloyd J: Duoderm hydroactive dressing versus silver sulphadiazine/bactigras in the emergency treatment of partial skin thickness burns. Burns 1992;18:313-316.

19 Wagner HE, Brandenburg R, Kozlov KV, Sonnenfeld A, Michel P, Behnke JF: The barrier discharge: Basic properties and applications to surface treatment. Vacuum 2003;71:417-436.

20 Kogelschatz U: Dielectric-barrier discharges: Their history, discharge physics, and industrial applications. Plasma Chem Plasma Process 2003;23:1-46.

21 Weltmann K-D, Fricke K, Stieber M, Brandenburg R, Woedtke Tv, Schnabel U: New nonthermal atmospheric-pressure plasma sources for decontamination of human extremities. IEEE Trans Plasma Sci 2012;40:2963 - 2969.

22 Weltmann KD, Kindel E, von Woedtke T, Hähnel M, Stieber M, Brandenburg R: Atmospheric-pressure plasma sources: Prospective tools for plasma medicine. Pure Appl Chem 2010;82:1223-1237.

23 ICNIRP: Guidelines on limits of exposure to ultraviolet radiation of wavelengths between 180 nm and 400 nm (incoherent optical radiation). Health Phys 2004;87:117-186.

24 Grobe S, Wingender J, Trüper HG: Characterization of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from technical water systems. J Appl Microbiol 1995;79:94-102.

25 Matthes R, Hübner N, Bender C, Koban I, Weltmann K, Kramer A: Screening test for quality control of surface barrier discharged plasma sources with the microorganism-agar test (mat). GMS Krankenhhyg Interdiszip 2010;5:DOC02.

26 Müller G, Kramer A: Biocompatibility index of antiseptic agents by parallel assessment of antimicrobial activity and cellular cytotoxicity. J Antimicrob Chemother 2008;61:1281-1287.

27 Molecular Probes: Product information: Live/dead® *bac*light™ bacterial viability kits; in INVITROGEN (ed): MP 07007, 2001, pp 1-8.

28 DIN EN 1040 D: Din en 1040:2006-03 chemical disinfectants and antiseptics - quantitative suspension test for the evaluation of basic bactericidal activity of chemical disinfectants and antiseptics - test method and requirements (phase 1); german version en 1949:2005; in CEN/TC 216 - Chemical disinfectants and antiseptics (ed). Berlin, Beuth-Verlag, 2006, pp 1-42.

29 Hseu YC, Chou CW, Senthil Kumar KJ, Fu KT, Wang HM, Hsu LS, Kuo YH, Wu CR, Chen SC, Yang HL: Ellagic acid protects human keratinocyte (HaCaT)

cells against UVA-induced oxidative stress and apoptosis through the upregulation of the HO-1 and Nrf-2 antioxidant genes. Food Chem Toxicol 2012;50:1245-1255.

30 Nasti TH, Timares L: Inflammasome activation of IL-1 family mediators in response to cutaneous photodamage. Photochem Photobiol 2012;88:1111-1125.

31 Lin F, Xu W, Guan C, Zhou M, Hong W, Fu L, Liu D, Xu A: Niacin protects against UVB radiation-induced apoptosis in cultured human skin keratinocytes. Int J Mol Med 2012;29:593-600.

32 Haywood R, Wardman P, Sanders R, Linge C: Sunscreens inadequately protect against ultraviolet-a-induced free radicals in skin: Implications for skin aging and melanoma? J Invest Dermatol 2003;121:862-868.

33 Rändler C, Matthes R, McBain AJ, Giese B, Fraunholz M, Sietmann R, Kohlmann T, Hübner N-O, Kramer A: A three-phase in-vitro system for studying *Pseudomonas aeruginosa* adhesion and biofilm formation upon hydrogel contact lenses. BMC Microbiol 2010;10:282-212.

34 Becker K: Exopolysaccharide production and attachment strength of bacteria and diatoms on substrates with different surface tensions. Microb Ecol 1996;32:23-33.

35 Koban I, Holtfreter B, Hübner N-O, Matthes R, Sietmann R, Kindel E, Weltmann K-D, Welk A, Kramer A, Kocher T: Antimicrobial efficacy of non-thermal plasma in comparison to chlorhexidine against dental biofilms on titanium discs in vitro - proof of principle experiment. J Clin Periodontol 2011;38:956–965.

36 Koban I, Matthes R, Hübner NO, Welk A, Meisel P, Holtfreter B, Sietmann R, Kindel E, Weltmann KD, Kramer A, Kocher T: Treatment of *Candida albicans* biofilms with low-temperature plasma induced by dielectric barrier discharge and atmospheric pressure plasma jet. New J Phys 2010;12:073039.

37 Lim JP, Uhm HS, Li SZ: Influence of oxygen in atmospheric-pressure argon plasma jet on sterilization of *Bacillus atrophaeous* spores. Phys Plasmas 2007;14:093504.

38 McKay K, Liu DX, Rong MZ, Iza F, Kong MG: Generation and loss of reactive oxygen species in low-temperature atmospheric-pressure RF He + O_2 + H_2O plasmas. J Phys D: Appl Phys 2012;45:172001.

39 Lee HW, Park GY, Seo YS, Im YH, Shim SB, Lee HJ: Modelling of atmospheric pressure plasmas for biomedical applications. J Phys D: Appl Phys 2011;44:053001.

40 Ehlbeck J, Schnabel U, Polak M, Winter J, von Woedtke T, Brandenburg R, von dem Hagen T, Weltmann KD: Low temperature atmospheric pressure plasma sources for microbial decontamination. J Phys D: Appl Phys 2011;44:013002.

41 Hähnel M, Woedtke Tv, Weltmann K-D: Influence of the air humidity on the reduction of *Bacillus* spores in a defined environment at atmospheric pressure using a dielectric barrier surface discharge. Plasma Processes Polym 2010;7:244–249.

42 Dobrynin D, Friedman G, Fridman A, Starikovskiy A: Inactivation of bacteria using dc corona discharge: Role of ions and humidity. New J Phys 2011;13:103033.

43 Srivastava N, Wang CJ: Effects of water addition on oh radical generation and plasma properties in an atmospheric argon microwave plasma jet. J Appl Phys 2011;110:053304.

44 Moisan M, Barbeau J, Moreau S, Pelletier J, Tabrizian M, Yahia LH: Low-temperature sterilization using gas plasmas: A review of the experiments and an analysis of the inactivation mechanisms. Int J Pharm 2001;226:1-21.

45 Gaunt LF, Beggs CB, Georghiou GE: Bactericidal action of the reactive species produced by gas-discharge nonthermal plasma at atmospheric pressure: A review. IEEE Trans Plasma Sci 2006;34:1257-1269.

46 Shin DH, Choi YS, Cho YH: Unusual properties of catalase a (kata) of *Pseudomonas aeruginosa* pa14 are associated with its biofilm peroxide resistance. J Bacteriol 2008;190:2663-2670.

47 Bjarnsholt T, Jensen PØ, Burmølle M, Hentzer M, Haagensen JA, Hougen HP, Calum H, Madsen KG, Moser C, Molin S, Høiby N, Givskov M: *Pseudomonas aeruginosa* tolerance to tobramycin, hydrogen peroxide and polymorphonuclear leukocytes is quorum-sensing dependent. Microbiology 2005;151:373-383.

48 Wagatsuma K, Hirokawa K: Effect of oxygen addition to an argon glow-discharge plasma source in atomic-emission spectrometry. Anal Chim Acta 1995;306:193-200.

49 Xu KD, Stewart PS, Xia F, Huang CT, McFeters GA: Spatial physiological heterogeneity in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm is determined by oxygen availability. Appl Environ Microbiol 1998;64:4035-4039.

50 de Beer D, Stoodley P, Roe F, Lewandowski Z: Effects of biofilm structures on oxygen distribution and mass transport. Biotechnol Bioeng 1994;43:1131-1138.

51 Sharma A, Pruden A, Yu ZQ, Collins GJ: Bacterial inactivation in open air by the afterglow plume emitted from a grounded hollow slot electrode. Environ Sci Technol 2005;39:339-344.

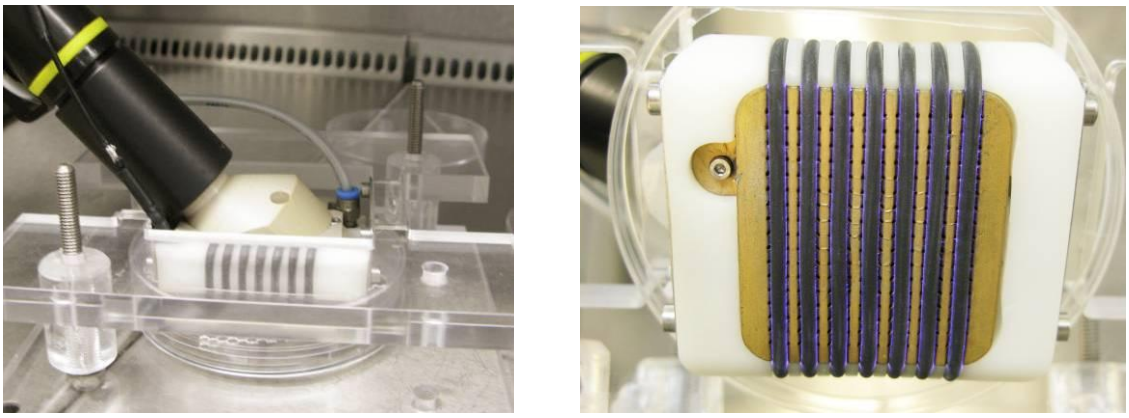
52 Kostov KG, Rocha V, Koga-Ito CY, Matos BM, Algatti MA, Honda RY, Kayama ME, Mota RP: Bacterial sterilization by a dielectric barrier discharge (DBD) in air. Surf Coat Technol 2010;204:2954-2959.

53 James GA, Swogger E, Wolcott R, Pulcini E, Secor P, Sestrich J, Costerton JW, Stewart PS: Biofilms in chronic wounds. Wound Repair Regen 2008;16:37-44.

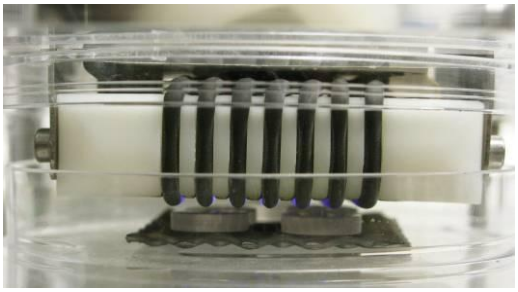
Figures and Tables

Figure 1. Experimental setup of the SBD plasma source.

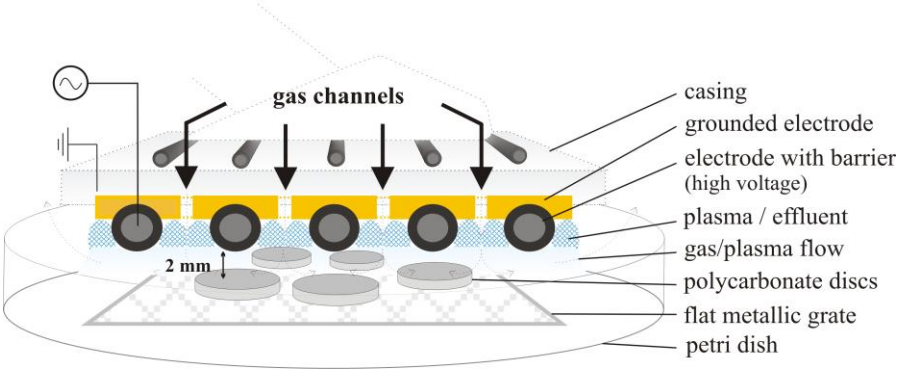
a) b)



c)



d)



(a) SBD plasma source fixed in housing for action. (b) Bottom side of the SBD plasma source in action. (c) Plasma treatment of biofilm-covered discs. (d) Schematic depiction of SBD plasma source (cross section).

Table 1. Summary of results

	Ar				$Ar+O_2$				$Ar+H_2O$				
Treatment mode	N	**RF ± SD**	95% CI limits lower	upper	N	**RF ± SD**	95% CI limits lower	upper	N	**RF ± SD**	95% CI limits lower	upper	p
plasma - 30 s	22	**1.15** ±0.99 [c]	0.72	1.59	14	**1.66** ±1.20 [h]	0.97	2.36	6	**0.97** ±0.37	0.58	1.36	0.2242
plasma - 60 s	21	**1.63** ±0.67 [gh]	1.32	1.94	13	**2.19** ±1.28 [h]	1.42	2.97	12	**1.19** ±0.86	0.64	1.73	0.0438
plasma - 150 s	21	**2.45** ±1.03 [cg]	1.98	2.91	14	**2.62** ±0.95 [cg]	2.07	3.17	6	**1.55** ±0.93	0.58	2.52	0.0976
plasma - 300 s	14	**4.88** ±2.21 [cgh]	3.60	6.15	12	**2.97** ±1.64 [c]	1.93	4.01	6	**2.65** ±1.21 [cg]	1.38	3.92	0.0666
p		0.0001				0.0355				0.0313			0.0001
gas - 30 s	6	**0.66** ±0.50 [c]	0.13	1.18	7	**1.94** ±1.19	0.84	3.05	6	**0.85** ±0.65	0.17	1.53	0.0784
gas - 60 s	6	**0.62** ±0.26 [c]	0.35	0.88	7	**1.41** ±0.53	0.97	1.85	6	**0.56** ±0.56	-0.03	1.14	0.0135
gas - 150 s	14	**1.11** ±0.83	0.63	1.59	12	**0.79** ±0.43	0.52	1.07	6	**1.28** ±1.10	0.12	2.43	0.6751
gas - 300 s	11	**1.52** ±0.80	0.98	2.05	8	**1.97** ±1.31	0.87	3.06	6	**0.47** ±0.30	0.16	0.79	0.0052
p		0.0153				0.018				0.3589			0.4598
CHG 0.1%	22	**1.41** ±0.73	1.08	1.73									
control	36	**0.00** ±0.340	-0.19	0.06									
p		0.0001				0.0001				0.0001			0.0001

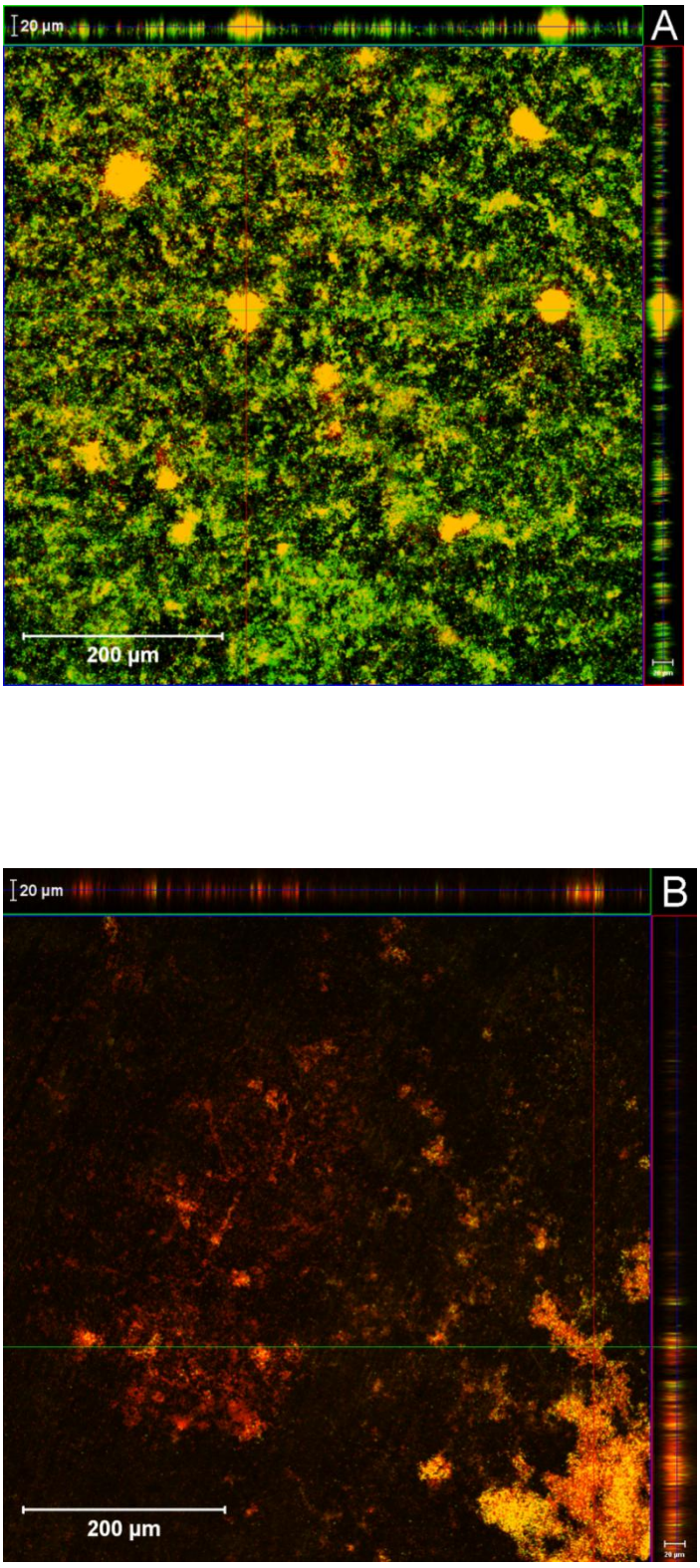
[c] significantly different from CHG

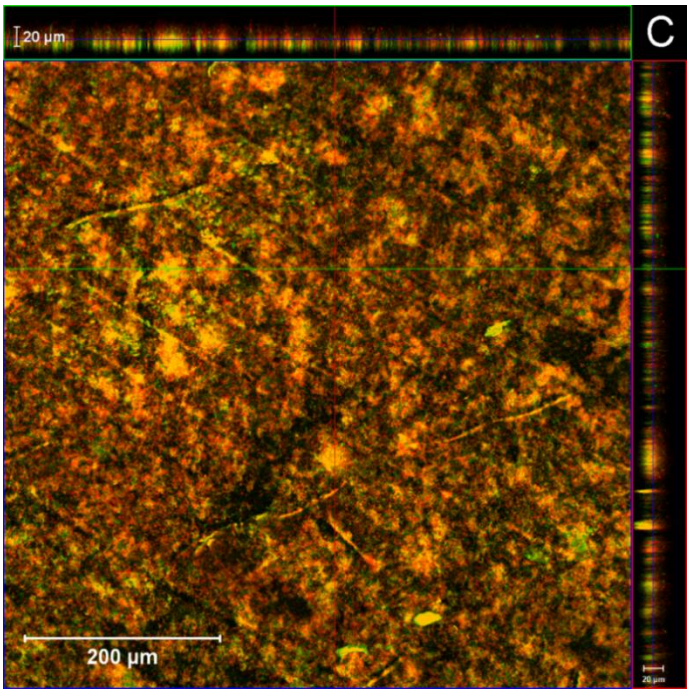
[g] significantly different from the respective gas control

[h] significantly different from the respective $Ar+H_2O$ plasma treatment time

Number of samples (N), colony reduction factor (RF) expressed as $\log_{10}$ CFU/cm^2 ± standard deviation (SD), lower and upper 95% confidence limits (CI) after Ar plasma, Ar+O_2 plasma and Ar+H_2O plasma treatment for 30 to 300 s treatment time and for 300 s treatment time of respective gas controls, 0.1% CHG after 600 s exposure time and untreated control of *Pseudomonas aeruginosa* SG81 biofilms [p-values of omnibus tests (Kruskal-Wallis) and two-sample tests (Whitney U); statistical significance: α=0.05].

Figure 2. Orthogonal section visualisation of biofilms





x-, y-, z- axis (red, green, blue lines). Live/dead staining of bacterial nucleic acid in biofilms (CLSM510 Exciter, objective "Plan-Neofluar" 10x/0.3, Zeiss, Jena). Living cells stain green (Syto9®) and dead cells stain red (propidium iodide); yellow is the overlap of green and red areas, showing the effect of argon plasma and chlorhexidine-digluconate on biofilms of *Pseudomonas aeruginosa* SG81 grown on polycarbonate discs. (A) Untreated biofilm. (B) After 300 s Ar plasma. (C) After 600 s of 0.1% CHG.

Manuskript:

PLOS ONE

Nr. PONE-S-12-48386

Matthes R, Bender C, Schlüter R, Koban I, Bussiahn R, Reuter S, Weltmann KD, Kramer A (2012)

Antimicrobial efficacy of air plasma in comparison of two surface barrier discharges against in vitro biofilms.

*Manuscript
Click here to download Manuscript: Matthes_et_al_SBD_air.docx

Antimicrobial efficacy of two surface barrier discharges with air plasma against *in vitro* biofilms

Rutger Matthes[1], Claudia Bender[1], Rabea Schlüter[2], Ina Koban[3], René Bussiahn[4], Stephan Reuter[4,5], Jürgen Lademann[6], Klaus-Dieter Weltmann[4], Axel Kramer[1]

[1] Institute for Hygiene and Environmental Medicine, University Medicine Greifswald, Walther-Rathenau-Str. 49a, 17487 Greifswald, Germany

[2] Institute of Microbiology, University of Greifswald, Friedrich-Ludwig-Jahn-Str. 15, 17487 Greifswald, Germany

[3] Unit of Periodontology, Dental School, University Medicine Greifswald, Rotgerberstr. 8, 17475 Greifswald, Germany

[4] Leibniz Institute for Plasma Science and Technology (INP), Felix-Hausdorff-Str.2, 17489 Greifswald, Germany

[5] Center for innovation competence (ZIK) plasmatis, Felix-Hausdorff-Str. 2, 17489 Greifswald, Germany

[6] Department of Dermatology, Venerology and Allergology, Charité – Universitätsmedizin Berlin, Charitéplatz 1, 10117 Berlin, Germany

Corresponding author:
Dipl. hum. biol. Rutger Matthes, Institute for Hygiene and Environmental Medicine, University Medicine Greifswald, Walther-Rathenau-Straße 49a, 17487 Greifswald, rutger.matthes@uni-greifswald.de

Abstract

The treatment of infected wounds is one possible therapeutic aspect of plasma medicine. Chronic wounds are often associated with microbial biofilms which limit the efficacy of antiseptics. The present study investigates two different surface barrier discharges with air plasma to compare their efficacy against microbial biofilms with chlorhexidine digluconate solution (CHX) as representative of an important antibiofilm antiseptic. *Pseudomonas aeruginosa* SG81 and *Staphylococcus epidermidis* RP62A were cultivated on polycarbonate discs. The biofilms were treated for 30, 60, 150, 300 or 600 s with plasma or for 600 s with 0.1 % CHX, respectively. After treatment, biofilms were dispensed by ultrasound and the antimicrobial effects were determined as difference in the number of the colony forming units by microbial culture. A high antimicrobial efficacy on biofilms of both plasma sources in comparison to CHX

treatment was shown. The efficacy differs between the used strains and plasma sources. For illustration, the biofilms were examined under a scanning electron microscope before and after treatment.
Additionally, cytotoxicity was determined by the MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay with L929 mouse fibroblast cell line. The cell toxicity of the used plasma limits its applicability on human tissue to maximally 150 s.
The emitted UV irradiance was measured to estimate whether UV could limit the application on human tissue at the given parameters. It was found that the UV emission is negligibly low.
In conclusion, the results support the assumption that air plasma could be an option for therapy of chronic wounds.

Keywords:
atmospheric pressure plasma, dielectric barrier discharge (DBD), surface barrier discharge (SBD), *Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus epidermidis*, antisepsis, biofilm, chlorhexidine digluconate

1 Introduction

Physical plasmas under atmospheric conditions, operated near room temperature, can be used to inactivate microorganisms successfully and are discussed as possible treatment method in health care [1,2]. Their development has generated a new field of research, the so-called plasma medicine [3]. Chronic wounds, device related infections as well as inflammations of implants are often associated with microbial colonisations [4,5]. The formation of biofilms protects the microorganism against antiseptic treatment and host defences. Additionally, the biofilms prolong the inflammation processes in chronic wounds. The efficacy of antiseptics is limited by tissue toxicity [6,7,8]. Additionally, chronically infected wounds increase therapy costs, they are painful and impair the patients quality of life [9]. Moreover, sometimes the wound does not heal despite correct treatment [10]. Therefore alternative

treatment methods are required. The treatment of chronically infected wounds by tissue tolerable plasma (TTP) is an interesting field of investigation [11]. Investigations carried out in this respect with a TTP plasma jet [12] – the so-called kinpen09 [13] – resulted in antibiofilm effects [14,15], inactivation of drug resistant bacteria [16] as well as tissue activation [17] and improvement of tissue regeneration, which has meanwhile been confirmed on real wounds [18].

Actually, the efficacy of many different plasma sources for medical use was investigated on bacteria spread on nutrient agar plates. Those practices falsify *in vivo* conditions, because bacteria mostly live in biofilms, also in chronic wounds [19]. Investigations of antimicrobial effects on biofilms with different plasma sources are rare but of high interest for potential wound treatment. The plasma chemistry and the interaction with living systems are very complex and currently under investigation by many research groups [20,21]. Reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) are discussed as main effectors for antimicrobial mechanisms of plasma [22], UV radiation and pH variations seem to be supportive [23]. To enhance the understanding of interactions between plasma and microorganisms and the development of suitable plasma devices, the antimicrobial efficacy of different plasma sources on biofilms is to be investigated and compared. Surface dielectric barrier discharge (SBD) plasmas could be suitable for wound treatment because the generated plasma spreads over a large area, does not need the substrate as second electrode [3] and the physical parameters can be modified to generate a plasma with tissue tolerable properties.

In this study, the antimicrobial efficacy of two different SBD plasma sources was investigated for different exposure times on *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus epidermidis* as biofilm forming organisms. A high antimicrobial efficacy on biofilms was expected due to the high amount of released ROS [24,25]. *Pseudomonas aeruginosa* is ubiquitous in wet habitats and frequently identified in chronic wounds. *Staphylococcus epidermidis* is a common skin flora organism and often isolated from implants or catheter associated infections and chronic wounds [26,27].

The results of both plasma sources were compared to the antimicrobial efficiency of chlorhexidine digluconate (CHX). CHX as an important antiseptic is regarded as gold standard for dental biofilm treatment [28] and also used in wound dressings [29]. Additionally, UV emission was measured and cytotoxicity on a fibroblasts cell line

was examined to evaluate the potential applicability of the generated plasmas of both SBD plasma sources on living tissue.

2 Material and Methods

Plasma sources

Two different types of surface barrier discharges were used (neoplas GmbH, Greifswald, Germany): a structured electrode planar SBD (SBD-A) and a wire electrode SBD (SBD-B). They have been developed and described by Leibniz Institute for Plasma Science and Technology (INP, Greifswald, Germany) [3]. The specifications and physical parameters of both plasma sources are shown in table 1. The input power of both electrodes was measured via the Lissajous method. A Lissajou figure is the *x-y* plot of the charge dissipated into the plasma and the applied voltage. If the plasma is switched on, this plot will yield a parallelogram, whose area resembles the energy dissipated into the plasma per duty cycle of the applied voltage [30]. SBD-A is made of a 1.5 mm thick printed circuit board (epoxy glass fiber bulk material), which acts as dielectric barrier, having etched copper electrode structures on its surface (Figure 1). SBD-B has a grounded metallic layer electrode and a high voltage electrode consisting of seven wires of 0.6 mm thickness. Here, silicone insulations around each wire act as dielectric barrier (Figure 2). Both SBD sources are operated with ambient air.

Additionally, SBD-B had applied a flow of compressed air of 0.5 standard litres per minute (slm) through perforations in the grounded electrodes along the border of the insulated powered wire electrodes. The gas flow was controlled by a mass flow controller (MKS Instruments, Germany). The gas temperature of both discharges is close to room temperature at the surface of the substrate [3].

Cultivation and evaluation of biofilms

The Gram-negative strain *Pseudomonas aeruginosa* SG81 (*P. aeruginosa*) and the Gram-positive *Staphylococcus epidermidis* RP62A (*S. epidermidis*) were used. Bacterial cultivation and preparation were performed as described elsewhere [14,31]. For biofilm cultivation an artificial wound medium [6] was used at a final concentration of 10^7 colony forming units (CFU)/ml. The biofilms were grown on sterile

polycarbonate discs (∅ 13 mm, height 3 mm, Arthur Krueger KG, Barsbüttel, Germany), positioned into wells of microplates (Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Germany) and were covered with 800 µl of batch medium. The medium was replaced after 4 h and 24 h. After 24 h discs were turned around to assure similar conditions for both sides of the discs. The biofilms were grown for 48 h at 37 °C aerobically and washed once with phosphate buffered saline solution (PBS) to remove unattached bacteria before antiseptic treatments were performed. After treatment, each disc was transferred into sterile wells of microplates and filled with 1 ml PBS. The biofilms were dispensed for 20 min by ultrasound (130 W, Branson 2510 Ultrasonic Cleaner, EMERSON Technologies GmbH & Co. OHG, Dietzenbach, Germany). The antimicrobial effect was determined as difference in the number of the colony forming units (CFU) by microbial culture, as described earlier [14].

Plasma treatment

Plasma sources and experimental setup are shown in figures 1 and 2. The prepared biofilm-covered discs were transferred onto sterile plastic flat grates. The plasma sources were positioned 2 mm above the discs. The plasma exposure times were 30, 60, 120, 300 or 600 s, each, on the upper and bottom side of the discs (for this, the discs were turned).

Treatment with chlorhexidine digluconate (CHX)

The prepared biofilm-covered discs were positioned in sterile microplate wells filled with 0.8 ml of 0.1 % CHX solution (20 % in H_2O, Fagron GmbH & Co KG, Barsbüttel, Germany) and incubated for 600 s at room temperature. Antiseptic activity was stopped by replacing CHX with 1 ml of inactivation solution (40 g/l Tween 80, 30 g/l saponine, 4 g/l lecitin, 10 g/l sodium dodecyl sulphate, 1 g/l sodium thioglycolate [Serva, Heidelberg, Germany]) and left for 600 s. The efficacy of the inactivation solution was verified according to DIN 1040 [32].

For the cytotoxicity test the 0.1 % CHX solution was prepared in the artificial wound medium.

Statistical analysis

Counted CFU were transformed to $\log_{10}$ (CFU/cm^2). The colony reduction factor (CRF) is defined by the formula:

CRF = $\log_{10}$ (mean CFU of untreated samples) – $\log_{10}$ (CFU of treated samples).

Standard deviations (SD), confidence intervals (CI) and p values were calculated based on $\log_{10}$ (CFU/cm^2) values. Statistical differences between the different treatment times, applied plasma sources and test organisms were analyzed with the Kruskal-Wallis test, followed by a Mann–Whitney *U*-test using statistical analyses system SAS® Enterprise Guide® 4.1 (SAS Institute GmbH, Heidelberg, Germany), where applicable. For the analyses of the cytotoxicity additionally the Bonferroni correction was used.

Scanning electron microscopic images

For the scanning electron microscopy, the biofilms of *S. epidermidis* and *P. aeruginosa* were prepared in different ways. Discs with *S. epidermidis* biofilms were fixed in 2.5 % glutaraldehyde (Sigma-Aldrich, Munich, Germany), solved in 5 mM HEPES (pH 7.4), for 1 h at room temperature and subsequently at 4 °C before treatment with amino acid-sucrose-solution (2 % arginine, 2 % glycine, 2 % glutamate, 2 % sucrose) followed by guanidine-tannin-solution (2 % guanidine, 2 % tannin; Sigma-Aldrich, Munich, Germany) for the first 5 min in a microwave and then extended to 1.5 h at room temperature for each solution, 1 % osmium tetroxide for 2 h, and 2 % uranyl acetate (Plano GmbH, Wetzlar, Germany) for 1.5 h with washing steps in between. After that, samples were dehydrated in a graded series of aqueous ethanol solutions (10 - 100%) and then critical point-dried via amylacetate and CO_2.

Discs with *P. aeruginosa* biofilms were prepared as follows. After a fixation step (1 h in 1 % glutaraldehyde, 4 % paraformaldehyde (Science Services GmbH, Munich, Germany), 100 mM cacodylate buffer [pH 7.4], 1 mM $CaCl_2$, 1 mM $MgCl_2$, and 50 mM NaN_3 at room temperature, then 4 °C over night), the samples were treated with 2 % tannic acid for 1 h, 1 % osmium tetroxide for 2 h and after a washing step with 1 % osmium tetroxide over night, and with 2 % uranyl acetate for 2 h with washing steps in between. The samples were dehydrated in a graded series of aqueous ethanol solution (10 - 100%) and then critical point-dried via amylacetate and CO_2.

Finally, samples of both microorganisms were mounted on aluminium stubs, sputtered with gold/palladium and examined in a scanning electron microscope EVO LS10 SEM (Zeiss, Oberkochen, Germany).

UV radiation measurement

The UV irradiance was measured in a range of 200-400 nm in µW/cm^2 by optical emission spectroscopy with a fiber optics coupled spectrometer (Avantes AvaSpec-3648, Apeldoorn, Netherlands). The UV exposition in mJ/cm^2 was determined in accordance with ICNIRP Guidelines [33]. The representation of the graph of UV irradiation and the area under the curve was calculated by using Origin 7.0 (OriginLab Corporation, Northampton, USA).

Cytotoxicity determination of plasma

Mouse fibroblasts of the cell line L929 (NCTC clone 929, ATCC CCL-1, USA) were cultivated at 37 °C and 5 % CO_2 on round cover glasses (∅ 15 mm, Menzel GmbH, Braunschweig, Germany) in wells of microplates by using 1.5 ml artificial wound medium per well. The colorimetric MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; Sigma-Aldrich, Munich, Germany) assay in accordance with DIN EN ISO 10993-5 [34] was used to determine the cytotoxic effects of CHX and the generated plasma (parameters as used for biofilm treatment, see above) respectively. The MTT assay was based on the selective ability of living cells to reduce the salt MTT to formazan by dehydrogenases [35].

For plasma treatment, discs with cells were positioned on plastic flat grates in a petri dish at a distance of 2 mm to the electrodes of the plasma sources. The edges of the discs were surrounded with medium to have wet conditions to avoid drying. For CHX treatment, discs were transferred into a separate 24-well-microplate and the cells were covered with 300 µl of 0.1 % CHX solution for 30, 60, 150, 300 and 600 s, respectively. Then, the discs were washed two times with fresh cell culture media.

The acute cytotoxicity test was carried out after 48 h of cell cultivation (4 samples with plasma and 3 samples with CHX, respectively). In order to determine the chronic cytotoxicity the cells were treated with plasma or CHX after 24 h of cultivation (3 samples, respectively). Afterwards, they were incubated again for 24 h at 37 °C and 5 % CO_2 in fresh medium, before the MTT-assay started. After plasma treatment, 5 µg/ml gentamicin and 0.25 µg/ml amphotericin B were added to the medium to

inactivate possible bacterial contamination during treatment. For the acute and chronic cytotoxicity test 3 samples were used as untreated control, on open air beside the plasma treatment or incubated with fresh media only for the CHX treatment, respectively.

For the MTT assay the discs were transferred into a new microplate. The wells were filled with 0.5 ml MTT media (500 µg MTT/ml culture media) and incubated at 37 °C with 5 % CO_2 for 3 h. Next, MTT media was replaced by 0.04M HCl in 2-propanol (97%, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) for 1 h at room temperature on an agitator at 300 rpm (Polymax, Heidolph, Germany) to elute the formazan crystals. 200 µl of the eluate of each well were transferred into wells of a 96-well microplate and measured by spectrometry at 540 nm (PowerWave HT, BioTek Instruments GmbH, Bad Friedrichshall, Germany). Besides the untreated control, a positive control with Triton-x100 (10% in H_2O, Sigma-Aldrich, Munich, Germany) was used to verify the test.

3 Results

Antimicrobial effects were shown for all treatment variations (Tables 2 and 3) and were statistically significant compared to the control (Tables 4 and 5). The efficacy depended on treatment time and differed between SBD-A and SBD-B. Generally, SBD-A showed a higher CRF than SBD-B and the CRF increased with increasing treatment time. The difference between both plasma sources is statistically significant for every treatment applied to *P. aeruginosa*, irrespective of the duration, and within a treatment time of 150 and 600 s for *S. epidermidis*. The range of CRF of SBD-A electrode was 1.4 $\log_{10}$ (CFU/cm^2) up to 7.1 $\log_{10}$ (CFU/cm^2), and of SBD-B electrode 1.1 $\log_{10}$ (CFU/cm^2) up to 3.8 $\log_{10}$ (CFU/cm^2) for *P. aeruginosa*, and 0.7 $\log_{10}$ (CFU/cm^2) to 3.4 $\log_{10}$ (CFU/cm^2) as well as 0.6 $\log_{10}$ (CFU/cm^2) to 2.7 $\log_{10}$ (CFU/cm^2) for *S. epidermidis*.

The scanning electron micrographs in figure 3 show untreated (Figure 3 A and B) as well as plasma treated biofilms of *P. aeruginosa* (Figure 3 C and D) and *S. epidermidis* (Figure 3 E and F). Untreated biofilms of *P. aeruginosa* show stable rod-shaped and *S. epidermidis* spherical cell morphology (Figure 3 A and B). After plasma treatment the micrographs showed that the biofilms were covered by a flat layer (Figure 3 E) or by conglomerated cells (Figures 3 C, D and F). Figure 4 shows

destructed but non-conglomerated cells in different morphology for *P. aeruginosa* and *S. epidermidis*. Cells of *P. aeruginosa* show mushy (Figure 4 A) and *S. epidermidis* show split shape (Figure 4 B).

The maximum UV irradiation measured between 200-400 nm was 2.5 µW/cm^2 by SBD-B during 300 s of exposure time. Here, the irradiance in µW/cm^2 is shown for the measured emission spectra, specifically the optical emission peaks between 200 and 400 nm (Figure 5). The UV radiation of SBD-A is below the detection limit.

The acute toxicity of both plasma sources determined by the MTT-assay is similar (Table 6). Compared to the untreated control, the viability exceeds in this case 50 % after plasma treatment times from 30 s to 150 s, whereas it decreases below 50 % after 300 s and 600 s treatment time. The cell viability after the chronic toxicity test after plasma treatment was above 50 % of SBD-A for 30 s to 60 s and of SBD-B for 30 s to 150 s. Additionally, the gas flow of SBD-B showed no devitalising effects in acute toxicity. However, the viability of L929 cells in the chronic toxicity test was reduced but not falling below than 50 % of the control viability. Compared to the control values, the viability after the acute and chronic cytotoxicity test of 0.1 % CHX was less than 50 % at treatment times between 30 to 600 s (Table 7). The differences between plasma and CHX treated cells to the untreated control as well as the differences between the plasma treated cells to the CHX treated cells were statistically significant for SBD-A until 150 s of treatment time and at any treatment time for SBD-B. Exceptions were 150 s plasma treatment by SBD-A and the 30 s, 300 s and 600 s plasma treatment by SBD-B to 60 s CHX treatment in the chronic cytotoxicity test assay.

4 Discussion

Currently, no standard model for testing of antiseptics against microorganisms in biofilms on various substrates is defined in literature. The used biofilm model with incubation times of 48 h at 37 °C and early replacement of medium showed optimal results for stable and standardized biofilms in previous experiments. The used test microorganisms *Pseudomonas aeruginosa* SG81 and *Staphylococcus epidermidis* RP62A are often used for biofilm analyses and tests [36,37,38,39,40]. They are

relevant biofilm forming pathogens in chronic wounds or device related infections [27,41]. Furthermore, both organisms have been partly isolated from clinical cases as drug-resistant strains [42,43]. The number of infections with drug-resistant microorganisms is increasing worldwide [44] which underlines the necessity to develop new eradication strategies.

An artificial wound medium was used as growth medium to investigate biofilms under more realistic wound-like conditions. For the experiments, polycarbonate discs as substrate were used because polycarbonate is widely used in medicine [45] and is also suited to culture biofilms [46]. The biofilms of the untreated controls had to result in more than 6 $\log_{10}$ (CFU/cm^2) after dispersion by ultrasound to ensure a sufficient biofilm growth. The untreated controls in the study showed mean values at 7.89 ± 0.38 $\log_{10}$ (CFU/cm^2) for *P. aeruginosa* and 6.85 ± 0.41 $\log_{10}$ (CFU/cm^2) for *S. epidermidis* and were used to calculate the CRFs after antiseptic treatment. Previous experiments showed that the CRF after antiseptic treatment with 0.1 % CHX after 600 s treatment time was in range at 1.3 to 1.8 $\log_{10}$ (CFU/cm^2) for *P. aeruginosa* and 1.0 to 1.5 $\log_{10}$ (CFU/cm^2) for *S. epidermidis* (data not shown). Requirements for antiseptic efficacy against microbial biofilms are not defined yet. Notwithstanding to this indefiniteness, a CRF of 1.5 $\log_{10}$ (CFU/cm^2) seems to be suited as minimum CRF threshold of the efficacy of antiseptics to *in vitro* biofilms grown under the used conditions. The antimicrobial efficacy on biofilms of CHX could be used as threshold for different antiseptics, because CHX has been the gold standard of dental biofilm treatment for decades [47] and has a high potential against planktonic bacteria. Koburger *et al*. [44] showed that the efficacy of 0.1 % CHX solution applied for less than 600 s to eliminate planktonic bacteria resulted in a high reduction factor at > 4.8 $\log_{10}$ (CFU/ml) for a *Pseudomonas aeruginosa* and a *Staphylococcus aureus* strain, suggesting also an increased antimicrobial resistance to biofilms. In comparison, our study shows a biofilm RF at almost 1.5 $\log_{10}$ (CFU/cm^2). Biofilm covered discs used for plasma treatment were transferred onto a plastic flat grate in order to keep the contact area minimal, since both sides of the discs were exposed to the plasma for the respective treatment time in order to treat the whole colonised area. A distance of 2 mm between the discs and electrode had been determined as optimal for treatment by the microbial agar test method [31] by pre-tests.

The two investigated SBD plasma sources were selected because large area discharges could be suitable to treat homogenously superficial infected wounds on skin. Additionally, the shape of SBD-B electrode can be customized to different surface structures and application forms for possible plasma treatment on skin or wounds [48]. Furthermore, the temperature of the electrodes during plasma generation was equal to the adjacent room temperature for SBD-A and close to body temperature for SBD-B (fluoroptic temperature measurement), and the maximally generated UV radiation at 2.5 µW/cm^2 corresponded to an UV-exposition of less than 0.05 mJ/cm^2 which is extremely low and non-hazardous according to the ICNIRP Guidelines on limits of exposure to ultraviolet radiation [33]. The graphical peaks were NO at 297 nm and excited N_2 at 314, 316.7, 338, 354.5, 358.5, 376.5 and 381 nm. The irregular peaks between 200 and 225 nm are due to increased noise caused by the detection limit of the spectrometer used.

Both plasma sources work with air. Advantages of air as working gas are that oxygen and nitrogen for ROS and RNS generation are continuously available, no separate gas tanks or gas connections are necessary, thus it is easier applicable and cheaper than commonly used inert gases. The gas flow of SBD-B was applied to enhance the homogeneous distribution of the reactive plasma components.

Both SBDs showed different inactivation efficacies (Table 1). SBD-A is more effective than SBD-B for all treatment times on *P. aeruginosa* ($p < 0.027$) and after 600 s on *S. epidermidis* biofilms ($p = 0.046$). The difference was obvious, in particular for *P. aeruginosa* where the maximum CRF of SBD-A was 7.1 $\log_{10}$ (CFU/cm^2) but only 3.8 $\log_{10}$ (CFU/cm^2) by SBD-B. However, for *S. epidermidis* the maximum CRF of SBD-A was 3.4 $\log_{10}$ (CFU/cm^2) and 2.7 $\log_{10}$ (CFU/cm^2) by SBD-B.

An explanation could be the formation of differently dense cell detritus layers on top of the biofilms which inhibits deeper plasma effects on biofilm. Scanning electron micrographs of *P. aeruginosa* biofilms after 300 s of exposure to plasma (Figure 3 C, D) showed that the plasma treatment seems to produce different dense detritus layers. Maybe, for SBD-A, the reactive plasma-gas compound could work in deeper biofilm regions of *P. aeruginosa* than SBD-B despite of gentle gas flow, because the reactive products which are responsible for the antimicrobial effect in deeper layers could possibly generated at different concentrations. The micrographs additionally showed that the detritus layer on *S. epidermidis* biofilm after plasma treatment with both plasma sources was very dense (Figure 3 E, F). The scanning electron

micrographs revealed non-destructed bacteria visible between the clods of the disrupted biofilms. Those bacteria are probably not inactivated by plasma. It can be deduced that the detritus layer on the biofilm surface restricts the plasma efficiency. This could be an explanation for the increased standard deviation after treatment of *P. aeruginosa* biofilms on the one hand and the limited antimicrobial effect against *S. epidermidis* on the other hand.

The detritus layer seems to be the result of coagulated biofilm matrix as well as cytoplasm after bacterial cell wall disruption by reactions with the generated plasma products. Differences in disrupted cell morphology were visible between the Gram-negative *P. aeruginosa* and the Gram-positive *S. epidermidis*, whereas *S. epidermidis* as a Gram-positive strain with a cell wall containing a thick peptidoglycan layer is opened and *P. aeruginosa* as a Gram-negative strain with an outer cell membrane and only a thin peptidoglycan layer loses the three-dimensionality to a flat irregular morphology (Figure 4) after longer treatment time. That corresponds to observations of other authors [49,50]. Similar cell wall disruption of *S. epidermidis* was shown for *Candida albicans*, a unicellular fungi with a glycan rich cell wall, in a former study [51]. That supports the supposition of a cell wall influenced dependence of the antimicrobial mechanism of plasma [50]. For comparison, figure 3 shows untreated biofilms of *P. aeruginosa* and *S. epidermidis*. The “clods” of disrupted biofilms visible in scanning electron micrographs of figure 3 C-F were probably caused by drying due to the plasma treatment or the drying steps by SEM procedure.

Also, a different structure of biofilm matrix between *S. epidermidis* and *P. aeruginosa* could explain the different results of SBD-B treatment on both test organisms but not the different results between both plasma sources against *P. aeruginosa* biofilms. The higher power per area of SBD-B at 0.18 mW/cm^2 compared to SBD-A electrode at 0.03 mW/cm^2 cannot be decisive for antimicrobial results. Here, effluent distribution over the substrate or different plasma-gas compounds by different plasma generation seems to influence the biological effects perceptibly. So, it is important to investigate and compare the plasma-gas compound of both plasma sources which were used with plasma and gas phase diagnostics [21].

Generally, in biofilms *P. aeruginosa* SG81 was more sensitive than *S. epidermidis* RP62A to air plasma in that study, which could be due to the oxidation of membrane lipids of the Gram-negative *P. aeruginosa* strain [52,53]. However, previous studies

showed that other conditions or plasma setups can result in different effects between Gram-positive and Gram-negative bacteria by treatment with air plasma [54]. In comparison to the untreated control all antiseptic treatments exhibited a superior efficacy towards the used strains ($p < 0.001$) which is statistically significant. In comparison to 600 s of CHX treatment, the CRFs of plasma had shown a statistically higher value already after 150 s of treatment for both strains (all $p < 0.028$), except for SBD-B at 150 s treatment time for *P. aeruginosa* ($p = 0.057$).

Additional, results of chronic and acute cytotoxicity test by MTT assay showed that the average viability of the cells did not decrease below 50 % until 150 s of exposure to plasma for SBD-B, however the chronic cytotoxicity of SBD-A required the treatment to be limited to 60 s, if a cell viability loss of 50 % would be the threshold as acceptable cytotoxicity of used agent. The 50% limit was chosen based on the XTT assay, which is similar to the MTT assay, described in DIN EN ISO 10993-5. Here, a loss of the cell viability between 70 % to 50 % compared to the control is described as moderate cytotoxicity [34]. That suggests an acceptable tissue tolerability within individual limited treatment times. Here, the antimicrobial efficacy on biofilms was approximately 1.5 $\log_{10}$ (CFU/cm^2) for *S. epidermidis* and 1.8 to 2 $\log_{10}$ (CFU/cm^2) for *P. aeruginosa*. That is low but reaches our proposed minimal efficacy limit for the effect of antiseptics on biofilms. Additionally, the cell viability of 0.1 % CHX was clearly less than 50 % compared to the control for 30 s to 600 s treatment time while the antimicrobial efficacy with a CRF at 1.1 $\log_{10}$ (CFU/cm^2) for *S. epidermidis* and 1.7 $\log_{10}$ (CFU/cm^2) for *P. aeruginosa* is comparable to the air plasma treatment times for cytotoxicity acceptable doses.

Tissue tolerable plasma sources using argon as working gas, such as the kinpen 09, achieved higher antimicrobial effects against biofilms in former studies [14,15] and showed stimulating wound healing effects [18]. Additional, an air plasma source enhanced cell growth was reported by other authors [55]. These facts could promote a therapeutic application form of the investigated plasma sources as support for wound healing processes with slight antimicrobial effect (in tissue tolerable doses).

For future therapy options, it is indispensable to consider the limitations of the presented plasma application, i.e., side effects like the observed cell detritus. Also,

the treatment time must be correctly chosen as plasma treatment could turn toxic if applied too long.

The present study recommends short treatment times (< 60 s) on biofilms to reduce possible dense cell detritus layers which complicate a whole biofilm inactivation and to minimize the toxic risks. Maybe combination of plasma with antiseptic solutions could be a treatment option. Promising results for combinations of chemical antiseptics with plasma were recently reported and presented [18,56].

The study has some limitations. We used 48-h-old monospecies *in vitro* biofilms grown under controlled conditions to investigate the antimicrobial efficacy of plasma, however natural and wound multi-species biofilms *in vivo* are more complex than our monospecies biofilms [19]. The plasma treatment is to be realised under defined exposure distances from the specimen for standardization, while biological surfaces to be treated often have variable structures. In order to allow the comparability, the cytotoxicity test was carried out with a standard murine fibroblast cell line for *in vitro* cytotoxicity tests [34] and not with human epithelial cells. Consequently, these results are only for orientation. Additional, plasma effects on real wounds are influenced by individual wound secret and local immunologic cells, so more complex reactions and influences than under laboratory conditions are expected.

Conclusion

A high antimicrobial effect on biofilms with *P. aeruginosa* and *S. epidermidis* is confirmed for both plasma sources used. Here, SBD-A is more effective than SBD-B. Taking into consideration the cytotoxicity, it is recommended to limit the application time to 60 s for SBD-A and 150 s for SBD-B. Within these exposure times both plasma sources meet the basic conditions of tissue tolerability. Their antimicrobial efficacy is comparable to the efficacy of 0.1 % chlorhexidine digluconate solution, the antiseptic gold standard for dental biofilm treatment, however with significantly lower cytotoxicity of the used plasma. In addition, if these plasma sources prove suitable to expedite wound healing processes, they are likely to be successfully applied in wound care management, too.

Formation of bacterial cell detritus on biofilm surface can limit the antimicrobial effect which depends on plasma source, plasma exposition time and treated type of

microorganism. Here, the Gram-negative bacterium was more sensitive to air plasma than the Gram-positive strain. Future investigations into the antimicrobial mechanisms of plasma could elucidate the differences of both generated “types” of air plasma by SBD-A and -B.

Acknowledgements

This study was conducted within the multi-disciplinary cooperative research program “Campus PlasmaMed”, in particular within the sub-project “PlasmaCure”.

The authors thank Marcel Hähnel and Christiane Meyer for their skilful support in operating the plasma equipment, scientific assistance with the plasma source and measurements of plasma parameters as well as Jaqueline Mentz for her excellent technical assistance, Juliane Jeschke for her skilful support in performing the cell culture and MTT-Assay, and Joachim Lehmann and colleagues of the medical technology lab for preparing the polycarbonate discs and plastic flat grates.

Conflict of interest statement

The authors declare no conflicts of interest.

4 Literature

1. Daeschlein G, Woedtke Tv, Kindel E, Brandenburg R, Weltmann K-D, et al. (2010) Antibacterial Activity of an Atmospheric Pressure Plasma Jet Against Relevant Wound Pathogens in vitro on a Simulated Wound Environment. Plasma Processes Polym 7: 224-230.
2. Kramer A, Lindequist U, Weltmann KD, Wilke C, von Woedtke T (2008) Plasma Medicine - its perspective for wound therapy. GMS Krankenhhyg Interdiszip 3: :Doc16.
3. Weltmann KD, Kindel E, von Woedtke T, Hähnel M, Stieber M, et al. (2010) Atmospheric-pressure plasma sources: Prospective tools for plasma medicine. Pure Appl Chem 82: 1223-1237.

4. Burmølle M, Thomsen TR, Fazli M, Dige I, Christensen L, et al. (2010) Biofilms in chronic infections - a matter of opportunity - monospecies biofilms in multispecies infections. FEMS Immunol Med Microbiol 59: 324-336.

5. Lademann O, Kramer A, Richter H, Patzelt A, Meinke MC, et al. (2011) Skin Disinfection by Plasma-Tissue Interaction: Comparison of the Effectivity of Tissue-Tolerable Plasma and a Standard Antiseptic. Skin Pharmacol Physiol 24: 284-288.

6. Müller G, Kramer A (2008) Biocompatibility index of antiseptic agents by parallel assessment of antimicrobial activity and cellular cytotoxicity. J Antimicrob Chemother 61: 1281-1287.

7. Hammann A, Hübner N-O, Bender C, Ekkernkamp A, Hartmann B, et al. (2010) Antiseptic Efficacy and Tolerance of Tissue-Tolerable Plasma Compared with Two Wound Antiseptics on Artificially Bacterially Contaminated Eyes from Commercially Slaughtered Pigs. Skin Pharmacol Physiol 23: 328-332.

8. Lademann J, Richter H, Schanzer S, Patzelt A, Thiede G, et al. (2012) Comparison of the antiseptic efficacy of tissue-tolerable plasma and an octenidine hydrochloride-based wound antiseptic on human skin. Skin Pharmacol Physiol 25: 100-106.

9. Vinh DC, Embil JM (2005) Device-related infections: a review. J Long Term Eff Med Implants 15: 467-488.

10. Bjarnsholt T, Kirketerp-Møller K, Jensen PØ, Madsen KG, Phipps R, et al. (2008) Why chronic wounds will not heal: a novel hypothesis. Wound Repair Regen 16: 2-10.

11. Kramer A, Hübner N-O, Assadian O, Below H, Bender C, et al. (2009) Chances and perspectives of the plasma medicine by use of Tissue Tolerable Plasma (TTP). GMS Krankenhhyg Interdiszip 4 :Doc10.

12. Lademann J, Richter H, Alborova A, Humme D, Patzelt A, et al. (2009) Risk assessment of the application of a plasma jet in dermatology. J Biomed Opt 14: 054025.

13. Weltmann KD, Kindel E, Brandenburg R, Meyer C, Bussiahn R, et al. (2009) Atmospheric Pressure Plasma Jet for Medical Therapy: Plasma Parameters and Risk Estimation. Contrib Plasma Phys 49: 631-640.

14. Hübner NO, Matthes R, Koban I, Rändler C, Müller G, et al. (2010) Efficacy of chlorhexidine, polihexanide and tissue-tolerable plasma against *Pseudomonas aeruginosa* biofilms grown on polystyrene and silicone materials. Skin Pharmacol Physiol 23: 28-34.

15. Koban I, Holtfreter B, Hübner N-O, Matthes R, Sietmann R, et al. (2011) Antimicrobial efficacy of non-thermal plasma in comparison to chlorhexidine against dental biofilms on titanium discs in vitro - proof of principle experiment. J Clin Periodontol 38: 956–965.

16. Hübner N, Matthes R, Gruman D, Holtfreter S, Bröker B, et al. Antimicrobial efficacy of low-temperature plasma against 65 genetically characterized *Staphylococcus aureus* isolates including PVL-positive, MRSA and c-MRSA strains; 2010 3-5 November; Valladolid (Spain).

17. Bender C, Partecke LI, Kindel E, Döring F, Lademann J, et al. (2011) The modified HET-CAM as a model for the assessment of the inflammatory response to tissue tolerable plasma. Toxicol In Vitro 25: 530-537.

18. Bender C, Hübner NO, Weltmann KD, Scharf C, Kramer A (2012) Tissue Tolerable Plasma and Polihexanide: Are Synergistic Effects Possible to Promote Healing of Chronic wounds? In Vivo and In Vitro Results. In: Machala Z, Hensel K, Akishev Y, editors. NATO Science for Peace and Security Series A: Chemistry and Biology. Dordrecht: Springer Netherlands. pp. 479.

19. James GA, Swogger E, Wolcott R, Pulcini E, Secor P, et al. (2008) Biofilms in chronic wounds. Wound Repair Regen 16: 37-44.

20. Kalghatgi S, Kelly CM, Cerchar E, Torabi B, Alekseev O, et al. (2011) Effects of Non-Thermal Plasma on Mammalian Cells. PLoS One 6: e16270.

21. Reuter S, Tresp H, Wende K, Hammer MU, Winter J, et al. (2012) From RONS to ROS: Tailoring Plasma Jet Treatment of Skin Cells. IEEE Trans Plasma Sci 40: 2986 - 2993.

22. Nosenko T, Shimizu T, Morfill GE (2009) Designing plasmas for chronic wound disinfection. New J Phys 11.

23. Oehmigen K, Hähnel M, Brandenburg R, Wilke C, Weltmann KD, et al. (2010) The Role of Acidification for Antimicrobial Activity of Atmospheric Pressure Plasma in Liquids. Plasma Processes Polym 7: 250–257.

24. Joshi SG, Cooper M, Yost A, Paff M, Ercan UK, et al. (2011) Nonthermal Dielectric-Barrier Discharge Plasma-Induced Inactivation Involves Oxidative DNA Damage and Membrane Lipid Peroxidation in *Escherichia coli*. Antimicrob Agents Chemother 55: 1053-1062.

25. 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. Int J Mass Spectrom 233: 81-86.

26. Fazli M, Bjarnsholt T, Kirketerp-Møller K, Jørgensen B, Andersen AS, et al. (2009) Nonrandom Distribution of *Pseudomonas aeruginosa* and Staphylococcus aureus in Chronic Wounds. J Clin Microbiol 47: 4084-4089.

27. Uckay I, Pittet D, Vaudaux P, Sax H, Lew D, et al. (2009) Foreign body infections due to Staphylococcus epidermidis. Ann Med 41: 109-119.

28. Moshrefi A (2002) Chlorhexidine. J West Soc Periodontol Periodontal Abstr 50: 5-9.

29. Muangman P, Nitimonton S, Aramwit P (2011) Comparative Clinical Study of Bactigras and Telfa AMD for Skin Graft Donor-Site Dressing. Int J Mol Sci 12: 5031-5038.

30. Wagner HE, Brandenburg R, Kozlov KV, Sonnenfeld A, Michel P, et al. (2003) The barrier discharge: basic properties and applications to surface treatment. Vacuum 71: 417-436.

31. Matthes R, Hübner N, Bender C, Koban I, Weltmann K, et al. (2010) Screening test for quality control of surface barrier discharged plasma sources with the microorganism-agar test (MAT). GMS Krankenhhyg Interdiszip 5: DOC02.

32. DIN EN 1040 D (2006) DIN EN 1040:2006-03 Chemical disinfectants and antiseptics - Quantitative suspension test for the evaluation of basic bactericidal activity of chemical disinfectants and antiseptics - Test method and requirements (phase 1); German version EN 1949:2005. In: CEN/TC 216 - Chemical disinfectants and antiseptics, editor. Berlin: Beuth-Verlag. pp. 1-42.

33. ICNIRP (2004) Guidelines on limits of exposure to ultraviolet radiation of wavelengths between 180 nm and 400 nm (incoherent optical radiation). Health Phys 87: 117-186.

34. DIN EN ISO 10993-5:2007 D (2007) Biological evaluation of medical devices - Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity (ISO/DIS 10993-5:2007);German version prEN ISO 10993-5:2007. In: CEN/TC 206 Biocompatibility of medical and dental materials and devices, editor. Berlin: Beuth-Verlag. pp. 41.

35. Edmondson JM, Armstrong LS, Martinez AO (1988) A rapid and simple MTT-based spectrophotometric assay for determining drug sensitivity in monolayer cultures. Journal of Tissue Culture Methods 11: 15–17.

36. Gómez-Suárez C, Pasma J, van der Borden AJ, Wingender J, Flemming HC, et al. (2002) Influence of extracellular polymeric substances on deposition and redeposition of *Pseudomonas aeruginosa* to surfaces. Microbiology 148: 1161-1169.

37. Tielen P, Rosenau F, Wilhelm S, Jaeger KE, Flemming HC, et al. (2010) Extracellular enzymes affect biofilm formation of mucoid *Pseudomonas aeruginosa*. Microbiology 156: 2239-2252.

38. Sadovskaya I, Vinogradov E, Flahaut S, Kogan G, Jabbouri S (2005) Extracellular carbohydrate-containing polymers of a model biofilm-producing strain, *Staphylococcus epidermidis* RP62A. Infect Immun 73: 3007-3017.

39. Linton CJ, Sherriff A, Millar MR (1999) Use of a modified Robbins device to directly compare the adhesion of *Staphylococcus epidermidis* RP62A to surfaces. J Appl Microbiol 86: 194-202.

40. Rändler C, Matthes R, McBain AJ, Giese B, Fraunholz M, et al. (2010) A three-phase in-vitro system for studying *Pseudomonas aeruginosa* adhesion and biofilm formation upon hydrogel contact lenses. BMC Microbiol 10: 282-212.

41. Bowler PG, Duerden BI, Armstrong DG (2001) Wound microbiology and associated approaches to wound management. Clin Microbiol Rev 14: 244-269.

42. Widerström M, Wiström J, Ek E, Edebro H, Monsen T (2011) Near absence of methicillin-resistance and pronounced genetic diversity among *Staphylococcus epidermidis* isolated from healthy persons in northern Sweden. Apmis 119: 505-512.

43. Deredjian A, Colinon C, Brothier E, Favre-Bonté S, Cournoyer B, et al. (2010) Antibiotic and metal resistance among hospital and outdoor strains of Pseudomonas aeruginosa. Res Microbiol 162: 689-700.

44. Hawkey PM (2008) The growing burden of antimicrobial resistance. J Antimicrob Chemother 62: i1-9.

45. Powell DG (1998) Medical Applications of Polycarbonate. Medical Plastics and Biomaterials. Available: http://www.mddionline.com/article/medical-applications-polycarbonate. Accessed 25 November 2012.

46. Becker K (1996) Exopolysaccharide production and attachment strength of bacteria and diatoms on substrates with different surface tensions. Microb Ecol 32: 23-33.

47. Kneist S (2011) Plaque Control by Chlorhexidine - Mouthrinses, Gels, Varnishes, Chips. ZWR - Das Deutsche Zahnärzteblatt 120: 156–167.

48. Weltmann K-D, Fricke K, Stieber M, Brandenburg R, Woedtke Tv, et al. (2012) New Nonthermal Atmospheric-Pressure Plasma Sources for Decontamination of Human Extremities. IEEE Trans Plasma Sci 40: 2963 - 2969.

49. Laroussi M, Richardson JP, Dobbs FC (2002) Effects of nonequilibrium atmospheric pressure plasmas on the heterotrophic pathways of bacteria and on their cell morphology. Appl Phys Lett 81: 772-774.

50. Pompl R, Jamitzky F, Shimizu T, Steffes B, Bunk W, et al. (2009) The effect of low-temperature plasma on bacteria as observed by repeated AFM imaging. New J Phys 11.

51. Koban I, Matthes R, Hübner NO, Welk A, Meisel P, et al. (2010) Treatment of *Candida albicans* biofilms with low-temperature plasma induced by dielectric barrier discharge and atmospheric pressure plasma jet. New J Phys 12.

52. Dobrynin D, Fridman G, Friedman G, Fridman A (2009) Physical and biological mechanisms of direct plasma interaction with living tissue. New J Phys 11.

53. Montie TC, Kelly-Wintenberg K, Roth JR (2000) An overview of research using the one atmosphere uniform glow discharge plasma (OAUGDP) for sterilization of surfaces and materials. IEEE Trans Plasma Sci 28: 41-50.

54. Matthes R, Bekeschus S, Bender C, Koban I, Hübner NO, et al. (2012a) Pilot-study on the influence of carrier gas and plasma application (open resp. delimited) modifications on physical plasma and its antimicrobial effect against *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. GMS Krankenhhyg Interdiszip 7: Doc02.

55. Hähnel M, Diener A, Kolukisaoglu U, Weltmann KD, Thurow K (2011) The Influence on Cell Growth Properties in Different Microtiterplate Types by Corona-Dielectric Barrier Discharge Plasma at Atmospheric Pressure. Plasma Processes Polym 8: 70-76.

56. Matthes R, Bender C, Hübner N-O, Koban I, Kramer A. Verstärkung der antimikrobiellen Effekte durch Kombination von TTP mit Antiseptika an in vitro Biofilmen.; 2012 25.-28.03.12; Berlin - Russisches Haus. mhp Verlag.

Figures Legends

Figure 1. Experimental setup of the SBD-A plasma source. A: Electrode and discs with biofilms on plastic flat grate. B: Configuration of the electrode in action mode. C: Schematic representation of the experimental setup of SBD-A.

Figure 2. Experimental setup of the SBD-B plasma source. A: Overview of the experimental setup. B: Near focus of the electrode in action mode above the discs with biofilms. C: Schematic representation of the experimental setup of SBD-B in cross section.

Figure 3. Scanning electron micrographs of untreated and air plasma treated biofilms on polycarbonate discs. A) untreated biofilm of *Pseudomonas aeruginosa* SG81 (5000-fold), B) untreated biofilm of *Staphylococcus epidermidis* RP62A (5000-fold), C) *Pseudomonas aeruginosa* SG81 biofilms after 300 s of air plasma treatment by SBD-A (2000-fold) and D) by SBD-B (1500-fold) as well as E) *Staphylococcus epidermidis* RP62A biofilms after 300 s of air plasma treatment by SBD-A (1000-fold) and F) by SBD-B (5000-fold).

Figure 4. Scanning electron micrographs of cell morphology damaged biofilm bacteria on polycarbonate discs after 300 s of air plasma treatment with A) *Pseudomonas aeruginosa* SG81 by SBD-B (7000-fold) and B) *Staphylococcus epidermidis* RP62A by SBD-A (10000-fold).

Figure 5. Spectrometric graph of irradiance by SBD-B generated air plasma within 300 s of exposure time between 200 and 400 nm.

Table
Click here to download Figure: Table_1.xls

Table 1. Operational parameters of SBD-A and SBD-B.

properties	SBD-A	SBD-B
U_{SS} (kV)	13	8
applied frequency (kHz)	20	30
plasma mode	burst (2 pulse/ms) = 800 pulse in 400 ms	burst (30 pulse/ms) = 7500 pulse in 250 ms
working mode	400 ms on, 1200 ms off	250 ms on, 750 ms off
input power (mJ/puls)	0.6	0.44
mean power/area (mW/cm^2)	0.03	0.18
in (mJ/cm^2) per minute	1.8	10.88
treatment area (cm^2)	10	18
electrode form	circular	rectangular
gas flow in slm	0	0.5

719 **Table 2. Antiseptic treatment of *Pseudomonas aeruginosa* SG81 biofilms.**

	SBD-A				SBD-B				
			95% CI limits				95% CI limits		
treatment	n	**CRF ± SD**	lower	upper	n	**CRF ± SD**	lower	upper	p
plasma - 30 s	20	**1.44** ±0.41 c*	1.25	1.63	26	**1.16** ±0.60 c*	0.92	1.40	0.0037
plasma - 60 s	24	**1.78** ±0.70	1.48	2.07	20	**1.32** ±0.41 c	1.13	1.51	0.0267
plasma - 150 s	22	**2.60** ±0.77 c	2.26	2.94	20	**2.06** ±0.66 *	1.76	2.37	0.0136
plasma - 300 s	23	**4.83** ±2.19 c*	3.88	5.77	20	**2.98** ±0.96 c*	2.53	3.43	0.0050
plasma - 600 s	16	**7.11** ±1.17 c*	6.48	7.73	12	**3.81** ±1.51 c	2.85	4.77	0.0001
p		0.0001				0.0001			0.0001
CHX 0.1%	35	**1.72** ±0.46	1.56	1.88					
control	38	**0.00** ±0.15	-0.05	0.05					
p		0.0001				0.0001			0.0001

[c] significantly different from CHX

*significantly different from the respective treatment time of *Staphylococcus epidermidis* RP62A

720

721

722 The analytical results by the Number of samples (n), Colony reduction factor (CRF) in $\log_{10}$ (CFU/cm^2)
723 ± Standard Deviation (SD), lower and upper 95% confidence limits (CI) after exposure to air plasma
724 for 30 - 600 s treatment time respectively and 0.1 % CHX after 600 s exposure time and untreated
725 control of *Pseudomonas aeruginosa* SG81 biofilms [p-values of omnibus tests (Kruskal-Wallis) and
726 two-sample tests (Whitney *U*); statistical significance: α=0.05].

727

728

729

730

731

732

733

734

735

736

737

738

739

740

741

742

743 **Table 3. Antiseptic treatment of *Staphylococcus epidermidis* RP62A biofilms.**

	SBD-A				SBD-B				
			95% CI limits				95% CI limits		
treatment	n	**CRF ± SD**	lower	upper	n	**CRF ± SD**	lower	upper	p
plasma - 30 s	20	**0.66** ±0.64 c*	0.36	0.97	12	**0.57** ±0.45 c*	0.28	0.85	0.8763
plasma - 60 s	22	**1.55** ±1.04	1.09	2.01	20	**1.23** ±0.40	1.05	1.42	0.5795
plasma - 150 s	22	**2.32** ±1.19 c	1.79	2.85	20	**1.45** ±0.56 c*	1.19	1.71	0.0219
plasma - 300 s	22	**2.77** ±1.27 c*	2.20	3.33	20	**2.04** ±0.58 c*	1.77	2.31	0.0698
plasma - 600 s	16	**3.38** ±0.87 c*	2.92	3.85	12	**2.69** ±0.98 c	2.07	3.31	0.0459
p		0.0001				0.0001			0.0001
CHX 0.1%	32	**1.14** ±0.73	0.88	1.41					
control	30	**0.00** ±0.30	-0.11	0.11					
p		0.0001				0.0001			0.0001

[c] significantly different from CHX
*significantly different from the respective treatment time of *Pseudomonas aeruginosa* SG81

744

745 The analytical results by the Number of samples (n), Colony reduction factor (CRF) in $\log_{10}$ (CFU/cm^2)
746 ± Standard Deviation (SD), lower and upper 95% confidence limits (CI) after exposure to air plasma
747 for 30 - 600 s treatment time and 0.1 % CHX after 600 s exposure time and untreated control of
748 *Staphylococcus epidermidis* RP62A biofilms [p-values of omnibus tests (Kruskal-Wallis) and two-
749 sample tests (Whitney *U*); statistical significance: α=0.05].

750

751

752

753

754

755

756

757

758

759

760

761

762

763

764

765

Table 4. Statistical overview of p values after treatment of *Pseudomonas aeruginosa* SG81 biofilms in the different treatment modes.

SBD-A

treatment	control	CHX 600 s	plasma 60 s	plasma 150 s	plasma 300 s	plasma 600 s
plasma - 30 s	<.0001	0.052	0.081	<.0001	<.0001	<.0001
plasma - 60 s	<.0001	0.793		0.001	<.0001	<.0001
plasma - 150 s	<.0001	<.0001			0.0002	<.0001
plasma - 300 s	<.0001	<.0001				0.0001
plasma - 600 s	<.0001	<.0001				

SBD-B

treatment	control	CHX 600 s	plasma 60 s	plasma 150 s	plasma 300 s	plasma 600 s
plasma - 30 s	<.0001	<.0001	0.042	<.0001	<.0001	<.0001
plasma - 60 s	<.0001	0.004		0.0003	<.0001	<.0001
plasma - 150 s	<.0001	0.057			0.001	0.0001
plasma - 300 s	<.0001	<.0001				0.087
plasma - 600 s	<.0001	<.0001				

Statistically calculated p values after 30-600 s treatment with air plasma, 0.1 % CHX treatment as well as untreated control compared to each other by the two-sample Whitney *U* test.

Table 5. Statistical overview of p values after treatment of *Staphylococcus epidermidis* RP62A biofilms in the different treatment modes.

SBD-A

treatment	control	CHX 600 s	plasma 60 s	plasma 150 s	plasma 300 s	plasma 600 s
plasma - 30 s	0.006	0.031	0.002	<.0001	<.0001	<.0001
plasma - 60 s	<.0001	0.109		0.016	0.001	<.0001
plasma - 150 s	<.0001	<.0001			0.222	0.006
plasma - 300 s	<.0001	<.0001				0.132
plasma - 600 s	<.0001	<.0001				

SBD-B

treatment	control	CHX 600 s	plasma 60 s	plasma 150 s	plasma 300 s	plasma 600 s
plasma - 30 s	0.001	0.015	0.0004	0.0002	<.0001	<.0001
plasma - 60 s	<.0001	0.128		0.137	<.0001	0.0001
plasma - 150 s	<.0001	0.028			0.006	0.001
plasma - 300 s	<.0001	<.0001				0.062
plasma - 600 s	<.0001	<.0001				

Statistically calculated p values after 30-600 s treatment with air plasma, 0.1 % CHX treatment as well as untreated control compared to each other by the two-sample Whitney *U* test.

Table 6. Cytotoxicity of air plasma by SBD-A and SBD-B on L929 cell line (mouse fibroblasts).

SBD-A

treatment	n	acute toxicity	ratio to control (%)	n	chronic tocicity	ratio to control (%)
plasma - 30 s	3	0.090	**89.0**	3	0.077	**78.6**
plasma - 60 s	4	0.096	**94.1**	3	0.062	**63.3**
plasma - 150 s	4	0.075	**74.1**	3	0.039	**40.1**
plasma - 300 s	4	0.036	**35.0**	3	0.007	**7.1**
plasma - 600 s	4	0.004	**4.2**	3	0.000	**0.0**
control	4	0.102		2	0.098	

SBD-B

treatment	n	acute toxicity	ratio to control (%)	n	chronic tocicity	ratio to control (%)
plasma - 30 s	2	0.094	**92.6**	3	0.070	**71.8**
plasma - 60 s	4	0.075	**73.9**	3	0.079	**80.3**
plasma - 150 s	4	0.085	**83.3**	3	0.078	**79.6**
plasma - 300 s	4	0.044	**43.3**	3	0.037	**37.8**
plasma - 600 s	4	0.043	**42.6**	3	0.032	**32.3**
gas flow - 300 s	2	0.088	**86.7**	2	0.054	**54.6**
control	4	0.102		2	0.098	

Measured values of MTT-Assay after 30-600 s treatment time of air plasma by SBD-A (above) and SBD-B (below) with the Number of samples (n) and the cell vitality as ratio in comparison to the control in percent.

Table 7. Cytotoxicity of 0.1 % chlorhexidine digluconate solution on L929 cell line (mouse fibroblasts).

CHX (0.1%)						
treatment	**n**	**acute toxicity**	**ratio to control (%)**	**n**	**chronic tocicity**	**ratio to control (%)**
CHX - 30 s	3	0.046	**15.2**	3	0.004	**1.6**
CHX - 60 s	3	0.021	**6.8**	2	0.037	**15.2**
CHX - 150 s	3	0.069	**22.8**	3	0.024	**9.8**
CHX - 300 s	3	0.016	**5.3**	3	0.012	**4.8**
CHX - 600 s	3	0.007	**2.2**	3	0.019	**7.7**
control	3	0.304		3	0.244	

Measured values of MTT-Assay after 30-600 s treatment time with 0.1 % of chlorhexidine dicluconate solution (in culture media) with the Number of samples (n) and the cell vitality as ratio in comparison to the control in percent.

Figure
Click here to download high resolution image

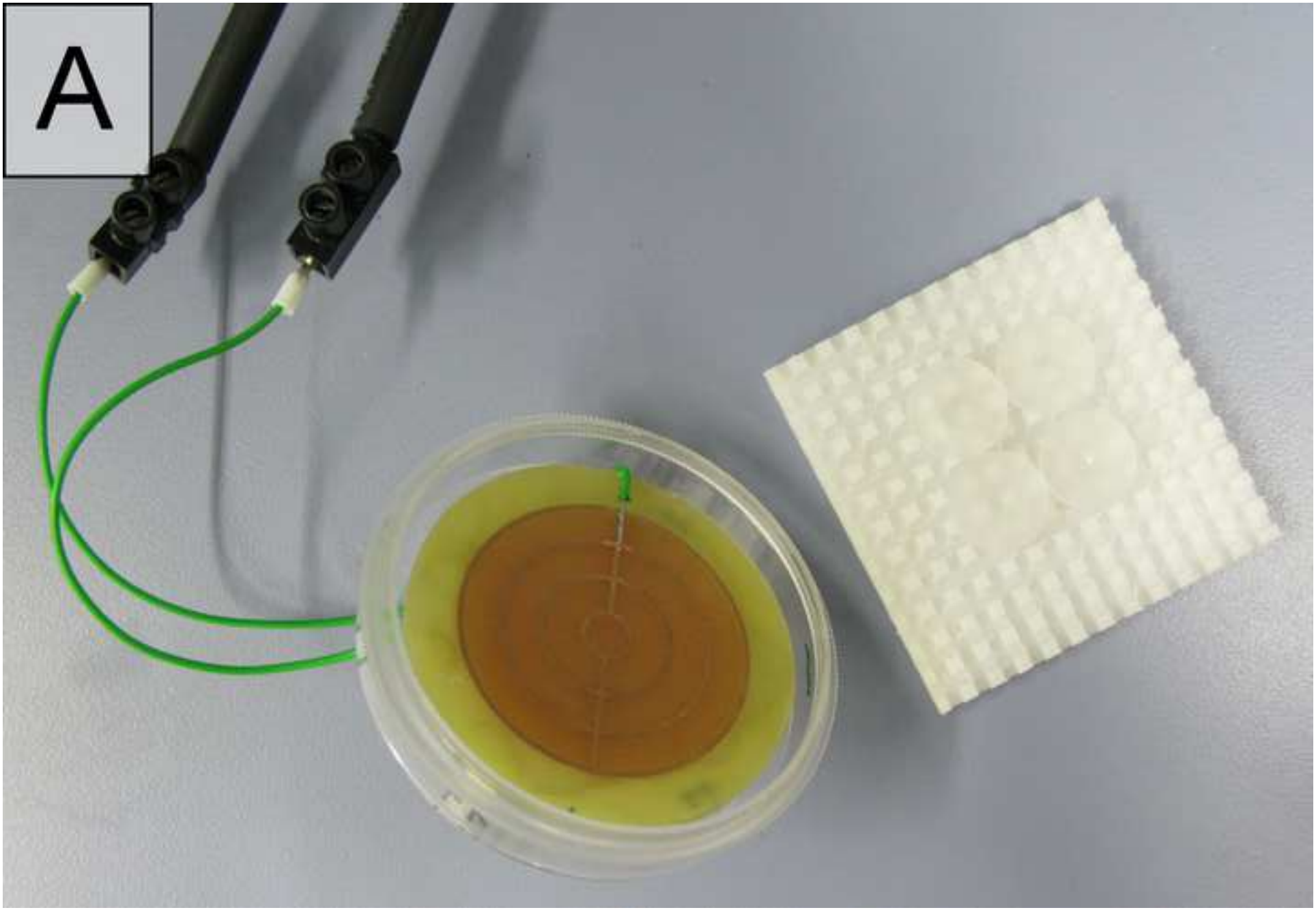


Figure
Click here to download high resolution image

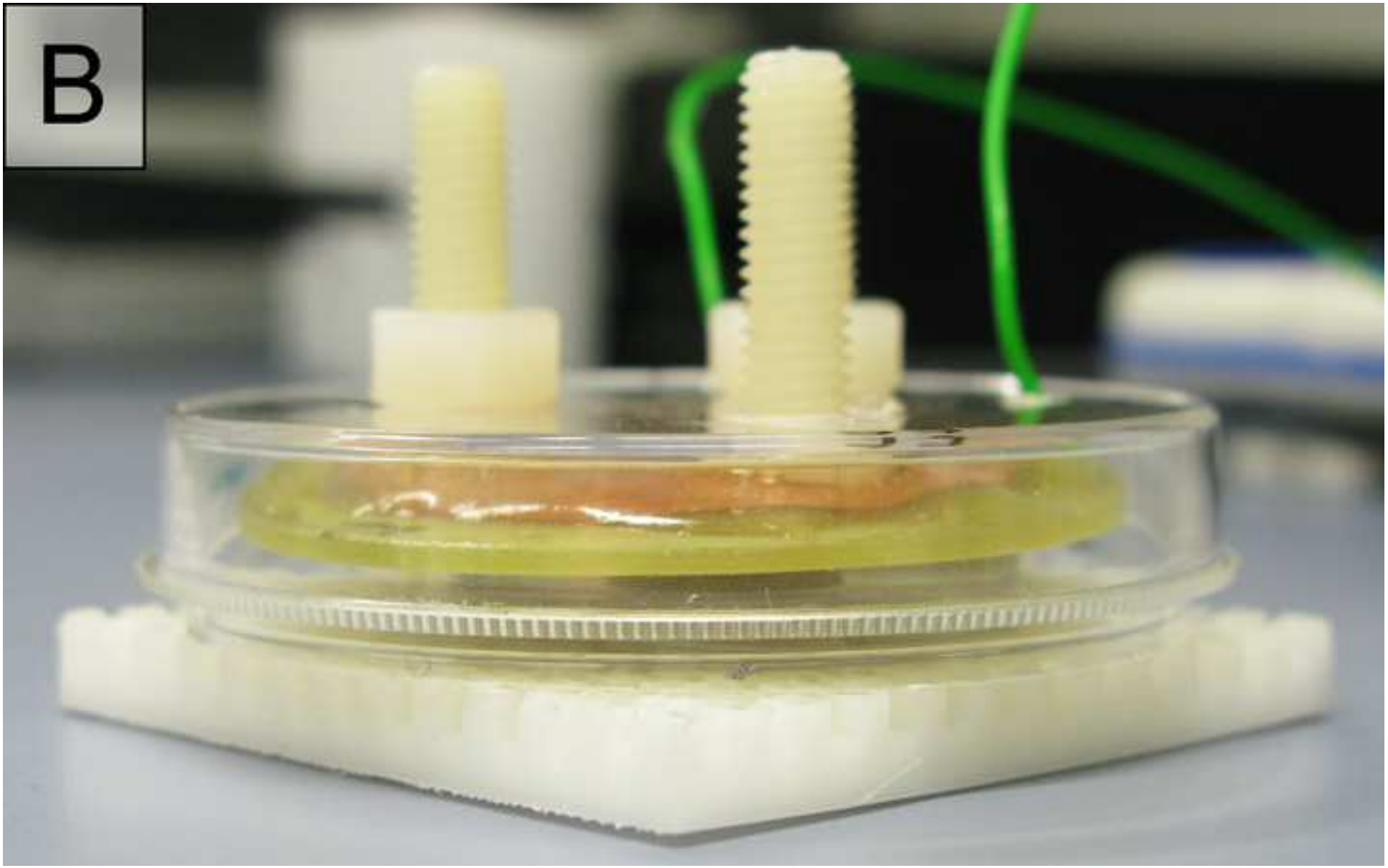


Figure
Click here to download high resolution image

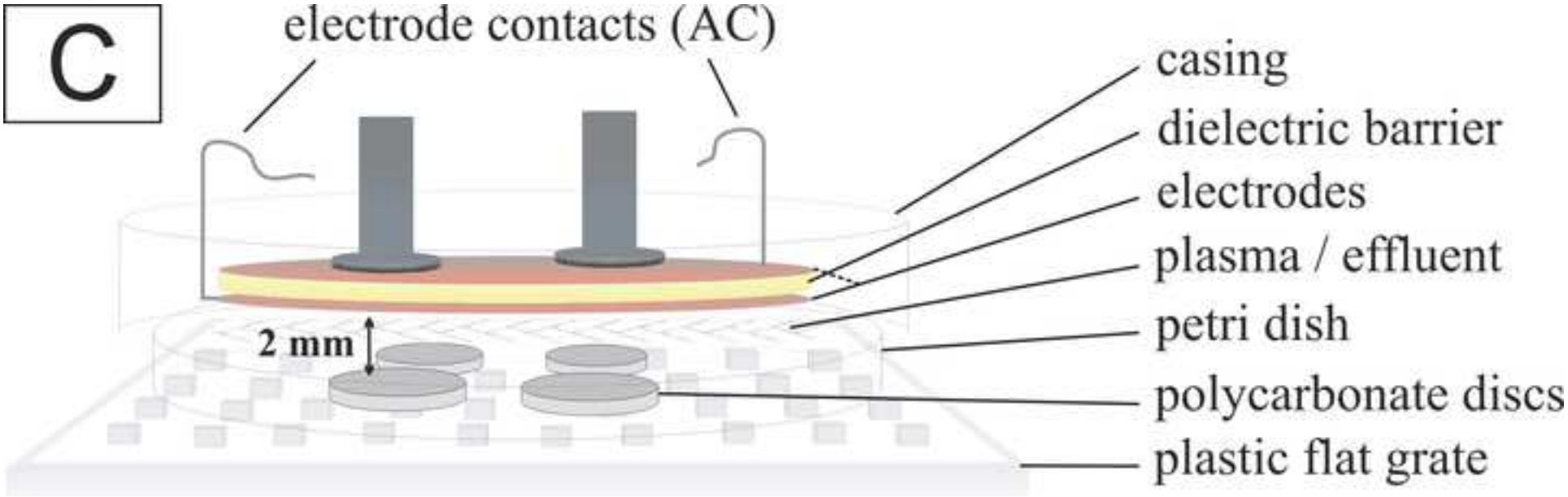


Figure
Click here to download high resolution image

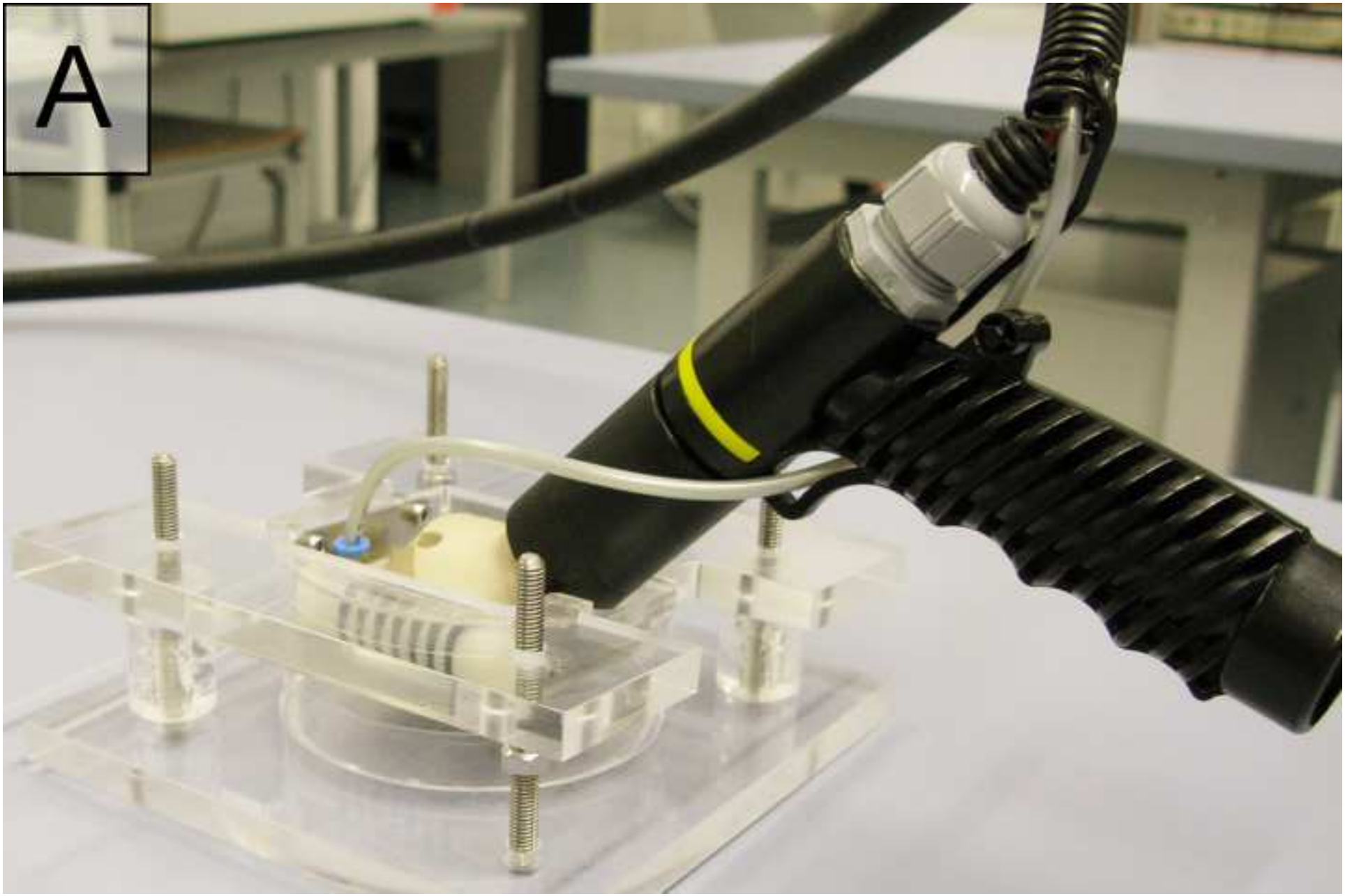


Figure
Click here to download high resolution image

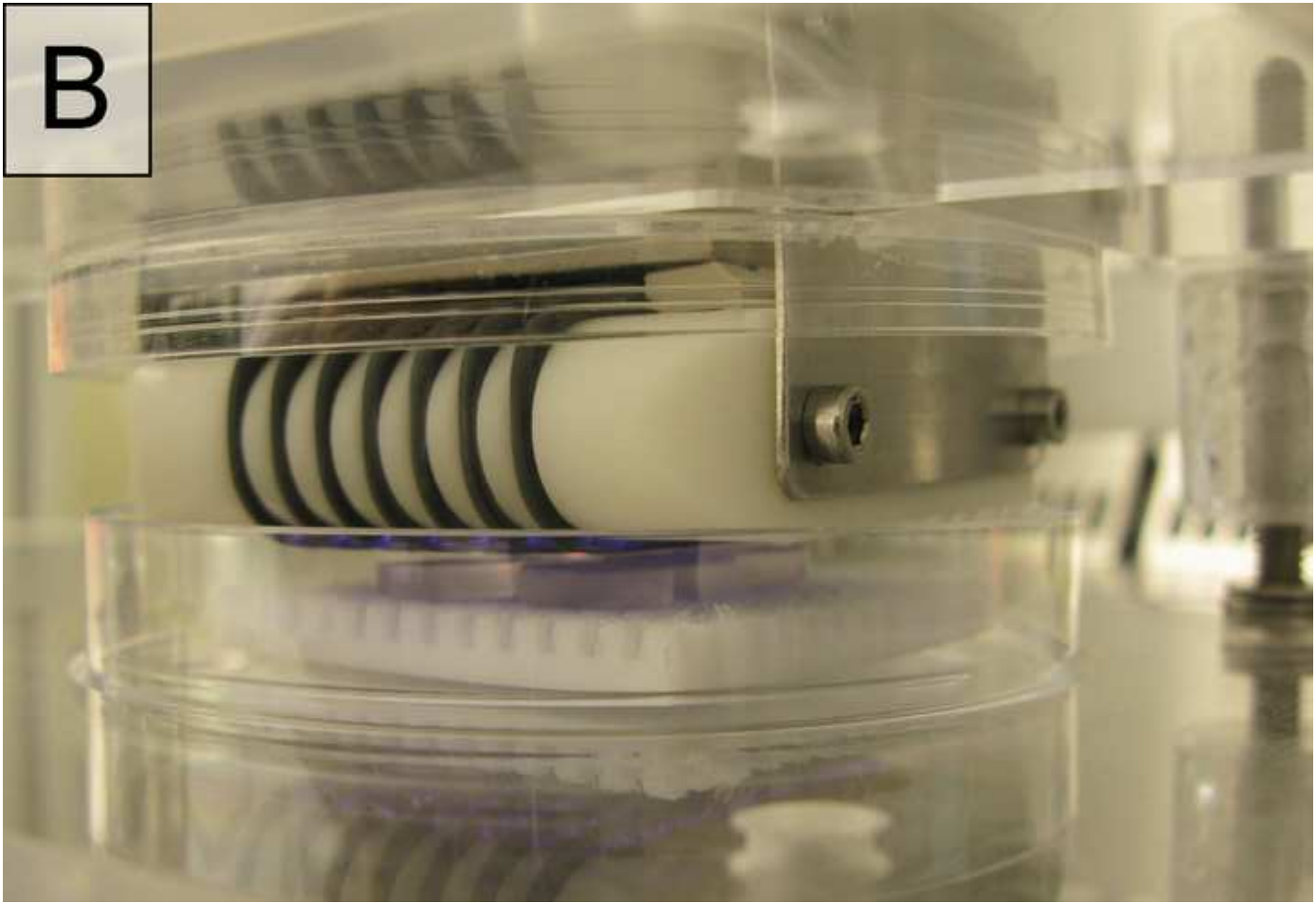


Figure
Click here to download high resolution image

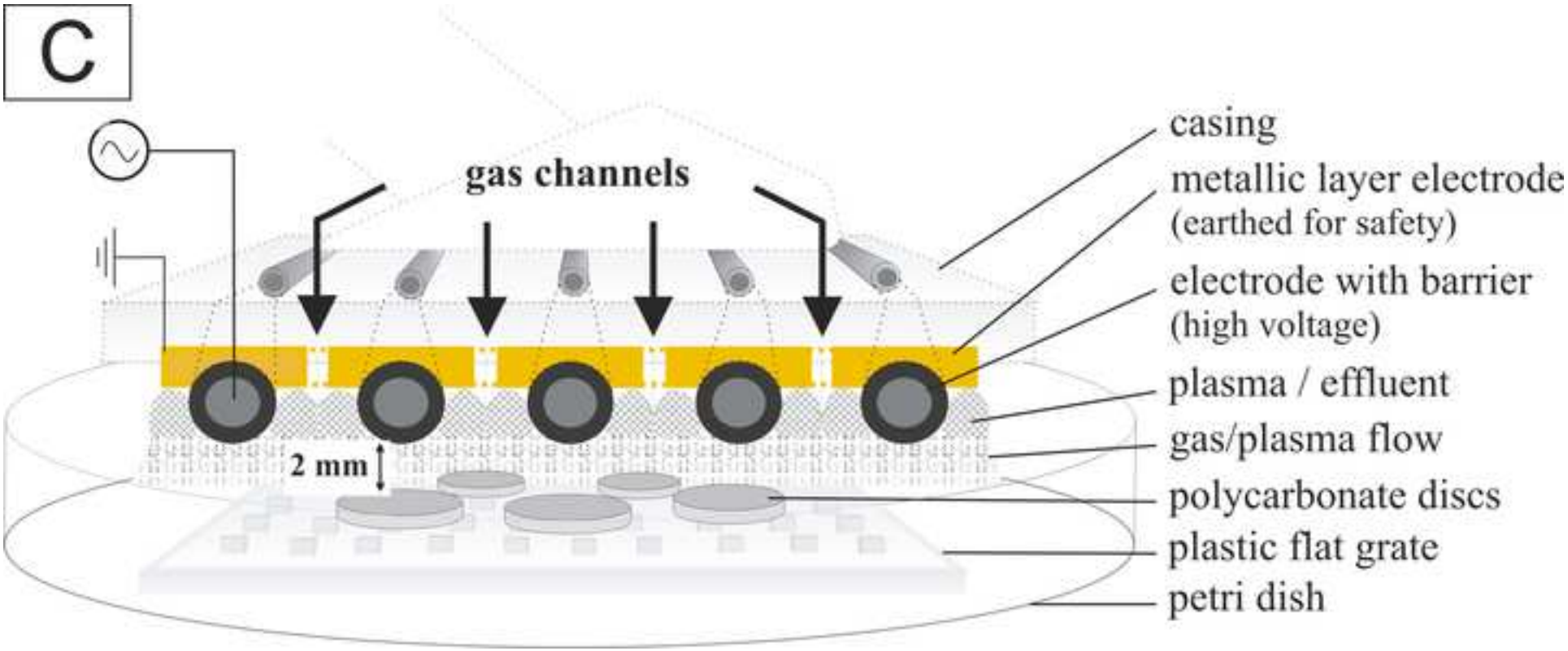


Figure
Click here to download high resolution image

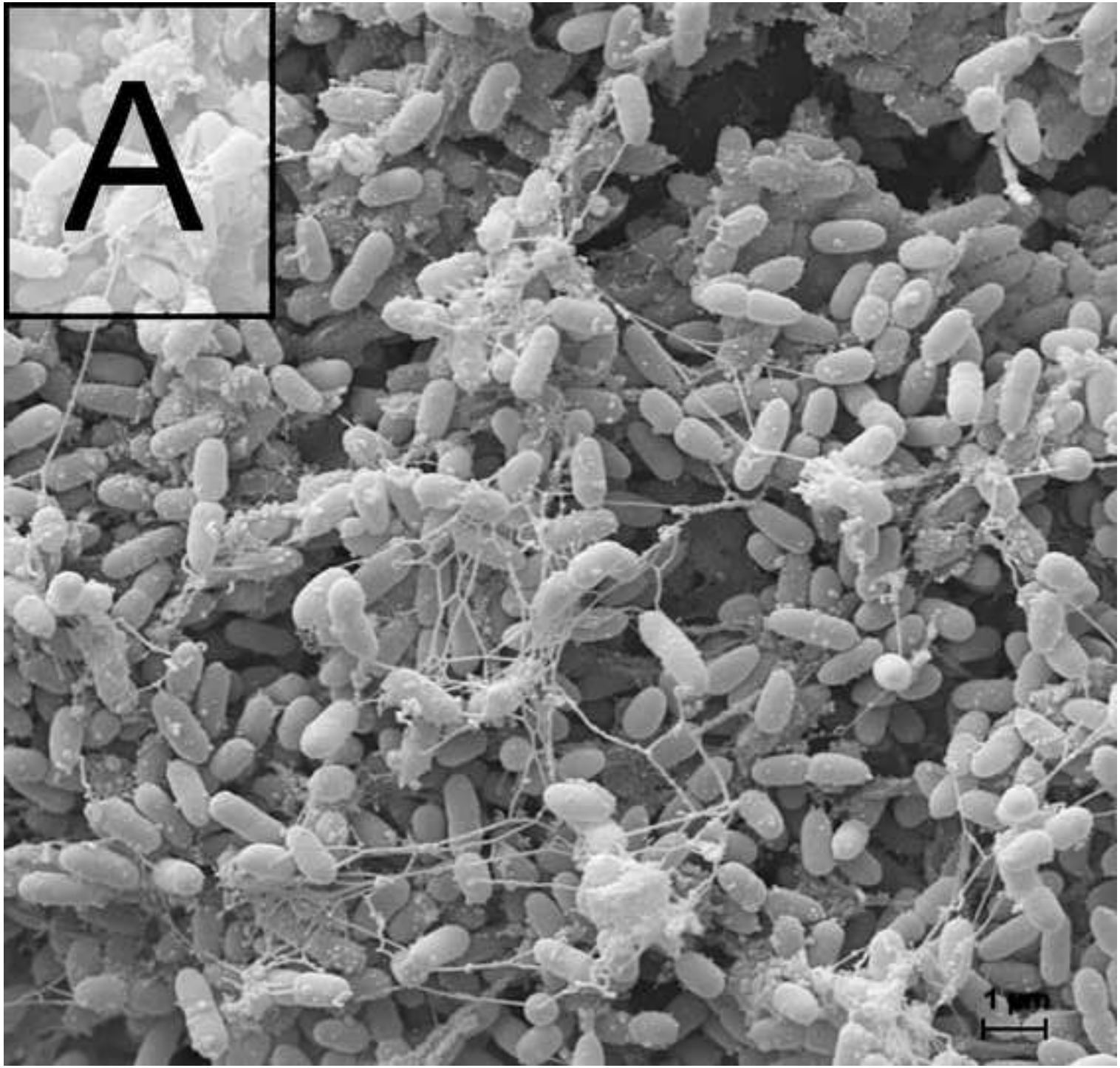


Figure
Click here to download high resolution image

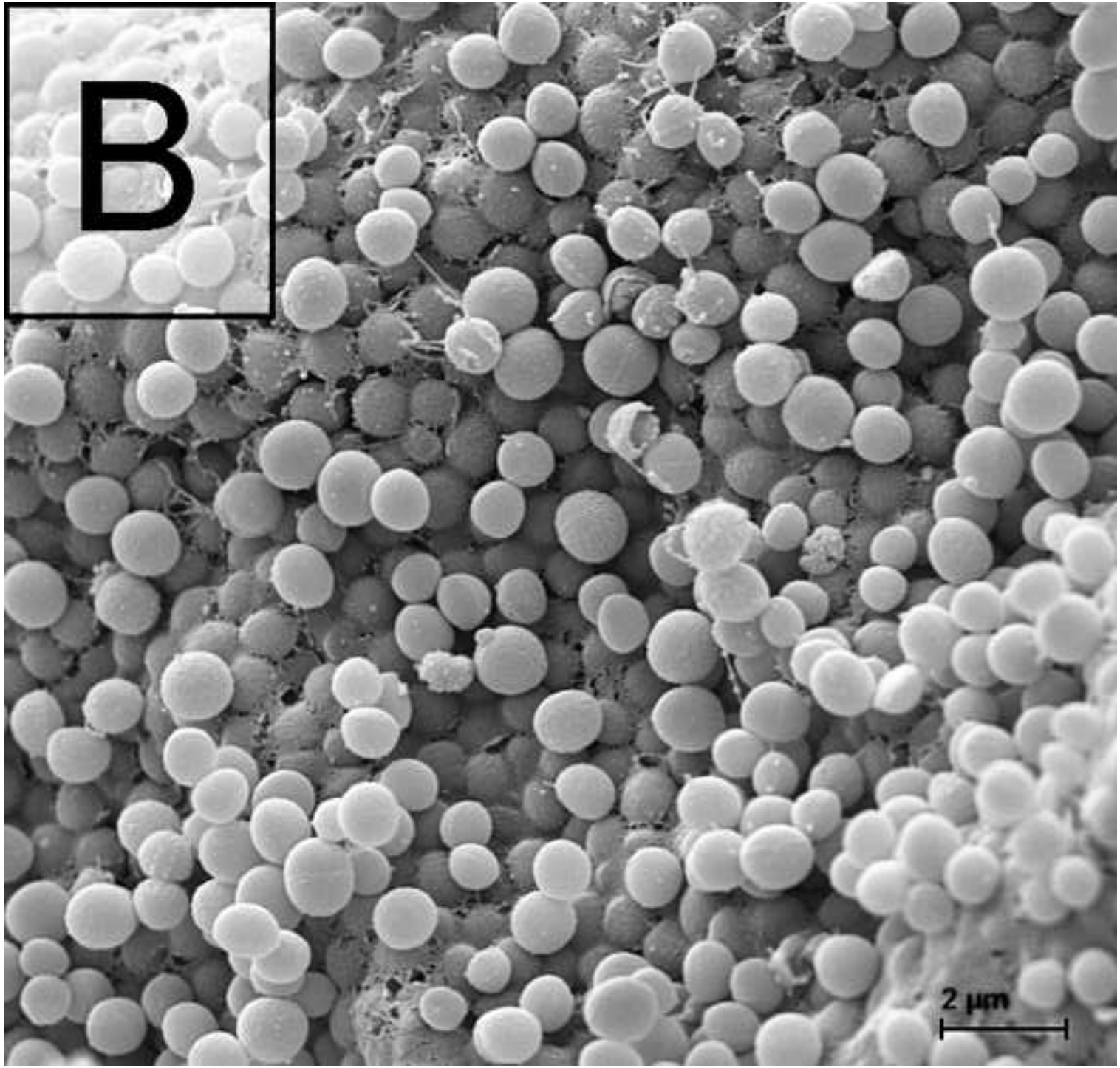


Figure
Click here to download high resolution image

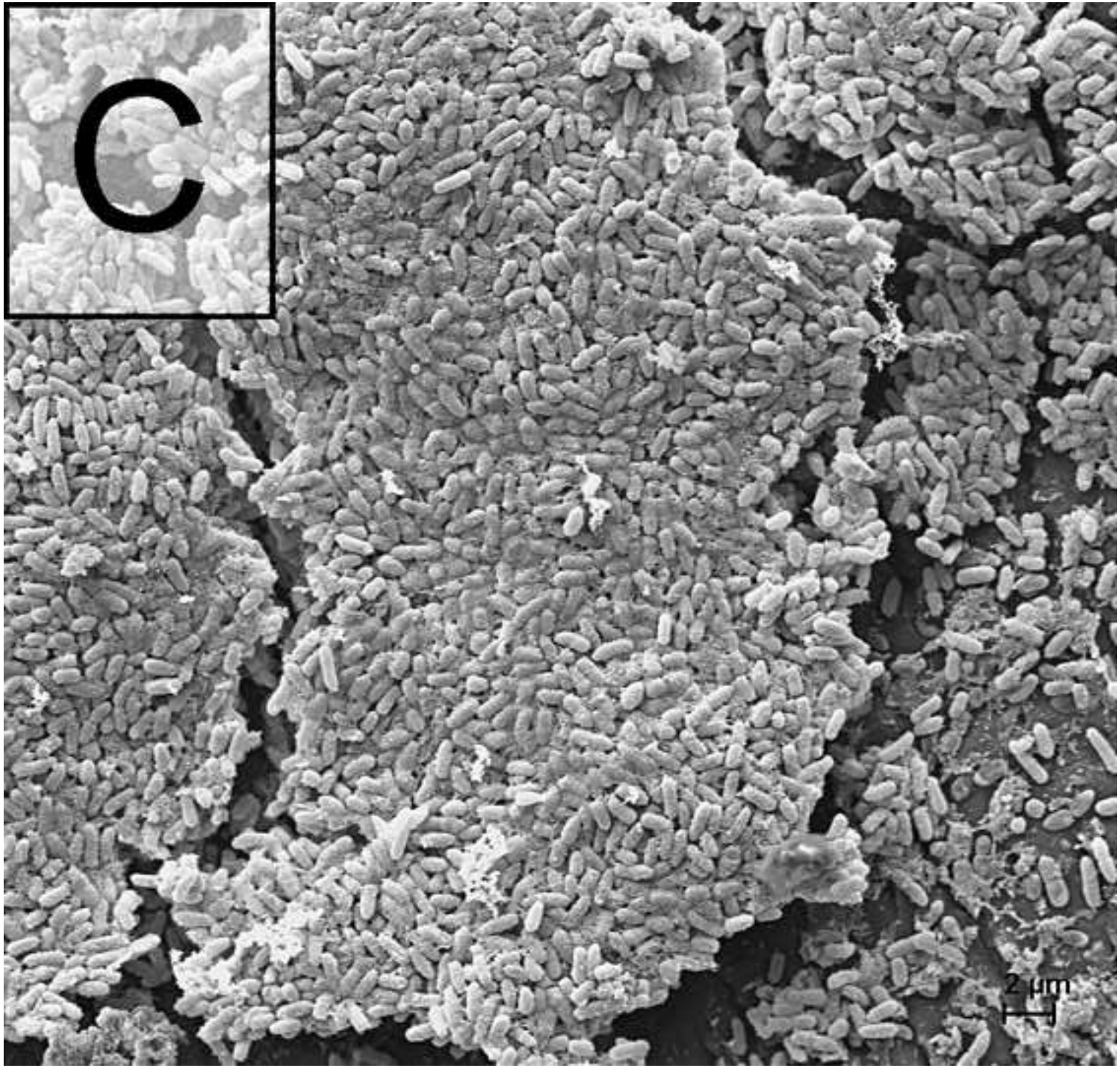


Figure
Click here to download high resolution image

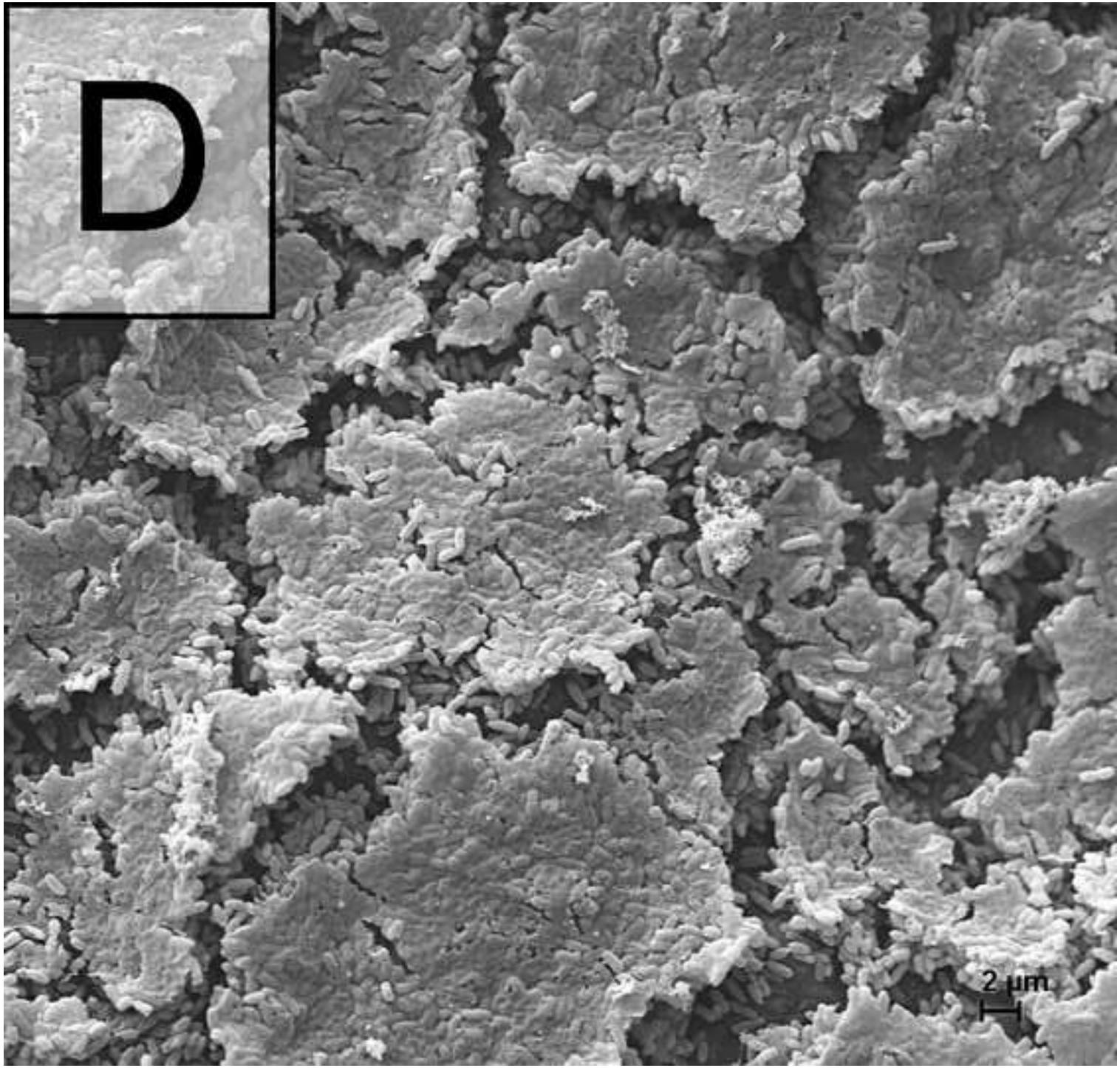


Figure
Click here to download high resolution image

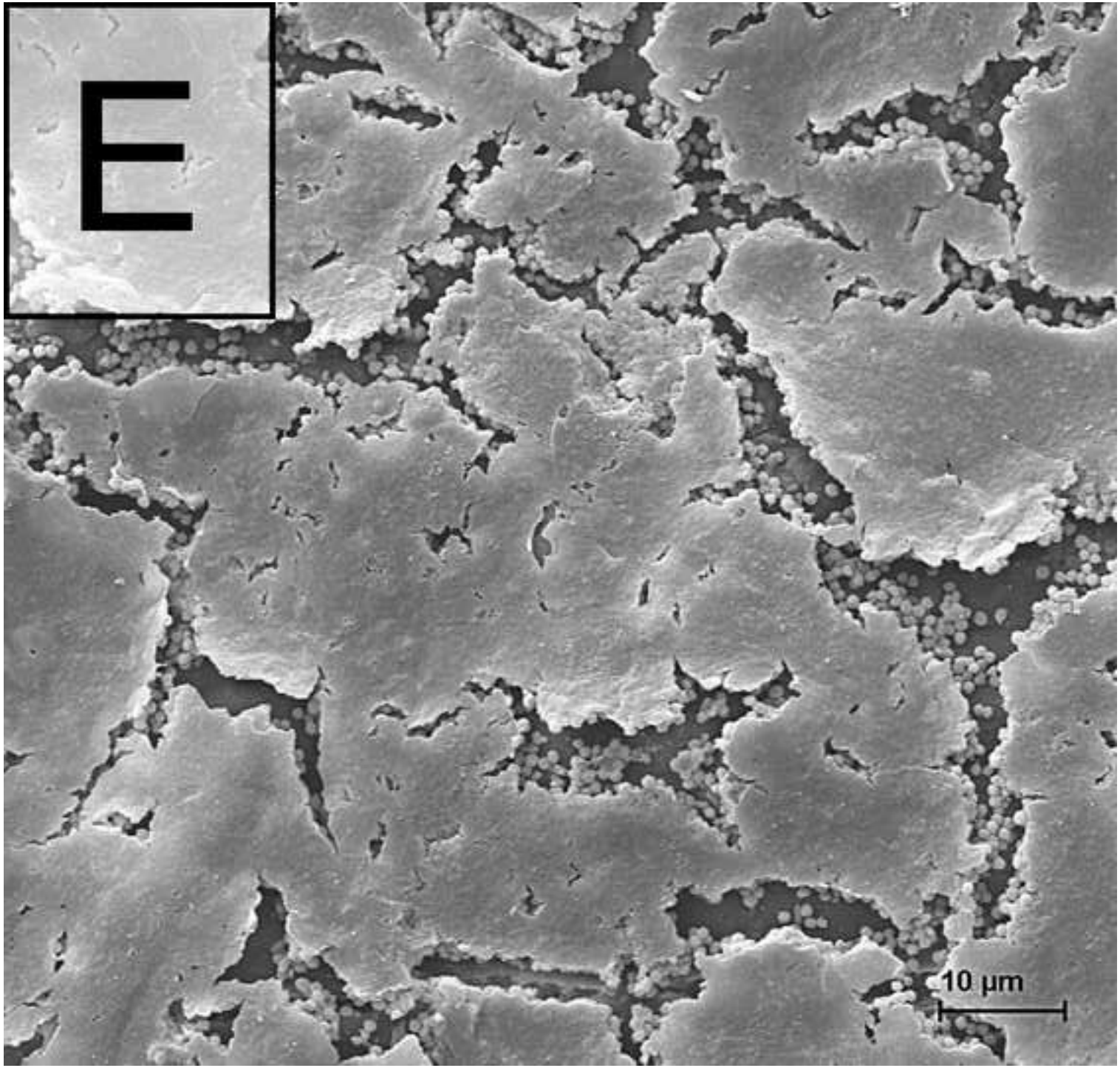


Figure
Click here to download high resolution image

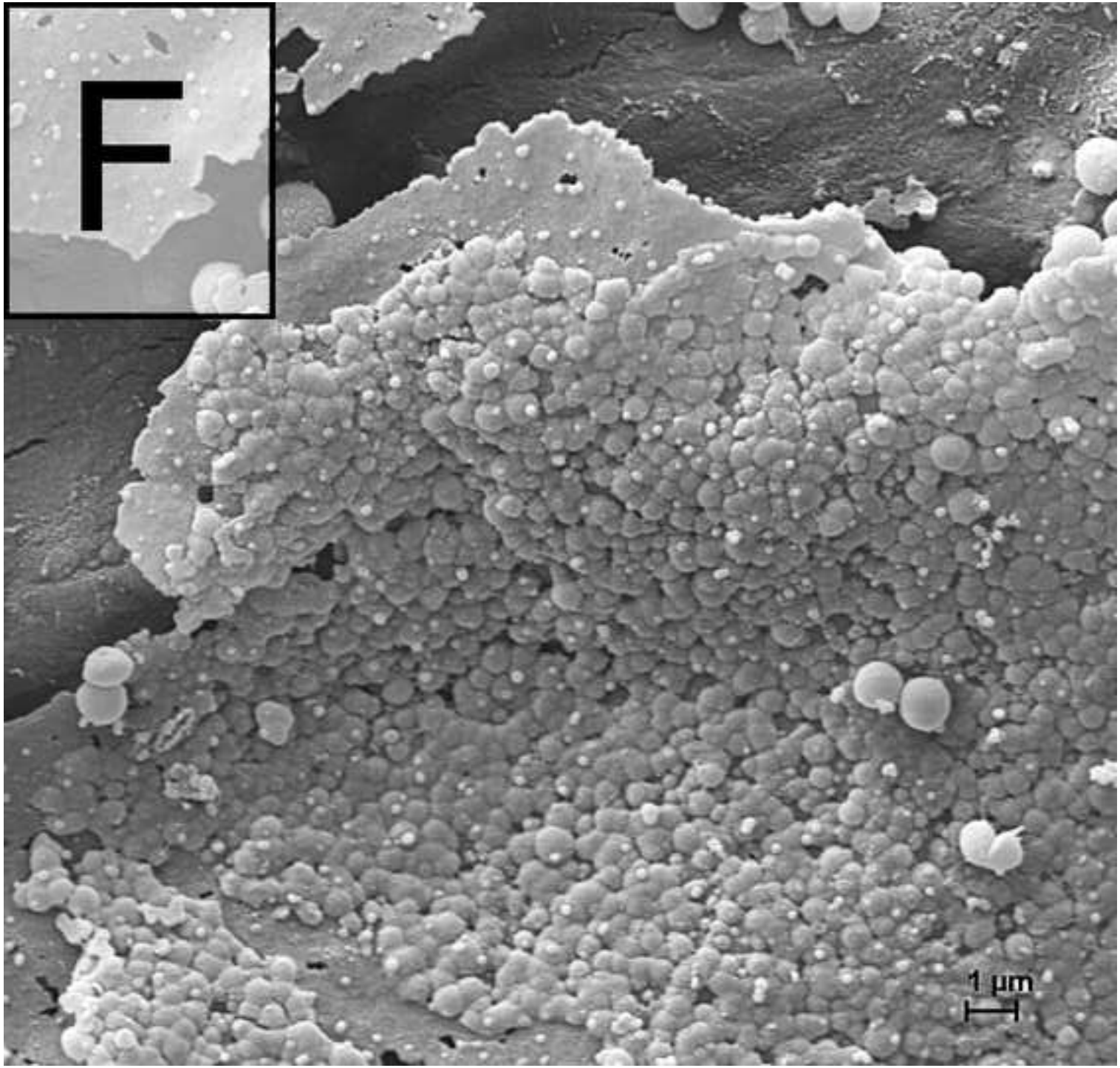


Figure
Click here to download high resolution image

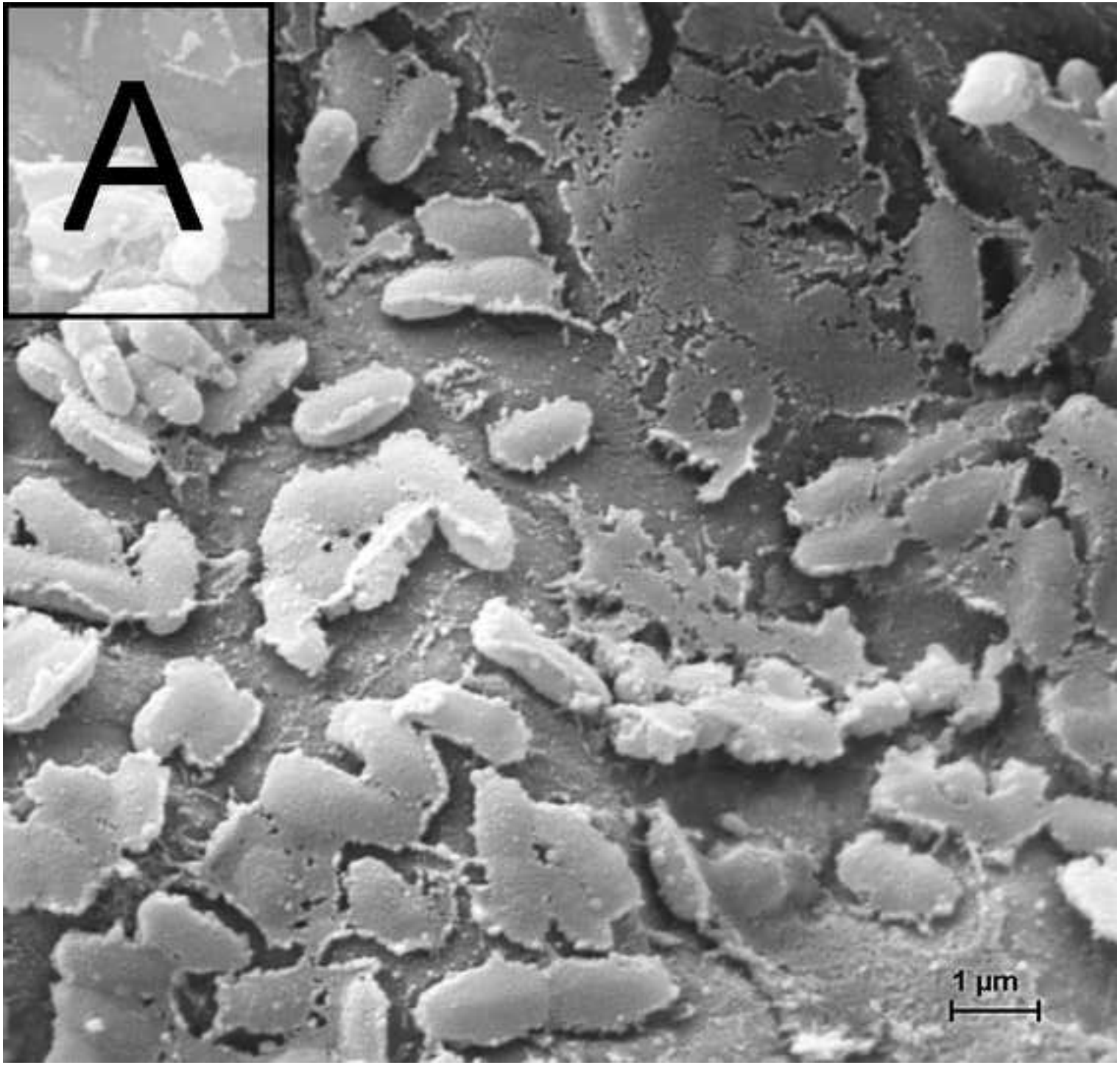


Figure
Click here to download high resolution image

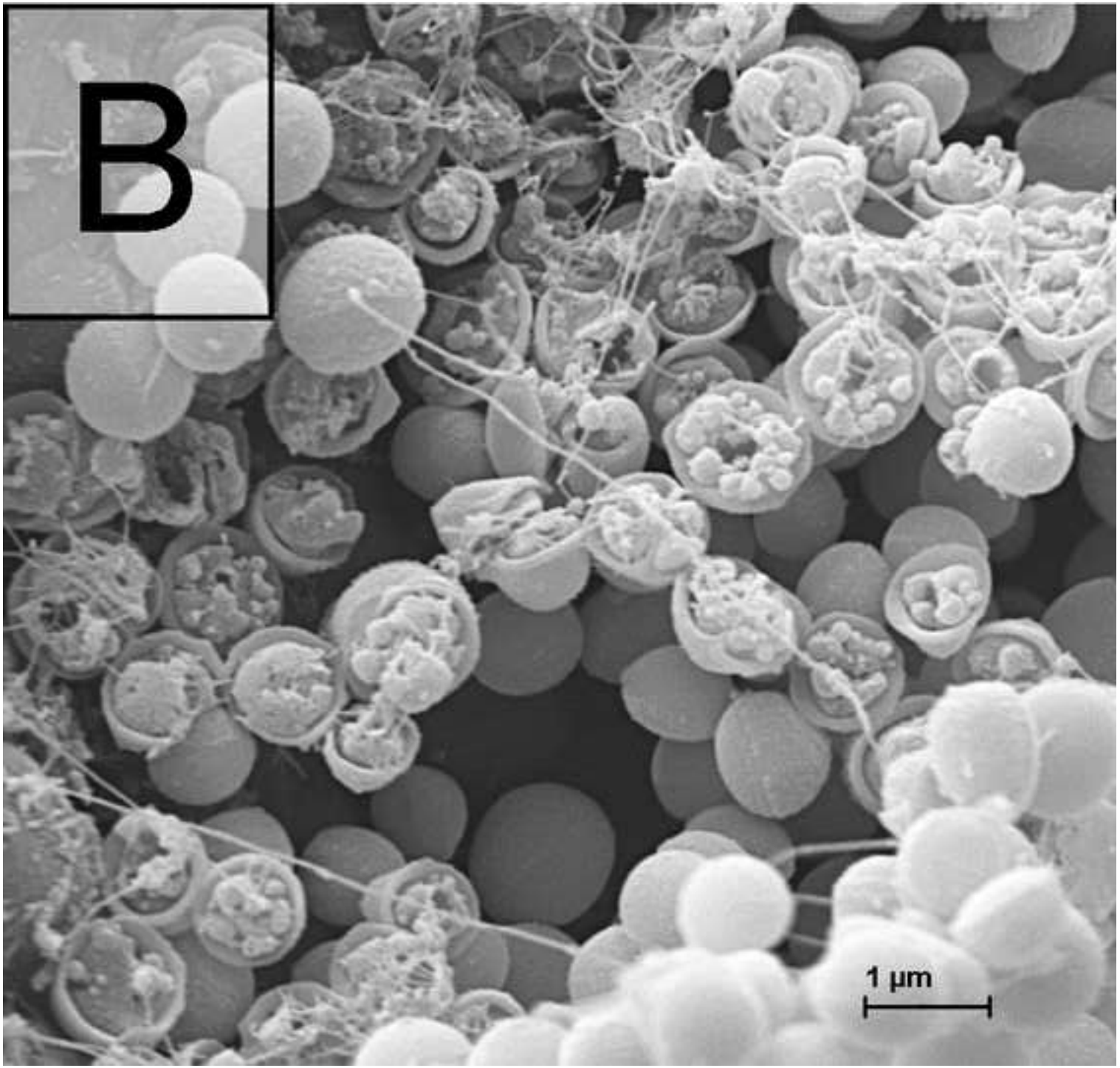
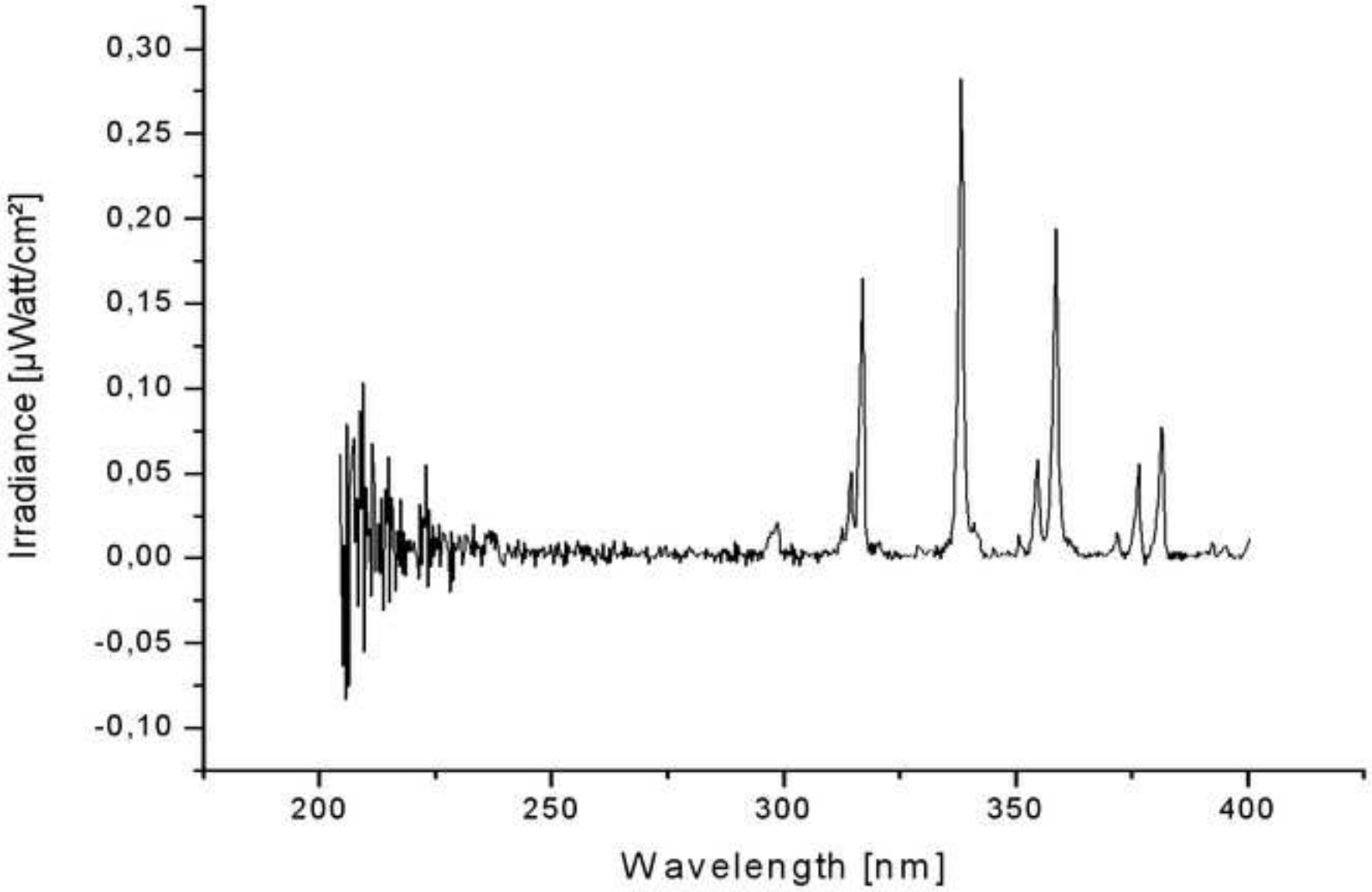


Figure
Click here to download high resolution image



Anmerkungen

Zum Zeitpunkt der Abgabe der Dissertationsarbeit am 06.12.2012 war die im Folgenden genannte Veröffentlichung beim Journal *Plasma Processes and Polymers* online publiziert (01.10.2012; DOI: 10.1002/ppap.201100133). Die im Journal *Plasma Processes and Polymers* gedruckte Veröffentlichung erfolgte im Februar 2013. Die Zitierung lautet:

Matthes R, Koban I, Bender C, Masur K, Kindel E, Weltmann KD, Kocher T, Kramer A, Hübner NO (2012). Antimicrobial efficacy of an atmospheric pressure plasma jet against biofilms of Pseudomonas aeruginosa and Staphylococcus epidermidis. *Plasma Processes and Polymers* 10(2):161–6.
[Literaturverzeichnis-Nummer: 103]

Zum Zeitpunkt der Abgabe der Dissertationsarbeit am 06.12.2012 waren folgende Manuskripte eingereicht und noch nicht zur Veröffentlichung akzeptiert:

Matthes R, Hübner NO, Bender C, Koban I, Horn S, Bekeschus S, Kocher T, Weltmann KD, Kramer A and Assadian O (2012). Modulations of feed-gases for barrier discharge plasma generation influence the survival of Pseudomonas aeruginosa embedded in biofilm. *Skin Pharmacology and Physiology* (eingereicht, Nr. SPP2590).
[Literaturverzeichnis-Nummer: 104]

Matthes R, Bender C, Schlüter R, Koban I, Bussiahn R, Reuter S, Weltmann KD, Kramer A (2012). Antimicrobial efficacy of air plasma in comparison of two surface barrier discharges against in vitro biofilms. *PLoS ONE* (eingereicht, Nr. PONE-S-12-48386).
[Literaturverzeichnis-Nummer: 105]

Diese Manuskripte wurden im Juni 2013 von den Journalen zur Veröffentlichung angenommen.

Das im Journal *PLoS ONE* eingereichte Manuskript wurde am 24.07.2013 veröffentlicht. Die Zitierung lautet:

Matthes R, Bender C, Schlüter R, Koban I, Bussiahn R, Reuter S, Lademann J, Weltmann KD, Kramer A (2013). Antimicrobial Efficacy of Two Surface Barrier Discharges with Air Plasma against In Vitro Biofilms. *PLoS ONE* 8(7):e70462.

Das im Journal *Skin Pharmacology and Physiology* eingereichte Manuskript wurde am 20.06.2013 zur Veröffentlichung akzeptiert. Es befindet sich derzeit (August 2013) noch im Vorgang der Veröffentlichung, die Druckausgabe erfolgt voraussichtlich im Jahr 2014. Die Veröffentlichung kann mit einer DOI (Digital Object Identifier) zur Zitierung angegeben werden. Aufgrund einer Überarbeitung wurde der Titel "Modulations of feed-gases for barrier discharge plasma generation influence the survival of Pseudomonas aeruginosa embedded in biofilm" in "Efficacy of different carrier gases for barrier discharge plasma generation compared to chlorhexidine on the survival of Pseudomonas aeruginosa embedded in biofilm in vitro" geändert. Die Zitierung lautet:

Matthes R, Hübner NO, Bender C, Koban I, Horn S, Bekeschus S, Kocher T, Weltmann KD, Kramer A and Assadian O. (accepted, 2013) Efficacy of different carrier gases for barrier discharge plasma generation compared to chlorhexidine on the survival of Pseudomonas aeruginosa embedded in biofilm in vitro. *Skin Pharmacology and Physiology*; DOI: 10.1159/000353861.

Die im Publikationsverzeichnis angegebene Veröffentlichung:

Kramer A, Lademann J, Bender C, Sckell A, Hartmann B, Hinz P, Ekkernkamp A, Matthes R, Koban I, Partecke LI, Heidecke CD, Assadian O (2012). Suitability of Tissue Tolerable Plasmas (TTP - cold atmospheric-pressure plasmas with tissue applicable properties) for chronic wound management. *Clinical Plasma Medicine* (in press).

war zum Zeitpunkt der Abgabe der Dissertationsarbeit am 06.12.2012 zur Veröffentlichung angenommen. Der Artikel erschien im Journal *Clinical Plasma Medicine* im April 2013. Die Zitierung lautet:

Kramer A, Lademann J, Bender C, Sckell A, Hartmann B, Münch S, Hinz P, Ekkernkamp A, Matthes R, Koban I, Partecke I, Heidecke C, Masur K, Reuter S, Weltmann KD, Koch S, Assadian O (2013). Suitability of Tissue Tolerable Plasmas (TTP) for the management of chronic wounds. *Clinical Plasma Medicine* 1(1):11–8.